

**Escola Superior de Saúde Egas Moniz**  
**Mestrado em Biologia Molecular em Saúde**



**Piso dos Parques Infantis como fonte de contaminação  
microbiana.**

Ana Cláudia Cordeiro Fernandes

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular em Saúde

Setembro de 2013

**Escola Superior de Saúde Egas Moniz**  
**Mestrado em Biologia Molecular em Saúde**



**Piso dos Parques Infantis como fonte de contaminação  
microbiana.**

Ana Cláudia Cordeiro Fernandes

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular em Saúde

**Dissertação orientada por:**

Doutora Helena Barroso

Setembro de 2013

## *Agradecimentos*

À Doutora Helena Barroso, que aceitou orientar este projecto, pela paciência, compreensão e profissionalismo que teve ao longo de quase três anos, por ter acompanhado as várias etapas que a vida me proporcionou durante este tempo.

À Doutora Aida Duarte pela disponibilidade e amabilidade com acompanhou este projecto.

À Doutora Alexandra Maia e Silva e a todo o corpo docente do Mestrado, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Senhor Bagulho pela sua cooperação.

Aos meus colegas de Mestrado que tantas vezes ouviram a expressão, “as minhas bichas”. Anabela Vinagre sem ti teria sido um percurso solitário, obrigado pelas muitas horas de laboratório em conjunto.

À Joana Couceiro e Ana Lages que estiveram sempre por perto para me incentivar, a ti Susana Bandarra obrigado por partilhares a verdadeira viagem da vida, aos pares até pareceu fácil.

À Ana Vieira por estar sempre presente.

Ao meu “Rapaz” que teve muita paciência, esperou muito por este momento, obrigado por seres como és e por andares sempre ao meu lado.

À “Budinha”, por ter mudado o meu mundo.

## Resumo

Os parques infantis são locais de diversão integrados na sociedade, servem a população infantil, e são considerados no geral como locais seguros. A maior preocupação centra-se sempre na correcta utilização dos equipamentos disponíveis de modo a evitar acidentes, e na realidade o perigo está menos visível. Este estudo foca o piso dos parques infantis como fonte de contaminação microbiana.

Este estudo teve como objectivo quantificar a presença de microrganismo patogénicos para os humanos, analisando amostras do solo de 6 parques infantis da cidade de Lisboa, e relacionar os resultados obtidos com as condições climatéricas registadas no período de tempo compreendido entre Dezembro de 2010 e Agosto de 2011.

No global de todos os parques os resultados revelam a presença de microrganismos patogénicos em valores muito elevados, sendo que os mais frequentes são *Escherichia coli*, Enterococos fecais e fungos.

Assume-se que a presença destes microrganismos se deva ao facto de os parques serem espaços abertos, passíveis de contaminação proveniente da flora e fauna existente nas imediações, uma vez que na sua maioria as instalações dispõem de barreiras físicas ineficientes, permitindo o acesso a animais como cães, gatos, pequenos roedores e répteis.

As bactérias isoladas, provenientes das amostras, foram sujeitas a análises microbianas e foi identificada a presença de resistência a antibióticos. Em todas as 18 colheitas realizadas se encontraram isolados com estas características.

Para determinar o mecanismo de resistência presente em *Escherichia coli*, isolada neste estudo, foram seleccionadas 8 amostras que quando analisadas por meio de sequenciação, revelaram ser portadoras do gene EampC, que confere à bactéria resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Parque Infantil, microrganismos patogénicos, resistência, *Escherichia coli*, EampC.

## ***Abstract***

The playgrounds are places of entertainment integrated in society, they serve the child population, and they are generally regarded as safe areas. The biggest concern is always focused on the proper use of equipment available, in order to avoid accidents, and in fact the risk is less visible. The study focuses surface of playgrounds as a source of microbial contamination.

The aim of the present study is to quantify the presence of pathogenic microorganisms to humans, analyzing soil samples from six playgrounds in the city of Lisbon, and relating the obtained results to weather conditions observed in the period of time ranging from December 2010 to August 2011.

Overall, all parks reveal the presence of pathogenic microorganisms in very large values, and the most common are *Escherichia coli*, faecal enterococci and fungi.

It is assumed that the presence of these microorganisms is due to the fact that the parks are open spaces liable to contamination from the flora and fauna, mostly because the installations have inefficient physical barriers, allowing access to animals such as dogs, cats, small rodents and reptiles.

Bacteria isolated from the samples were subjected to microbial analysis and it was identified the presence of antibiotic resistance. In all 18 samples resistant strains were found.

To determine the mechanism of resistance in *Escherichia coli*, isolated in this study, eight samples were selected, and when analyzed by automatic sequencing method proved they are carriers of the gene EampC, which confers bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics.

**KEYWORDS:** Playgrounds, pathogens, resistance, *Escherichia coli*, EampC.

## Lista de Abreviaturas

ABAE - Associação Bandeira Azul da Europa

ADE – Água destilada estéril

AMC – Amoxicilina + ácido clavulâmico

AMP – Ampicilina

APA - Agência Portuguesa do Ambiente

APTE - Água peptonada tamponada estéril

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

CAZ – Ceftazidima

CIP - Ciprofloxacina

CN – Gentamicina

CTX – Cefotaxina

EDTA – Ácido Etileno-Diamino Tetra-Acético

FOX – Cefoxitina

IPM – Imipenem

MPM – Meropenem

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR - Reacção de polimerização em cadeia

RPM – Rotações por minuto

TSA - Triptona soja agar

UFC – Unidade formadora de colónias

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

VMA – Valores Máximos Admissíveis

VMR – Valores Máximos Recomendados

*Vs – Versus*

KPa – Quilopascal

# Índice

Introdução .....	11
1. Estudos em Parques Infantis .....	11
2. Legislação .....	14
3. Fauna .....	15
4. Solo.....	16
4.1. Qualidade do Solo .....	17
4.2. Indicadores Biológicos .....	17
4.3. Microbiologia do Solo .....	18
4.4. Química do solo .....	19
4.5. Temperatura do Solo .....	19
4.6. Concentração de Água no Solo .....	20
5. População microbiana .....	21
5.1. População Microbiana Normal.....	21
5.2. População Microbiana Normal vs Hospedeiro .....	21
5.3. Microrganismos Oportunistas .....	22
5.4. Bactérias Patogénicas .....	22
6. Estabelecimento da Doença.....	23
6.1. Classificação de Doenças Infecciosas .....	23
6.2. Contaminação.....	23
6.3. Reservatórios de Infecção.....	23
6.4. Mecanismos Microbianos de Patogenicidade .....	24
7. Antimicrobianos .....	26
7.1. Descoberta e evolução de antimicrobianos .....	26
7.2. Resistência microbiana .....	28
7.3. Meio Ambiente vs Resistência Microbiana.....	30
7.4. Mecanismo de Resistência.....	31
Objectivo.....	32
Materiais e Métodos .....	33
1. Colheita das amostras .....	33
2. Análise Microbiológica .....	33
2.1. Pesquisa de <i>Salmonella</i> .....	34
2.2. Identificação e Caracterização dos Microrganismos isolados .....	35
2.2.1. Coloração de Gram.....	35

2.2.2. Testes Bioquímicos de Identificação de Microrganismos .....	35
2.3. Identificação de Fungos .....	38
3. Testes de susceptibilidade a antimicrobianos .....	38
3.1. Resistência à Ampicilina .....	38
3.2. Antibiograma .....	38
3.3. Testes de Inibição .....	39
4. Caracterização Molecular por PCR.....	39
4.1. Desnaturação.....	40
4.2. Hibridização ou <i>Annealing</i> .....	40
4.3. Extensão.....	40
4.4. Extração de ADN.....	40
4.5. Amplificação do gene <i>EampC</i> em <i>Escherichia coli</i> .....	41
4.6. Purificação do Produto de PCR.....	41
4.7. Sequenciação.....	41
4.8. Análise de Resultados.....	42
Resultados .....	43
1. Análise Social dos Parques Infantis .....	43
1.1. Parque Alameda.....	43
1.2. Parque Constantino .....	44
1.3. Parque Eduardo VII.....	45
1.4. Parque Amoreiras.....	46
1.5. Parque Estrela.....	47
1.6. Parque Ceuta .....	48
2. Condições Meteorológicas .....	49
2.1. Precipitação.....	50
2.2. Temperatura Atmosférica .....	50
3. Pesquisa de população microbiana no solo dos parques infantis. ....	51
4. Pesquisa de resistência a agentes antimicrobianos .....	61
4.1. Ampicilina.....	61
4.2. Antibiograma .....	62
4.3. Testes de Inibição de mecanismos de resistência a antibióticos .....	67
5. Análise Molecular .....	69
5.1. Pesquisa do gene <i>EampC</i> .....	69
5.2. Análise das Sequências.....	70
6. Biocida .....	74

Discussão .....	75
Conclusão .....	77
Bibliografia .....	78
Anexos .....	84

## Índice de Figuras

Figura 1. Actividade microbiana em resposta à temperatura. ....	20
Figura 2. Localização da microbiota normal no corpo humano .....	21
Figura 3. Recolha da amostra no local e acondicionamento das amostras em contentor térmico .....	33
Figura 4. Sequência de trabalho descrita no ponto 2. ....	34
Figura 5. Instalações do parque infantil da Alameda .....	44
Figura 6. Instalações do parque infantil do Jardim Constantino.....	45
Figura 7. Instalações do parque infantil do Jardim do Parque Eduardo VII. ....	46
Figura 8. Instalações do parque infantil do Jardim Amoreiras .....	47
Figura 9. Instalações do parque infantil do Jardim Guerra Junqueiro. ....	48
Figura 10. Instalações do parque infantil da Avenida de Ceuta. ....	48
Figura 11. Ocorrência de precipitação durante o período de colheitas .....	50
Figura 12. Registo de Temperatura média das 24 horas que antecedem o dia da colheita, entre Dezembro de 2010 e Agosto de 2011.....	51
Figura 13. Resultado da análise Bacteriana no solo do parque infantil Alameda. ....	55
Figura 14. Resultado da análise Bacteriana no solo do parque infantil Constantino. ....	56
Figura 15. Resultado da análise Bacteriana no solo do parque infantil Eduardo VII. ....	57
Figura 16. Resultado da análise Bacteriana no solo do parque infantil Amoreiras (A) (B) (C); Resultado da análise Micológica no solo do parque infantil Amoreiras (D) (E). ....	58
Figura 17. Resultado da análise Bacteriana no solo do parque infantil Estrela .....	59
Figura 18. Resultado da análise Bacteriana no solo do parque infantil Ceuta.....	60
Figura 19. Distribuição, por parque infantil, da presença de microrganismos que apresentam resistência à Ampicilina. ....	62
Figura 20. Número de bactérias isoladas com susceptibilidade a 2 ou mais antibióticos. ....	63
Figura 21. Ensaio com adição de 15µl cloxacilina aos discos de Amc e FOX. ....	67
Figura 22. Ensaio com adição de 15µl cloxacilina aos discos de Amc FOXe CTX .....	68
Figura 23. Teste de Inibição de bombas de efluxo com adição de 15µl de reserpine aos discos de IPM e MPM. ....	69
Figura 24. Amplificação do gene EampC por PCR .....	70
Figura 25. Alinhamento da proteína inibitor-sensitive AmpC beta-lactamase. ....	73

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Microrganismos encontrados por grama em várias profundidades de um solo típico de jardim.	19
Tabela 2. Tolerância de diferentes organismos ao potencial hídrico do solo.	20
Tabela 3. Principais grupos e géneros de bactérias patogénicas para humanos.	22
Tabela 4. Classificação de bactérias consoante a coloração de Gram.	35
Tabela 5. Critérios aplicados na selecção da galeria API a utilizar.	37
Tabela 6. Características e condições dos <i>primers</i> usados para detecção do gene <i>EampC</i> .	41
Tabela 7. Parâmetros microbiológicos quantificados.	51
Tabela 8. Valores máximos recomendados (VMR) e Valores máximos admissíveis (VMA) referentes ao painel de microrganismos em estudo.	52
Tabela 9. Microrganismos isolados das amostras do solo dos seis parques.	61
Tabela 10. Multirresistências detectadas nas bactérias isoladas a partir das amostras provenientes do solo do parque infantil Alameda.	64
Tabela 11. Multirresistências detectadas nas bactérias isoladas a partir das amostras provenientes do solo do parque infantil Constantino.	64
Tabela 12. Multirresistências detectadas nas bactérias isoladas a partir das amostras provenientes do solo do parque infantil Eduardo VII.	65
Tabela 13. Multirresistências detectadas nas bactérias isoladas a partir das amostras provenientes do solo do parque infantil Amoreiras.	65
Tabela 14. Multirresistências detectadas nas bactérias isoladas a partir das amostras provenientes do solo do parque infantil Estrela.	66
Tabela 15. Multirresistências detectadas nas bactérias isoladas a partir das amostras provenientes do solo do parque infantil Alameda.	66
Tabela 16. Amostras submetidas a sequenciação e percentagem de homologia com sequência do gene <i>EampC</i> .	70

## **Introdução**

“O termo «brinquedo» serve muitas vezes para designar objectos que os adultos desenharam ou seleccionaram para atrair uma criança. Os objectos servem por diversas formas como elo de ligação entre a criança e o meio”(Garvey 1977).

A nossa sociedade reconhece nas Autarquias o dever de providenciar espaços dedicados à população infantil, nomeadamente locais de prática de desporto e ou brincadeira, nos quais se englobam os parques infantis. Nestes as crianças despertam para enumeras brincadeiras essenciais ao seu desenvolvimento social, recriando um mundo imaginário com aplicação de conhecimentos incutidos pela aprendizagem, disfrutando do contacto com a natureza.

Sendo que a implementação de parques infantis obedece a legislação específica, deve proporcionar ambientes saudáveis e apelativos, tendo sendo sempre em vista a segurança infantil. Para que se exerça o direito a brincar expresso no artigo 31º da Convenção Internacional dos Direitos da Criança (Nacional 2009):

1 – “Os Estados Parte reconhecem à criança o direito ao repouso e aos tempos livres, o direito de participar em jogos e actividades recreativas próprias da sua idade e de participar livremente na vida cultural e artística.”(Unicef 1990)

2 – “Os Estados Parte respeitam e promovem o direito da criança de participar plenamente na vida cultural e artística e encorajam a organização, em seu benefício, de formas adequadas de tempos livres e de actividades recreativas, artísticas e culturais, em condições de igualdade.” (Unicef 1990)

### **1. Estudos em Parques Infantis**

Ao efectuar pesquisas sobre a segurança em parques infantis em Portugal, detectou-se que todos os estudos efectuados centram-se na segurança física dos espaços recreativos, focam o número de acidentes que ocorrem anualmente, que resultam frequentemente em contusões, hematomas e feridas abertas nos membros e cabeça, sem necessidade de internamente hospitalar. Os parâmetros analisados são recorrentemente a qualidade dos baloiços, vedações, pintura, acessos exteriores, sinalização e vigilância, ignorando a análise detalhada ao solo, considerando apenas a limpeza e condições de higiene. Que na maioria aparenta ser satisfatória ([www.educacao.te.pt/pais\\_educadores](http://www.educacao.te.pt/pais_educadores), consultado em 09-09-2013).

Estes estudos demonstram claramente a falta de informação e desconhecimento da realidade sobre os solos destes espaços. Sabe-se que areia, seixo ou piso sintético, materiais utilizados como solo em parques infantis, são fontes de contaminação de agentes microbianos patogénicos para os humanos (Halliday & Gast 2012). Em Portugal existe uma lacuna no sentido de avaliar a qualidade do solo em parques infantis, não tendo sido possível encontrar dados da existência de estudos direccionados nessa área.

No entanto no âmbito do projecto “Bandeira Azul em Portugal”, coordenado pela Associação Bandeira Azul da Europa (ABAE) em associação com Agência Portuguesa do Ambiente (APA) e Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), foi possível aceder ao relatório de Monitorização da qualidade das areias das praias balneares, realizado durante a época balnear de 2010 (Brandão *et al.* 2011). Considerando as praias como locais de recreação, é possível transpor este estudo para os parques infantis, servindo de base para implementação de normas de manutenção e higienização do solo dos parques.

Para fundamentar a necessidade desta prática é preciso consciencializar as autoridades do risco emergente que representa a presença de agentes patogénicos nos locais de recreio infantil. Nesse sentido países como Estados Unidos da América, Brasil e Canadá realizam estudos para detectar, quantificar e identificar a presença de indicadores de contaminação, nos quais focam o areal das praias e as chamadas caixas de areia, local onde as crianças brincam, bastante comuns nestas comunidades (Araújo *et al.* 2008) (Quality & Board 2011).

É necessário recorrer a estudos realizados em zonas balneares para relacionar a presença de microrganismo patogénicos em areias, tendo presente que a maioria avalia a qualidade da água. No entanto, estudos recentes evidenciam que a chamada zona seca, apresenta um número elevado de ufc/g de microrganismos patogénicos. Estima-se que anualmente a nível mundial, 120 milhões de casos de doenças do foro gastrointestinal e 50 milhões de casos de doença respiratória, tenham origem em contaminação ocorridas em zonas balneares. Estes casos são provocados por uma diversidade de agentes patogénicos fecais introduzidos no ambiente aquático por fontes tais como; o tratamento de águas e descargas de esgotos, escoamento agrícola, descarga de embarcações, dos próprios banhistas, e de população de animais locais (Halliday & Gast 2012).

O areal da praia pode fornecer condições favoráveis para a persistência de indicadores fecais, proporcionando proteção contra radiação solar, condições nutricionais favoráveis e superfícies colonizantes.

Estudos têm reconhecido a areia da praia como um potencial reservatório de bactérias fecais. Os números de ufc/g na areia podem exceder os da água da praia. Concentrações de enterococos foram referenciados com números acima de 70 ufc/g, em praias da Califórnia e Flórida, concentrações de *Escherichia coli* atingiram valores acima dos 2000 ufc/g em areia seca em praias da Flórida e 105 ufc/g em uma praia de água doce do lago Ontário (Boehm *et al.* 2010).

O crescimento de *E. coli* e Enterococos tem sido investigados em areias, no entanto, poucos estudos tem documentado a sobrevivência e persistência de agentes patogénicos, e esses estudos têm-se centrado principalmente em sedimentos de água doce. Estudos na areia marinha são limitados, no ano de 2012, um estudo realizado em 53 areias de praias do estado Califórnia, revelou a presença de *E. coli*, Enterococos, *Campylibacter sp*, *Salmonelle sp*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) entre outros microrganismos, este estudo focou especificamente a persistência de um patogénico humano, a *E. coli* O157:H7 (Yamahara *et al.* 2012).

Os estudos indicaram que a persistência de muitos dos organismos detectados pode ocorrer por mais de 20 dias, em areias das zonas balneares. No geral, os resultados sugeriram que os indicadores fecais encontrados podem ser viáveis por um período de 3 semanas representando um risco para a saúde (Yamahara *et al.* 2012).

A Organização Mundial de Saúde recomenda que os estudos que visam analisar a qualidade das águas das zonas balneares inclua a qualidade microbiológica das areias, de modo a melhorar o entendimento do aparecimento de sintomas ao nível da pele, olhos, ouvidos e gastrointestinais (WHO 2013).

A presença de microrganismos patogénicos no solo de parques infantis é um risco de saúde para a população infantil, exponencialmente agravado quando esses agentes são portadores de múltiplas resistências a antibióticos. Em caso de contaminação a criança fica susceptível a ocorrência de doença podendo ser necessária a administração terapêutica de antibióticos. A percentagem de população de pacientes imunologicamente vulneráveis (crianças, idosos, portadores de imunodeficiência) tem

vindo a aumentar assim como a frequência de infecções provocadas por agentes patogénicos oportunistas, o que representa um aumento de internamentos prolongados em hospitais e serviços de saúde, onde a disseminação e exposição a agentes multirresistentes é privilegiada (Wright 2007).

## **2. Legislação**

Em Portugal os Parques Infantis são regulamentados por dois decretos de lei publicados em Diário da República, Decreto-Lei nº 379/97 de 27 de Dezembro de 1997 e Decreto-Lei nº 119/2009 de 19 de Maio de 2009. Ambos os diplomas têm como objectivo proceder à definição e regulamentação das condições de segurança a observar na localização, implantação, concepção e organização funcional dos espaços de jogo e recreio, respectivo equipamento e superfícies de impacto, criando ainda um sistema inspectivo e sancionatório adequado. De acordo com a regulamentação, no Capítulo II do Decreto-Lei 379/97 Artigo 4º - Obrigação geral de segurança, os espaços de jogo e recreio não podem ser susceptíveis de pôr em perigo a saúde e segurança do utilizador ou de terceiros, devendo obedecer aos requisitos de segurança constantes no regulamento. O Artigo 9º de ambos os decretos determina a Protecção dos espaços, os espaços de jogos e recreio devem ser protegidos, através de uma vedação ou outro tipo de barreira física, de modo a impedir a entrada de animais e dificultar actos de vandalismo (Nacional 2009).

Ambos os diplomas focam pormenorizadamente todas as áreas de recreio existentes nos parques infantis, no entanto para o presente trabalho será apenas realçada a Secção II referente ao Solo e segurança das superfícies de impacte. Esta secção define quais os materiais interditos para uso no solo e área de impacte, a periodicidade da manutenção, condições higieno-sanitárias, fiscalização, sanções entre outros.

O número 2 do Artigo 25º determina que não é permitida a utilização de superfícies de impacte constituídas por tijolo, pedra, betão, material betuminoso, macadame, madeira ou outro material rígido que impossibilite o amortecimento adequado do impacte. Sendo que o Artigo 24º refere que o espaço de jogo e recreio deve possuir condições de drenagem adequadas, sendo que esta referência não se torna obrigatória. No que diz respeito à manutenção dos equipamentos e superfície de impacte o número 4 do Artigo 28º faz referência, que sempre que a superfície de impacte seja constituída por areia,

aparas de madeira ou outro material semelhante, deve ser assegurado o nível de altura da camada de material adequada à absorção de impacte (Nacional 2009).

O Artigo 29º referente às condições higieno-sanitárias determina que esta responsabilidade seja a cargo da entidade responsável pelo espaço, a mesma que deverá assegurar a limpeza dos equipamentos, superfície de impacte, mobiliário urbano e instalações de apoio. Refere ainda que sempre que a superfície de impacte seja constituída por areia, aparas de madeira ou outro material semelhante, deve proceder-se à sua renovação completa pelo menos uma vez por ano. Em relação à fiscalização, o Decreto- Lei 119/2009, entre outras alterações, transfere a competência de fiscalização para a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). De acordo com o número 1 do Artigo 33º, este organismo deve promover, pelo menos, uma fiscalização anual a todos os espaços de jogo e recreio. Sendo que a responsabilidade de fiscalização de cumprimento do regulamento compete às câmaras municipais. É de referir que o diploma determina a aplicação de coimas e sanções que podem ascender ao valor máximo de € 30.000 ou encerramento do espaço (Nacional 2009).

### **3. Fauna**

Tradicionalmente em Portugal os parques infantis estão inseridos em zonas urbanas, jardins públicos ou espaços verdes de grandes dimensões passíveis de utilização pelo público em geral. Na sua maioria os parques infantis são em espaços abertos, sujeitos a condições climáticas variáveis, de acordo com as estações do ano.

Tendo em consideração a fauna existente nos centros urbanos, é de prever que determinadas espécies têm acesso aos parques, sendo as mais visíveis e prováveis os canídeos, felinos, roedores, aves e répteis. Estes animais maioritariamente habitam o meio envolvente ao parque infantil, não se consideram como animais domésticos, uma vez que não tem intervenção do ser humano para garantir a sua sobrevivência, deste modo não há um acompanhamento veterinário, impossibilitando a prevenção de patologias ou zoonoses (Marrow *et al.* 2009).

Em Portugal o estado sanitário das populações de animais selvagens e a epidemiologia das várias doenças nestas espécies não é avaliado, sendo escassos os estudos existentes, o mesmo se aplica à rede de epidemiovigilância. Estes estudos têm relevância na Saúde Pública e Saúde Animal, uma vez que é crescente o contacto entre seres humanos e

fauna selvagem, o que aumenta a probabilidade de transmissão ao Homem de algumas patologias (Morais 2009).

Em relação à Saúde Animal, deve-se considerar o risco permanente de a fauna selvagem actuar como reservatório de agentes patogénicos transmissíveis às espécies domésticas (Santos 2004). Existe ainda o problema do comércio ilegal de animais selvagens, muitas vezes sem controlo sanitário adequado.

A zoonose é uma doença infecciosa que pode ser transmitida de animais selvagens ou domésticos para os seres humanos. Sabe-se que 61% dos organismos patogénicos que afectam os seres humanos são de origem zoonótica (Percival *et al.* 2011).

#### **4. Solo**

O enfoque sobre a qualidade do solo tem despertado na comunidade científica um interesse crescente, este fenómeno teve início em 1993 com o lançamento do livro “Soil and water quality an agenda for agriculture”, pelo “Board on Agriculture of the National Research Council” dos Estados Unidos da América, onde é referido que a qualidade do solo é tão importante quanto a qualidade do ar e da água, na determinação da qualidade global do meio ambiente.

A qualidade do solo tem efeitos profundos na saúde e na produtividade de um determinado ecossistema e nos ambientes que com ele se relacionam. Todavia ao contrário do que acontece com o ar e água para os quais existem padrões de qualidade, o solo devido à complexidade dos factores envolvidos e por não ser objecto de consumo, não permite que sejam estabelecidos padrões de avaliação de qualidade. A qualidade é aceite frequentemente como uma característica abstracta que depende dos atributos intrínsecos, de factores externos, das práticas de uso e manuseamento, de interacções com o ecossistema e das prioridades socioeconómicas (Dias 2007).

O solo é composto por matéria mineral, raízes de plantas, biomassa microbiana e animal, matéria orgânica em vários graus de decomposição, assim como por água e uma atmosfera gasosa (Ferreira & Sousa, 1998).

Actualmente existem estudos sobre a contaminação microbiana em superfícies em contexto hospitalar, assim como já foram estudadas superfícies usadas em contexto familiar, no entanto pouco se sabe sobre este aspecto quando se trata de superfícies de uso público, como por exemplo o solo de um parque infantil (Reynolds *et al.* 2005).

#### **4.1. Qualidade do Solo**

Actualmente o conceito de qualidade do solo compreende o equilíbrio entre os condicionalismos geológicos, hidrológicos, químicos, físicos e biológicos do solo (Zilli *et al.* 2003). A saúde do solo é principalmente uma característica ecológica, foi definida em termos de estabilidade e resistência dos ecossistemas em resposta a uma perturbação ou *stress*. Indicadores de saúde do solo podem ser encontrados ao monitorizar as respostas da comunidade microbiana do solo quando aplicados diferentes factores de *stress* em intensidades diversas (Bruggen & Semenov 2000).

#### **4.2. Indicadores Biológicos**

Um indicador biológico é definido como a presença ou ausência de uma determinada espécie numa área específica, associada a determinada condição ambiental. O processo passa por seleccionar uma espécie representativa e observar alterações na sua população, que passam a ser indicadores das condições dos outros componentes biológicos do ecossistema. Para consenso de aplicação foram estabelecidas características ideais para caracterizar a qualidade de um indicador biológico (Visser & Parkinson 1992):

- Ser capaz de responder de forma rápida e cuidada, a um distúrbio no solo;
- Reflectir os aspectos de funcionamento do ecossistema;
- Ser economicamente viável;
- Ter distribuição universal e independente de sazonalidade.

##### **4.2.1. Indicadores Clássicos para avaliação do solo**

Os indicadores biológicos usados em maior frequência como indicadores de contaminação fecal são designados comumente como clássicos e apresentam-se em 3 grupos: Coliformes totais e fecais; Enterococos fecais e Fungos (SENAC/ DN 2001).

Em termos práticos o indicador biológico mais utilizado para determinar a qualidade do solo, tem sido o grupo dos Coliformes, totais e fecais. Estas bactérias têm presença usual no trato intestinal dos seres vivos. Ocorrem em elevado número e representam 10% da flora intestinal. Caracterizam-se por serem organismos Gram -, em forma de bastonete, não esporulados, facultativamente anaeróbicos, oxidase-negativa, crescem em condições aeróbicas em meio de cultura selectivo, capazes de fermentar lactose em 48h a 37°C. Neste grupo encontramos espécies como *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, (Ferreira & Sousa 1998).

O grupo designado por *Enterococcus* fecais é também reconhecido por ser responsável por contaminação fecal proveniente de animais, sendo nesse sentido utilizado como indicador biológico. Caracteriza-se pela sua capacidade de crescimento a 45°C, na presença de 40% de sais biliares e em concentrações de cloreto de sódio de 6,5% (inibidores de coliformes e maioria das bactérias). Neste grupo incluem-se *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* (Ferreira & Sousa 1998).

Por último o grupo do Fungos, estes microrganismos têm presença dominante no solo, podem ser simbioses ou patogénicos de plantas, no entanto a sua acção foca-se principalmente na decomposição de matéria orgânica. Na imensa diversidade deste grupo incluem-se espécies como *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* (Ferreira & Sousa 1998).

#### **4.3. Microbiologia do Solo**

São muitos os organismos que habitam os solos, desde os visíveis a olho nu até aos de dimensões microscópicas, que em conjunto formam uma comunidade viva e vibrante. O solo providencia uma diferenciada gama de habitats para procariotas, representativos de uma enorme diversidade genética. Em apenas um grama de solo é possível encontrar quilómetros de hifas e mais de  $10^9$  bactérias das mais diversas espécies e origens. Na composição do solo podemos observar áreas com maior ou menor concentração de microrganismos, (tabela 1). À superfície o solo é enriquecido com matéria em decomposição e outros nutrientes, apresentando uma concentração elevada de microrganismos, no subsolo por ser pobre em nutrientes, observa-se um decréscimo destas populações. A sustentabilidade da biomassa é determinada por um conjunto de factores, tais como: actividade biológica, variações de pH, mineralização do solo, temperatura e percentagem de água (Eldor 2007).

Os microrganismos presentes no solo em maior percentagem são as bactérias, estas são particularmente importantes em consequência da sua diversidade metabólica, sendo as espécies mais comuns: *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter* e *Nitrobacter* (Ferreira & Sousa 1998).

As populações de bactérias do solo são estimadas através de contagem em placas em meio nutriente, e esses números são subestimados por esse método, devido a não ser possível reunir num único meio de cultura todos os nutrientes ou condições de

crescimento, e outras exigências necessárias para todos os microrganismos do solo (Tortora, Funke, & Case, 2005).

**Tabela 1.** Microrganismos encontrados por grama em várias profundidades de um solo típico de jardim. Adaptado de Alexander, 1991.

<b>Número de microrganismos por grama de um solo típico de jardim em várias profundidades</b>				
<b>Profundidade (cm)</b>	<b>Bactérias</b>	<b>Actinomicetes</b>	<b>Fungos</b>	<b>Algas</b>
3-8	9.750.000	2.080.000	119.000	25.000
20-25	2.179.000	245.000	50.000	5.000
35-40	570.000	49.000	14.000	500
65-75	11.000	5.000	6.000	100
135-145	1.400	-	3.000	-

#### **4.4. Química do solo**

A composição química do solo proporciona o ambiente para os organismos, é necessário ter em consideração a sua massa e os principais componentes; água, matéria orgânica dissolvida, matéria não orgânica,  $O^2$  e  $CO^2$ . A biogeoquímica do solo é determinada principalmente por reacções ácido-base e oxidação-redução, consequentemente as actividades termodinâmicas de prótons e electrões na solução do solo definem o ambiente químico que controla a actividade microbiana (Tortora *et al.* 2008).

##### **4.4.1. pH do Solo**

A acidez é um tributo importante uma vez que influencia muitas das reacções químicas e biológicas que ocorrem no solo. O pH é directamente responsável pela actividade das populações microbianas. O solo torna-se mais ácido quando bases como, o cálcio, magnésio, potássio e sódio, são removidos do solo e substituídos por iões de hidrogénio, assim sendo regiões mais húmidas apresentam um solo mais ácido. Sabe-se que um solo mais ácido tem tendência a ter um aumento da população de fungos, reduzindo a percentagem de bactérias presentes, o que resulta numa alteração na taxa de decomposição da matéria orgânica e resíduos orgânicos (Batie *et al.* 1993).

#### **4.5. Temperatura do Solo**

Muitos processos químicos, físicos e biológicos que ocorrem no solo são influenciados pela temperatura. O aumento da temperatura acentua a mineralização da matéria orgânica e acelera a decomposição dos resíduos vegetais, o que leva a um aumento das

taxas de reacções fisiológicas acelerando a difusão de substratos solúveis no solo. A subida da temperatura pode também alterar a composição da população microbiana, influenciada pelo aumento das taxas de difusão molecular e pelo decréscimo da solubilidade dos gases presentes no solo, o que leva a um atraso no metabolismo microbiano, (figura 1). São poucos os solos que conseguem manter temperaturas uniformes, devido á variação horária e sazonal. Um solo húmido é menos susceptível a variações de temperatura, entre outros factores a exposição à intensidade e irradiação solar é fundamental para regular a temperatura do solo (Eldor 2007).

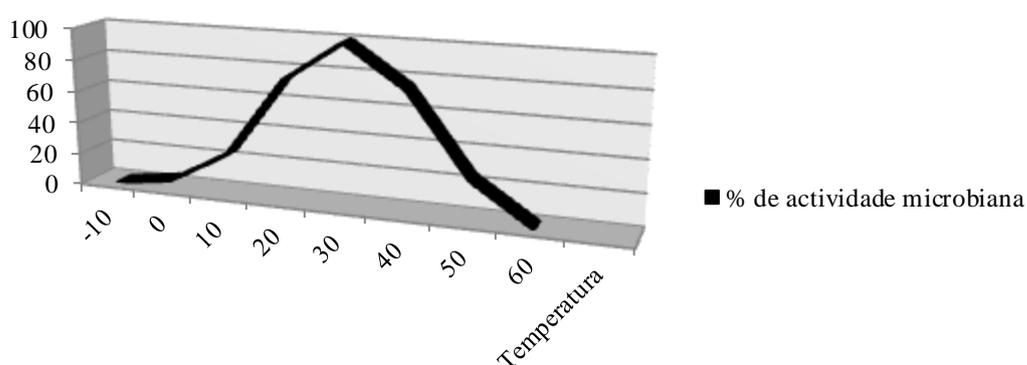


Figura 1. Actividade microbiana em resposta à temperatura. Adaptado de Eldor, 2007.

#### 4.6. Concentração de Água no Solo

A concentração de água afecta a composição do solo nos seguintes aspectos: nível de humidade, ventilação, natureza e quantidade de matéria solúvel, pressão osmótica e pH.

O potencial hídrico do solo determina a energia que um organismo tem de gastar para obter água a partir do solo, a actividade aeróbica microbiana tem um potencial óptimo de  $-50$  KPa, à medida que que varia a saturação do solo este potencial pode decrescer ou aumentar. Os fungos são geralmente considerados como mais tolerantes ao aumento do potencial hídrico (Eldor 2007) (tabela 2).

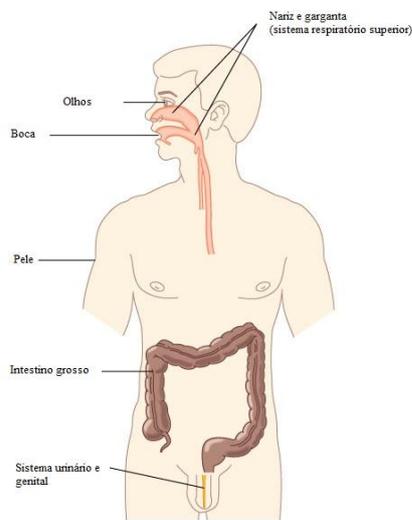
Tabela 2. Tolerância de diferentes organismos ao potencial hídrico do solo. Adaptado de Eldor, 2007.

KPa	Organismos
<b>-1500</b>	<i>Rhizobium, Nitrosomomas</i>
<b>-1000</b>	<i>Clostridium, Mucor</i>
<b>-2500</b>	<i>Micrococcus, Penicillium</i>
<b>-6500</b>	<i>Xeromyces, Sacchoromyces</i>

## 5. População microbiana

### 5.1. População Microbiana Normal

Os seres humanos têm o seu primeiro contacto com micróbios no momento do parto, sendo os lactobacilos os primeiros microrganismos a colonizar os intestinos de um recém-nascido. Outros microrganismos serão introduzidos no corpo através da respiração e alimentação. Esses microrganismos permanecem no organismo ao longo da vida, (figura 2), em resposta a condições ambientais podem aumentar ou diminuir, são normalmente inofensivos e colonizam várias partes do organismo incluindo a pele. O corpo humano tem em média  $1 \times 10^{14}$  células bacterianas, (Tortora *et al.* 2008).



<b>Pele</b>
Estafilococos ( <i>Staphylococcus epidermis</i> ) Corinebacterias
<b>Mucosa Nasal</b>
Estafilococos ( <i>Staphylococcus aureus</i> )
<b>Orafaringe/Nasofaringe</b>
Estreptococos grupo viridans <i>Neisseria</i> comensal Fusobacterias (anaeróbios)
<b>Intestino</b>
Enterobactérias ( <i>E. coli</i> ) Anaeróbios <i>Candida (albicans)</i>
<b>Uretra distal</b>
Estafilococos ( <i>Staphylococcus epidermes</i> ) Corinebacterias
<b>Vagina</b>
Lactobacilos

Figura 2. Localização da microbiota normal no corpo humano. Adaptado de Prats, 2006.

### 5.2. População Microbiana Normal vs Hospedeiro

A população microbiana normal pode beneficiar o hospedeiro prevenindo o crescimento excessivo de microrganismo nocivos, esta acção denomina-se de antagonismo microbiano, e caracteriza-se pela competição de nutrientes entre espécies. Quando o equilíbrio entre as duas floras é alterado pode ocorrer episódio de doença. A relação entre população microbiana normal e hospedeiro é denominada de simbiose, que pode ser classificada em diferentes tipos (Tortora *et al.* 2008):

- Comensal – um dos organismos é beneficiado sem afectar o outro.
- Mutualismo – ambos os organismos são beneficiados,
- Parasitismo – um dos organismos é beneficiado em função do outro.

### 5.3. Microrganismos Oportunistas

A simbiose pode sofrer alterações provocadas por um desequilíbrio. Em condições propícias um organismo mutualista, como a *E. coli*, pode tornar-se patogénico, para isso basta que deixe o seu habitat natural, o intestino grosso, e migre até outros locais do corpo, como a bexiga ou pulmões. Considera-se uma predisposição para este estado quando um individuo saudável sofre uma lesão na pele ou nas membranas mucosas, ou que seja um individuo imunodeprimido como por exemplo um portador de VIH (vírus da imunodeficiência humana) (Braunwald *et al.* 2002).

### 5.4. Bactérias Patogénicas

Diariamente são identificados possíveis agentes causadores de doença, este número tem vindo a aumentar maioritariamente devido aos estudos que se dedicam a analisar o distúrbio ecológico introduzido pelo VIH e por outros agentes de imunossupressão. Bactérias, vírus, fungos, protozoários e helmintas anteriormente desconhecidos ou que só actuavam em animais ou meio-ambiente, juntam-se actualmente à lista de potenciais agentes patogénicos para humanos (tabela 3). Esta lista altera-se constantemente, devido à introdução de novas tecnologias que permitem identificar novos agentes e acções de saneamento e vacinação que têm por função erradicar ou enfraquecer a acção do agente patogénico (Schaechter 1999).

**Tabela 3.** Principais grupos e géneros de bactérias potencialmente patogénicas para humanos. Adaptado de Schaechter, 1999.

<b>Espiroquetas</b>	<b>Bacilos Gram -</b>
<i>Treponema</i>	<i>Legionella</i>
<i>Borrelia</i>	<i>Bordetella</i>
<i>Leptospira</i>	<i>Haemophilus</i>
<b>Cocos Gram -</b>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Neisseria</i>	<b>Bacilos Gram – Entéricos</b>
<b>Cocos Gram +</b>	<i>Escherichia</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Shigella</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>
<b>Bacilos Gram +</b>	<i>Salmonella</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Proteus</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Listeria</i>	<b>Parasitas intracelulares</b>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Chlamydia</i>
<i>Mycobacterium</i>	<i>Rickettsia</i>

## **6. Estabelecimento da Doença**

### **6.1. Classificação de Doenças Infecciosas**

As doenças são classificadas em função de como se comportam dentro de um hospedeiro e em determinada população, avaliando sinais e sintomas.

Qualquer doença que se dissemina de um hospedeiro para outro, directa ou indirectamente, é chamada de Doença Transmissível (exemplo herpes e tuberculose). Denomina-se de Doença Contagiosa, quando ocorre facilmente a disseminação de humano para humano, por exemplo varicela. Considera-se uma Doença não Transmissível quando não ocorre disseminação entre hospedeiros, a causa consiste na presença de microrganismo comensais que ocasionalmente provocam doença ou então por introdução de microrganismos patogénicos no corpo, por exemplo o tétano (Tortora *et al.* 2008).

### **6.2. Contaminação**

Ao longo dos tempos, estudos têm demonstrado que objectos inanimados, como os baloiços, escorregas, areias entre outros, tem um papel importante na transmissão de agentes patogénicos para humanos. A transmissão pode ocorrer por contacto directo entre a boca e superfície, ou contacto indirecto através da contaminação das mãos que posteriormente vão contaminar objectos que serão levados à boca, sendo que as principais vias de entrada dos agentes patogénicos serão as vias aéreas superiores. No entanto, existem outras vias de exposição como os olhos, cortes ou arranhões na pele (Reynolds *et al.*, 2005).

### **6.3. Reservatórios de Infecção**

Define-se por reservatório o habitat de um agente infeccioso, no qual este vive, cresce e se multiplica. Considera-se que o reservatório seja indispensável para a perpetuação do agente infeccioso, ao passo que a fonte de infecção é responsável pela eventual transmissão (Morais 2009)(Sommer *et al.* 2010)

#### **Reservatório humano**

A maioria das doenças infecciosas tem o humano como reservatório. O homem é considerado como portador do agente infeccioso e pode transmitir a doença directa ou indirectamente a outros indivíduos. Sendo que o homem pode ser assintomático para a doença (Sommer *et al.* 2010)

### **Reservatório animal**

As doenças infecciosas que são transmitidas em condições normais de animais para o homem são denominadas zoonoses. Por norma, essas doenças são transmitidas de animal para animal, o contágio ao homem ocorre acidentalmente, contacto directo com os dejectos do animal, contaminação de alimentos ou água, consumo de animais infectados ou por artrópodes (Morais 2009).

### **Reservatório ambiental**

As plantas, o solo e a água podem comportar-se como reservatórios para alguns agentes infecciosos. Como exemplo, a bactéria *Legionella pneumophila*, tem a água como reservatório, sendo encontrada com frequência em sistemas de aquecimento de água, tais como na água das torres de refrigeração existente nos sistemas de circulação de ar, humidificadores, etc.; o solo é o reservatório do *Clostridium botulinum*, produtor da toxina botulínica (Tortora *et al.* 2008) (Moya *et al.* 2010) .

## **6.4. Mecanismos Microbianos de Patogenicidade**

Para provocar doença, a maioria dos agentes patogénicos tem de ter acesso ao hospedeiro, aderir aos tecidos do mesmo, penetrar ou iludir as defesas e lesar os tecidos. Mas nem todos os microrganismos causam doença através da lesão em tecidos, centrando os seus mecanismos de patogenicidade na acumulação de produtos tóxicos. O conhecimento das estruturas moleculares da superfície microbiana, a sua interacção com o hospedeiro e a resposta do hospedeiro é fundamental para uma compreensão dos processos básicos das infecções e doenças. A entrada do microrganismo baseia-se nas características biológicas do micróbio e reflecte a presença de factores microbianos específicos e necessários para a persistência e crescimento num determinado tecido. No entanto, é de esperar que estes microrganismos encontrem variados mecanismos de defesa do organismo, que vão tentar erradicar o “ataque” (Braunwald *et al.* 2002) .

### **6.4.1. Adesão**

Um agente patogénico pode aceder praticamente a qualquer parte do organismo humano, uma vez no seu interior necessita de se fixar aos tecidos, dando início ao processo de aderência. Este processo envolve moléculas de superfícies que se encontram no agente microrganismo denominadas de ligantes ou adesinas que se vão ligar a receptores que se encontram na superfície celular de determinados tecidos do hospedeiro. As adesinas compreendem inúmeras estruturas de superfície que sustentam a adesão ao tecido e

promovem a entrada do microrganismo na célula, como também suscitam respostas dos hospedeiros fundamentais para o processo patogénico. A maioria das adesinas estudadas são glicoproteínas ou lipoproteínas, sendo os receptores na sua maioria açúcares (Tortora *et al.* 2008).

#### **6.4.2. Crescimento**

Uma vez estabelecidos num local da mucosa ou da pele, os agentes patogénicos tem de se replicar antes de induzir infecção ou doença. Para crescerem as bactérias necessitam de adquirir nutrientes específicos ou sintetiza-los a partir de precursores disponíveis no tecido do hospedeiro, o que pode determinar a especificidade das superfícies lesadas por determinado microrganismo, como por exemplo o vírus Influenza na mucosa respiratória (Braunwald *et al.* 2002).

#### **6.4.3. Evasão**

Os hospedeiros têm uma variedade de mecanismo de defesa, que permitem detectar a presença de agentes patogénicos e contribuem para a eliminação dos mesmos. Barreiras físicas como a pele, que apresenta componentes de acção antimicrobiana, como por exemplo o pH ou a secreção de componentes tóxicos para muitos micróbios, assim como a saliva, lágrimas ou muco contêm factores antibacterianos, como a lisozima, e factores antivirais como os interferões. Entre outros exemplos encontra-se a flora comensal do trato vaginal e gastrointestinal que interfere na capacidade dos agentes patogénicos em colonizarem e infectarem o hospedeiro (Ferreira & Sousa 1998).

Se o agente agressor sobreviver a estes factores, terá ainda que enfrentar as respostas fagocitária, endocítica e inflamatória, que o sistema imunitário acciona, além dos factores genéticos do hospedeiro que determinam o nível em que um patogénico pode sobreviver e replicar-se (Braunwald *et al.* 2002).

Variados microrganismos tem a capacidade de alterar os seus antigénios, através da activação de genes alternativos, antes do hospedeiro conseguir preparar uma resposta imunitária, este processo denomina-se de Variação Antigénica. Nas bactérias Gram-positivo, a presença de cápsula, parede celular rígida, permite que estas sobrevivam em ambientes desfavoráveis, servindo de resistência bacteriana à fagocitose (Tortora *et al.* 2008).

#### **6.4.4. Invasão dos tecidos**

Quando o agente agressor supera as defesas do hospedeiro leva geralmente à ocorrência de lesão celular. Para penetrar na célula os microrganismos usam a proteína actina que se encontra no citoesqueleto. Através de proteínas de superfície denominadas de invasinas, os microrganismos rearranjam os filamentos de actina, que por sua vez levam a que uma estrutura citoplasmática da célula do hospedeiro se projecte mantendo assim o contacto. Algumas bactérias utilizam a proteína caderina, que liga as junções, para se moverem de uma célula para outra, formando assim uma rede de transporte entre as células do hospedeiro (Tortora *et al.* 2008).

O agente agressor pode lesar as células de quatro formas:

- 1) Absorvendo os nutrientes do hospedeiro;
- 2) Provocando uma lesão directa nas estruturas vizinhas ao local da invasão;
- 3) Produzindo toxinas, que transportadas pela corrente sanguínea vão provocar lesões em tecidos e locais distantes do ponto de invasão;
- 4) Induzindo reacções de hipersensibilidade

### **7. Antimicrobianos**

#### **7.1. Descoberta e evolução de antimicrobianos**

Para que seja possível entender a resistência microbiana aos antibióticos é necessário recuar no tempo e analisar a descoberta e evolução destes compostos.

##### **7.1.1. Definição de Antibiótico**

1889 –Vuillemin propõe o termo “antibiose”, que define como o antagonismo dos seres vivos em geral (Davies & Davies 2010);

1942 – Waksman aplica o nome “antibiótico” que define como substância produzida por microrganismos, antagonista ao desenvolvimento ou à vida de outros microrganismos em altas diluições no meio bioquímico do nosso corpo. Com a evolução da medicina, o uso diário do termo, incluiu os agentes antibacterianos sintéticos (Davies & Davies 2010).

### **7.1.2. A evolução de antimicrobianos**

A evolução dos antimicrobianos divide-se em três grandes eras.

#### **Alcalóides**

A primeira data de 1619, ano em que se anotaram os primeiros registos de sucesso no tratamento de Malária (Zaffiri *et al.* 2012).

Na década de 1860, Joseph Lister estudou o efeito inibitório de substâncias químicas sobre as bactérias e como aplicar os seus conhecimentos directamente na medicina. Usando fenol para esterilizar instrumentos cirúrgicos obteve resultados significativos na diminuição da taxa de mortalidade associada à cirurgia. Alguns autores atribuem esse evento como o início da acção antimicrobiana, e por esses motivos é conhecido como o pai da cirurgia asséptica ([http://www.historylearningsite.co.uk/joseph\\_lister.htm](http://www.historylearningsite.co.uk/joseph_lister.htm), consultado em 12-09-13).

Em 1880 Louis Pasteur e Jules Francois Joubert foram os primeiros a reconhecer o potencial clínico dos agentes antimicrobianos como terapêuticos ([http://www.historylearningsite.co.uk/louis\\_pasteur.htm](http://www.historylearningsite.co.uk/louis_pasteur.htm), consultado em 12-09-13).

#### **Compostos Sintéticos**

A segunda era inicia-se com o marco da descoberta de salvarsan por Paul Ehrlich em 1909, utilizado no tratamento de doenças causadas por tripanossomas e outros protozoários. Em 1910 Ehrlich testou o 606, composto arsénico, e demonstrou que este composto era activo contra o treponema causador de sífilis. Foi usado como tratamento de sífilis até à data de 1940, altura em que foi substituído por penicilina. A penicilina havia sido sintetizada por Alexander Fleming em 1929, mas o seu potencial não fora explorado devido à sua instabilidade (Zaffiri *et al.* 2012).

#### **A era moderna dos Antibióticos**

A terceira era, conhecida como a era moderna dos antibióticos, foi marcada pelo controlo das infecções por estreptococos e pneumococos através do uso de sulfonamidas. Alguns autores mencionam a data de 1940 como o início da terceira era, com os primeiros relatos feitos em Oxford por Ernest Boris Chain, sobre as propriedades do extracto de *Penicillium notatum*. Hoje conhecida como penicilina, após a sua síntese, começou a ser produzida pela "School of Pathology at Oxford", porém quando administrada em seres humanos com infecções, era rapidamente excretada, necessitando

de novas administrações, ([http://www.historylearningsite.co.uk/louis\\_pasteur.htm](http://www.historylearningsite.co.uk/louis_pasteur.htm), consultado em 12-09-13). Dessa forma, a penicilina descoberta em 1929, com o seu uso clínico definido em 1940 deu origem à mais variada e mais utilizada classe de antibióticos, os  $\beta$ -lactâmicos (Chambers & Deleo 2009).

Em 1944, Selman Waksman na procura de antibióticos com efeitos menos tóxicos, juntamente com o estudante Albert Schatz, isolou a estreptomicina de uma estirpe de *Streptomyces*, o primeiro composto eficaz na terapêutica contra a tuberculose e por isso recebeu o Prémio Nobel da Medicina em 1952 ([http://www.historylearningsite.co.uk/medical\\_changes\\_from\\_1945.htm](http://www.historylearningsite.co.uk/medical_changes_from_1945.htm), consultado em 12-09-13).

Em 1948, Waksman isolou a neomicina. O seu método de procura por novos compostos dominou a indústria farmacêutica durante décadas (Davies & Davies 2010)

Sabe-se hoje que todos os agentes terapêuticos que tiveram sucesso, tinham entre si propriedades em comum: os antimicrobianos devem exercer uma actividade microbiana letal ou inibitória e em altas diluições no meio bioquímico do corpo humano. Estando em contacto com os vários tecidos do corpo, não devem influenciar a função do órgão ou tecido e não devem ter efeitos danosos. Devem ser estáveis, com baixa taxa de excreção e ter óptima difusão (Finch *et al.* 2010)

A resistência bacteriana era o principal entrave à evolução de novos compostos. Os novos antibióticos produzidos eram derivados dos que já existiam, com propriedades semelhantes às conhecidas anteriormente, apesar disso, e após um século de estudos e controle quase total sobre as infecções bacterianas. A resistência bacteriana tornou-se um sério risco de saúde pública sendo necessário adoptar medidas urgentes para a controlar. A Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a resistência bacteriana como uma das três maiores ameaças para a saúde humana (Nature 2010).

## **7.2. Resistência microbiana**

Uma das razões mais importantes e sustentadas para a condução da descoberta de antimicrobianos durante o século XX foi a resistência dos microrganismos aos antibióticos. Simplificando, a resistência é o contínuo crescimento de microrganismos na presença de antibióticos em concentrações citotóxicas (Wright 2007). Embora a resistência aos antibióticos seja um problema persistente, desde que estes foram

introduzidos, é o aumento do número, diversidade e variedade de organismos resistentes que provoca grande preocupação (Tenover 2006)

Os organismos multirresistentes são actualmente um desafio para a medicina moderna (Levy & Marshall 2004). Existem pelo menos duas classes de organismos multirresistentes, a primeira são agentes patogénicos conhecidos, muitos dos quais classificados nos mesmos géneros e espécies que as bactérias existentes na flora comensal do ser humano, mas que por algum motivo adquiriram genes de resistência aos antibióticos e que frequentemente apresentam um aumento da virulência. A segunda classe é composta por agentes patogénicos oportunistas, que são frequentemente de origem ambiental e geralmente só infectam indivíduos imunocomprometidos (McGowan 2006) (Lupo *et al.* 2012).

Inicialmente as infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos ocorreram principalmente em ambiente hospitalar, onde o uso de antimicrobianos foi mais aplicado e por extensos períodos. As bactérias portadoras de genes de resistência antimicrobiana têm a vantagem de ter uma sobrevivência que facilita a sua disseminação. Os esforços para reduzir as infecções hospitalares, especialmente as que envolvem resistência a antimicrobianos, são um dos principais focos dos serviços de saúde, mais recentemente, um factor que tem sido igualmente perturbador, o aumento da tendência para a propagação de bactérias resistentes na comunidade (Furuya & Lowy 2006).

A principal razão para esta tendência, reflecte o aumento do volume do uso de antimicrobianos em todo o mundo, estudos indicam que existe uma relação directa entre o uso de antibióticos e a extensão da resistência (Goossens *et al.* 2005).

A maioria destes medicamentos são utilizados em ambiente ambulatorio, e estudos estimam que metade é prescrita para indicações inadequadas, como infecções virais (Huang 2005).

### **7.2.1. Antimicrobianos $\beta$ -lactâmicos**

Antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos são considerados os agentes antimicrobianos de maior sucesso desde o início da era antibiótica. Logo após a introdução da penicilina, microrganismos capazes de destruir os  $\beta$ -lactâmicos foram referenciados, ressaltando a facilidade destes microrganismos patogénicos desenvolverem resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (Jacoby 2009).

Em agentes patogénicos Gram-negativo, a produção de  $\beta$ -lactamases é o principal mecanismo envolvido na resistência adquirida aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Quatro classes de  $\beta$ -lactamases têm sido descritas: A, B, C e D. As classes A, C e D são enzimas com uma molécula de serina no centro activo, que catalisa a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico através de um intermediário acil de serina, enquanto as enzimas da classe B requerem um coactor de metal (por exemplo de zinco na sua forma natural) para funcionar e, por essa razão, são também referidos como metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs) (Bush *et al.* 1995).

Para superar a resistência de  $\beta$ -lactamase mediada, uma combinação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e um inibidor de  $\beta$ -lactamases, tem sido amplamente utilizada no tratamento de infecções humanas (Pérez-Llarena & Bou 2009).

### **7.3. Meio Ambiente vs Resistência Microbiana**

Muitas vezes assume-se que os antibióticos são compostos introduzidos no meio ambiente pelo homem, e que por sua vez têm por consequência promover a resistência. Na realidade, muitos dos antibióticos de relevância clínica, são naturalmente produzidos pelos microrganismos existentes no meio ambiente. A função destas pequenas moléculas produzidas naturalmente ainda não são totalmente compreendidas (Yim *et al.* 2007), mas pode incluir papéis como a comunicação bacteriana através de células de sinalização (Davies 2006).

Estes compostos podem ter impacto sobre as populações microbianas de várias maneiras, incluindo a selecção de populações que possuem mecanismos de resistência a pequenas moléculas (Yim *et al.* 2007). A presença destes compostos no meio ambiente raramente é considerado como uma potencial contribuição para a resistência, mas é evidente que há um nível de fundo de resistência que deve ser contabilizado (Schmitt *et al.* 2006). O dogma histórico entende que a resistência ao antibiótico não deve estar presente num local onde não tenham sido utilizados antibióticos (Singer *et al.* 2006).

Quando os dados de resistência a antibióticos são analisados nas mais variadas escalas geográficas, como por exemplo através de sistemas de vigilância, são detectadas significantes diferenças nos perfis isolados de resistência aos antibióticos (Swaminathan *et al.* 2006). Um dos principais desafios neste tipo de estudo é caracterizar correctamente a exposição aos antibióticos e qualquer outro factor que possa induzir alterações na resistência (Singer *et al.* 2006). Por conseguinte, um dos mais difíceis

aspectos dos estudos ecológicos é a selecção adequada de comparação (controlo), uma vez que requer o conhecimento do potencial da causa da resistência (Lipsitch & Samore 2002)(Sommer *et al.* 2010).

Talvez o aspecto mais difícil na concepção do estudo de resistências a antibióticos é a inclusão de rotas e as probabilidades de transmissão, as bactérias podem ser disseminadas em vários locais, e como tal a resistência pode ser encontrada em diversas áreas, independentemente de qualquer método de selecção. A transmissão é uma fonte de novos genes de resistência e não apenas o potencial de amplificação de genes existentes (Lipsitch & Samore 2002).

#### **7.4. Mecanismo de Resistência**

As bactérias adquirem resistência aos antibióticos, como resultado de mutações cromossómicas ou por trocas horizontais de material genético entre espécies de bactérias (Watanabe 1963)(Stokes & Hall 1989). A troca genética ocorre de várias maneiras, incluindo transdução, transformação e conjugação. Estes eventos genéticos ocorrem na presença ou na ausência de antibióticos. Há no entanto, várias formas em que a contribuição da utilização de agentes antimicrobianos induz resistência aos mesmos: o efeito concomitante selectivo, a vantagem competitiva subsequente desse efeito e a transferência genética bacteriana. A vantagem do efeito selectivo dá-se em simultâneo com a morte do microrganismo e a sobrevivência dos microrganismos resistentes ou seja estes persistem e perpetuam. O efeito competitivo erradica os agentes patogénicos e não patogénicos, criando um vazio no ambiente normal que pode predispor um indivíduo a colonizações menos inócuas (resistentes) (Barza & Travers 2002). Por último, a genética bacteriana permite a transferência para a sobrevivência da resistência antimicrobiana, não apenas na descendência genética de estirpes resistentes mas também em linhagens independentes de bactérias (Furuya & Lowy 2006).

Para um organismo resistente sobreviver, o seu mecanismo de resistência deve ser sustentável, mesmo na ausência de pressão selectiva (antibióticos), a maquinaria genética adicional não deve colocar uma restrição significativa da sobrevivência (Furuya & Lowy 2006) (Lupo *et al.* 2012).

## **Objectivo**

O principal objectivo deste trabalho é a análise microbiológica dos pisos de vários parques infantis na zona de Lisboa.

Pretendeu-se com este estudo determinar quais os microrganismos presentes nos parques infantis (indicadores de contaminação fecal, potenciais patogénicos), relacionando a sua presença em maior ou menor quantidade com as condições de higiene do parque, o tipo de população que o frequenta, e ainda relacionar com as condições climáticas aquando da colheita das amostras.

Um segundo objectivo deste estudo foi verificar se as bactérias isoladas apresentavam resistência a antibióticos, procedendo posteriormente à sua caracterização molecular.

O estudo tem como objectivo final confirmar que os parques infantis são potenciais fontes de contaminação para as crianças e demonstrar a necessidade de um controlo regular dos mesmos e a sua desinfeção periódica.

## **Materiais e Métodos**

### **1. Colheita das amostras**

As colheitas dos seixos (piso dos parques) realizaram-se entre os meses de Dezembro de 2010 e Agosto de 2011, com intervalos de duas semanas, o que fez um total de 18 colheitas. Foram seleccionados seis parques infantis da área metropolitana da cidade Lisboa: Parque Alameda Afonso Henriques; Parque Jardim Constantino; Parque Eduardo VII; Parque Jardim das Amoreiras; Parque Jardim da Estrela e Parque Ceuta (Alcântara).

As amostras foram colhidas em três pontos distintos do solo de cada parque, foram acondicionadas em sacos de plástico, identificadas e mantidas em contentor térmico até chegarem ao laboratório para análise (figura 3). O material que compõe a amostra é identificado como seixo.



**Figura 3.** Recolha da amostra no local e acondicionamento das amostras em contentor térmico

### **2. Análise Microbiológica**

Para cada amostra foram pesados 25g e adicionados a 225ml de água peptonada tamponada estéril (APTE) (Buffered Peptone Water (ISO) Oxoid). Esta mistura foi sujeita a agitação durante 40 minutos (119 rpm). O método utilizado para isolar e quantificar os microrganismos foi a filtração. Alíquotas de 10ml e 500 µl foram filtradas, utilizando filtros de nitrocelulose de 45 µm, e os respectivos filtros colocados nos meios de cultura específicos para o isolamento dos diferentes microrganismos (figura 4).

- MacConkey Agar (Oxoid) – Coliformes Totais (incubação: 37°C/24H) e Coliformes Fecais (incubação: 42°C/24h)
- Slanetz Bartley (Oxoid) - Enterecocos Fecais (incubação: 42°C/24H)

- Baird Parker (Oxoid) - *Staphylococcus aureus* (incubação:37°C/48H)
- Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Oxoid) – Fungos (incubação: 25°C/72H)
- Brillance Candida (Oxoid) - *Candida albicans* (incubação: 25°C/72H)



Figura 4. Sequência de trabalho descrita no ponto 2.

### 2.1. Pesquisa de *Salmonella*

Para a pesquisa de *Salmonella* a suspensão de APTE com a amostra foi incubada a 37°C durante 24h. Após a incubação foram inoculados 100 µl desta suspensão em dois meios líquidos diferentes, Rapaport e Muller Kauffmann (ambos selectivos para *Salmonella*). Estes foram incubados por 24h a 37°C e após essa incubação alíquotas de 100 µl de cada um foram inoculadas em meio agar cromogénico Brillance Salmonella (Oxoid). Este foi então incubado também por 24h a 37°C.

## 2.2. Identificação e Caracterização dos Microrganismos isolados

Após a incubação dos meios de cultura foi efectuada a contagem do número de unidades formadoras de colónias (ufc) que se desenvolveram à superfície dos mesmos. Foi estudada a evolução da flora microbiana durante os meses em que decorreu o estudo. Foram seleccionadas, de forma aleatória, algumas colónias dos meios de MacConkey (incubado a 42°C) e Slanetz (tendo por base o número e aspecto morfológico), para serem identificadas recorrendo a testes bioquímicos. Para tal, as colónias seleccionadas foram primeiro isoladas em Tripton soja agar (TSA), e posteriormente identificadas.

### 2.2.1. Coloração de Gram

É um método de coloração de bactérias, que permite diferenciar as bactérias com diferentes estruturas da parede celular. O método consiste em corar um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os reagentes cristal-violeta, lugol, álcool-acetona e fucsina, conforme o protocolo de execução. As bactérias que adquirem a cor violeta são Gram-positivo e as que adquirem cor rosa/vermelho são Gram-negativo (tabela 4).

**Tabela 4.** Classificação de bactérias consoante a coloração de Gram. Adaptado de Brancroft, 2002

Gram-positivo		Gram-negativo		
Cocos	Bacilos	Cocos	Bacilos	Cocobacilos
<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Bacillus</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Brucella</i>
<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Clostridium</i>		<i>Klebsiella</i>	<i>Bordetella</i>
	<i>Corynebacterium</i>		<i>Salmonella</i>	<i>Haemophilus</i>
	<i>Mycobacteria</i>		<i>Shigella</i>	
	<i>Lactobacillus</i>		<i>Proteus</i>	
	<i>Listeria</i>		<i>Pseudomonas</i>	
			<i>Vibrio</i>	
			<i>Pasturella</i>	

### 2.2.2. Testes Bioquímicos de Identificação de Microrganismos

Após caracterização da bactéria através da coloração de Gram, torna-se necessário proceder a testes bioquímicos, através da verificação das transformações químicas que ocorrem a determinado substrato, pela acção das enzimas de um dado microrganismo. Na prática estes testes podem ser usados como meio de identificação do microrganismo.

### ***Teste da Catalase***

A catalase é uma enzima que actua sobre a água oxigenada (peróxido de hidrogénio, 3 a 5%) originando água e oxigénio. A prova é efectuada colocando uma gota de peróxido de hidrogénio numa lâmina, em seguida com uma ansa de plástico coloca-se uma colónia em contacto com a gota. O teste é considerado positivo quando ocorre efervescência (borbulhar). Neste estudo o teste foi usado nos cocos Gram positivo para diferenciar *Staphylococcus*, que são catalase positiva, de *Streptococcus*, que são catalase negativa.

### ***Teste da Oxidase***

O teste de oxidase é um procedimento para determinar a presença ou ausência de actividade do citocromo C nas bactérias.

Esta actividade depende da presença de um sistema de citocromo oxidase intracelular que catalise a oxidação do citocromo C através de oxigénio molecular que, por sua vez, irá funcionar como receptor final de electrões no sistema de transporte de electrões do organismo. Na presença de oxigénio na atmosfera e de citocromo C, esta enzima oxida o reagente fenilenediamina, para formar um composto colorido violeta, o indofenol.

O procedimento utilizado no nosso laboratório consiste em colocar um disco branco (Oxid) sobre uma lâmina, impregnar o disco com um gota de Oxidase Reagent (Biomérieux®), colocar uma colónia no disco (usar uma ansa de plástico) e aguardar pelo resultado num tempo máximo de 60 segundos. O teste é considerado positivo quando ocorre reacção e o produto adquire cor violeta.

### ***Teste Coagulase***

Este teste é utilizado para distinguir espécies patogénicas de *Staphylococcus* de espécies não patogénicas.

As coagulases são enzimas com capacidade de coagular o plasma sanguíneo através de um mecanismo semelhante ao da coagulação normal. A prova da coagulase consistia em adicionar a um tubo com Freeze-Dried Rabbit Plasma (Biokar diagnostics) uma colónia isolada do meio Braid Parker, que deverá respeitar os seguintes critérios: ser de cor preta e com halo, “Baird-Parker Agar” contém as fontes de carbono e nitrogénio necessárias ao seu crescimento. A glicina, o cloreto de lítio e a telurite de potássio actuam como agentes selectivos. A gema de ovo é o substrato para detectar a produção

de lecitinase e, além disso, a actividade da lipase. Os estafilococos produzem colónias cinzento escura a preto devido à redução de telurite; os estafilococos que produzem ultrapassam a gema do ovo e provocam zonas transparentes em volta das respectivas colónias. Pode formar-se uma zona opaca de precipitação devido à actividade da lípase” (GmbH & BD Diagnostic Systems 2003).

A formação de coágulos após uma incubação de 24h/37°C é interpretada como resultado positivo para coagulase. Caso não ocorra coagulação a prova deverá ser considerada negativa.

### **API®**

O método estabelecido para identificação manual de microrganismos ao nível da espécie, foi a galeria API BioMérieux®, um sistema utilizado na identificação de bactérias Gram-positivo, Gram-negativo e leveduras. O sistema oferece uma vasta base de dados acessível através da internet (apiweb serviço™), onde é possível aceder à identificação com base num perfil numérico.

Em conjunto com os resultados obtidos nos testes acima descritos e com base na gama de API® apresentada pelo fabricante, seleccionou-se o tipo de teste API® a aplicar para identificar os isolados (tabela 5).

**Tabela 5.** Critérios aplicados na selecção da galeria API a utilizar.

<b>Bacilos Gram Negativo</b>		<b>Cocos Gram Positivo</b>	
Oxidase Negativa API®20E	Oxidase Positiva API®20NE	Catalase Negativa API® <u>Strep</u>	Catalase Positiva API®Staph

API®20E – Identificação de espécies e subespécies de *Enterobacteriaceae* e espécies ou grupos não fermentadoras Gram -.

API®20NE – Identificação de espécies Gram negativo não-*Enterobacteriaceae*

API®20Strep – Identificação de *Streptococcus* e *Enterococcus*

API®Staph – Identificação de *Staphylococcus*

## **2.3. Identificação de Fungos**

### ***Candida albicans***

O meio seleccionado, Brillance Candida (Oxoid) é um meio cromogénico e identifica as espécies de *Candida* através de diferentes colorações; as colónias de cor verde correspondem a *Candida albicans*, sendo assim imediata a sua identificação e quantificação.

### ***Bolores***

Os meios utilizados (Cooke Rose Bengal) para o isolamento de fungos, nomeadamente bolores, foram observados 72h após a inoculação, isto para que ocorresse crescimento que permitisse a identificação das espécies através de visualização ao microscópio. A preparação das lâminas consistiu em retirar com ansa ou bisturi, uma pequena porção das diferentes colónias visíveis, colocar sobre uma lâmina com Azul Lactofenol, cobrir com lamela e observar ao microscópio com objectiva de 40x.

## **3. Testes de susceptibilidade a antimicrobianos**

Existem várias técnicas para determinar a sensibilidade dos microrganismos aos antibióticos, mas no geral o princípio baseia-se na determinação da capacidade que um microrganismo tem para se reproduzir *in vitro*, na presença destes compostos.

### **3.1. Resistência à Ampicilina**

Para verificar a existência ou não de resistência à Ampicilina, os isolados identificados foram inoculados em meio de cultura LB agar (Sigma-Aldrich) com Ampicilina Trihidratada (Sigma-Aldrich) (numa concentração final de 50 mg/ml). Se se verificasse crescimento o isolado era considerado resistente.

### **3.2. Antibiograma**

As bactérias que apresentaram resistência à Ampicilina foram testadas para outros antibióticos. O antibiograma foi executado pela técnica de Kirby-Bauer (pelo método de difusão em agarose). A formação de um halo em torno do disco corresponde à sensibilidade do microrganismo ao fármaco; os halos são medidos e o valor obtido permite classificar os organismos como, sensíveis, intermédios ou resistentes aos agentes antimicrobianos (de acordo com os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute*). Para execução do antibiograma foram seleccionados os seguintes antibióticos:

- Cefoxitina – FOX
- Ceftazidima – CAZ
- Imipenem – IPM
- Cefotaxina – CTX
- Gentamicina – CN
- Ciprofloxacina – CIP
- Amoxicilina + ácido clavulâmico – AMC

### 3.3. Testes de Inibição

Para as bactérias que apresentaram resistência aos antibióticos AMC, FOX e CTX, foram realizadas provas de inibição de  $\beta$ -lactamases do tipo cefalosporinases (Amp C-type) por adição de 15 $\mu$ l de cloxacilina aos discos de AMC, FOX e CTX .

Para determinar a acção das bombas de efluxo em algumas bactérias que apresentaram resistência aos antibióticos, foi realizada uma prova adicional, que consistia em impregnar os discos de IPM e MPM com 15 $\mu$ l de reserpina.

A inibição da presença de metalo- $\beta$ -lactamases foi efectuada por aplicação 15 $\mu$ l de ácido etileno-diamino tetra-acético (EDTA) a 10mM ao disco de IPM. Todos os testes de inibição foram efectuados em paralelo com os discos de antibióticos sem os inibidores, de modo a comparar os halo de inibição sem e com inibidores.

## 4. Caracterização Molecular por PCR

Para caracterização dos genes de resistência em isolados de *E. coli*, que apresentaram resistência a Ampicilina e Amoxicilina + ácido clavulâmico, foi realizada a técnica de PCR (reacção de polimerização em cadeia).

A reacção de PCR é uma técnica *in vitro* que permite a amplificação de sequências específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN), sendo a característica mais importante a capacidade de amplificar exponencialmente cópias de ADN a partir de uma reduzida quantidade de material.

A técnica de PCR está desenhada de acordo com o princípio natural de replicação de ADN, o processo decorre em três passos, que em conjunto se designam como um ciclo e que se repete um número específico de vezes. No final do primeiro ciclo obtemos duas novas cadeias de ADN idênticas à cadeia original, quando completado o número total de ciclos programados obtemos um elevado número de cópias.

#### **4.1. Desnaturalização**

O processo de desnaturalização do ADN é obtido pelo aumento da temperatura (acima dos 90°C), de modo a separar as duas cadeias simples permitindo a ligação de oligonucleótidos iniciadores conhecidos como *primers* (<http://www.roche.pt/>, consultado em 30-06-13)

#### **4.2. Hibridização ou Annealing**

Os *primers* que são sequências sintéticas de nucleótidos de pequenas dimensões, entre 20 a 30 pb, marcam as extremidades da sequência alvo. Numa reacção de PCR são adicionados dois *primers* (*forward* e *reverse*), um para cada cadeia simples de DNA que foi separada durante o passo de desnaturalização, estes hibridizam com a sequência complementar. Para que este passo ocorra sem erros a temperatura de *annealing* encontra-se entre 40 °C e 65 °C, dependendo do comprimento dos *primers* e da sua sequência; a temperatura ideal está dependente da percentagem de bases GC da sequência a amplificar, e a sua optimização permite elevada especificidade (<http://www.roche.pt/>, consultado em 30-06-13).

#### **4.3. Extensão**

Após a ligação dos *primers* às sequências complementares de ADN, a temperatura eleva-se a aproximadamente 72 °C e a enzima *Taq* polimerase (ou equivalente) replica a cadeia de ADN. A *Taq* polimerase é uma polimerase de ADN recombinante do organismo *Thermus aquaticus*, que se mantém activa a temperaturas elevadas.

O processo de síntese é iniciado numa zona com cadeia dupla, incorporando os nucleótidos complementares à sequência alvo e utilizando os dNTPs em solução.

A extensão inicia-se sempre no extremo 3' do *primer*, criando uma cadeia dupla a partir de cada uma das cadeias simples. A *Taq* polimerase sintetiza exclusivamente na direcção 5' para 3' (<http://www.roche.pt/>, consultado em 30-06-13).

#### **4.4. Extracção de ADN**

Para a extracção de ADN dos isolados, necessário à técnica de PCR, foi utilizado o kit de extracção RTP Bacteria DNA Mini Kit (Invitex, Quilaban), de acordo com as normas de utilização indicadas pelo fabricante.

#### 4.5. Amplificação do gene *EampC* em *Escherichia coli*

Os *primers* utilizados para esta amplificação foram cedidos pelo laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia de Lisboa, e têm como alvo a amplificação do gene *EampC*  $\beta$ -Lactamase em *Escherichia coli*, as suas sequências nucleotídicas foram adaptadas a partir de literatura referente a outros estudos realizados em *Escherichia coli* (Doi *et al.* 2004).

Os ensaios de PCR foram realizados no termociclador MJ Mini (BioRad), as condições de corrida foram: pré-desnaturação de 94°C por 3 min, 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, hibridação dos *primers* a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min seguidos de uma extensão final de 72°C por 7 min. As sequências dos *primers*, tamanho dos produtos e a temperatura de anelring encontram-se descritos na tabela 6.

**Tabela 6.** Características e condições dos *primers* usados para detecção do gene *EampC*.

<i>Primers</i>	Gene Alvo	Sequências (5'-3')	Temperatura anelring	Tamanho produto	Referência
EampF EampR	EampC	ATGTTCAAACGACGCTCTG CGGTA ACTCTCGCTGGATTG	55°C	1093 pb	(Doi et al. 2004)

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1%. Após electroforese a 100V durante 45 min a 1h, o gel foi visualizado e fotografado sobre luz UV no aparelho UV Transilluminator.

#### 4.6. Purificação do Produto de PCR

A purificação do produto de PCR teve como objectivo preparar a amostra para o processo de sequenciação, esta técnica permite eliminar contaminantes e produtos excedentes que resultam da amplificação e que são prejudiciais no processo de sequenciação.

Para a purificação das amostras foi utilizado o kit Invisorb Fragment CleanUp (Invitex, Quilaban) de acordo com as normas recomendadas pelo fabricante.

#### 4.7. Sequenciação

A sequenciação foi efectuada no exterior por uma empresa.

#### 4.8. Análise de Resultados

Os géis foram analisados manualmente e as sequências obtidas foram analisadas e tratadas recorrendo a *software* de utilização livre disponível na internet, que permitem identificar e comparar os resultados.

- Blast: Basic Local Alignment Search Tool  
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)
- BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)
- Mega4 (<http://www.megasoftware.net/>)
- NCBI: National Center for Biotechnology Information  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

# Resultados

## 1. Análise Social dos Parques Infantis

Os resultados obtidos em laboratório foram enquadrados na realidade social que cada parque apresenta, tendo em consideração a localização geográfica, a condição socioeconómica dos utilizadores, o meio ambiente envolvente, a fauna e flora, e por último as condições e estruturas físicas do espaço. Todas estas variáveis alteram e contribuem para a discrepância de quantidade e diversidade de espécies encontradas nas análises realizadas.

### 1.1. Parque Alameda

Localiza-se no Jardim da Alameda Afonso Henriques em Lisboa, o jardim destaca-se pela sua grande dimensão e pela Fonte Luminosa. Caracteriza-se por um grande relvado ladeado por árvores, na sua maioria pinheiros e palmeiras.

O jardim está dotado de parque infantil (figura 5), mesas de jogo e miradouro, é frequentado de modo sazonal por turistas de várias faixas etárias, ao longo do ano são os residentes que frequentam o espaço que se encontra envolvido pela actividade socioeconómica existente na Alameda. Esta caracteriza-se como um misto de zona comercial de média actividade com zona residencial e local de passagem uma vez que se encontra junto a um polo de transportes públicos.

É possível determinar que este jardim é frequentado por uma classe socioeconómico de nível médio, que a preservação do espaço é cuidada, no entanto à data deste estudo o parque infantil apresentava alguma deterioração ao nível das estruturas fixas e era frequente encontrar-se lixo proveniente dos utilizadores do espaço.

Não sendo autorizada a presença de animais no interior do parque infantil, é de referir que a vedação que limita o espaço do parque infantil permite o acesso a animais sem dono ou sem vigilância, assim como é necessário admitir que todas as espécies inerentes ao jardim (aves, répteis e pequenos roedores) têm acesso a este espaço.



**Figura 5.** Instalações do parque infantil da Alameda

## **1.2. Parque Constantino**

Localiza-se no Jardim Constantino em Lisboa, na freguesia de São João de Arroios, caracteriza-se por ter uma dimensão reduzida, cerca de 0,28 hectares, composto por canteiros e lago com fontanário, a flora deste jardim foi considerada como interesse público devido à presença de uma espécie rara de árvore, *Melaleuca styphelioides* (<http://www.cm-lisboa.pt/equipamentos/equipamento/info/jardim-constantino> consultado em 29-07-2013).

O jardim está dotado de parque infantil, instalações sanitárias e quiosque com esplanada, é frequentado pela população residente, no entanto é muito frequente a presença de um pequeno grupo de sem-abrigo que utilizam o espaço como local de permanência diurna. Em resultado desta situação o jardim apresenta uma imagem descuidada ao nível da higiene.

O jardim foi alvo de intervenção de requalificação em 2009/2010, o facto de o quiosque encontrar-se a poucos metros do parque infantil serve como vigilância ao espaço, permitindo algum cuidado com as instalações. O parque encontra-se cercado por uma vedação, com entrada por um pequeno portão que se encontra habitualmente fechado reduzindo assim o acesso a animais como cães ou gatos, no entanto todo este jardim é *habitat* de muitas espécies de pequeno porte, na sua maioria aves e roedores (figura 6).



**Figura 6.** Instalações do parque infantil do Jardim Constantino.

### **1.3. Parque Eduardo VII**

Localiza-se no Parque Eduardo VII de Inglaterra em Lisboa, no topo da Avenida da Liberdade na freguesia de São Sebastião da Pedreira, destaca-se pela sua grandiosa dimensão, na ordem dos 26 hectares, onde se pode encontrar longos jardins de relvado, zonas de calçada portuguesa e zonas arborizadas.

No total da sua composição o parque está dotado dos seguintes equipamentos: Pavilhão dos Desportos, Estufa-fria, lagos, conjunto de estatuária, restaurante com esplanada, parque infantil, miradouro, coreto, Parque de merendas e quiosque ( <http://www.cm-lisboa.pt/equipamentos/equipamento/info/parque-eduardo-vii-de-inglaterra> consultado em 29-07-13). Considerado pelos guias como um local de interesse turístico, este jardim é visitado diariamente por elevado número de pessoas.

Dos seis Parques infantis analisados neste estudo, este é o único que se encontra dotado de vigilante presente durante o horário de funcionamento, sendo que não é permitida a permanência de adultos sem estarem acompanhados de crianças. O Parque infantil encontra-se inserido nos jardins do Parque Eduardo VII, cercado por vedação alta, o acesso faz-se por porta, no seu interior o espaço é dividido em três zonas de recreio, edifício e jardins (figura 7). Destaca-se por apresentar excelentes condições de higiene e manutenção das estruturas.

Apesar de não ser permitido o acesso a animais, toda a envolvência e a proximidade da Estufa-fria, leva a que seja frequentado por aves de espécies menos frequentes em outros locais da cidade, e pela habitual fauna inerente aos jardins.



**Figura 7.** Instalações do parque infantil do Jardim do Parque Eduardo VII.

#### **1.4. Parque Amoreiras**

Inserido no Jardim Amoreiras na freguesia de São Mamede, este jardim é limitado pela estrutura final do aqueduto das águas livres e no seu subsolo encontra-se a Mãe d'água. O Jardim dispõe de Parque Infantil, lago, quiosque e esplanada, distribuídos por 0,6 ha (<http://www.cm-lisboa.pt/equipamentos/equipamento/info/jardim-das-amoreiras-jardim-marcelino-de-mesquita>, acedido em 29-07-2013).

Considerado como espaço de lazer, com pouca actividade comercial, caracteriza-se por ser uma zona residencial, o quiosque a poucos metros do parque infantil, permite a vigilância do espaço, no entanto centra uma grande quantidade de aves, nomeadamente pombos que vão sendo alimentados pelos utentes.

A flora caracteriza-se pela diversidade de espécies de árvores que serve de *habitat* a aves e animais inerentes ao jardim. As condições de limpeza são satisfatórias, no entanto dos seis parques, este é o que regista maior uso como local de passeio para animais domésticos acompanhados pelos donos.

O Parque infantil é cercado por vedação de estrutura muito baixa permitindo o acesso total a animais, à data deste estudo os equipamentos apresentavam alguma degradação e o solo requeria manutenção e limpeza (figura 8).



**Figura 8.** Instalações do parque infantil do Jardim Amoreiras

### **1.5. Parque Estrela**

Inserido no Jardim Guerra Junqueiro, conhecido por Jardim da Estrela na freguesia da Lapa, é um espaço único pelas características que o protagoniza, é um jardim fechado por gradeamento, com portões que permitem a entrada por diferentes acessos. Este jardim é bastante completo em relação aos equipamentos disponíveis; no interior dos seus 4,6 ha podemos encontrar: instalações sanitárias, casa de ferramentas, lago, miradouro, coreto, jardim-de-infância, centro de dia, biblioteca, café-esplanada, polidesportivo informal e Parque infantil (<http://www.cm-lisboa.pt/equipamentos/equipamento/info/jardim-da-estrela-jardim-guerra-junqueiro> , consultado em 29-07-2013).

O Jardim da Estrela tem uma dinâmica muito própria e activa, serve como local de passagem uma vez que comunica com várias avenidas, situado numa zona residencial com actividade comercial sustentada pelo polo de hospitais aí existentes.

O parque infantil beneficia do facto de o jardim ser detentor de oficina, sendo que as instalações, equipamento e solo apresentam elevado estado de limpeza e manutenção (figura 9). No entanto este espaço é conhecido pela sua diversidade de flora e fauna, desde espécies exóticas de aves, cágados, patos, entre outros, que tem acesso ao espaço de recreio infantil. É de referir que os residentes optam por passear os seus animais domésticos, cumprindo as recomendações de higiene e segurança estipuladas pelo jardim.



**Figura 9.** Instalações do parque infantil do Jardim Guerra Junqueiro.

### **1.6. Parque Ceuta**

O Parque infantil designado de Ceuta localiza-se na Avenida de Ceuta, na freguesia de Alcântara, encontra-se inserido numa área polivalente integrada num bairro de inserção social. O local de implantação, distanciado da estrada por alguns metros, não é dotado de espaços verdes, sendo que no interior do Parque existem árvores de grande porte, que servem de habitat às poucas aves existentes. Não é um local propício a fauna, excepto pequenos roedores e animais domésticos ou sem dono.

O Parque tem dimensões reduzidas, à data deste estudo apresentava elevado grau de deterioração dos equipamentos, o solo requeria manutenção urgente e não havia sinais de manutenção ou limpeza do espaço, assim como não havia indícios de que fosse frequentado por crianças (figura 10).



**Figura 10.** Instalações do parque infantil da Avenida de Ceuta.

## 2. Condições Meteorológicas

A variabilidade e alterações climáticas observadas e ocorridas por influência de fenómenos extremos, com modificações acentuadas na temperatura e precipitação, têm impacto nas actividades socioeconómicas e bem-estar da população. “No clima os fenómenos interessam pela sua duração ou persistência e pela sua repetição e são caracterizados por valores médios, variações e probabilidades de ocorrência de valores extremos, relativamente aos vários elementos climáticos”(Couto, Miguel 2011).

A relação do clima associada à população microbiana, é essencial para o entendimento das variações quantitativas de microrganismos verificada sazonalmente, (Rodrigues et al. 2011). Elementos meteorológicos tais como: temperatura, humidade, temperatura do solo e luminosidade reúnem condição essenciais para o entendimento e distribuição espacial destes seres vivos nos diversos ecossistemas naturais, (Tortora *et al.* 2008).

Alguns autores referem que as alterações que ocorrem durante as estações do ano, entre o solo e a cobertura vegetal, originam flutuações na actividade microbiana do solo que se evidenciam mais à superfície onde a humidade e temperatura são mais variáveis, (Rodrigues *et al.* 2011).

Este estudo propõe-se a relacionar o aumento e decréscimo da população microbiana com as condições meteorológicas registadas durante a época de colheitas, o período de colheitas decorreu durante 9 meses e permitiu abranger inverno, primavera e verão, estações do ano que se caracterizam por serem distintas entre si, com variações de temperatura e precipitação.

À data do trabalho de campo desenvolvido, o Instituto de Meteorologia de Portugal não disponibilizava gratuitamente dados sobre as condições meteorológicas ocorridas por datas específicas, como tal foi necessário recorrer a um *site* de informação meteorológica internacional, <http://www.wunderground.com/>, que permite o acesso e consulta do registo diário das condições meteorológicas registadas na estação meteorológica localizada no aeroporto de Lisboa.

Deste modo os valores apresentados referem-se a esse ponto geográfico, não sendo possível determinar com exactidão as condições registadas localmente em cada parque, uma vez que estes são distantes do ponto de referência.

## 2.1. Precipitação

Na caracterização do regime de precipitação considera-se a precipitação média anual e a sua distribuição temporal ao longo das estações do ano, deste modo é necessário dispor do número médio anual de dias com ocorrência de precipitação relacionando a época sazonal (Couto, Miguel 2011).

Os valores percentuais de precipitação não se encontram disponíveis para consulta, como tal, a metodologia adoptada consistiu na criação de uma escala de 0 a 5 valores para estabelecer a relação de dias em que ocorreu precipitação (0 – ausência de precipitação; 5 – máximo de dias com ocorrência), os dados reportam aos 5 dias que antecedem a colheita da amostra, (figura 11). A ocorrência de precipitação registou o padrão esperado de acordo com as estações do ano sem alterações significativas.

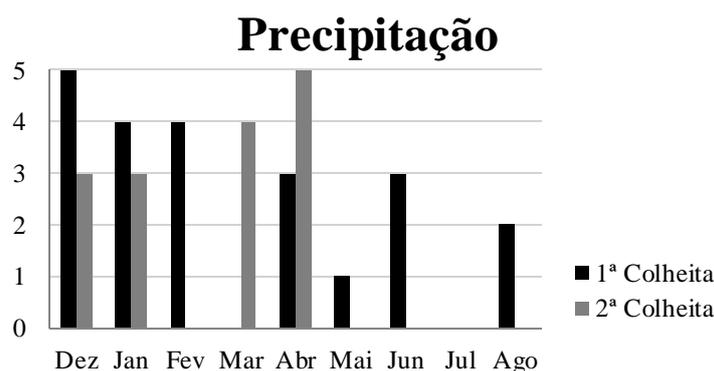
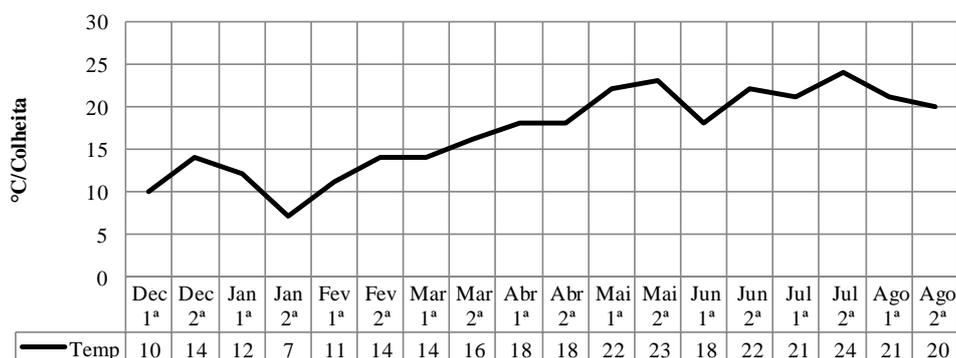


Figura 11. Ocorrência de precipitação durante o período de colheitas

## 2.2. Temperatura Atmosférica

A temperatura do ar é medida através de termómetros instalados em abrigos meteorológicos, a 1,5 m de altura do solo e os valores exprimem-se em graus Célsius (°C), (Couto, Miguel 2011). É possível afirmar que os valores da temperatura mantiveram-se estáveis e corresponderam aos valores esperados para os períodos em estudo. Regista-se uma diminuição da temperatura nos meses de verão ainda assim dentro da média registada em outros anos, sem alterações significativas (figura 12). Os valores indicados correspondem à temperatura média (Anexo I).

## Temperatura



**Figura 12.** Registo de Temperatura média das 24 horas que antecedem o dia da colheita, entre Dezembro de 2010 e Agosto de 2011.

### 3. Pesquisa de população microbiana no solo dos parques infantis.

Os parâmetros microbiológicos (indicadores de qualidade) a pesquisar neste estudo foram adaptados do Relatório de Qualidade das Areias em Zonas Balneares de 2010 (tabela 7). Para análise de dados foram adoptados os valores de referência publicados no Relatório de Qualidade das Areias em Zonas Balneares de 2010 (tabela 8), (Brandão *et al.* 2011). Verificou-se que todos os parques registam valores muito acima dos VMR, no entanto dentro dos VMA.

**Tabela 7.** Parâmetros microbiológicos quantificados.

<b>Micologia</b>	
<b>Fungos leveduriformes</b>	<b>Fungos filamentosos potencialmente patogénicos</b>
<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Aspergillus sp</i>
	<i>Fusarium sp</i>
	<i>Cladosporium sp</i>
	<i>Alternaria sp</i>
	<i>Penicillium sp</i>
<b>Bacteriologia</b>	
Coliformes Totais	
Coliformes fecais	
Enterococos Fecais	

**Tabela 8.** Valores máximos recomendados (VMR) e Valores máximos admissíveis (VMA) referentes ao painel de microrganismos em estudo. Adaptado de (Brandão *et al.* 2011)

Parâmetros	VMR	VMA
Leveduras	3 ufc/g	60 ufc/g
Fungos potencialmente patogénicos	5 ufc/g	85 ufc/g
Dermatófitos	1 ufc/g	15 ufc/g
Coliformes totais	5 ufc/g	100 ufc/g
<i>Escherichia coli</i>	1 ufc/g	20 ufc/g
Enterococos fecais	1 ufc/g	20 ufc/g

No parque Alameda, os meses com maior percentagem de Coliformes isolados são Dezembro e Janeiro, a presença de Enterococos fecais é mais significativa nos meses de Dezembro a Maio (figura 13A). O facto de este parque estar totalmente exposto a raios solares poderá contribuir, em grande parte, para o decréscimo acentuado do número de bactérias presentes no solo registado a partir do mês de Março e até Agosto. Os resultados revelam situação semelhante na pesquisa de fungos, sendo que o número de ufc/g de *Candida albicans* encontra-se dentro dos VMA, excepto na segunda colheita do mês de Janeiro e primeira colheita do mês de Agosto (figura 13D). Poderá ter contribuído para este aumento, a percentagem de humidade no solo, uma vez que em ambas as colheitas ocorreu precipitação nos dias que se antecederam.

O parque Constantino, será no global dos parques analisados, o que apresenta os piores resultados quantitativos, com números elevados de ufc/g. Em relação ao padrão observado regista-se um ligeiro decréscimo no número de população bacteriana nos meses de Março, Abril e Agosto (figura 14A, 14B e 14C). Segundo a informação disponível, nestes meses ocorreu precipitação e as temperaturas médias diárias rondaram os 14 a 21 graus °C. Em comparação com os restantes meses não se encontra uma relação directa entre os fenómenos climatéricos e a diminuição da população bacteriana. Na pesquisa de fungos o padrão mantém-se, embora se altere ligeiramente e especificamente para a presença de *Candida albicans*, em que o declínio populacional se inicia logo no mês de Fevereiro (figura 14E). Das variáveis possíveis propostas neste estudo (precipitação, exposição solar, temperatura e contaminação via animal), nenhuma se enquadra como resposta a este fenómeno.

Em contraste com os restantes parques, o parque Eduardo VII apresenta os melhores resultados quantitativos com valores dentro dos VMA, revelando que os cuidados

aplicados nestas instalações são satisfatórios. No total das 18 colheitas, a primeira colheita de Agosto regista um aumento anómalo da população microbiana, provavelmente justificável pela ocorrência de precipitação, que conseqüentemente altera a percentagem de humidade do solo, que quando associado a valores de temperatura superiores a 20 °C, poderá reunir condições favoráveis para crescimento da população microbiana (figura 15A, 15B e 15C). Os resultados da pesquisa de fungos são semelhantes aos restantes parques, elevada percentagem de bolores e números mais razoáveis, por vezes perto dos VMA, na espécie *Candida albicans* (figura 15D e 15E).

No parque Amoreiras é possível observar um consenso de valores populacionais entre os Coliformes totais e fecais, com picos elevados nos meses de Dezembro e Julho, mais uma vez não foi possível relacionar as condições climatéricas com este fenómeno (figura 16<sup>a</sup> e 16B). No entanto as características físicas e ambientais deste parque são em muito semelhante às do parque Constantino, ambos partilham o facto da presença de um quiosque de refeições nas mediações do parque infantil, assim como a falta de luz solar directa. A população de Enterococos fecais regista grandes variações ao longo das 18 colheitas (figura 16C). Os resultados da pesquisa de fungos revelam um padrão estável com valores muito elevados, sendo o parque com maior número de ufc/g nestas espécies (figura 16D e 16E).

O parque Estrela já foi descrito como um local de características muito próprias, é um espaço que dispõem de uma equipa de manutenção que assegura a limpeza do parque infantil. Era expectável que os resultados traduzissem o facto de este parque se encontrar inserido num jardim com fauna e flora diversificada, com características que não se encontram noutra local da cidade. A análise dos resultados revela que a manutenção e limpeza do solo do parque são satisfatórias uma vez que os números de ufc/g de Coliformes totais e fecais embora registem valores elevados nos meses de Dezembro e Janeiro, tem um decréscimo acentuado nos meses seguintes à excepção da segunda colheita dos meses de Abril e Julho (figura 17A e 17B). Em relação a Enterococos fecais observa-se um padrão de diminuição populacional entre os meses de Dezembro a Abril, seguido de ausência total até ao mês de Agosto (figura 17C). A pesquisa de fungos apresenta variações ao longo das 18 colheitas (17D e 17E). Perante estes resultados mais uma vez não foi possível determinar o envolvimento das condições climatéricas.

O parque Ceuta contraria o que até agora foi demonstrado nos outros parques, registrando um acentuado aumento de Coliformes totais nos meses de Maio a Agosto, com a particularidade de ocorrer apenas na primeira colheita de cada mês, seguido de ausência total de Coliformes totais na colheita seguinte, excepto no mês de Julho (figura 18A). Nos Coliformes fecais e Enterococos fecais é possível observar dois picos de aumento populacional e nas restantes colheitas os valores são significativamente reduzidos chegando mesmo haver total ausência destas bactérias (figura 18B e 18C). Os fungos apresentam resultados semelhantes aos coliformes fecais mantendo um padrão de aumento da população a partir do mês de Março mantendo se estável com números elevados até Agosto (figura 18D e 18E).

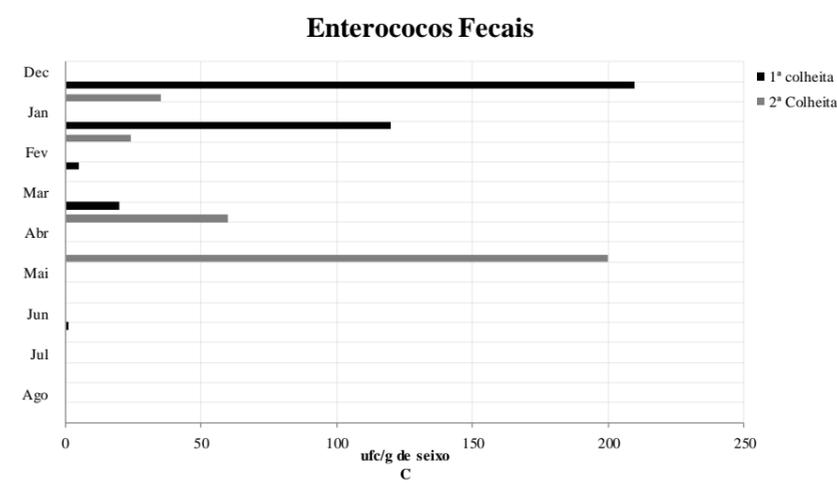
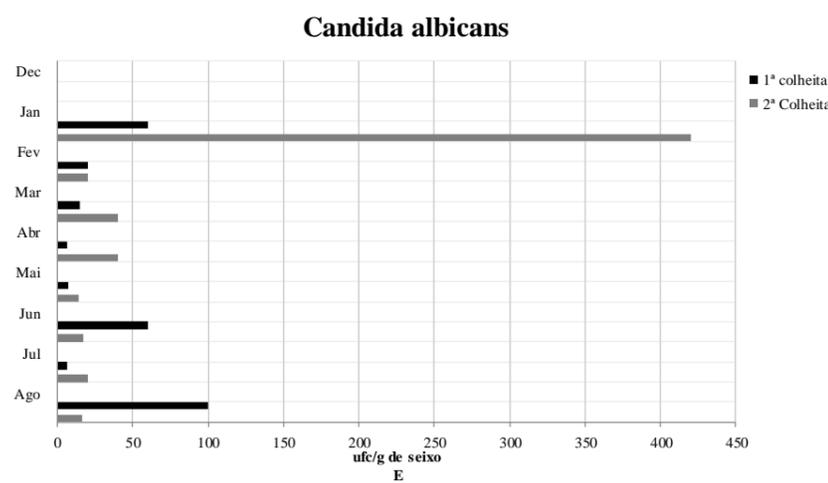
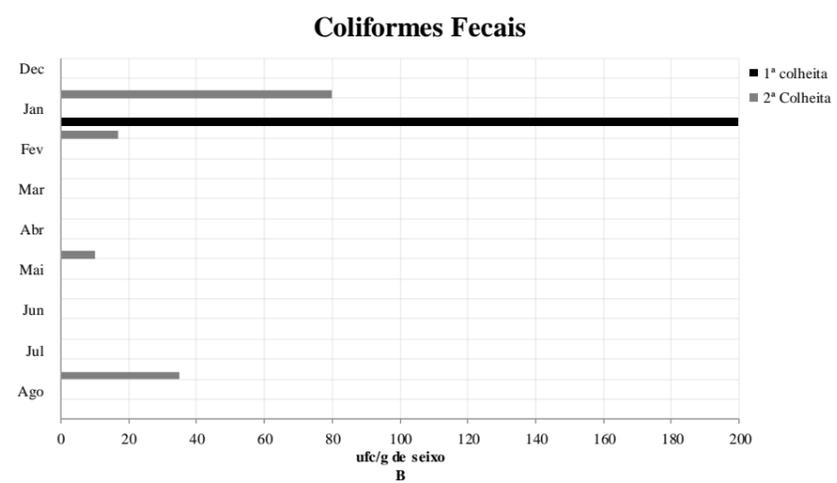
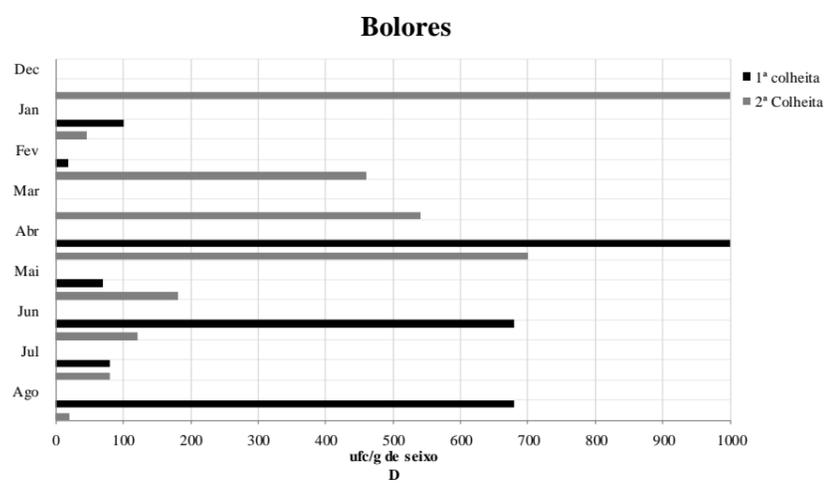
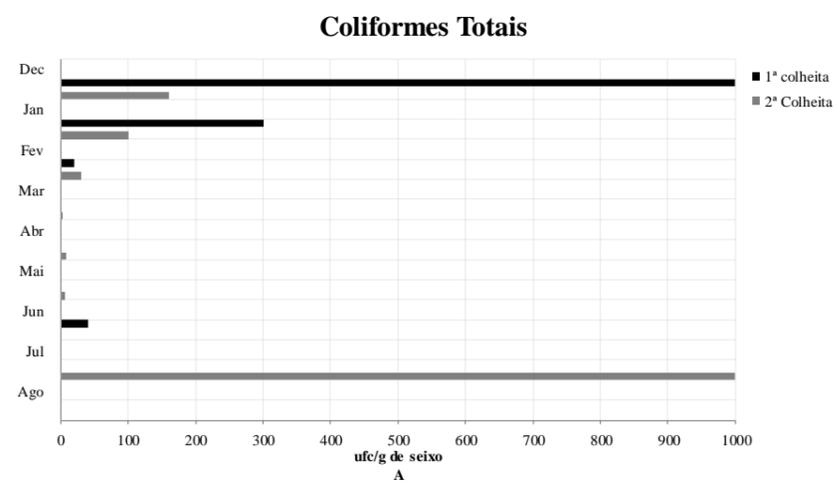


Figura 13. Resultado da análise Bacteriana no solo do parque infantil Alameda (A) (B) (C); Resultado da análise Micológica no solo do parque infantil Alameda (D) (E).

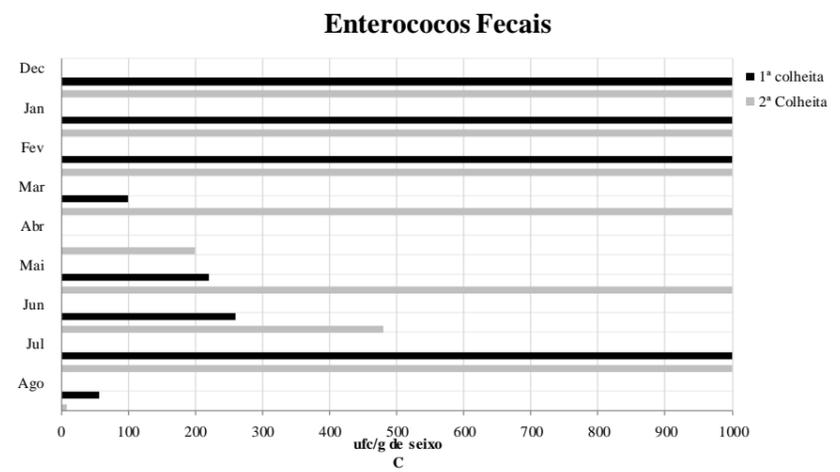
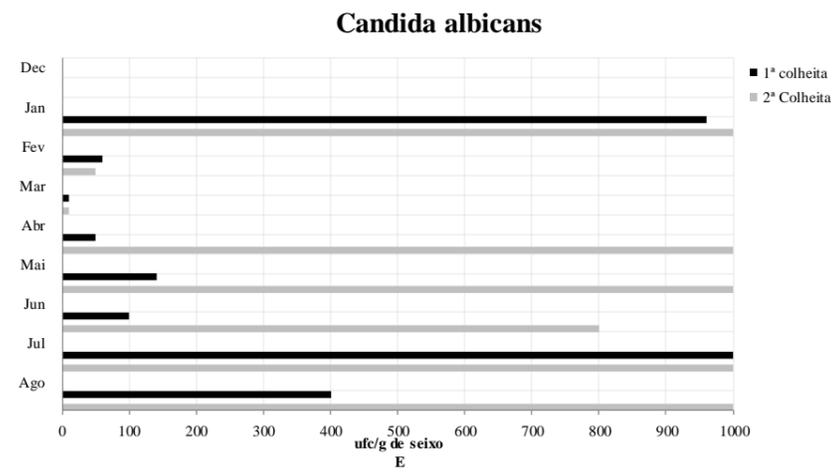
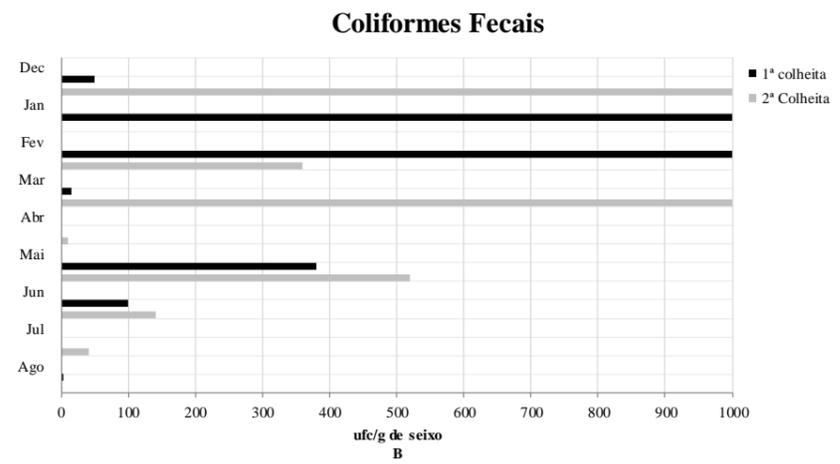
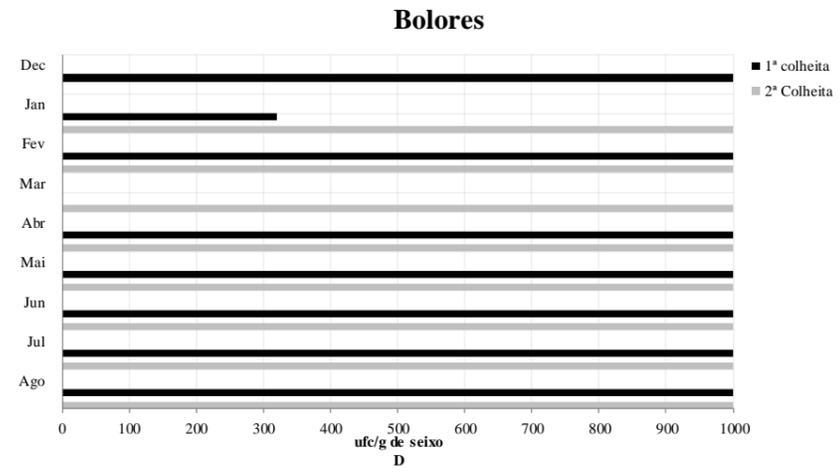
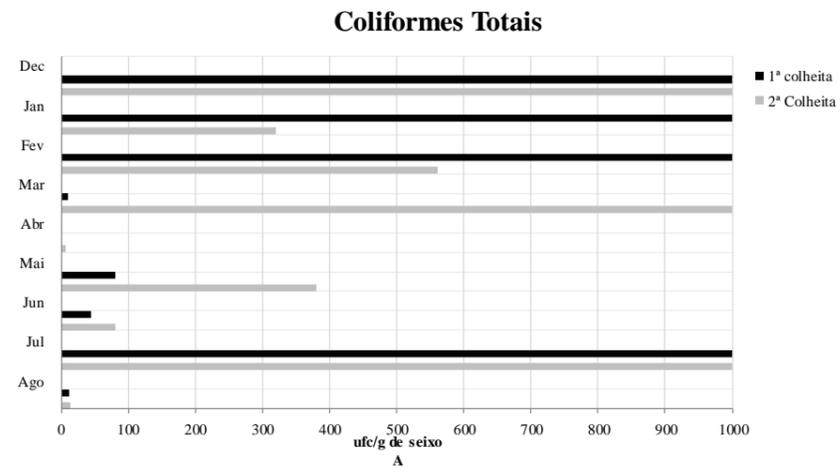
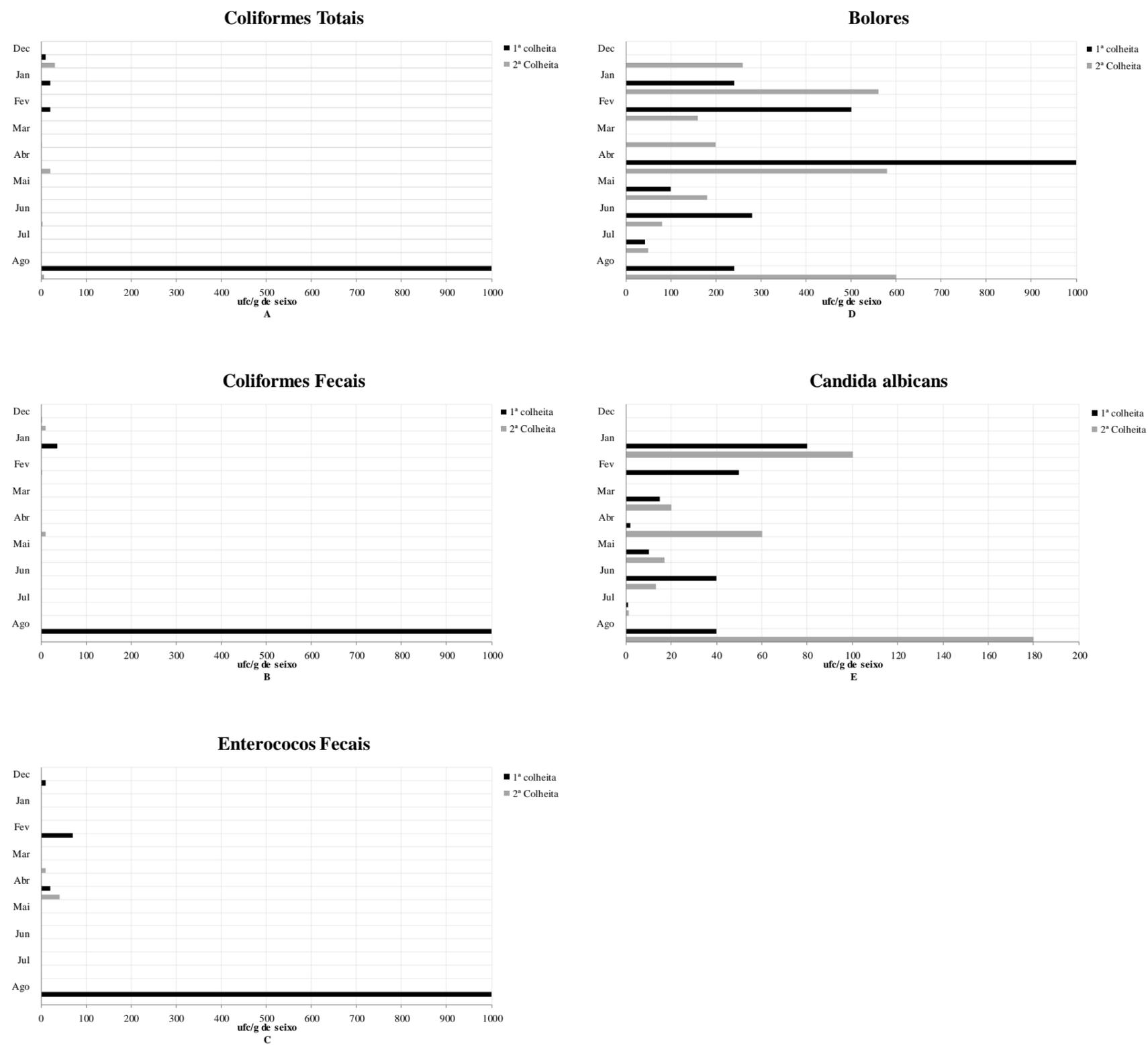


Figura 14. Resultado da análise Bacteriana no solo do parque infantil Constantino (A) (B) (C); Resultado da análise Micológica no solo do parque infantil Constantino (D) (E).



**Figura 15.** Resultado da análise Bacteriana no solo do parque infantil Eduardo VII (A) (B) (C); Resultado da análise Micológica no solo do parque infantil Eduardo VII (D) (E).

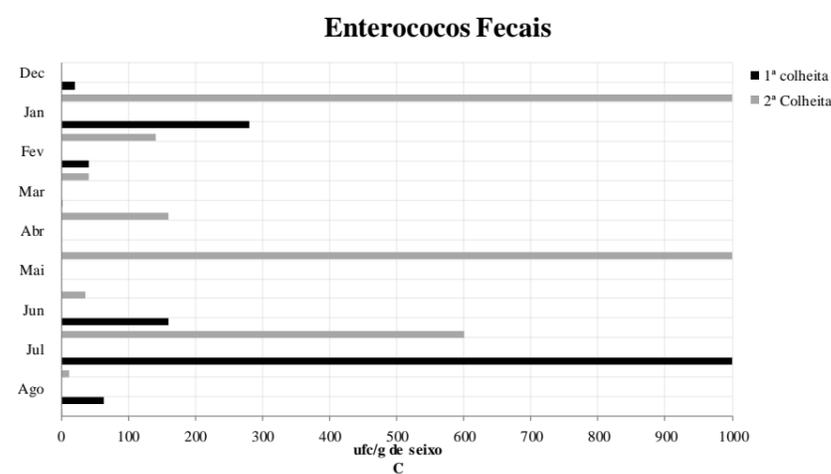
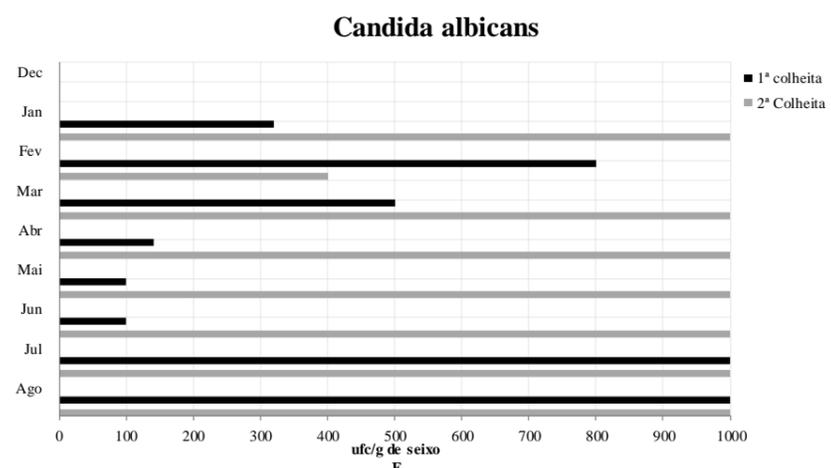
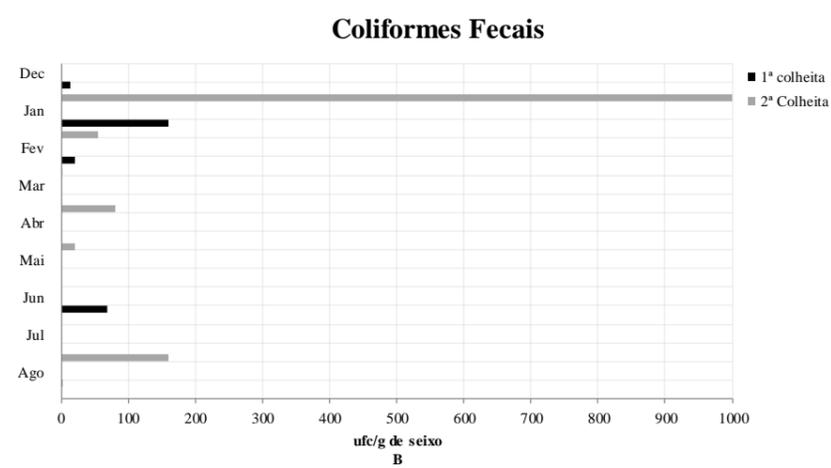
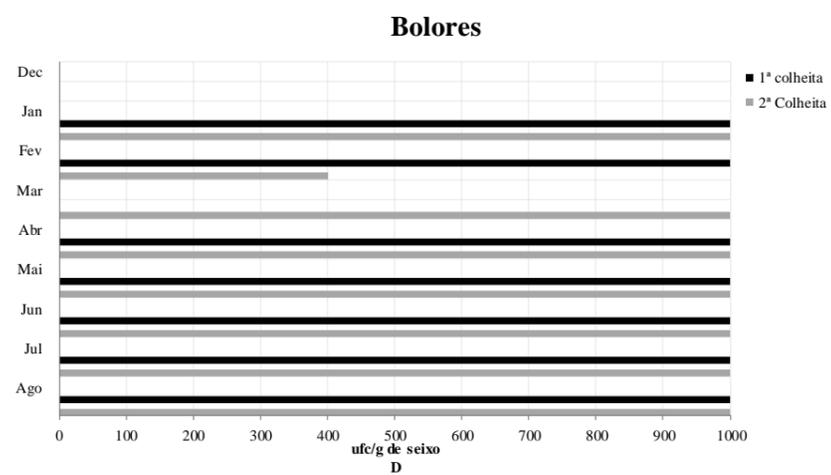
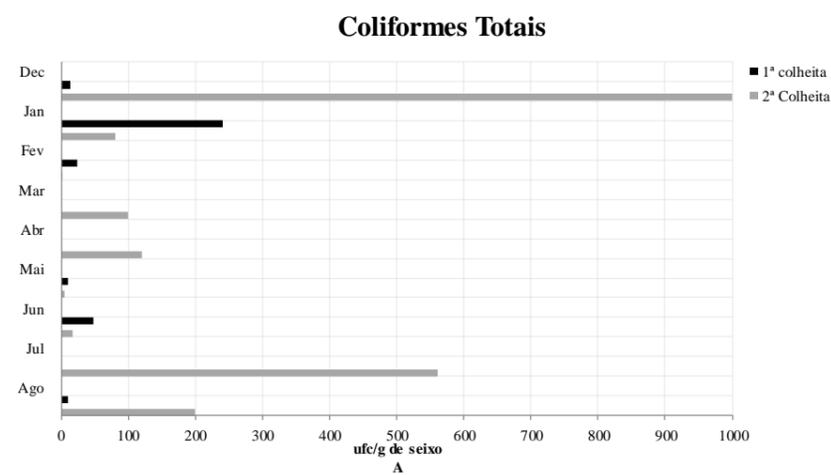


Figura 16. Resultado da análise Bacteriana no solo do parque infantil Amoreiras (A) (B) (C); Resultado da análise Micológica no solo do parque infantil Amoreiras (D) (E).

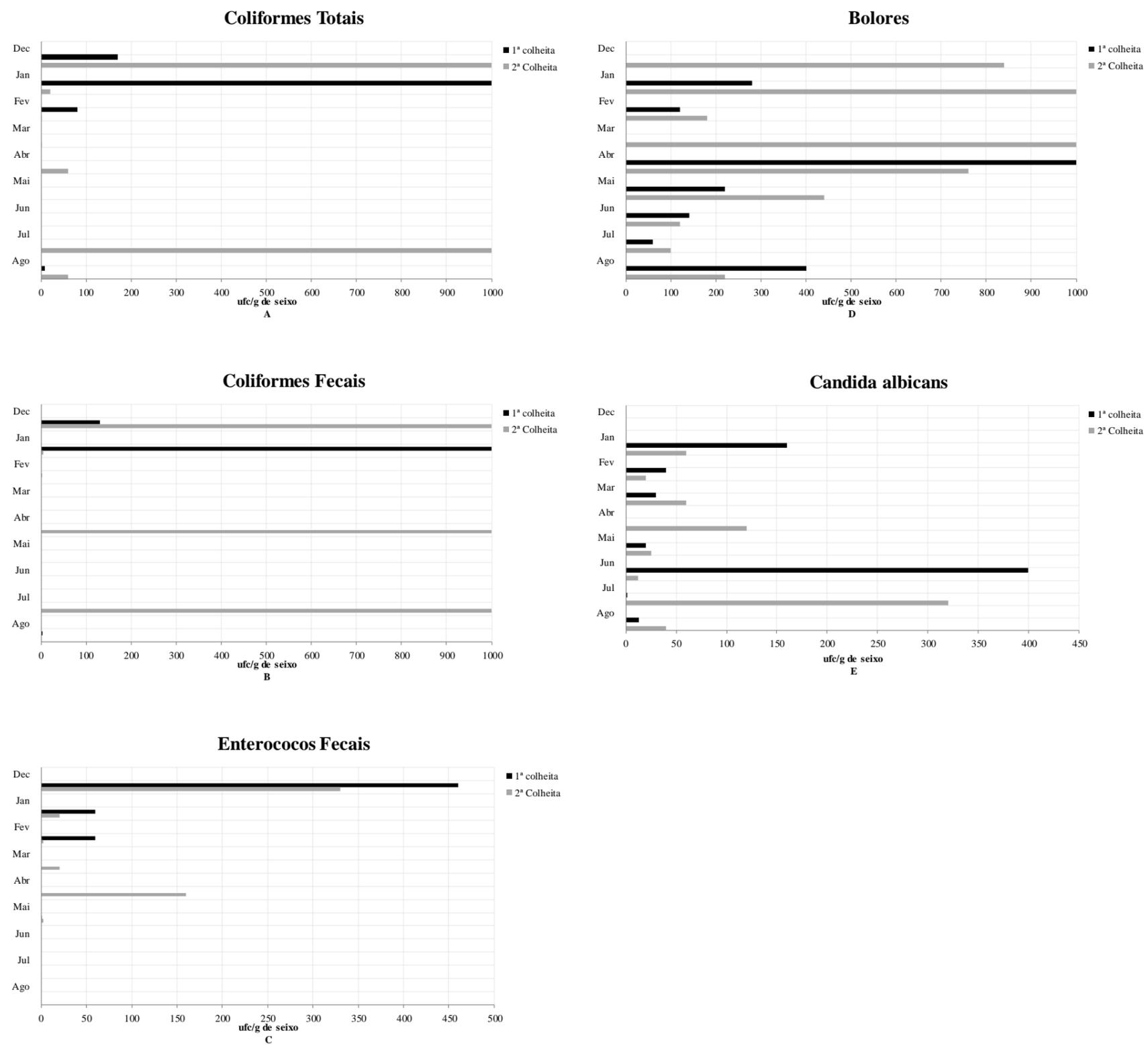
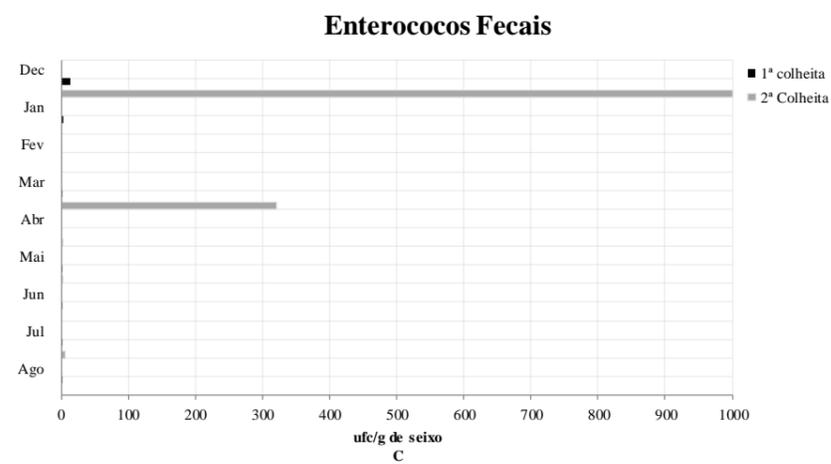
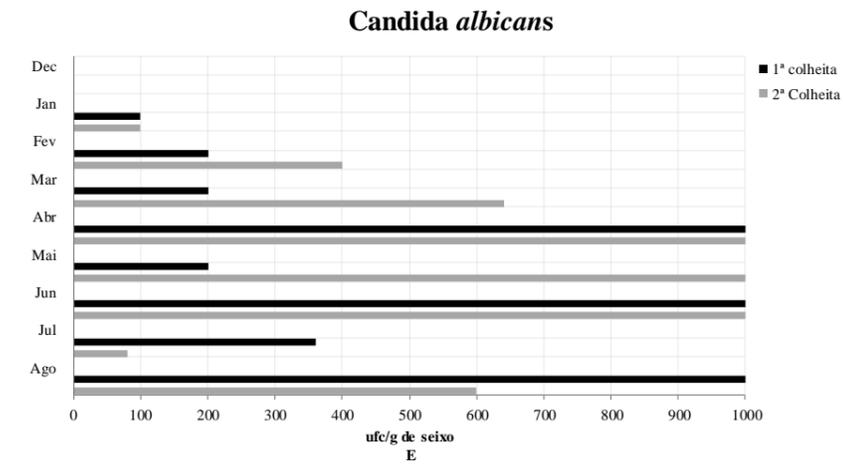
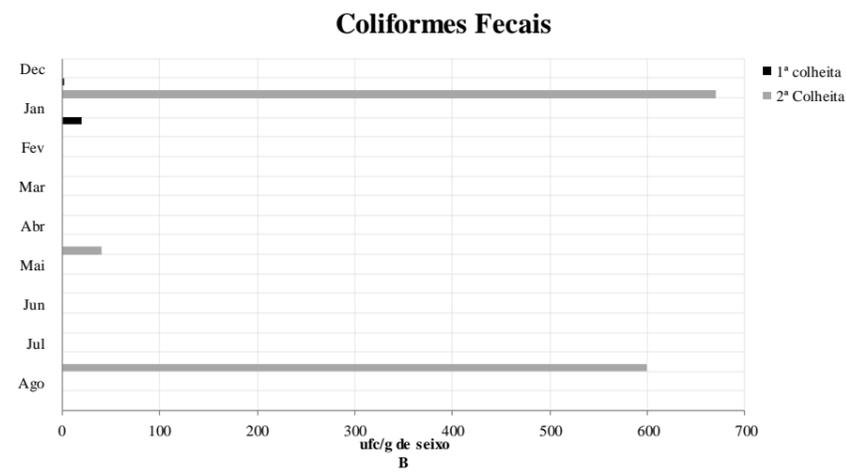
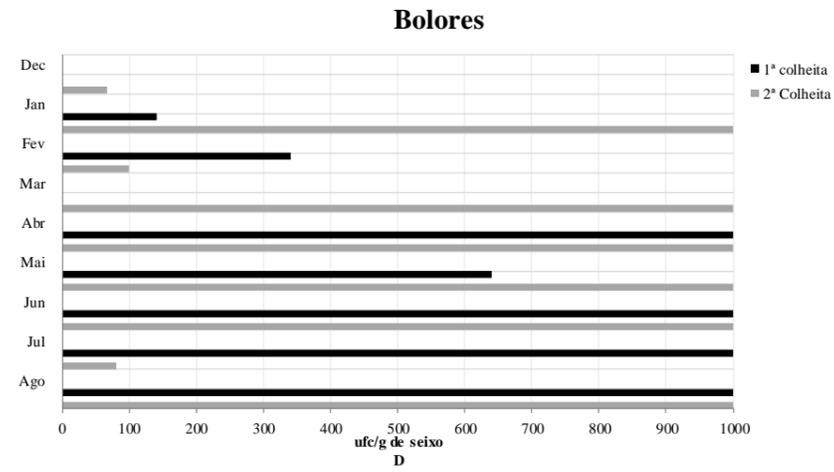
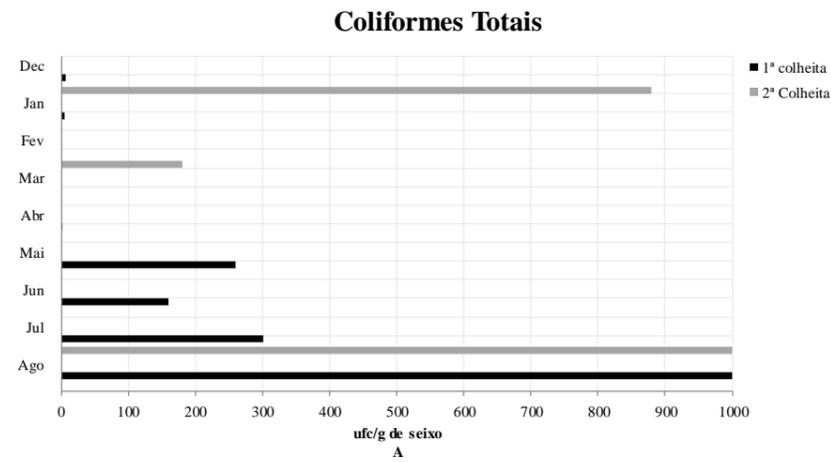


Figura 17. Resultado da análise Bacteriana no solo do parque infantil Estrela (A) (B) (C); Resultado da análise Micológica no solo do parque infantil Estrela (D) (E).



**Figura 18.** Resultado da análise Bacteriana no solo do parque infantil Ceuta (A) (B) (C); Resultado da análise Micológica no solo do parque infantil Ceuta (D) (E).

Alguns dos microrganismos isolados foram identificados. As bactérias foram identificadas através de testes API<sup>®</sup>, os fungos foram identificados recorrendo ao microscópio (tabela 9).

**Tabela 9.** Microrganismos isolados das amostras do solo dos seis parques infantis que foram identificados.

<b>Bactérias</b>	
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	<i>Lactococcus lactis spp</i>
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Micrococcus sp</i>
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	<i>Pontea</i>
<i>Butiauzella agrestis</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Citrobacter Koseri/ amalonaticus</i>	<i>Salmonella choleraesuis ssp arizonae</i>
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Serratia Ficaria</i>
<i>Citrobacter youngae</i>	<i>Serratia odorifera</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Enterobacter amnigenus</i>	<i>Staphylococcus lentus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
<i>Enterobacter intermedius</i>	<i>Klebsiella pneumoniae spp</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Kluyvera spp</i>
<i>E. coli</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia hermannii</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Escherichia vulneris</i>	
<i>Hafnia alvei</i>	
<b>Fungos</b>	
<i>Alternaria</i>	
<i>Aspergillus sp</i>	
<i>Aspergillus niger</i>	
<i>Candida albicans</i>	
<i>Fusarium</i>	
<i>Geotrichum</i>	
<i>Penicillium</i>	
<i>Mucor</i>	

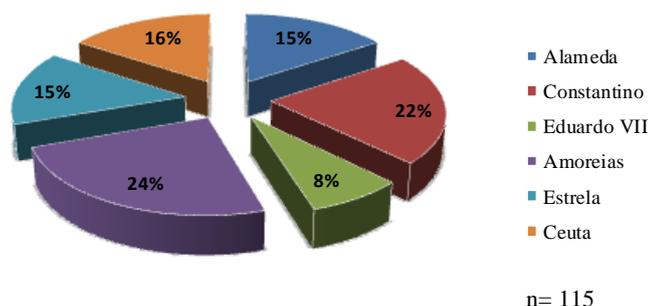
## 4. Pesquisa de resistência a agentes antimicrobianos

### 4.1. Ampicilina

Um dos objectivos propostos era determinar a presença de resistência a agentes antimicrobianos, para tal todas as bactérias isoladas foram submetidas a testes de sensibilidade com o antibiótico ampicilina. Num total de 18 colheitas, foram utilizadas 1224 placas de meio de cultura, das quais foram isoladas e identificadas 115 bactérias que apresentaram resistência à ampicilina.

O parque Amoreias regista o maior número de bactérias resistentes à ampicilina, seguido do parque Constantino. Provavelmente associado às características que ambos

os parques partilham; existência de um quiosque com serviço de refeições em esplanada, a poucos metros do parque, propício à concentração de aves que procuram alimento; o tipo de vedação ineficiente e facilmente transposto por animais; o meio envolvente e a densidade das copas árvores que não permite exposição solar; a falta de cuidado e higiene por parte dos utilizadores, associada à inexistente limpeza e manutenção do solo do parque infantil. Os parques Ceuta, Alameda e Estrela registam valores muito semelhantes. Dentro das características de cada local é possível determinar que a limpeza e manutenção do solo verificada no parque Estrela atenuam a contaminação, uma vez que este espaço se encontra inserido num jardim de grandes dimensões, que serve de habitat a diversas espécies de animais que coabitam ou frequentam o parque infantil. Os resultados obtidos na análise ao parque Eduardo VII eram expectáveis, uma vez que reúne boas condições de higiene, manutenção e segurança do espaço (figura 19).

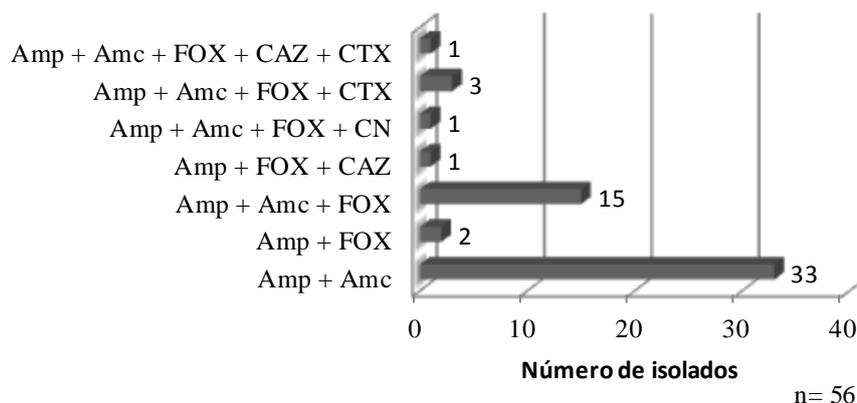


**Figura 19.** Distribuição, por parque infantil, da presença de microrganismos que apresentam resistência à Ampicilina.

#### 4.2. Antibiógrama

Foi posteriormente estudada a sensibilidade dos 115 isolados a outros antibióticos, para identificar a presença de resistências. Foram detectados 56 isolados que apresentaram resistência a 2 ou mais agentes microbianos (figura 20). Não foram considerados os isolados identificados como *Enterococcus faecium*, uma vez que este microrganismo é conhecido pela sua resistência intrínseca a muitos agentes antimicrobianos, tem também uma notável capacidade de adquirir resistência a outros antibióticos, tais como ciprofloxacina, eritromicina, tetraciclina, linezolid, vancomicina entre outros, sendo expectável os resultados obtidos (Tremblay *et al.* 2011).

## Susceptibilidade a Antibióticos



**Figura 20.** Número de bactérias isoladas com resistência a 2 ou mais antibióticos. Amp (ampicilina); Amc (amoxicilina + ácido clavulânico); FOX (cefoxitina); CAZ (ceftazidima); CTX (cefotaxima); CN (gentamicina);

Verifica-se que os padrões de resistência e multirresistência variam entre os parques (tabelas 10 a 15). O parque Eduardo VII destaca-se dos restantes apresentando os melhores resultados, com um reduzido número de isolados, sugerindo desde de início que a prevenção aplicada na limpeza e manutenção do solo resultam no decréscimo do número de bactérias e consequentemente no número de resistências (tabela 12).

**Tabela 10.** Multirresistências detectadas nas bactérias isoladas a partir das amostras proveniente do solo do parque infantil Alameda.

Identificação	Amp	Amc	FOX	CAZ	CIP	CN	CTX	IPM	E-Tst V
<i>Staphylococcus aureus</i>	R								
<i>E. coli</i> (3)	R	R							
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	R		R						
<i>Chryseobacter Indoligenes</i>	R	R	R						
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2)	R								
<i>Pontea spp3</i>	R	R							
<i>Enterobacter Cloacae</i>	R								
<i>Serratia Plymuthica</i>	R								
<i>Brevundimona vesicularis</i>	R		R	R					
<i>Acinotbacter</i>	R	R	R						
<i>Enterobacter</i>	R								
<i>Escherichia hermannii</i>	R	R							
<i>Enterobacter</i>	R	R							
<i>Citrobacter braakii</i>	R								
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R						

AMP (ampicilina em meio agar); AMC (amoxicilina + ácido clavulânico); FOX (cefoxitina); CAZ (ceftazidima); CIP (ciprofloxacina); CN (gentamicina); CTX (cefotaxima); IPM (imipenem); E-Tst V (E-teste Vancomicina). Só foram anotados os resultados de Resistente (R), quando o halo correspondia a um valor de Sensível ou Intermédio não foi considerado.

**Tabela 11.** Multirresistências detectadas nas bactérias isoladas a partir das amostras provenientes do solo do parque infantil Constantino

Identificação	Amp	Amc	FOX	CAZ	CIP	CN	CTX	IPM	E-Tst V
<i>E. coli</i> (7)	R	R							
<i>Enterococcus faecium</i>			R	R	R	R	R		
<i>E. coli</i> (4)	R								
<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	R							
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	R	R							
<i>Pontea spp3</i>	R								
<i>Citrobacter Freundii</i>	R								
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	R	R							
<i>E. coli</i>	R	R	R						
<i>Staphylococcus xylosus</i>	R								R
<i>Citrobacter braakii</i>	R	R	R				R	R	
<i>Enterococcus faecium</i>			R	R	R	R	R	R	
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R							
<i>Escherichia hermannii</i>	R	R							
<i>Escherichia vulneris</i>	R					R			
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R						

AMP (ampicilina em meio agar); AMC (amoxicilina + ácido clavulânico); FOX (cefoxitina); CAZ (ceftazidima); CIP (ciprofloxacina); CN (gentamicina); CTX (cefotaxima); IPM (imipenem); E-Tst V (E-teste Vancomicina). Só foram anotados os resultados de Resistente (R), quando o halo correspondia a um valor de Sensível ou Intermédio não foi considerado.

**Tabela 12.** Multirresistências detectadas nas bactérias isoladas a partir das amostras provenientes do solo do parque infantil Eduardo VII.

Identificação	Amp	Amc	FOX	CAZ	CIP	CN	CTX	IPM	E-Tst V
<i>Enterobacter cloacae</i> (2)	R	R	R						
<i>Enterococcus faecium</i>	R				R				
<i>Klebsiela oxytoca</i>	R								
<i>Enterococcus faecium</i>			R	R		R	R	R	R
<i>Staphylococcus xylosos</i>	R								
<i>E. coli</i> (2)	R	R							
<i>Aeromonas</i>	R	R							
<i>Hydrophila/caviae</i>									

AMP (ampicilina em meio agar); AMC (amoxicilina + ácido clavulânico); FOX (cefotaxima); CAZ (cefazidima); CIP (ciprofloxacina); CN (gentamicina); CTX (cefotaxima); IPM (imipenem); E-Tst V (E-teste Vancomicina). Só foram anotados os resultados de Resistente (R), quando o halo correspondia a um valor de Sensível ou Intermediário não foi considerado.

**Tabela 13.** Multirresistências detectadas nas bactérias isoladas a partir das amostras provenientes do solo do parque infantil Amoreiras.

Identificação	Amp	Amc	FOX	CAZ	CIP	CN	CTX	IPM	E-Tst V
<i>Rhizobium radiobacter</i>	R								
<i>Serratia odorifera</i>	R								
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	R	R							
<i>E. coli</i> (3)	R								
<i>Pseudomonas oryzae</i>	R	R	R						
<i>Staphylococcus xylosos</i>	R								
<i>Citrobacter braakii</i>	R	R							
<i>Salmonella choleraesuis</i>	R								
<i>Citrobacter braakii</i>	R								
<i>Vibrio vulnificus</i>	R								
<i>Escherichia hermannii</i>	R	R							
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R							
<i>Citrobacter braakii</i> (2)	R								
<i>Escherichia vulneris</i>	R								
<i>Citrobacter braakii</i>	R	R	R						
<i>Enterococcus Faecium</i>	R								
<i>Enterococcus faecium</i>			R	R		R	R		
<i>Enterobacter intermedius</i>	R	R							
<i>Citrobacter</i>									
<i>Koseri/amalonicus</i>	R								
<i>Enterobacter sakazakii</i>	R	R							
<i>Escherichia hermannii</i> (2)	R	R							
<i>Citrobacter freundii</i> (2)	R	R	R						
<i>E. coli</i>	R	R				S			

AMP (ampicilina em meio agar); AMC (amoxicilina + ácido clavulânico); FOX (cefotaxima); CAZ (cefazidima); CIP (ciprofloxacina); CN (gentamicina); CTX (cefotaxima); IPM (imipenem); E-Tst V (E-teste Vancomicina). Só foram anotados os resultados de Resistente (R), quando o halo correspondia a um valor de Sensível ou Intermediário não foi considerado.

**Tabela 14.** Multirresistências detectadas nas bactérias isoladas a partir das amostras provenientes do solo do parque infantil Estrela.

Identificação	Amp	Amc	FOX	CAZ	CIP	CN	CTX	IPM	E-Tst V
<i>Enterobacter cloacae</i>	R								
<i>E. coli</i> (3)	R								
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R			R			
<i>Buttiauxella agrestis</i>	R								
<i>Enterococcus faecalis</i>	R								
<i>Pseudomonas putida</i> (2)	R	R	R				R		
<i>Serratia ficaria</i>	R								
<i>Enterococcus faecium</i>			R	R	R	R	R		
<i>Staphylococcus lentus</i>	R								R
<i>Enterobacter sakazakii</i> / <i>E. coli</i>	R	R							
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	R								
<i>Serratia ficaria</i>	R								
<i>Enterococcus faecium</i>			R	R	R	R	R	R	
<i>E. coli/salmonella</i>	R	R	R						

AMP (ampicilina em meio agar); AMC (amoxicilina + ácido clavulânico); FOX (cefotaxima); CAZ (ceftazidima); CIP (ciprofloxacina); CN (gentamicina); CTX (cefotaxima); IPM (imipenem); E-Tst V (E-teste Vancomicina). Só foram anotados os resultados de Resistente (R), quando o halo correspondia a um valor de Sensível ou Intermédio não foi considerado.

**Tabela 15.** Multirresistências detectadas nas bactérias isoladas a partir das amostras provenientes do solo do parque infantil Alameda.

Identificação	Amp	Amc	FOX	CAZ	CIP	CN	CTX	IPM	E-Tst V
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	R			R		
<i>E. coli</i>	R								
<i>E. coli</i>	R	R							
<i>Citrobacter youngae</i>	R								
<i>Enterobacter sakazakii</i>	R	S	R				R		
<i>Enterococcus faecalis</i>	R		R	R	R	R	R		
<i>Citrobacter youngae</i>	R								
<i>Enterococcus faecium</i> (2)	R	R	R	R	R	R	R	R	
<i>Staphylococcus lentus</i>	R								R
<i>Buttiauxella agrestis</i>	R								
<i>Pseudomona luteada</i>	R								
<i>Enterobacter cloacae</i>	R								
<i>Pontea</i>	R	R	R						
<i>Enterococcus faecium</i>			R	R	R	R	R		
<i>Pontea</i>	R	R							
<i>Escherichia hermannii</i>	R	R							
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R						

AMP (ampicilina em meio agar); AMC (amoxicilina + ácido clavulânico); FOX (cefotaxima); CAZ (ceftazidima); CIP (ciprofloxacina); CN (gentamicina); CTX (cefotaxima); IPM (imipenem); E-Tst V (E-teste Vancomicina). Só foram anotados os resultados de Resistente (R), quando o halo correspondia a um valor de Sensível ou Intermédio não foi considerado.

### 4.3. Testes de Inibição de mecanismos de resistência a antibióticos

Para determinar os mecanismos de acção de resistência aos agentes antimicrobianos foram aplicados testes de inibição. Os ensaios foram realizados em isolados seleccionados, consoante a combinação de múltiplas resistências.

#### 4.3.1. Amc + FOX com adição de cloxacilina

A cloxacilina caracteriza-se por ser um antibiótico  $\beta$  – lactâmico do grupo das penicilinas, actua na síntese da parede bacteriana. Tem ainda a propriedade de inibir a acção da enzima AmpC impedindo assim a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico. Num total de 9 isolados analisados, 8 demonstram que a adição de cloxacilina inibiu o crescimento bacteriano, sugerindo a presença do gene AmpC. Apenas 1 isolado, identificado como *E. coli*, não apresentou reacção, mantendo o seu crescimento, o que poderá ser o resultado de uma sobre expressão do gene, uma vez que é possível identificar uma ligeira redução da população em redor do disco (figura 21) (Mirelis *et al.* 2006).



**Figura 21.** Ensaio com adição de 15 $\mu$ l cloxacilina aos discos de Amc (amoxicilina + ácido clavulânico) e FOX (cefoxitina), as setas indicam crescimento bacteriano com ligeira redução da população, não ocorreu inibição da AmpC.

#### 4.3.2. Amc + FOX + CTX com adição de cloxacilina

Dos 3 isolados analisados, quando adicionada cloxacilina a FOX e a CTX, apenas ocorreu inibição de crescimento do isolado identificado como *Citrobacter* (proveniente do solo do parque Ceuta), sugerindo a presença do gene AmpC. É de referir que houve crescimento de sub-populações dentro da área do halo, assinaladas por seta (figura 22).



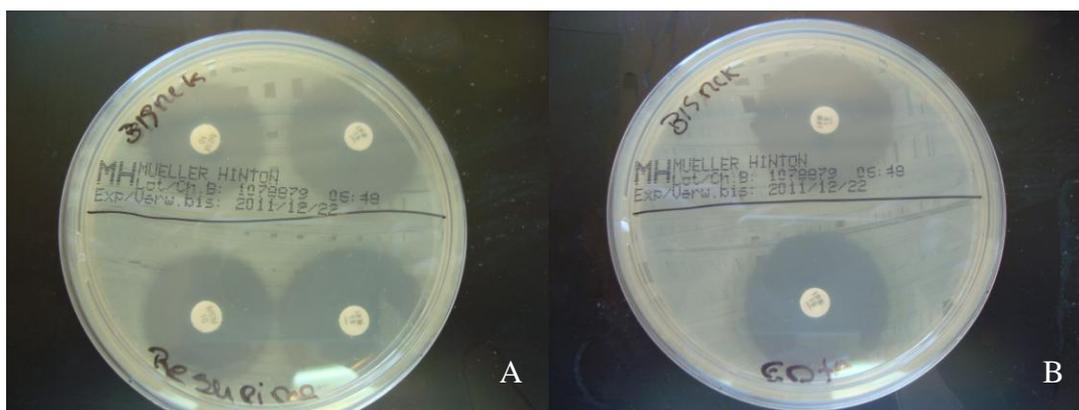
**Figura 22.** Ensaio com adição de 15µl cloxacilina aos discos de Amc (amoxicilina + ácido clavulânico), FOX (cefoxitina) e CTX (cefotaxima), observa-se inibição do crescimento bacterianos através do aumento do diâmetro do halo nos discos de FOX e CTX. As setas indicam a presença de sub-população na área do halo.

#### 4.3.3. IPM + MPM com adição de reserpine

Imipenem e meropenem são antibióticos com espectro de actividade muito amplo, resistentes a beta-lactamases e activos contra microrganismos Gram+/Gram- e anaeróbicos, (Infarmed 2010). O bombeamento activo de antimicrobianos do meio intracelular para o meio extracelular, denominado de efluxo activo, produz resistência bacteriana a determinados antimicrobianos. O composto reserpine actua na inibição das bombas de efluxo, (Chroma & Kolar 2010). Foi submetido a este ensaio o isolado identificado como *Citrobacter braaki*, proveniente do solo do parque infantil Constantino. Não se registam alterações no diâmetro do halo, sugerindo que o mecanismo de resistência apresentado por este microrganismo, não tem origem nas bombas de efluxo, mas sim em outro, sendo necessário proceder a outros ensaios para determinar qual (figura 23A).

##### 4.3.3.1. IPM com adição de EDTA

Quando se realizou o teste de inibição com o EDTA a única estirpe que apresentou um aumento do halo de inibição para o Imipenemo foi o *Citrobacter braaki*. Para confirmar o resultado apresentado foi efectuada nova análise como referido no ponto 4.3.3. Não foi possível reproduzir o resultado anterior, a estirpe apresentou sensibilidade aos antibióticos estudados (figura 23B), o que sugere que os genes estavam num plasmídeo que foi inibido durante o período de conservação da estirpe bacteriana



**Figura 23.** Teste de Inibição de bombas de efluxo com adição de 15µl de reserpine aos discos de IPM (Imipenem) e MPM (meropenem), não houve alteração no halo de inibição (A). Teste de inibição de Metalo –  $\beta$  – lactamases com adição de 15µl de EDTA (Ácido Etileno-Diamino Tetra-Acético) ao disco de IPM (Imipenem), não houve alteração no halo de inibição (B).

## 5. Análise Molecular

Após análise dos resultados anteriores, foram elaborados critérios para a selecção de isolados a serem sujeitos a análise molecular: o microrganismo escolhido deveria estar presente em todos os parques, distribuído por várias colheitas, apresentar 2 ou mais resistências a antibióticos e ter elevada percentagem de identificação nos testes bioquímicos. Deste modo foram seleccionados 17 isolados de *E.coli* com perfil de resistência a Ampicilina e Amoxicilina + ácido clavulâmico.

Os resultados obtidos sugeriam a presença de  $\beta$ -lactamases AmpC em *E. coli*, e nesse sentido optou-se por pesquisar o gene *EampC*, em detrimento de outros mecanismos de resistência presentes em outros isolados, e susceptíveis de resultados mais relacionados com a emergente disseminação de multirresistências.

### 5.1. Pesquisa do gene *EampC*

A técnica de PCR torna-se na ferramenta mais fácil de aplicar na detecção de  $\beta$ -lactamases, através da amplificação de todo o gene que codifica para as enzimas (gene *bla*), ou de partes específicas do gene através de oligonucleótidos específicos da zona alvo alvo. As sequências de genes estão disponíveis em bancos de dados públicos, como o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), (Chroma & Kolar 2010).

Das 17 amostras sujeitas a PCR, 4 deram resultados negativos e em 13 observou-se, no gel após electroforese, a banda acima dos 1000 pares de base (figura 18), correspondente ao gene EampC. Dessas amostras, 8 foram seleccionadas para sequenciação (tabela 15). Após análise das sequências, a amostra 3 foi excluída, uma vez que não reunia condições de utilização (tinha má qualidade).



**Figura 24.** Amplificação do gene EampC por PCR, a seta indica o local dos 1000 pb, as bandas acima dos 1000pb identificadas com algarismos correspondem às amostras de *E. coli*.

## 5.2. Análise das Sequências

Recorrendo ao programa Blast foi possível comparar as sequências das amostras com a sequência do gene EampC n.º AB108683. Todas revelaram uma elevada percentagem de homologia (tabela 16).

**Tabela 16.** Amostras submetidas a sequenciação e percentagem de homologia com sequência do gene EampC.

	Referência	% de Identificação	Parque
1	A02MCK	88%	Alameda
2	B05MCK	95%	Constantino
3	B22MCK	-	Constantino
4	C32MCK	87%	Eduardo VII
5	B032MCK	90%	Constantino
18	B18MCK	88%	Constantino
14	B032MCK	88%	Constantino
15	A006MCK	94%	Alameda

O alinhamento das sequências através do software ClustalW2 (Anexo II), permitiu comparar as amostras entre si, juntamente com a sequência de referência. Foi ainda adicionada uma sequência obtida através de bibliografia, da qual foram retirados os primers utilizados na reacção de PCR (Doi et al. 2004). Aquando do tratamento das sequências, recorrendo ao programa BioEdit, a parte inicial foi deletada entre 70 a 95 pb em todas as amostras (esta zona das sequências apresentava má qualidade). A sequenciação com o *primer forward* não permitiu a sequenciação integral do gene, e as sequências resultantes da sequenciação com o *primer reverse* revelaram-se de fraca qualidade, pelo que também o fim do gene não está presente (as sequencias têm entre 980 e 1070 pb). No entanto foi possível determinar que, quando comparada com a sequência original, as regiões que se encontram disponíveis para alinhamento, apresentam homologia confirmando a presença do gene *EampC* nestas bactérias, ou seja a presença em *E. coli* isoladas a partir do solo dos parques infantis.

Ao longo do alinhamento das sequências verificam-se deleções e substituições de nucleótidos. Para determinar se estas alterações têm expressão nas respectivas proteínas efectuou-se a tradução das sequências de nucleótidos, recorrendo ao programa informático Mega4. A análise do resultado revela alterações em um número considerável de codões. Segundo a literatura, esta proteína caracteriza-se pela presença de três assinaturas distintas, região de activação da  $\beta$ -lactamase, SVSK, na posição 80 a 84, a região conservada KTG na posição 311 a 333 e por último a região YXN ou YAN na posição 166 a 168 conhecida como classificadora da classe C (figura 25). Através da detecção das assinaturas genéticas conhecidas é possível afirmar que estamos na presença de *E. coli* que expressam a proteína “inhibitor-sensitive AmpC beta-lactamase”. No entanto, como terão ocorrido modificações nas bases, seria necessário efectuar estudos moleculares adicionais para detectar a origem, e quais as consequências que estas representam na função da proteína.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
E. coli EampC MFKTTLCTLL ITASCSTFAA PQQINDIVHR TITPLIEQQK IPGMAVAVIY
geneAmpC MFKTTLCTLL ITASCSTFAA PQQINDIVHR TITPL??QQK IPGMAVAVIY
15+EampcF -----? PQQINDIVHR TITPLIEQQK IPGMAVAVIY
5+EampcF ----- -?TPLIEQQK IPGMAVAVIY
14+EampcF ----- --?INDIVHR TITPLIEQQK IPGMAVAVIY
2+EampcF ----- ---INDIVHR TITPLIEQQK IPGMAVAVIY
4+EampcF ----- ---INDIEHR TLTPLEHQK IPGMAVAVIY
18+EampcF ----- ---HR TLTPLEQQK IPGMAVAVIY
1+EampcF ----- -?TPLIEQQK IPGMAVAVIY

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90          100
E. coli EampC QGKPYFTWG YADIAKKQPV TQQLFELGS VSKTFTGVLG GDAIARGEIK
geneAmpC QGKPYFTWG YADIAKKQPV TQQLFELGS VSKTFTGVLG GDAIARGEIK
15+EampcF QGKPYFTWG YADIAKKQPV TQQLFELGS VSKTFTGVLG GDAIARGEIK
5+EampcF QGKPYFTWG YADIAKKQPV TQQLFELGS VSKTFTGVLG GDAIARGEIK
14+EampcF QGKPYFTWG YADIAKKQPV TQQLFELGS VSKTFTGVLG GDAIARGEIK
2+EampcF QGKPYFTWG YADIAKKQPV TQQLFELGS VSKTFTGVLG GDAIARGEIK
4+EampcF QGKPYFTWG YADIAKKHPV TQQLFELGS VSKTFTGVLG GDAIARGEIK
18+EampcF QGKPYFTWG YADIAKKQPV TQQLFELGS VSKTFTGVLG GDAIARGEIK
1+EampcF QGKPYFTWG YADIAKKQPV TQQLFELGS VSKTFTGVLG GDAIARGEIK

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110         120         130         140         150
E. coli EampC LSDPTTKYWP ELTAKQWNGI TLLHLATYTA GGLPLQVPDE VKSSDLLRF
geneAmpC LSDPTTKYWP ELTAKQWNGI TLLHLATYTA GGLPLQVPDE VKSSDLLRF
15+EampcF LSDPTTKYWP ELTAKQWNGI TLLHLATYTT GGLPLQVPDE VKSSDLLRF
5+EampcF LSDPTTKYWP ELTAKQWNGI TLLHLATYTA GGLPLQVPDE VKSSDLLRF
14+EampcF LSDPTTKYWP ELTAKQWNGI TLLHLATYTA GGLPLQVPDE VKSSDLLRF
2+EampcF LSDPATKYWP ELTAKQWNGI TLLHLATYTA GGLPLQVPDD VKSSDLLRF
4+EampcF LSDPTTKYCP ELTAKQWNGI TLLHLATYTA GGLPLQVPDE VKSSDLLRF
18+EampcF LSDPTTKYWP ELTAKQWNGI TLLHLATYTA GGLPLQVPDE VKSSDLLRF
1+EampcF LSDPATKYWP ELTAKQWNGI TLLHLATYTA GGLPLQVPDD VKSSDLLRF

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160         170         180         190         200
E. coli EampC YQNWQPAWAP GTQRLYANSS IGLFGALAVK PSGLSFEQAM KTRVFQPLKL
geneAmpC YQNWQPAWAP GTQRLYANSS IGLFGALAVK PSGLSFEQAM KTRVFQPLKL
15+EampcF YQNWQPAWAP GTQRLYANSS IGLFGALAVK PSGLSFEQAM QTRVFQPLKL
5+EampcF YQNWQPAWAP GTQRLYANSS IGLFGALAVK PSGLSFEQAM QTRVFQPLKL
14+EampcF YQNWQPAWAP GTQRLYANSS IGLFGALAVK PSGLSFEQAM QTRVFQPLKL
2+EampcF YQNWQPAWAP GAQRLYANSS IGLFGALAVK PSGLSFEQAM QTRVFQPLKL
4+EampcF YQNWQPAWAP GTQRLYANSS IGLFGALAVK PSGLSFEQVM QTRVFQPLKL
18+EampcF YQNWQPAWAP GTQRLYANSS IGLFGALVVK PSGLSFEQVM QTRVFQPLKL
1+EampcF YQNWQPAWAP GAQRLYANSS IGLFGALAVK PSGLSFEQAM QTRVFQPLKL

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210         220         230         240         250
E. coli EampC NHTWINVPSA EEKNYAWGYR EGKAVHVSPR ALDAEAYGVK STIEDMARWV
geneAmpC NHTWINVPSA EEKNYAWGYR EGKAVHVSPR ALDAEAYGVK STIEDMARWV
15+EampcF NHTWINVPPA EEKNYAWGYR EGKAVHVSPG ALDAETYGVK STIEDMACWV
5+EampcF NHTWINVPPA EEKNYAWGYR EGKAVHVSPG ALDAETYGVK STIEDMACWV
14+EampcF NHTWINVPPA EEKNYAWGYR EGKAVHVSPG ALDAETYGVK STIEDMACWV
2+EampcF THTWINVPPA EEKNYAWGYR EGKAVHVSPG ALDAEAYGVK STIEDMGLLV
4+EampcF NHTWINVPPA EEKNYAWGYR ERKAVHVSPG PLDAETYGVK STIEDMACWV
18+EampcF NHTWINVPPP EEKNYAWGYR EGNVHVSPG VLDAEAYGVK STIEDMARWV
1+EampcF THTWINVPCA EEKNYAWGYR EGKAVHVSPG ALDAEAYGVK STIEDMARWV

```

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	260	270	280	290	300	
<i>E. coli EampC</i>	QSNLKPLDIN	EKTLQQGIQL	AQSRYWQTGD	MYQGLGWEML	DWPVNPDI II	
<i>geneAmpC</i>	QSNLKPLDIN	EKTLQQGIQL	AQSRYWQTGD	MYQGLGWEML	DWPVNPDI II	
<i>15+EampcF</i>	RSNLMHRDIN	DKTLQQGIQL	AQSRYWQTGD	MYQGLGWEML	DWPVNSDI IV	
<i>5+EampcF</i>	RSNLMNPRDIN	DKTLQQGIQL	AQSRYWQTGD	MYQGLGWEML	DWPVNPDS II	
<i>14+EampcF</i>	LSNMNPRDIN	DKTLQQGIQL	AQSRYWQTGD	MYQDLGWEML	DWPVNPDS II	
<i>2+EampcF</i>	QSSLKVR YIT	EKTLQQGIQL	AQSPIWQTGD	MYQGLGWEML	DWPVNPDI II	
<i>4+EampcF</i>	RSNLMNPLDIN	DKTLQQGIQL	AQSRYWQTGD	MYQDLGWEML	DCPVNPDS II	
<i>18+EampcF</i>	RSNLMNPRDIN	DKTLQQGIQL	AQSRYWQTGD	MYQGLGWEML	DWPVNPDS II	
<i>1+EampcF</i>	QSNLKPLDIT	EKTLQQGIQL	AQSRYWQTGD	MYQGLGWEML	DWPVNPDI II	
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	310	320	330	340	350	
<i>E. coli EampC</i>	N---NKIALA	ARPVKPI TPP	TPAVRASWVH	<u>KTGATGGFGS</u>	YVAFIPEKEL	
<i>geneAmpC</i>	N---NKIALA	ARPVKPI TPP	TPAVRASWVH	<u>KTGATGGFGS</u>	YVAFIPEKEL	
<i>15+EampcF</i>	KRSDNKIALP	AHPVKAI PPP	IPVIP?----	-----	-----	
<i>5+EampcF</i>	NGTVHKIALA	AHPVKAI TPP	TPAVRASWVH	<u>KTGATGGFGS</u>	YVAFIPEKEL	
<i>14+EampcF</i>	NGSGNKIALA	APPVKAI TPP	TPAVRASWVH	<u>KTGATGGFGS</u>	YVAFIPEKEL	
<i>2+EampcF</i>	NGSDNKIALA	GKPVKAI TPP	TPAVRASWVH	<u>KTGATGGFGS</u>	YVAFNPEKEL	
<i>4+EampcF</i>	NGSGNKIALP	AHPVKAI TPP	TPAVRASWVH	<u>KTGATGGFGS</u>	YVAFIPEKEL	
<i>18+EampcF</i>	NGSGNKIALA	ARPVKAI TPP	TPAVRASWVH	<u>KTGATGGFGS</u>	YVAFIPEKEL	
<i>1+EampcF</i>	NGSDNKIALA	ARPVKAI TPP	TPAVRASWVH	<u>KTGATGGFGS</u>	YVAFIPEKEL	
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	360	370				
<i>E. coli EampC</i>	GIVMLANKNY	PNPARVAAAW	QILNALQ*			
<i>geneAmpC</i>	GIVMLANKNY	PNPARVAAAW	QILNALQ*			
<i>15+EampcF</i>	-----	-----	-----			
<i>5+EampcF</i>	GIVML?----	-----	-----			
<i>14+EampcF</i>	GIGP-----	-----	-----			
<i>2+EampcF</i>	GIVML-----	-----	-----			
<i>4+EampcF</i>	GS?-----	-----	-----			
<i>18+EampcF</i>	GIVML?----	-----	-----			
<i>1+EampcF</i>	GI?-----	-----	-----			

Figura 25. Alinhamento da proteína inibitor-sensitive AmpC beta-lactamase. As regiões sublinhadas correspondem ao local activação da  $\beta$ -lactamase (SVSK), região conservada (KTG), e *class C motif* (YAN). *E. coli EampC* - sequência da proteína BAC99094.1( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>). *geneAmpC* – Sequência editada da literatura (Doi et al. 2004); *15+EampcF*, *5+EampcF*, *14+EampcF*, *2+EampcF*, *4+EampcF*, *18+EampcF*, *1+EampcF* – Sequência das amostras de *E. coli* isolada nos solos dos parques infantis.

## **6. Biocida**

Em paralelo com o estudo proposto neste trabalho, mas fora dos objectivos do mesmo, foi realizado um ensaio para determinar a acção/efeito do uso de um biocida como desinfectante do solo (Marrow et al. 2009) Em primeiro lugar foi comprovada a eficiência da actividade biocida de um composto usualmente utilizado com essa função. O produto utilizado tem por base o iodo, e o ensaio foi conduzido em conformidade com a norma AFNOR T 72-152 de Abril de 2006. Os resultados revelaram que o composto se encontrava de acordo com as especificações da norma, ou seja era eficaz a destruir os microrganismos. O ensaio foi efectuado com estirpes de referência indicadas pela norma, e também com alguns dos microrganismos isolados dos parques durante este trabalho. Em segundo foram analisadas amostras dos mesmos parques após a desinfecção e verificou-se que os números de ufc/g dos vários microrganismos quantificados reduziram drasticamente, descendo para valores dentro dos recomendados pela Associação Bandeira Azul da Europa (ABAE) e pela Agência Portuguesa do Ambiente (APA), para as areias das praias balneares.

É importante referir que para a análise ao solo dos parques, que decorreu entre o mês de Dezembro de 2010 e Agosto de 2011, não foi efectuada qualquer tipo de limpeza ou lavagem ao seixo que cobre toda a área dos parques infantis. Após estas datas foram realizadas colheitas entre os meses de Setembro a Dezembro de 2011, período que corresponde ao início do tratamento do solo dos parques, efectuado por uma empresa especializada nessa área, que consiste em lavar o seixo com o produto com acção biocida.

O Laboratório de Microbiologia Aplicada Egas Moniz, disponibilizou para consulta, os resultados obtidos nesse ensaio, para que fosse possível comparar e comprovar a eficiência que traduz a aplicação deste processo de manutenção, reduzindo assim a presença do número de microrganismos potencialmente patogénicos num recinto frequentado por crianças, prevenindo a disseminação destes agentes por outros locais. Ao consultar os dados fornecidos foi possível constatar uma melhoria acentuada da qualidade do solo, reduzindo a presença de população microbiana para valores recomendados ou admissíveis, (Anexo III).

## Discussão

Este estudo teve como objectivo inicial identificar e quantificar a presença de microrganismos patogénicos presentes no solo de parques infantis, das análises realizadas ao seixo, matéria que compõe o solo dos parques, foi possível determinar que este material confere aos microrganismos um ambiente propício ao seu desenvolvimento, podendo ser considerado um reservatório ambiental de agentes patogénicos.

A pesquisa foi direccionada para coliformes totais, coliformes fecais, enterococos fecais, fungos e especificamente *candida albicans*, microrganismos considerados como indicadores de qualidade do solo. Estes parâmetros foram determinados em concordância com os utilizados na monitorização de areias balneares em praias portuguesas.

As variações no número de população microbiana registadas ao longo dos meses, indicam que as condições meteorológicas condicionam o crescimento microbiano, a ocorrência de precipitação, o aumento da temperatura média e a exposição solar afecta directamente o desenvolvimento da população. São vários os autores que relacionam os efeitos das condições climáticas com a presença de microrganismo no meio ambiente, nomeadamente no solo. É imprescindível conhecer as características do solo, determinar as alterações que cada evento climático provoca, ter um registo detalhado desses eventos, e aplicar esses dados a cada espécie, no sentido que os fungos tem maior afinidade para meios húmidos e as bactérias para meios secos (Rodrigues et al. 2011).

Ao longo dos meses foram observadas variações nos valores de ufc/g no solo dos parques infantis, com colheitas a registar números na ordem de  $10^3$  ufc/g de coliformes totais e coliformes fecais, quando o VMA é de 100 ufc/g para coliformes totais e 20 ufc/g para *E. coli*. Nos enterococos fecais os resultados são semelhantes com valores variáveis entre  $10^3$  ufc/g e ausência total, os VMA para estes microrganismos são de 20 ufc/g. Em comparação com os VMA registados para a região Lisboa e Vale do Tejo, no relatório de monitorização de areias de praias, nos meses de Verão os parques infantis registam de igual modo VMA, justificável pelas condições meteorológicas (Brandão et al. 2011).

Como foi referido anteriormente em Portugal não há registo de estudos realizados em parques infantis, como tal é necessário recorrer a extrapolação de estudos realizados em outros países.

Um estudo realizado a caixas de areia inseridas em zonas de recreio infantil quantificou a presença de coliformes fecais, os autores obtiveram variações de valores médios entre  $50^3$  ufc/g e  $1.3^3$  ufc/g, este estudo teve a duração de 10 dias consecutivos a origem destas variações não foi determinada (Carabin et al. 1998). De igual modo não foi possível determinar a origem do padrão de variações na população microbiana, apresentado em determinadas colheitas no solo dos parques, que variam entre ausência total de ufc/g a  $10^3$  ufc/g de coliformes e fungos.

A origem da contaminação microbiana é de difícil detecção, sendo os parques infantis locais ao ar livre, é possível afirmar que a exposição a animais domésticos ou de rua, é um dos factores a ter em consideração, assim como o meio envolvente (Carabin et al. 1998) (Morais 2009). Foram detectados microrganismos patogénicos em todos os parques, com maior prevalência no grupo de Coliformes fecais, revelando o risco que estes microrganismos representam para saúde pública, com foco na população infantil utente destes espaços públicos (Shah *et al.* 2011).

Ainda de acordo com os objectivos deste estudo foi detectada a presença de microrganismo portadores de multirresistência a antibióticos, 115 isolados revelaram ser resistentes à ampicilina, dos quais 56 apresentaram resistência a 2 ou mais antibióticos. A combinação de Amp com Amc apresenta o maior número de microrganismos resistentes, 33 no total, seguida da combinação entre Amp, Amc e FOX com 15 microrganismo resistentes. Da selecção de 17 *E. coli* com perfil de resistência a Amp e Amc, foi detectada a presença do gene EampC em 7, que confere resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos De acordo com Guenther e Ewers, houve um aumento do número de estudos onde se descreve a prevalência de *E. coli* resistente a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, no meio ambiente, com disseminação à escala mundial, patronizada pela contaminação de animais selvagens. Como medida preventiva recomenda-se a administração prudente de antibióticos na medicina humana e veterinária (Guenther *et al.* 2011)(Ewers *et al.* 2012).

## **Conclusão**

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se a presença de agentes microbianos patogênicos para os humanos, portadores de múltiplas resistências a antibióticos, no solo dos parques infantis sujeitos análise.

Considerando que os parques infantis são estruturas criadas para servir a população infantil, no âmbito social de providenciar a esta faixa etária condições de recreio seguras, é explícita a necessidade de se cumprir o estipulado por lei, no sentido de controlar estes locais e providenciar manutenção adequada.

Perante os resultados obtidos, antes e após o tratamento com o biocida, sugere-se que sejam implementadas normas de higienização do solo, de forma a combater a disseminação das espécies patogênicas para o homem, assim como prevenir um contínuo aumento da resistência a agentes antimicrobianos presentes no meio ambiente.

É necessário ter presente que a multirresistência é um problema à escala mundial, para o qual não se tem resposta de terapêutica clínica, nem se prevê num futuro imediato a actualização de compostos terapêuticos. Torna-se assim urgente educar a população no sentido de minimizar os efeitos adversos que acções diárias praticadas pelo homem provocam no meio ambiente no âmbito da Saúde.

## Bibliografia

- Araújo, N. da S., Rodrigues, C.T. & Cury, M.C., 2008. Helminths in sandboxes in day care centers in the city of Uberlândia, Minas Gerais. *Revista de Saúde Pública*, 42(1), pp.150–153. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102008000100021&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102008000100021&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt) [Accessed November 13, 2012].
- Barza, M. & Travers, K., 2002. Excess infections due to antimicrobial resistance: the “Attributable Fraction”. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34 Suppl 3, pp.S126–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988883> [Accessed March 10, 2011].
- Batie, S.S. et al., 1993. *Soil and Water Quality: An Agenda for Agriculture*, Washington: The National Academies Press.
- Boehm, A.B. et al., 2010. Faecal indicator bacteria enumeration in beach sand: a comparison study of extraction methods in medium to coarse sands. *NIH Public Access*, 107(5), pp.1740–1750.
- Brancroft, J., 2002. *Theory and practice of histological techniques*,
- Brandão, J. et al, 2011. *Monitorização da Qualidade das Areias em Zonas Balneares*,
- Braunwald, E. et al., 2002. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 15th Editi. E. Braunwald et al, eds., McGraw-Hill Companies.
- Bruggen, A.H.C. & Semenov, A.M., 2000. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology*, 15(1), pp.13–24. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00068-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00068-8) [Accessed March 20, 2013].
- Bush, K., Jacoby, G.A. & Medeiros, A.A., 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(6), pp.1211–33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=162717&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 13, 2012].
- Carabin, H. et al., 1998. Comparison of methods of sampling for *Toxocara* species and fecal coliforms in an outdoor day care environment. *The Canadian journal of infectious diseases = Journal canadien des maladies infectieuses*, 9(3), pp.149–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3250911&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 9, 2013].
- Chambers, H.F. & Deleo, F.R., 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature reviews. Microbiology*, 7(9), pp.629–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680247>.

- Chroma, M. & Kolar, M., 2010. Genetic methods for detection of antibiotic resistance: focus on extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 154(4), pp.289–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21293539>.
- Couto, Miguel, et al, 2011. *ATLAS CLIMÁTICO IBÉRICO*,
- Davies, J., 2006. Are antibiotics naturally antibiotics? *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 33(7), pp.496–9. Available at: <http://www.springerlink.com/content/0667t684u1432mgw/> [Accessed August 18, 2010].
- Davies, J. & Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 74(3), pp.417–33. Available at: <http://mmbbr.asm.org/content/74/3/417.full> [Accessed September 12, 2013].
- Dias, A.P., 2007. *Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental*,
- Doi, Y. et al., 2004. Inhibitor-sensitive AmpC beta-lactamase variant produced by an *Escherichia coli* clinical isolate resistant to oxyiminocephalosporins and cephamycins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(7), pp.2652–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=434168&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 4, 2012].
- Eldor A., P., 2007. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry* Third Edit. P. Eldor A., ed., Elsevier.
- Ewers, C. et al., 2012. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(7), pp.646–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22519858>.
- Ferreira, W. & Sousa, J.C., 1998. *Microbiologia Volume I*, Lisboa: LIDEL - Edições Técnicas LDA.
- Finch, R.G. et al., 2010. *Antibiotic and Chemotherapy (Google eBook)*, Elsevier Health Sciences. Available at: <http://books.google.com/books?id=DE4Mxc3aesEC&pgis=1> [Accessed September 12, 2013].
- Furuya, E.Y. & Lowy, F.D., 2006. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature reviews. Microbiology*, 4(1), pp.36–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16357859> [Accessed August 22, 2010].
- Garvey, C., 1977. *Brincar* 2<sup>o</sup> ed. Salamandra, ed.,

- GmbH, B.D. & BD Diagnostic Systems, 2003. BD Baird-Parker Agar. , pp.186–187. Available at: <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/PT-PA-255084.pdf>.
- Goossens, H. et al., 2005. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*, 365(9459), pp.579–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15708101> [Accessed May 10, 2013].
- Guenther, S., Ewers, C. & Wieler, L.H., 2011. Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution? *Frontiers in microbiology*, 2, p.246. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3244693&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 6, 2012].
- Halliday, E. & Gast, R.J., 2012. Bacteria in beach sands: an emerging challenge in protecting coastal water quality and bather health. , 45(2), pp.370–379.
- Huang, N., 2005. Antibiotic prescribing by ambulatory care physicians for adults with nasopharyngitis, URIs, and acute bronchitis in Taiwan: a multi-level modeling approach. *Family Practice*, 22(2), pp.160–167. Available at: <http://fampra.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/22/2/160> [Accessed March 2, 2011].
- Infarmed, 2010. *Prontuário Terapêutico INFARMED*, ed.,
- Jacoby, G.A., 2009. AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 22(1), pp.161–82, Table of Contents. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2620637&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 10, 2012].
- Levy, S.B. & Marshall, B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10(12 Suppl), pp.S122–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15577930> [Accessed March 10, 2011].
- Lipsitch, M. & Samore, M.H., 2002. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. *Emerging infectious diseases*, 8(4), pp.347–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2730242&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lupo, A., Coyne, S. & Berendonk, T.U., 2012. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Frontiers in microbiology*, 3, p.18. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3266646&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 19, 2012].
- Marrow, J. et al., 2009. Prevalence and antibiotic-resistance characteristics of *Enterococcus* spp. Isolated from free-living and captive raptors in Central Illinois.

- Journal of wildlife diseases*, 45(2), pp.302–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19395740> [Accessed February 26, 2013].
- McGowan, J.E., 2006. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *The American journal of medicine*, 119(6 Suppl 1), pp.S29–36; discussion S62–70. Available at: [http://www.amjmed.com/article/S0002-9343\(06\)00345-7/abstract](http://www.amjmed.com/article/S0002-9343(06)00345-7/abstract) [Accessed October 28, 2010].
- Mirelis, B. et al., 2006. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 24(6), pp.370–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16792938> [Accessed April 20, 2012].
- Morais, J.A., 2009. Zoonoses emergentes em Portugal: Epidemiologia e Clínica. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 5, pp.95–114.
- Moya, J., Mujica, O. & Hentzy, G., 2010. Saúde e doença na população. In *Módulos de Principios de Epidemiología para el Control de Enfermedades*. Washington, p. 47.
- Nacional, C., 2009. *Diário da República*, 1.<sup>a</sup> série — N.º 96 — 19 de Maio de 2009,
- Nature, 2010. Standing up to antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12), pp.836–836. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2484> [Accessed March 8, 2011].
- Percival, S.L., Knottenbelt, D.C. & Cochrane, C.A., 2011. *Biofilms and Veterinary Medicine*, Springer. Available at: <http://www.springer.com/life+sciences/microbiology/book/978-3-642-21288-8>.
- Pérez-Llarena, F.J. & Bou, G., 2009. Beta-lactamase inhibitors: the story so far. *Current medicinal chemistry*, 16(28), pp.3740–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747143> [Accessed March 8, 2011].
- Quality, W. & Board, C., 2011. Distribution of Fecal Indicator Bacteria along the Malibu , California , Coastline. *U.S. Geological Survey, California Water Science Center*. Available at: <http://pubs.usgs.gov/of/2011/1091/pdf/ofr20111091.pdf>.
- Reynolds, K.A. et al., 2005. Occurrence of bacteria and biochemical markers on public surfaces. *International journal of environmental health research*, 15(3), pp.225–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16134485> [Accessed November 15, 2012].
- Rodrigues, H.J.B. et al., 2011. Variabilidade quantitativa de população microbiana associada às condições microclimáticas observadas em solo de floresta tropical úmida. *Revista Brasileira de Meteorologia*, 26(4), pp.629–638. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-77862011000400012&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-77862011000400012&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) [Accessed August 27, 2013].

- Santos, N., 2004. Sanidade dos animais selvagens – importância, especificidade e exemplos em Portugal. *RPCV Supl 126*, pp.17–28. Available at: [http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf6\\_2004/550\\_17\\_28.pdf](http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf6_2004/550_17_28.pdf).
- Schaechter, M., 1999. *Mechanisms of Microbial Disease* 3rd ., Lippincott Williams & Wilkins.
- Schmitt, H. et al., 2006. Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: microcosm and field studies. *Microbial ecology*, 51(3), pp.267–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16598633> [Accessed February 1, 2011].
- SENAC/ DN, 2001. *MANUAL de elementos de apoio para o Sistema APPCC*, Rio de Janeiro: SENAC/DN. Available at: <http://www.ead.sebrae.com.br/premios/BPSA/5/elementos-apoio-sistema-appcc.pdf>.
- Shah, a H. et al., 2011. Indicator microbes correlate with pathogenic bacteria, yeasts and helminthes in sand at a subtropical recreational beach site. *Journal of applied microbiology*, 110(6), pp.1571–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21447014> [Accessed September 9, 2013].
- Singer, R.S., Ward, M.P. & Maldonado, G., 2006. Can landscape ecology untangle the complexity of antibiotic resistance? *Nature reviews. Microbiology*, 4(12), pp.943–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109031>.
- Sommer, M.O.A., Church, G.M. & Dantas, G., 2010. The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. *Landes Bioscience*, (August), pp.299–303.
- Stokes, H.W. & Hall, R.M., 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular microbiology*, 3(12), pp.1669–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2560119> [Accessed March 10, 2011].
- Swaminathan, B., Barrett, T.J. & Fields, P., 2006. Surveillance for human Salmonella infections in the United States. *Journal of AOAC International*, 89(2), pp.553–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16640306> [Accessed March 10, 2011].
- Tenover, F.C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, 119(6 Suppl 1), pp.S3–10; discussion S62–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735149> [Accessed March 10, 2011].
- Tortora, G.J., Funke, B.R. & Case, C.L., 2008. *Microbiologia* 8ª edição., São Paulo: Artmed.
- Tremblay, C.-L. et al., 2011. Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from cecal contents in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Canada and plasmid colocalization of tetO and ermB genes. *Journal*

- of food protection*, 74(10), pp.1639–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004810> [Accessed September 14, 2013].
- Unicef, 1990. *A Convenção sobre os Direitos da Criança*,
- Visser, S. & Parkinson, D., 1992. Soil biological criteria as indicators of soil quality: Soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture*, 7(1-2), pp.33–37. Available at: [http://journals.cambridge.org/abstract\\_S0889189300004434](http://journals.cambridge.org/abstract_S0889189300004434) [Accessed March 26, 2013].
- Watanabe, T., 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriological reviews*, 27, pp.87–115. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=441171&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 18, 2010].
- WHO, 2013. WHO | Guidelines for safe recreational water environments. , 1, pp.118–127. Available at: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/bathing/srwe1/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/srwe1/en/) [Accessed September 10, 2013].
- Wright, G.D., 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature reviews. Microbiology*, 5(3), pp.175–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17277795> [Accessed July 30, 2010].
- Yamahara, K.M. et al., 2012. Occurrence and persistence of bacterial pathogens and indicator organisms in beach sand along the California coast. *Applied and environmental microbiology*, 78(6), pp.1733–45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3298156&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 7, 2012].
- Yim, G., Wang, H.H. & Davies, J., 2007. Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 362(1483), pp.1195–200. Available at: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/content/abstract/362/1483/1195> [Accessed July 16, 2010].
- Zaffiri, L., Gardner, J. & Toledo-Pereyra, L.H., 2012. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*, 25(2), pp.67–77. Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/08941939.2012.664099> [Accessed September 12, 2013].
- Zilli, J.É. et al., 2003. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 20. Available at: <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/cct/article/view/8751/4927>.

# Anexos

## Anexo I

Registo da ocorrência de precipitação nas semanas em que foram realizadas colheitas

2010	Eventos	2010	Eventos	2011	Eventos
29 Nov	Nevoeiro, Chuva	10 Dez		7 Jan	Chuva
30	Nevoeiro, Chuva, Granizo, Trovoada	11		8	Chuva, Trovoada
01 Dez	Chuva, Trovoada	12	Nevoeiro, Chuva	9	Chuva
02	Chuva	13	Nevoeiro	10	Chuva
03	Chuva	14	Nevoeiro	11	
2011	Eventos	2011	Eventos	2011	Eventos
21 Jan		05 Fev	Nevoeiro	24 Fev	
22		06	Chuva	25	Nevoeiro
23	Chuva	07	Chuva	26	
24	Chuva	08	Chuva	27	
25	Chuva	09	Chuva	28	
2011	Eventos	2011	Eventos	2011	Eventos
20 Mar		26 Mar	Chuva	16 Abr	
21		27	Chuva	17	
22		28	Chuva	18	Chuva, Trovoada
23		29	Chuva	19	Chuva, Trovoada
24		30		20	Chuva
2011	Eventos	2011	Eventos	2011	Eventos
28 Abr	Chuva	07 Mai	Chuva, Trovoada	20 Mai	
29	Chuva, Trovoada	08		21	
30	Chuva, Trovoada	09		22	
01 Mai	Chuva	10		23	Trovoada
02	Chuva	11		24	
2011	Eventos	2011	Eventos	2011	Eventos
04 Jun	Chuva	25 Jun		08 Jul	
05		26		09	
06	Chuva	27		10	
07	Chuva	28		11	
08		29		12	
2011	Eventos	2011	Eventos	2011	Eventos
22 Jul		30 Jul		26 Ago	
23		31		27	
24		01 Ago	Chuva	28	
25		02	Chuva	29	
26		03		30	

## Anexo II

Alinhamento de seqüências.

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
		10	20	30	40	50
<i>E. coli EampC</i>	ATGTTCAAAA	CGACGCTCTG	CACCTTATTA	ATTACCGCCT	CTTGCTCCAC	
<i>geneAmpC</i>	ATGTTCAAAA	CGACGCTCTG	CACCTTATTA	ATTACCGCCT	CTTGCTCCAC	
<i>15+EampcF</i>	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>5+EampcF</i>	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>14+EampcF</i>	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>2+EampcF</i>	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>4+EampcF</i>	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>18+EampcF</i>	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>1+EampcF</i>	-----	-----	-----	-----	-----	
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
		60	70	80	90	100
<i>E. coli EampC</i>	ATTTGCCGCC	CCTCAACAAA	TCAACGATAT	TGTGCATCGC	ACAATTACCC	
<i>geneAmpC</i>	ATTTGCCGCC	CCTCAACAAA	TCAACGATAT	TGTGCATCGC	ACAATTACCC	
<i>15+EampcF</i>	-----C	CCTCAACAAA	TCAACGATAT	TGTGCATCGC	ACAATTACCC	
<i>5+EampcF</i>	-----	-----	-----	-----	----TTACCC	
<i>14+EampcF</i>	-----	-----AA	TCAACGATAT	TGTGCATCGC	ACAATTACCC	
<i>2+EampcF</i>	-----	-----A	TCAACGATAT	TGTGCATCGC	ACAATTACCC	
<i>4+EampcF</i>	-----	-----A	TCAACGATAT	TGAGCATCGC	ACTCTTACCC	
<i>18+EampcF</i>	-----	-----	-----	----CATCGC	ACTCTTACCC	
<i>1+EampcF</i>	-----	-----	-----	-----	----TTACCC	
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
		110	120	130	140	150
<i>E. coli EampC</i>	CGCTTATAGA	GCAACAAAAG	ATCCCCGGTA	TGGCGGTAGC	GGTAATTTAT	
<i>geneAmpC</i>	CGCTTAT---	GCAACAAAAG	ATCCCCGGTA	TGGCGGTAGC	GGTAATTTAT	
<i>15+EampcF</i>	CGCTTATAGA	GCAACAAAAG	ATCCCCGGTA	TGGCGGTGGC	GGTAATTTAT	
<i>5+EampcF</i>	CGCTTATAGA	GCAACAAAAG	ATCCCCGGTA	TGGCGGTGGC	GGTAATTTAT	
<i>14+EampcF</i>	CGCTTATAGA	GCAACAAAAG	ATCCCCGGTA	TGGCGGTGGC	GGTAATTTAT	
<i>2+EampcF</i>	CGCTTATAGA	GCAACAAAAG	ATCCCCGGTA	TGGCGGTGGC	GGTAATTTAT	
<i>4+EampcF</i>	CGCTTATAGA	GCATCAAAAAG	ATCCCCGGTA	TGGCGGTGGC	GGTAATTTAT	
<i>18+EampcF</i>	CGCTTATAGA	GCAACAAAAG	ATCCCCGGTA	TGGCGGTGGC	GGTAATTTAT	
<i>1+EampcF</i>	CGCTTATAGA	GCAACAAAAG	ATCCCCGGTA	TGGCGGTGGC	GGTAATTTAT	
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
		160	170	180	190	200
<i>E. coli EampC</i>	CAGGGTAAAC	CTTATTACTT	TACCTGGGGC	TATGCGGACA	TCGCCAAAAA	
<i>geneAmpC</i>	CAGGGTAAAC	CTTATTACTT	TACCTGGGGC	TATGCGGACA	TCGCCAAAAA	
<i>15+EampcF</i>	CAGGGTAAAC	CTTATTACTT	TACCTGGGGC	TATGCGGACA	TCGCCAAAAA	
<i>5+EampcF</i>	CAGGGTAAAC	CTTATTACTT	TACCTGGGGC	TATGCGGACA	TCGCCAAAAA	
<i>14+EampcF</i>	CAGGGTAAAC	CTTATTACTT	TACCTGGGGC	TATGCGGACA	TCGCCAAAAA	
<i>2+EampcF</i>	CAGGGCAAAC	CTTATTACTT	TACCTGGGGC	TATGCGGACA	TCGCCAAAAA	
<i>4+EampcF</i>	CAGGGTAAAC	CTTATTACTT	TACCTGGGGC	TATGCGGACA	TCGCCAAAAA	
<i>18+EampcF</i>	CAGGGTAAAC	CTTATTACTT	TACCTGGGGC	TATGCGGACA	TCGCCAAAAA	
<i>1+EampcF</i>	CAGGGTAAAC	CTTATTACTT	TACCTGGGGC	TATGCGGACA	TCGCCAAAAA	

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	210	220	230	240	250
<i>E. coli EampC</i>	GCAGCCCGTC	ACACAGCAAA	CGTTGTTTGA	GTTAGGTTTCG	GTCAGCAAAA
<i>geneAmpC</i>	GCAGCCCGTC	ACACAGCAAA	CGTTGTTTGA	GTTAGGTTTCG	GTCAGCAAAA
<i>15+EampcF</i>	GCAGCCCGTC	ACACAGCAAA	CGTTGTTTGA	GTTAGGTTTCG	GTCAGCAAAA
<i>5+EampcF</i>	GCAGCCCGTC	ACACAGCAAA	CGTTGTTTGA	GTTAGGTTTCG	GTCAGCAAAA
<i>14+EampcF</i>	GCAGCCCGTC	ACACAGCAAA	CGTTGTTTGA	GTTAGGTTTCG	GTCAGCAAAA
<i>2+EampcF</i>	GCAGCCCGTC	ACACAGCAAA	CGTTGTTTGA	GTTAGGTTTCG	GTCAGCAAAA
<i>4+EampcF</i>	GCATCCCGTC	ACACAGCAAA	CTTTGTTTGA	GTTAGGTTTCG	GTCAGCAAAA
<i>18+EampcF</i>	GCAGCCCGTC	ACACAGCAAA	CGTTGTTTGA	GTTAGGTTTCG	GTCAGCAAAA
<i>1+EampcF</i>	GCAGCCCGTC	ACACAGCAAA	CGTTGTTTGA	GTTAGGTTTCG	GTCAGCAAAA

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	260	270	280	290	300
<i>E. coli EampC</i>	CATTTACGGG	CGTGCTTGGT	GGCGACGCTA	TTGCTCGAGG	GGAAATCAAG
<i>geneAmpC</i>	CATTTACGGG	CGTGCTTGGT	GGCGACGCTA	TTGCTCGAGG	GGAAATCAAG
<i>15+EampcF</i>	CATTTACGGG	CGTGCTTGGT	GGCGACGCTA	TTGCTCGAGG	GGAAATCAAG
<i>5+EampcF</i>	CATTTACGGG	CGTGCTTGGT	GGCGACGCTA	TTGCTCGAGG	GGAAATCAAG
<i>14+EampcF</i>	CATTTACGGG	CGTGCTTGGT	GGCGACGCTA	TTGCTCGAGG	GGAAATCAAG
<i>2+EampcF</i>	CATTTACGGG	CGTACTTGGT	GGCGACGCTA	TTGCTCGAGG	GGAAATCAAG
<i>4+EampcF</i>	CATTTACGGG	CGTGCTTGGT	GGCGACGCTA	TTGCTCGAGG	GGAAATCAAG
<i>18+EampcF</i>	CATTTACGGG	CGTGCTTGGT	GGCGACGCTA	TTGCTCGAGG	GGAAATCAAG
<i>1+EampcF</i>	CATTTACGGG	CGTACTTGGT	GGCGACGCTA	TTGCTCGAGG	GGAAATCAAG

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	310	320	330	340	350
<i>E. coli EampC</i>	TTAAGCGATC	CCACAACAAA	ATACTGGCCT	GAACTTACCG	CTAAACAGTG
<i>geneAmpC</i>	TTAAGCGATC	CCACAACAAA	ATACTGGCCT	GAACTTACCG	CTAAACAGTG
<i>15+EampcF</i>	TTAAGCGATC	CCACAACAAA	ATACTGGCCT	GAACTTACCG	CTAAACAGTG
<i>5+EampcF</i>	TTAAGCGATC	CCACAACAAA	ATACTGGCCT	GAACTTACCG	CTAAACAGTG
<i>14+EampcF</i>	TTAAGCGATC	CCACAACAAA	ATACTGGCCT	GAACTTACCG	CTAAACAGTG
<i>2+EampcF</i>	TTAAGCGATC	CCGCGACAAA	ATACTGGCCT	GAACTTACCG	CTAAACAATG
<i>4+EampcF</i>	TTAAGCGATC	CCACAACAAA	ATACTGTCCT	GAACTTACCG	CTAAACAGTG
<i>18+EampcF</i>	TTAAGCGATC	CCACAACAAA	ATACTGGCCT	GAACTTACCG	CTAAACAGTG
<i>1+EampcF</i>	TTAAGCGATC	CCGCGACAAA	ATACTGGCCT	GAACTTACCG	CTAAACAATG

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	360	370	380	390	400
<i>E. coli EampC</i>	GAATGGGATC	ACACTATTAC	ATCTCGCAAC	CTACACCGCT	GGCGGCCTGC
<i>geneAmpC</i>	GAATGGGATC	ACACTATTAC	ATCTCGCAAC	CTACACCGCT	GGCGGCCTGC
<i>15+EampcF</i>	GAATGGGATC	ACACTATTAC	ATCTCGCAAC	CTACACTACT	GGCGGCCTGC
<i>5+EampcF</i>	GAATGGGATC	ACACTATTAC	ATCTCGCAAC	CTACACTGCT	GGCGGCCTGC
<i>14+EampcF</i>	GAATGGGATC	ACACTATTAC	ATCTCGCAAC	CTACACTGCT	GGCGGCCTGC
<i>2+EampcF</i>	GAATGGGATC	ACACTATTAC	ATCTTGGCAG	CTACACCGCT	GGCGGCCTGC
<i>4+EampcF</i>	GAATGGGATC	ACACTATTAC	ATCTCGCAAC	CTACACTGCT	GGCGGCCTGC
<i>18+EampcF</i>	GAATGGGATC	ACACTATTAC	ATCTCGCAAC	CTACACTGCT	GGCGGCCTGC
<i>1+EampcF</i>	GAATGGGATC	ACACTATTAC	ATCTTGGCAG	CTACACCGCT	GGCGGCCTGC

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	410	420	430	440	450
<i>E. coli EampC</i>	CATTGCAGGT	GCCGGATGAG	GTGAAATCCT	CAAGCGACTT	GCTGCGCTTC
<i>geneAmpC</i>	CATTGCAGGT	GCCGGATGAG	GTGAAATCCT	CAAGCGACTT	GCTGCGCTTC
<i>15+EampcF</i>	CATTGCAGGT	GCCGGATGAG	GTGAAATCCT	CAAGCGACTT	GCTGCGCTTC
<i>5+EampcF</i>	CATTGCAGGT	GCCGGATGAG	GTGAAATCCT	CAAGCGACTT	GCTGCGCTTC
<i>14+EampcF</i>	CATTGCAGGT	GCCGGATGAG	GTGAAATCCT	CAAGCGACTT	GCTGCGCTTC
<i>2+EampcF</i>	CATTGCAGGT	GCCGGATGAC	GTAAAATCCT	CAAGCGACTT	GCTGCGCTTC
<i>4+EampcF</i>	CATTGCAGGT	GCCGGATGAG	GTGAAATCCT	CAAGCGACTT	GCTGCGCTTC
<i>18+EampcF</i>	CATTGCAGGT	GCCGGATGAG	GTGAAATCCT	CAAGCGACTT	GCTGCGCTTC
<i>1+EampcF</i>	CATTGCAGGT	GCCGGATGAC	GTAAAATCCT	CAAGCGACTT	GCTGCGCTTC

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	460	470	480	490	500
<i>E. coli EampC</i>	TATCAAAACT	GGCAGCCTGC	ATGGGCTCCA	GGAACACAAC	GTCTGTATGC
<i>geneAmpC</i>	TATCAAAACT	GGCAGCCTGC	ATGGGCTCCA	GGAACACAAC	GTCTGTATGC
<i>15+EampcF</i>	TATCAAAACT	GGCAGCCTGC	ATGGGCGCCA	GGAACACAAC	GTCTGTATGC
<i>5+EampcF</i>	TATCAAAACT	GGCAGCCTGC	ATGGGCGCCA	GGAACACAAC	GTCTGTATGC
<i>14+EampcF</i>	TATCAAAACT	GGCAGCCTGC	ATGGGCGCCA	GGAACACAAC	GTCTGTATGC
<i>2+EampcF</i>	TATCAAAACT	GGCAACCTGC	ATGGGCTCCA	GGAGCACAAC	GTCTGTATGC
<i>4+EampcF</i>	TATCAAAACT	GGCAGCCTGC	ATGGGCGCCA	GGAACACAAC	GTCTGTATGC
<i>18+EampcF</i>	TATCAAAACT	GGCAGCCTGC	ATGGGCGCCA	GGAACACAAC	GTCTGTATGC
<i>1+EampcF</i>	TATCAAAACT	GGCAACCTGC	ATGGGCTCCA	GGAGCACAAC	GTCTGTATGC

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	510	520	530	540	550
<i>E. coli EampC</i>	CAACTCCAGT	ATCGGTTTGT	TCGGCGCACT	GGCTGTGAAG	CCGTCTGGTT
<i>geneAmpC</i>	CAACTCCAGT	ATCGGTTTGT	TCGGCGCACT	GGCTGTGAAG	CCGTCTGGTT
<i>15+EampcF</i>	CAACTCCAGT	ATCGGTTTGT	TCGGCGCACT	GGCTGTGAAG	CCGTCTGGTT
<i>5+EampcF</i>	CAACTCCAGT	ATCGGTTTGT	TCGGCGCACT	GGCTGTGAAG	CCGTCTGGTT
<i>14+EampcF</i>	CAACTCCAGT	ATCGGTTTGT	TCGGCGCACT	GGCTGTGAAG	CCGTCTGGTT
<i>2+EampcF</i>	CAACTCCAGT	ATCGGTTTGT	TCGGCGCACT	GGCTGTGAAG	CCGTCTGGTT
<i>4+EampcF</i>	CAACTCCAGT	ATCGGTTTGT	TCGGCGCACT	GGCTGTGAAG	CCGTCTGGAT
<i>18+EampcF</i>	CAACTCCAGT	ATCGGTTTGT	TCGGCGCACT	GGTGTGAAG	CCGTCTGGTT
<i>1+EampcF</i>	CAACTCCAGT	ATCGGTTTGT	TCGGCGCACT	GGCTGTGAAG	CCGTCTGGTT

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	560	570	580	590	600
<i>E. coli EampC</i>	TGAGTTTTGA	GCAGGCGATG	AAAACCTCGTG	TCTTCCAGCC	ACTCAAACCTC
<i>geneAmpC</i>	TGAGTTTTGA	GCAGGCGATG	AAAACCTCGTG	TCTTCCAGCC	ACTCAAACCTC
<i>15+EampcF</i>	TGAGTTTTGA	GCAGGCGATG	CAAACACGTG	TCTTCCAGCC	ACTCAAACCTC
<i>5+EampcF</i>	TGAGTTTTGA	GCAGGCGATG	CAAACACGTG	TCTTCCAGCC	ACTCAAACCTC
<i>14+EampcF</i>	TGAGTTTTGA	GCAGGCGATG	CAAACACGTG	TCTTCCAGCC	ACTCAAACCTC
<i>2+EampcF</i>	TGAGTTTTGA	GCAGGCGATG	CAAACCTCGTG	TCTTCCAGCC	ACTCAAACCTC
<i>4+EampcF</i>	TGAGTTTTGA	GCAGGTGATG	CAAACGCGTG	TCTTCCAGCC	ACTCAAACCTC
<i>18+EampcF</i>	TGAGTTTTGA	GCAGGTGATG	CAAACACGTG	TCTTCCAGCC	ACTCAAACCTC
<i>1+EampcF</i>	TGAGTTTTGA	GCAGGCGATG	CAAACCTCGTG	TCTTCCAGCC	ACTCAAACCTC

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	610	620	630	640	650
<i>E. coli EampC</i>	AATCATACGT	GGATTAATGT	ACCGTCCGCA	GAAGAAAAGA	ACTACGCCTG
<i>geneAmpC</i>	AATCATACGT	GGATTAATGT	ACCGTCCGCA	GAAGAAAAGA	ACTACGCCTG
<i>15+EampcF</i>	AACCATACGT	GGATTAATGT	ACCGCCC GCA	GAAGAAAAGA	ATTACGCCTG
<i>5+EampcF</i>	AACCATACGT	GGATTAATGT	ACCGCCC GCA	GAAGAAAAGA	ATTACGCCTG
<i>14+EampcF</i>	AACCATACGT	GGATTAATGT	ACCGCCC GCA	GAAGAAAAGA	ATTACGCCTG
<i>2+EampcF</i>	ACTCATACGT	GGATTAATGT	GCCGCCCGCA	GAAGAAAAGA	ATTACGCCTG
<i>4+EampcF</i>	AACCATACGT	GGATTAATGT	ACCGCCC GCA	GAAGAAAAGA	ATTACGCCTG
<i>18+EampcF</i>	AACCATACGT	GGATTAATGT	ACCTCCCCA	GAAGAAAAGA	ATTACGCCTG
<i>1+EampcF</i>	ACTCATACGT	GGATTAATGT	GCCGTGCGCA	GAAGAAAAGA	ATTACGCCTG

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	660	670	680	690	700
<i>E. coli EampC</i>	GGGATATCGC	GAAGGTAAGG	CAGTACATGT	TTCGCCAAGG	GCGTTAGATG
<i>geneAmpC</i>	GGGATATCGC	GAAGGTAAGG	CAGTACATGT	TTCGCCAAGG	GCGTTAGATG
<i>15+EampcF</i>	GGGATATCGC	GAAGGCAAGG	CAGTTCATGT	TTCGCCAGGG	GCGTTAGATG
<i>5+EampcF</i>	GGGATATCGC	GAAGGCAAGG	CAGTTCATGT	TTCGCCAGGG	GCGTTAGATG
<i>14+EampcF</i>	GGGATATCGC	GAAGGCAAGG	CAGTTCATGT	TTCGCCAGGG	GCGTTAGATG
<i>2+EampcF</i>	GGGATATCGC	GAAGGTAAGG	CAGTGCATGT	TTCGCCAGGG	GCGTTAGATG
<i>4+EampcF</i>	GGGATATCGC	GAACGCAAGG	CAGTTCATGT	TTCGCCAGGG	CCGTTAGATG
<i>18+EampcF</i>	GGGATATCGC	GAAGGTAACG	CAGTGCATGT	TTCGCCCGGG	GTGTTAGATG
<i>1+EampcF</i>	GGGATATCGC	GAAGGTAAGG	CAGTGCATGT	TTCGCCAGGG	GCGTTAGATG

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	710	720	730	740	750
<i>E. coli EampC</i>	CTGAAGCTTA	TGGTGTGAAG	TCGACCATTG	AAGATATGGC	CCGCTGGGTG
<i>geneAmpC</i>	CTGAAGCTTA	TGGTGTGAAG	TCGACCATTG	AAGATATGGC	CCGCTGGGTG
<i>15+EampcF</i>	CTGAAACTTA	TGGTGTGAAG	TCGACCATTG	AAGATATGGC	CTGCTGGGTA
<i>5+EampcF</i>	CTGAAACTTA	TGGTGTGAAG	TCGACCATTG	AAGATATGGC	CTGCTGGGTC
<i>14+EampcF</i>	CTGAAACTTA	TGGTGTGAAG	TCGACCATTG	AAGATATGGC	CTGCTGGGTC
<i>2+EampcF</i>	CTGAAGCTTA	TGGTGTGAAG	TCGACCATTG	AAGATATGGG	CCTGTTGGTG
<i>4+EampcF</i>	CTGAAACTTA	TGGTGTGAAG	TCGACCATTG	AAGATATGGC	CTGCTGGGTA
<i>18+EampcF</i>	CTGAAGCTTA	TGGTGTGAAG	TCGACCATTG	AAGATATGGC	CCGCTGGGTG
<i>1+EampcF</i>	CTGAAGCTTA	TGGTGTGAAG	TCGACCATTG	AAGATATGGC	CCGCTGGGTG

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	760	770	780	790	800
<i>E. coli EampC</i>	CAAAGCAATT	TAAAACCCCT	TGATATCAAT	GAGAAAACAC	TTCAACAAGG
<i>geneAmpC</i>	CAAAGCAATT	TAAAACCCCT	TGATATCAAT	GAGAAAACAC	TTCAACAAGG
<i>15+EampcF</i>	CGAAGCAATA	TGAATCACCG	TGATATCAAC	GACAAAACAC	TTCAACAAGG
<i>5+EampcF</i>	CGAAGCAATT	TAAATCCCCG	TGATATCAAC	GACAAAACAC	TTCAGCAAGG
<i>14+EampcF</i>	CTAAGCAATA	TGAATCCCCG	TGATATCAAC	GACAAAACAC	TTCAGCAAGG
<i>2+EampcF</i>	CAAAGCAGTT	TAAAGGTCCG	TTATATCACT	GAGAAAACGC	TTCAACAAGG
<i>4+EampcF</i>	CGAAGCAATA	TGAATCCCCT	TGATATCAAC	GACAAAACGC	TTCAACAAGG
<i>18+EampcF</i>	CAAAGCAATT	TGAATCCCCG	TGATATCAAC	GACAAAACAC	TTCAGCAAGG
<i>1+EampcF</i>	CAAAGCAATT	TAAAACCCCT	TGATATCACT	GAGAAAACGC	TTCAACAAGG

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      810      820      830      840      850
E. coli EampC GATACAAC TG GCACAATCTC GCTACTGGCA AACCGGCGAT ATGTATCAGG
geneAmpC GATACAAC TG GCACAATCTC GCTACTGGCA AACCGGCGAT ATGTATCAGG
15+EampcF GATACAAC TG GCACAATCTC GCTACTGGCA AACCGGCGAT ATGTATCAGG
5+EampcF GATACAAC TG GCACAATCTC GCTACTGGCA AACCGGCGAT ATGTATCAGG
14+EampcF GATACAAC TG GCACAATCTC GCTACTGGCA AACCGGCGAT ATGTATCAGG
2+EampcF GATACAAC TG GCACAATCTC CAATATGGCA AACCGGCGAT ATGTATCAGG
4+EampcF GATACAAC TG GCACAATCTC GCTACTGGCA AACCGGCGAT ATGTATCAGG
18+EampcF GATACAAC TG GCACAATCTC GCTACTGGCA AACCGGCGAT ATGTATCAGG
1+EampcF GATACAAC TG GCACAATCTC GATACTGGCA AACCGGCGAT ATGTATCAGG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      860      870      880      890      900
E. coli EampC GTCTGGGCTG GGAAATGCTG GACTGGCCGG TAAATCCTGA CATCATCATT
geneAmpC GTCTGGGCTG GGAAATGCTG GACTGGCCGG TAAATCCTGA CATCATCATT
15+EampcF GTCTGGGCTG GGAAATGCTG GACTGGCCGG TAAATCCTGA CATCATCGTT
5+EampcF GCCTGGGCTG GGAAATGCTG GACTGGCCGG TAAATCCTGA CAGCATCATT
14+EampcF ACCTGGGCTG GGAAATGCTG GACTGGCCGG TAAATCCTGA CAGCATCATT
2+EampcF GCCTGGGCTG GGAAATGCTG GACTGGCCGG TAAATCCTGA CATCATCATT
4+EampcF ACCTGGGCTG GGAAATGCTG GACTGTCCGG TAAATCCTGA CAGCATCATT
18+EampcF GCCTGGGCTG GGAAATGCTG GACTGGCCGG TAAATCCTGA CAGCATCATT
1+EampcF GCCTGGGCTG GGAAATGCTG GACTGGCCGG TAAATCCTGA CATCATCATT

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      910      920      930      940      950
E. coli EampC AAC----- --AATAAAAT TGCACTGGCA GCACGCCCCG TAAAACCGAT
geneAmpC AAC----- --AATAAAAT TGCACTGGCA GCACGCCCCG TAAAACCGAT
15+EampcF AAACGCAGTG ACAATAAAAT TGCACTGGCA GCACACCCCG TAAAAGCAAT
5+EampcF AACGGCACTG TGCATAAAAT TGCACTGGCA GCACACCCCG TAAAAGCGAT
14+EampcF AACGGCAGTG GCAATAAAAT TGCACTGGCA GCACCCCCCG TAAAAGCGAT
2+EampcF AACGGCAGTG ACAATAAAAT TGCCTGGCA GGTAACCCG TAAAAGCGAT
4+EampcF AACGGCAGTG GCAATAAAAT TGCACTGGCA GCACACCCCG TAAAAGCGAT
18+EampcF AACGGCAGTG GCAATAAAAT TGCACTGGCA GCACGACCTG TAAAAGCGAT
1+EampcF AACGGCAGTG ACAATAAAAT TGCACTGGCA GCACGCCCCG TAAAAGCGAT

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      960      970      980      990
1000
E. coli EampC TACGCCCCCA ACTCCTGCAG TACGCGCATC ATGGGTACAT AAAACGGGGG
geneAmpC TACGCCCCCA ACTCCTGCAG TACGCGCATC ATGGGTACAT AAAACGGGGG
15+EampcF ACCGCCCCCA ATTCCTGTCA TACCTC---- -----
5+EampcF TACGCCCCCA ACTCCTGCAG TACGCGCATC ATGGGTACAT AAAACAGGGG
14+EampcF TACGCCCCCA ACTCCTGCAG TACGCGCATC ATGGGTACAT AAAACAGGGG
2+EampcF TACGCCCCCA ACTCCTGCAG TACGCGCATC ATGGGTACAT AAAACGGGGG
4+EampcF TACGCCCCCA ACTCCTGCAG TACGCGCATC ATGGGTACAT AAAACAGGGG
18+EampcF TACGCCCCCA ACTCCTGCAG TACGCGCATC ATGGGTACAT AAAACAGGGG
1+EampcF TACGCCCCCA ACTCCTGCAG TACGCGCATC ATGGGTACAT AAAACGGGGG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                1010      1020      1030      1040
1050
E.coli EampC CGACCGGCGG ATTTGGTAGC TATGTCGCGT TTATTCCAGA AAAAGAGCTG
geneAmpC CGACCGGCGG ATTTGGTAGC TATGTCGCGT TTATTCCAGA AAAAGAGCTG
15+EampcF -----
5+EampcF CAACCGGCGG ATTTGGTAGC TATGTCGCGT TTATTCCAGA AAAAGAGCTG
14+EampcF CAACCGGCGG ATTTGGTAGC TATGTCGCGT TTATTCCAGA AAAAGAGCTG
2+EampcF CGACCGGCGG ATTTGGTAGC TATGTCGCGT TTAATCCAGA AAAAGAGCTG
4+EampcF CAACCGGCGG ATTTGGTAGC TATGTCGCGT TTATTCCAGA AAAAGAGCTG
18+EampcF CAACCGGCGG ATTTGGTAGC TATGTCGCGT TTATTCCAGA AAAAGAGCTG
1+EampcF CGACCGGCGG ATTTGGTAGC TATGTCGCGT TTATTCCAGA AAAAGAGCTG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                1060      1070      1080      1090
1100
E.coli EampC GGTATCGTGA TGCTGGCTAA CAAAACTAC CCCAATCCAG CGAGAGTCGC
geneAmpC GGTATCGTGA TGCTGGCTAA CAAAACTAC CCCAATCCAG CGAGAGTCGC
15+EampcF -----
5+EampcF GGTATAGTGA TGCTGC-----
14+EampcF GGTATAGGAC CG-----
2+EampcF GGTATCGTGA TGCTG-----
4+EampcF GGTAGTGA--
18+EampcF GGTATAGTGA TGCTG-----
1+EampcF GGTATCG---

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....
                1110      1120      1130
E.coli EampC CGCCGCCTGG CAGATTCTCA ACGCTCTACA GTAA
geneAmpC CGCCGCCTGG CAGATTCTCA ACGCTCTACA GTAA
15+EampcF -----
5+EampcF -----
14+EampcF -----
2+EampcF -----
4+EampcF -----
18+EampcF -----
1+EampcF -----

```

### **Anexo III**

Monitorização microbiológica de pisos de parques infantis realizada entre Setembro e Dezembro de 2012