

Nome : **WALTER TAVARES**

Email : tavareswalter14@gmail.com

Tel: (21) 2228-5196/ 2569-7196

CV Lattes : <http://lattes.cnpq.br/2719240807136334>

Tipo de Projeto : **PICPE**

Linha de pesquisa : **Bioética e ciências da saúde e do ambiente**

Participantes:

Matrícula: 01010006

Email:

sinarafigueiredo_eu@hotmail.com

Matrícula: 01009682

Email: mnchenu@gmail.com

DATA DO ENVIO: 24/03/12

TITULO

Isolamento e identificação de microrganismos em maçanetas do UNIFESO

RESUMO

Os coliformes fecais são microrganismos que habitam o intestino do homem e de outros animais, e cujo grupo compreende todas as bactérias na forma de bastonetes gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas sob a temperatura de 44,5° - 45,5°C. São amplamente utilizados como marcadores de parâmetros higiênico-sanitários, seja na análise de contaminação de alimentos ou mesmo como marcador deficitário de higiene pessoal.

Assim, o objeto de estudo deste trabalho consiste em estabelecer o grau de contaminação nas maçanetas dos banheiros de uma universidade localizada na região serrana do estado do Rio de Janeiro. O objetivo geral consiste em caracterizar a microbiota presente nestes objetos, através da contagem de unidades formadoras de colônia e os objetivos específicos residem em estabelecer a sensibilidade destes microrganismos aos discos impregnados com os antibióticos mais comuns à prática clínica, bem como familiarizar os estudantes envolvidos com o projeto com as práticas no cenário da microbiologia. É uma pesquisa quantitativa, cujo cenário será o Campus sede do Centro Universitário Serra dos Órgãos, no município de Teresópolis-RJ. A pesquisa será realizada no Departamento de Microbiologia desta instituição. A coleta de dados será realizada pelos pesquisadores envolvidos, e os resultados serão analisados pelos profissionais responsáveis pelo mencionado departamento. Os resultados serão expressos com base nas Unidades Formadoras de Colônias, e de acordo com a sensibilidade às drogas antimicrobianas.

PALAVRAS-CHAVE

Análise Microbiológica, Coliformes, Contaminação Biológica.

INTRODUÇÃO

As bactérias que habitam o trato intestinal do homem e de outros animais são denominadas Coliformes (PARDI et al., 1995; SILVA & JUNQUEIRA, 1995; VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1996). Assim, o grupo de microrganismos denominados coliformes totais compreende todas as bactérias na forma de bastonetes gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas sob a temperatura de 35°C. A mesma definição é válida para o grupo de coliformes fecais, entretanto, restringindo-se nesta classe, aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas a 44,5° - 45,5°C (HITCHINS et al., 1996; SILVA & JUNQUEIRA, 1995; SILVA et al., 1997).

O índice de coliformes totais é amplamente utilizado na literatura e em diversas práticas industriais, tratando-se da avaliação das condições higiênicas, enquanto o de coliformes fecais é mais comumente empregado como marcador de contaminação fecal, o qual avalia a inadequação das condições higiênico-sanitárias, uma vez que dentre os principais representantes deste grupo, encontra-se a *Escherichia coli* (SIQUEIRA, 1995). A *Escherichia coli* é o mais importante indicador de contaminação fecal (VANDERZANT & SPLITTSTOESSES, 1996), embora possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais (SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

As enterobactérias estão entre os mais importantes causadores de infecções intestinais, novamente dentre os quais, destaca-se a *E. coli*, dotada de potencial interesse às áreas da bromatologia bem como às áreas médicas, assim como outros gêneros pertencentes desta classe, tais como *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, os quais podem sobreviver por longos períodos de tempo e se multiplicarem em ambientes não fecais (SIQUEIRA, 1995).

Desde a sua designação, em 1982, após ter sido estabelecido o papel da *E. coli* como agente etiológico da colite hemorrágica (NASCIMENTO & STAMFORD, 2000), tal espécie vem sendo cada vez mais estudada, pelo seu potencial em causar doenças, bem como na caracterização dos índices qualiquantitativos de parâmetros higiênico-sanitários.

No que se refere aos alimentos, essas bactérias são extremamente prejudiciais, onde sua presença determina inutilidade dos mesmos (FRAZIER, 1976; JAY, 2005). Já no que tange à microbiologia médica, estes microrganismos sempre despertam interesse, apesar de estarem vulgarmente presentes no nosso cotidiano. Eventos como o recente surto da chamada Síndrome Hemolítico-Urêmica no continente europeu, provocado por cepas de *E. coli*, denotam a devida importância da caracterização e controle destes organismos nos ambientes que nos cercam, bem como servem para frisar e promover as importantes, velhas e boas práticas higiênicas, tais como a adequada lavagem das mãos, e ações de caráter social e educativo, acerca das quais.

Apesar do exposto, ao redigir este projeto, esbarramos na literatura com a dificuldade na obtenção de dados quantitativos adotados como padrão nas análises microbiológicas de ambientes e superfícies, excetuando-se os ambientes específicos, como as indústrias de alimentos. Em 1976, Harrigan & Maccance, propuseram em seus trabalhos como valores satisfatórios nos ambientes voltados à alimentação, aqueles situados abaixo de 5 UFC (Unidade formadora de colônia), e insatisfatórios aqueles acima de 25 UFCs. Em seguida, no ano de 1982, Moreno, em trabalho realizado junto à Organização

Panamericana de Saúde - OPAS, adotou os valores: entre 0 e 10 UFC como excelente, 11 e 29 UFC sendo bom, 30 e 49 UFC como regular, 50 e 99 UFC correspondendo a mau e péssimos aqueles valores acima de 100 UFC. Dois anos após, em 1984, SPECK propôs como satisfatórios, aqueles resultados situados abaixo de 2 UFC e acima de 4 UFC como sendo insatisfatórios. Finalmente, em 1993, SILVA JR, discorrendo em sua tese sobre os equipamentos e utensílios de cozinhas industriais, considerou como satisfatórios os resultados inferiores a 50 UFC e satisfatórios aqueles situados acima deste valor. Todas as referências recomendam, entretanto, como satisfatório a ausência de bactérias do grupo Coliformes em área de 100cm² da amostra.

Como se pode perceber há na literatura científica, vários estudos ao longo das últimas décadas que versam sobre estes índices quantitativos acerca da contaminação microbiológica. Estes índices, entretanto, estão relacionados praticamente na sua totalidade a outras áreas de concentração, que não a deste trabalho, ou seja, versam em sua maioria, de ambientes industriais, e no setor alimentício. Devido à ausência de trabalhos que contemplem os valores considerados toleráveis ou não em superfícies localizadas em banheiros públicos, como o cenário desta pesquisa, adotaremos como satisfatórios os valores abaixo de 100 Unidades Formadoras de Colônias e insatisfatórios aqueles acima deste valor. Consideraremos ainda, como excelentes, aqueles resultados que demonstrarem ausência deste grupo de microrganismos; como Bom os resultados entre 1 – 50 UFC e entre 50 e 100 UFC, serão considerados como regulares.

JUSTIFICATIVA

Como se viu, os coliformes fecais estão frequentemente implicados com diversas doenças que acometem os seres humanos, as quais incluem em seu espectro de manifestações clínicas, desde queixas diarréicas, inofensivas comumente na fase adulta, assim pode-se dizer, mas que, entretanto, ocasionam mortes na faixa pediátrica, e sendo consideradas próprias dos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. As enterobactérias Gram-negativas estão envolvidas ainda nesta faixa etária, com outras importantes patologias, tais como as pneumonias adquiridas na comunidade em recém nascidos (FERNANDES *et al.*, 2004), e a sepsé tardia neonatal, bem como meningite bacteriana também nesta faixa etária (KREBS *et al.*, 2005), se estendendo à idade adulta, com doenças complexas e graves como a mencionada síndrome hemolítico-urêmica, provocada por toxinas de *Shigellas* e *E.coli*, justificando o constante esforço dos setores das indústrias alimentícias, da bromatologia e dos serviços de vigilância sanitária em buscar adequações nestes parâmetros, como medidas de controle de qualidade e biossegurança.

Esta pesquisa está pautada na caracterização das medidas higiênicas dos universitários e demais indivíduos frequentadores do ambiente educacional desta instituição de ensino superior, teoricamente dotados de conhecimentos básicos de higiene pessoal, voltadas principalmente ao simples, mas importante hábito de lavagem das mãos.

Sob a dependência dos resultados encontrados com este estudo, será possível avaliar e inferir nos hábitos higiênicos desta população, através de medidas de educação continuada no que se refere aos hábitos de higiene pessoal, destes, que são indivíduos em processo de formação profissional.

OBJETIVOS

O presente projeto de pesquisa traz como **objetivo geral**:

- a) - Caracterizar a microbiota presente nas maçanetas de banheiros localizados no campus sede do Centro Universitário Serra dos Órgãos, através da contagem de unidades formadoras de colônia,

Já no que se refere aos **objetivos específicos** pretende-se o seguinte:

- a) – Estabelecer a sensibilidade destes microrganismos aos discos impregnados com os antibióticos mais comuns à prática clínica;
- b) – Familiarizar os estudantes envolvidos com o projeto com as práticas no cenário da microbiologia;
- c) – Identificar e intervir com ações educativas e de conscientização, das medidas de higiene, ao público frequentador deste cenário;

METODOLOGIA

Serão coletados através de swabs umedecidos em solução salina (Cloreto de Sódio 0,9%), áreas de 5cm² de maçanetas de banheiros do campus sede do Centro Universitário Serra dos Órgãos. Após a coleta, os swabs serão imediatamente imersos em tubos de ensaio contendo solução/meio de cultura à base de Triptanona de Soja (“Caldo Casoy”), e os quais serão imediatamente levados ao laboratório de microbiologia do Unifeso, permanecendo neste meio por 48 horas. A seguir, estas culturas serão semeadas em placas de Petri contendo solução de Muller-Hinton. As amostras serão distribuídas ainda em placas, contendo discos impregnados com antibióticos, para que se possa também, realizar além da identificação e quantificação (expressa em Unidades Formadoras de Colônias) dos microorganismos presentes nas maçanetas, a sensibilidade destes germes – através do então, antibiograma.

Com base no exposto, serão necessários para realização desta pesquisa, em caráter de iniciação científica, os seguintes materiais:

1. 40 swabs
2. 40 tubos de ensaio contendo solução salina;
3. 40 tubos de ensaio contendo Meio de Cultura à base de Triptanona de Soja;
4. Bicos de Bünsen;
5. Alças de inoculação;
6. 40 placas de Petri;
7. Meio de cultura Ágar-Müller Hinton
8. Estufa microbiológica;
9. Discos impregnados com diversas drogas antimicrobianas.

ESTRATÉGIAS DE COLETA DE DADOS

Será realizada desinfecção das maçanetas com 2 horas de antecedência do início das atividades nos cenários, com etanol 70°GL. Após um dia da desinfecção, serão realizadas coletas de material através de swab umedecido, conforme descrito na metodologia. Serão analisadas todas as maçanetas internas dos banheiros do campus sede, com repetição das análises em dias alternados.

ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO E ANÁLISE

As análises serão realizadas no laboratório multidisciplinar de microbiologia, pelos próprios pesquisadores, e suportadas pelo Procedimento Operacional Padrão institucional para isolamento e contagem de microrganismos.

BIBLIOGRAFIA

- FRAZIER NC. Microbiologia de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1976. 512p.
- FERNANDES JC, FERNANDES ICOF, EJZEMBERG B. Pneumonias bacterianas – Pediatria clínica especializada. 9ª ed, t3. São Paulo: Sarvier. 2004.
- Harrigan WF, McCance ME. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press Inc., London. 1976.
- HITCHINS AD, HARTMAN PA, TODD ECD. Compendium of methods for the microbiological examination of foods: Coliforms-Escherichia coli and its toxins. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1996. p.325-369.
- JAY, James M. Microbiologia de Alimentos. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- KREBS VLJ, VAZ FAC. Infecções adquiridas neonatais – Pediatria geral e neonatal. 9ª ed. São Paulo: Sarvier. 2005.
- MORENO. Organização Pan – Americana de Saúde – OPAS, 1982.
- NASCIMENTO MR & STAMFORD TLM. Incidência de Escherichia coli O157:H7. Rev. Higiene Alimentar, São Paulo, v.14, n.70, p.32-35, 2000.
- PARDI MC, SANTOS IF, SOUZA ER, PARDI HS. Ciência, higiene e tecnologia da carne: Riscos microbiológicos da carne, Goiânia: UFG, 1995. v.1, p.294-308.
- SILVA JÚNIOR EA. Contaminação microbiológica como indicadora das condições higiênico-sanitárias de equipamentos e utensílios de cozinhas industriais, para determinação de pontos críticos de controle. São Paulo, 1993. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo - USP.
- SILVA N & JUNQUEIRA VCA. Métodos de análise microbiológica de alimentos. Campinas: ITAL, 1995. 228p.
- SILVA N, JUNQUEIRA VCA, SILVEIRA NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varala, 1997. 295p.

SIQUEIRA RS. Manual de microbiologia de alimentos. Brasília: EMBRAPA, 1995. 159p.

SPECK ML. Compendium of methods for the microbiological examination of Foods, Washington: APHA/Technical Committee on Microbiological for Foods. 1984. 914 p.

VANDERZANT C & SPLITTSTOESSER DF. Compendium of methods for microbiological examination of foods. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1996. 873p.

CRONOGRAMA

O trabalho de pesquisa apresentado está projetado para nove meses, estando o cronograma disposto na tabela abaixo:

2012										
Etapas	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Qualificação do projeto de pesquisa;			X	X						
Submissão do projeto ao CCS/Unifeso						X				
Coleta das Amostras;						X				
Reprodução das etapas em bancada;						X	X			
Organização, documentação, análise estatística e interpretação dos dados;								X		
Confecção de relatório técnico e apresentação do mesmo;								X		
Elaboração de trabalho para submeter à publicação e a eventos da área.										

ORÇAMENTO

Por contar com todo o material necessário à realização desta pesquisa, não há, com este trabalho, nenhum gasto adicional à instituição, tendo em vista que todo o trabalho será realizado pelos próprios pesquisadores, e sob a supervisão dos orientadores, professores deste Centro Universitário.

ANEXO

APÊNDICE 1

OFÍCIO

Vimos por meio deste, solicitar junto à direção do Centro de Ciências da Saúde do Centro Universitário Serra dos Órgãos, autorização para o desenvolvimento da pesquisa intitulada “Isolamento e identificação de microrganismos em maçanetas do UNIFESO”, que em caso de aprovação, será desenvolvida nas dependências do campus sede do Centro Universitário Serra dos Órgãos.

Aproveitamos também para comunicar que conforme informações contidas no projeto de pesquisa original, colocado à vossa disposição agora e a qualquer momento, este projeto não envolve a participação de terceiros, ou seja, não é uma pesquisa que envolva seres humanos, e sendo assim, não necessita de aprovação pelo comitê de ética por ser isenta de riscos à comunidade do Unifeso.

Na expectativa de contar com a inestimável atenção da V.S.^a no atendimento desta solicitação, aproveitamos o ensejo para apresentar o elevado apreço da *Graduanda* e do *Professor* orientador dessa renomada Instituição de Ensino e agradecer a atenção e o apoio.

No aguardo da devida autorização,

Atenciosamente,

Orientadores: Prof. Dr. Walter Tavares

Graduanda: Marie Nathalie Chenu.

Deferido

Indeferido

Direção do CCS/UNIFESO

Teresópolis – RJ, __/__/____.

APÊNDICE 2

Plano de atividades dos estudantes

Os estudantes envolvidos ficarão responsáveis por:

1. Treinamento e aquisição de domínio de técnicas laboratoriais em microbiologia;
2. Levantamento bibliográfico de suporte;
3. Coleta de material microbiológico das maçanetas;
4. Preparação de meios de cultura;
5. Semeadura do material em placas de Petri e cultura do mesmo em estufa;
6. Análise do material através de contagem das UFC e aplicação do antibiograma;
7. Preparo do relatório técnico, sob supervisão da orientação;
8. Confecção de material de divulgação dos resultados;