UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Saúde Pública

**Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em amostras
de água de bebedouros e de aspersores em parques
públicos da cidade de São Paulo, Brasil.**

Geyse Aparecida Cardoso dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Saúde Pública

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Pepe Razzolini

São Paulo

2019

Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em amostras de água de bebedouros e de aspersores em parques públicos da cidade de São Paulo, Brasil.

Geyse Aparecida Cardoso dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Saúde Pública

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Pepe Razzolini

Versão Original
São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Cardoso dos Santos, Geyse Aparecida
Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em amostras de água de bebedouros e de aspersores em parques públicos da cidade de São Paulo, Brasil. / Geyse Aparecida Cardoso dos Santos; orientadora Maria Tereza Pepe Razzolini. -- São Paulo, 2019.
65 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2019.

1. Parques públicos. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Saúde Pública. 4. Água de consumo. 5. Acesso à água. I. Pepe Razzolini, Maria Tereza, orient. II. Título.

Dedicatória

Este trabalho dedico a todas as mulheres da família *Cardoso*, que com seus exemplos de vida foram combustíveis para minha jornada.

Dedico em especial a minha mãe *Teresa Cardoso* por ser minha super-heroína, a minha irmã *Jessica Janaina* por seu apoio quando não tive forças para seguir e a minha querida avó *Inês Soares Cardoso*, que de alguma forma se manteve presente conosco.

Sem vocês eu jamais chegaria até aqui!

AGRADECIMENTOS

A Deus e todos os seres de luz que me acompanham nesta vida.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. *Tereza Pepe Razollini*, pelo apoio e paciência.

À Prof. Dr. *Carlos Henrique Camargo* e ao Prof. *Flávio Krzyanowski Jr*, por compartilhar seus conhecimentos no Exame de Qualificação.

À Prof. Dr^a. *Milena Dropa*, à Prof^a. Dr^a. *Solange Martone Rocha* e Prof^a. *Francisca Alzira dos Santos Peternella* pela indiscutível contribuição para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores e funcionários do Departamento de Saúde Ambiental e do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da FSP-USP que me acolheram durante todos estes anos.

Aos colegas, companheiros e amigos da FSP-USP, pela amizade, apoio, parceria, convivência e troca de conhecimentos, *Felipe Cândido*, *Yuranny Ramírez*, *Jéssica Santiago*, *Giovanni Emiddio Romano*, *Giovanna Ribeiro*, *Giovanna Santiago*, *Beatriz Moreira*, *Agnes Lara*, *Bruna Suellen Breternitz*, *Bruno Kuchkarian*, *Marcos Malaquias* e demais estagiários, alunos, ex-estagiários, ex-alunos...

Aos queridos amigos *Veridiana Karmann Bastos*, *Érico Ibiapina* sempre presentes, me incentivando nos momentos mais necessários.

A minha família, por compreenderem os meus momentos de reclusão, por vibrarem comigo em cada pequena conquista e por estarem ao meu lado nas adversidades.

Aos funcionários da FSP- USP, pelo acolhimento e assistência necessária.

A Secretaria do Verde e Meio Ambiente (SVMA), da Cidade de São Paulo, em especial a *Andréa de Almeida Bossi* que intermediou a autorização cedida pelo Departamento de Parques e Áreas Verdes (DEPAVE-5) para a execução deste trabalho (Processo 2017-0.021.265-2).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro que subsidiou a realização deste estudo (Processo 134101/2017-0).

RESUMO

dos SANTOS, GAC. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em amostras de água de bebedouros e de aspersores em parques públicos da cidade de São Paulo, Brasil.** 2018. Dissertação - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Os parques públicos funcionam como equipamentos urbanos que melhoram a qualidade estética, funcional e ambiental da cidade, resultando em bem-estar para a população. A água de bebedouros e vaporizadores (aspersores) de água dos parques é fornecida pela rede pública de abastecimento. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade da água desses dispositivos de acesso à água, em quatro parques municipais de São Paulo. As coletas foram realizadas durante treze meses (n= 552), para a quantificação de *Escherichia coli*, de bactérias heterotróficas e teor de cloro livre cujos resultados foram avaliados com base no padrão de potabilidade preconizado pela legislação brasileira vigente. A detecção de *Staphylococcus aureus*, uma das principais bactérias responsáveis por infecções humanas e pela resistência a antimicrobianos no mundo, também foi realizada. A avaliação das características dos isolados foi realizada de acordo com o preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A confirmação de espécies de *S. aureus* foi através da detecção dos genes *nuc* e *coa*, a verificação de virulência das cepas foi realizada pela detecção dos genes de virulência, *sea*, *seg* e *luk-PVL* relacionados à expressão de enterotoxinas, e a detecção do gene *mecA* relacionado a resistência a metilina (MRSA). A resistência a antimicrobianos dos isolados, foi realizada por método de disco difusão e a avaliação de resistência à vancomicina pelo método de microdiluição em caldo (CIM) com base no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A presença de *S. aureus* foi detectada em 23 amostras distribuídas entre os parques estudados, representando 22,2% das amostras de bebedouro e 6,6% das amostras de aspersores, respectivamente. O gene *mecA* foi detectado em 73,91% (17/23) dos isolados de *S. aureus* encontrados em 23 amostras. A expressão de resistência a antimicrobianos dos isolados foi diversificada e 17,6 % dos isolados detectamos fenotipicamente eram *Staphylococcus aureus* Resistente a Metilina (MARSA). Não detectamos nenhum dos genes de virulência nas amostras, como também resistência e/ou sensibilidade reduzida à Vancomicina. A presença de *S. aureus* em água potável para o consumo humano encontrado neste estudo é um achado inédito, se fazendo necessário a vigilância de água potável para o consumo humano para patógenos, como *S. aureus*.

Palavras-chave; Parques públicos. *Staphylococcus aureus*. Saúde Pública. Água de consumo. Acesso à água.

ABSTRACT

dos SANTOS, G. Ap. C. [Occurrence of *Staphylococcus aureus* in water drinking fountains and sprinklers samples in public parks in the city of São Paulo, Brazil]. 2018. Dissertation - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Public parks role as urban facilities is to improve the aesthetic, functional and environmental quality of the city, resulting in well-being for the population. Water fountains and mist maker is provided by the public water supply. The objective of this study was to evaluate the water quality of these water access devices in four parks of the São Paulo city. The samples were collected for thirteen months (n=552) for the quantification of *Escherichia coli*, heterotrophic bacteria and free chlorine content. The results were evaluated based on the potability standard recommended by the Brazilian normalization. The detection of *Staphylococcus aureus*, one of the major responsible for human infections and antimicrobial resistance in the world, was also performed. The evaluation of the characteristics of the isolates was carried out according to the recommendations of the *National Sanitary Surveillance Agency* (ANVISA). Confirmation of *S. aureus* species was carried out through the detection of *nuc* and *coa* genes, the virulence of the strains was performed by detecting the following genes: *sea*, *seg* and *luk-PVL* related to enterotoxin expression, and the detection of *mecA* gene related to methicillin resistance. The antimicrobial resistance of the isolates was carried out by disc diffusion method and the evaluation of resistance to vancomycin by the broth microdilution method (CIM) based on the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). The presence of *S. aureus* was detected in 23 samples distributed among the studied parks, representing 22.2% of the drinking water samples and 6.6% of the mist maker samples, respectively. Seventeen isolates had *mecA* detection. The antimicrobial resistance expression of the isolates was diverse and 17.6% of the isolates phenotypically detected were *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). It is not detected any of the studied virulence genes for the isolates neither resistance and/or reduced sensitivity to vancomycin. The presence of *S. aureus* in drinking water for human consumption study is an unprecedented finding, put in evidence the necessity for surveillance of drinking water for human consumption.

Keywords; Public parks. *Staphylococcus aureus*. Public health. Consumption water. Access to water.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. <i>Staphylococcus aureus</i> : CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	10
2.1. <i>S. aureus</i> : Resistência a antimicrobianos.....	13
2.2. <i>S. aureus</i> : biofilme.....	16
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo geral	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Amostragem	19
4.1.1. Locais de coletas.....	19
4.2. Determinação de cloro residual livre.....	24
4.3. Indicadores de qualidade de água.....	25
4.3.1. Bactérias Heterotróficas.....	25
4.3.2. <i>Escherichia coli</i>	25
4.4. Detecção de <i>S. aureus</i>	26
4.4.1. Investigação Bacteriológica.....	26
4.4.2. Confirmação da espécie <i>S. aureus</i>	30
4.4.3. Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.....	36
4.4.3.1. Método de disco-difusão	36
4.4.3.2. Microdiluição em caldo	37
5. RESULTADOS.....	39
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÃO.....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
9 ANEXOS	61
ANEXO 1. Autorização da execução de coletas nos parques.	
ANEXO 2. Apresentação do estudo em congresso.	
10. CURRÍCULO LATTES	64

1. INTRODUÇÃO

O avanço da urbanização fez com que as pessoas se adaptassem ao longo dos anos, quanto à ocupação do solo e a perda de espaços naturais nas grandes cidades (KABISCH et al., 2015). Neste contexto, a necessidade humana por espaços naturais que propiciem atividades recreativas e de lazer tem aumentado cada vez mais (KONG e NAKAGOSHI 2006; BYOMKESH et al., 2012). Esses espaços podem ser os espaços verdes urbanos os quais são locais compostos de significativa vegetação caracterizando locais seminaturais (JIM e CHEN 2003), tais como parques públicos, áreas de preservação, campos esportivos, praças, vias verdes incluindo árvores, trilhas e jardins (dentre eles os verticais) (JAMES et al., 2009 e ROY; BYRNE; PICKERING, 2012).

Estes espaços construídos desempenham funções importantes, como o controle da temperatura, da regulação da umidade do ar (BEDIMO-RUNG; MOWEN; COHEN; 2005), da continuidade da biodiversidade (ATTWELL, 2000), refletindo em bem-estar das pessoas, além da redução de desequilíbrios ambientais, estes provocados pela expansão e desenvolvimento das metrópoles urbanas (CUMMINS e JACKSON, 2001; DE VRIES et al., 2003; NOWAK; CRANE; STEVENS, 2006; ESCOBEDO; KROEGER; WAGNER, 2011; NORTON et al., 2015).

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MMA), o parque urbano é definido como uma área verde com função ecológica, estética e de lazer, no entanto, com uma extensão maior que praças e jardins públicos (MMA, 2016). O Art. 8º, § 1º, da Resolução CONAMA Nº 369/2006, considera área verde, como o espaço de domínio público que desempenhe função ecológica, paisagística e recreativa, propiciando a melhoria da qualidade estética, funcional e ambiental da cidade, sendo dotado de vegetação e espaços livres de impermeabilização (CONAMA, 2006). Sob a ótica da urbanização e qualidade de vida nas metrópoles, os parques urbanos são considerados agentes estratégicos na qualidade de vida das pessoas e no conjunto das sociedades em crescente urbanização (KAPLAN e CAMACHO 1983; ULRICH, 1984; CHIESURA, 2004; TSUNETSUGU et al., 2013; KONIJNENDIJK et al., 2013; LIN et al., 2014; RAZAK; OTHMAN; NAZIR; 2016).

Para a população, os parques urbanos prestam serviços ambientais por meio da filtragem do ar, redução da poluição sonora e estabilização do microclima

(TRATALOS et al., 2007). A saúde ambiental destes espaços está também relacionada com a preservação da fauna, da flora, das fontes de água (córrego e lagos), da destinação adequada do lixo, da preservação e manutenção dos equipamentos urbanos como os bebedouros, ou seja, tudo que constitui estes espaços pode vir a repercutir positivamente aos seus visitantes e para a cidade (LIMNIOS e FURLAN 2013).

Ainda, no que dizem respeito às questões sociais, as áreas verdes são consideradas ou são compreendidas como espaços que promovem a saúde e bem-estar (MAAS et al., 2009; VAN DEN BERG, Magdalena et al., 2015; KREKEL; KOLBE; WÜSTEMANN; 2016). Um estudo observou dados de morbidade a partir de registros médicos e comparou com o percentual de espaços verdes em torno da residência de 345.143 pessoas. O estudo detectou uma menor prevalência de doenças, especialmente para transtornos de ansiedade e depressão, em indivíduos que residiam em áreas mais próximas e com mais espaços verdes disponíveis (MAAS et al., 2009).

Em revisão da literatura conduzida por Van den Berg et al. (2015), estes constataram a relação entre quantidade e qualidade de espaços com três desfechos de saúde: saúde geral percebida, saúde mental percebida e mortalidade. Os resultados mostraram associações positivas entre a quantidade de espaço verde e saúde. O acesso a áreas urbanas verdes, como jardins e parques, promove a satisfação com a vida em indivíduos que residem próximo a esses locais (KREKEL; KOLBE; WÜSTEMANN, 2016). Estudos que analisam espaços verdes urbanos como agentes de promoção à saúde têm demonstrado que pessoas que vivem em áreas mais verdes tendem a ter melhor condições de saúde mental quando comparadas com as que moram em áreas menos verdes (DE VRIES et al., 2003; VAN DEN BERG et al, 2010; COOMBES; JONES; HILLSDON, 2010; DE SOUZA ARAÚJO et al., 2015).

Um estudo realizado em Pernambuco (Brasil) verificou a influência do estilo de vida na pressão arterial de frequentadores de parque de lazer da cidade de Petrolina. Homens com baixa frequência de visitas no parque apresentavam pressão arterial maior quando comparados ao grupo que se utiliza desse equipamento público com maior frequência (DE SOUZA ARAÚJO et al., 2015).

Outros benefícios constatados em outros estudos são a diminuição de mortalidade por doenças cardiovasculares (MITCHELL e POPHAM, 2008; DONOVAN et al., 2013), redução do estresse (VAN DEN BERG et al., 2010), diminuição de problemas respiratórios (LOVASI et al., 2008), fortalecimento do sistema imunológico (HANSKI et al., 2012) e melhora da capacidade cognitiva (HAN, 2009; BERMAN et al., 2008).

Estes espaços também possuem a capacidade de influenciar de modo positivo na dinâmica da sociedade de uma forma geral, pois estes locais públicos têm sido vistos como ambientes de oportunidade para interações sociais (COLEY; SULLIVAN; KUO; 1997).

A Fundação do Desenvolvimento Administrativo (Fundap), órgão paulista, que atuou de 1974 até 2014, nas áreas de capacitação, pesquisa e consultoria em gestão pública, realizou em 2013, uma pesquisa intitulada: *“Pesquisa parques urbanos e praças de São Paulo conhecimento, uso e satisfação dos cidadãos”*. Foram entrevistadas 1.099 pessoas, distribuídas proporcionalmente por todo o Estado de São Paulo. Foi constatado que 43,2% dos usuários dos Parques têm entre 35 e 59 anos, sendo que a população que menos utiliza são os idosos acima de 60 anos (15,7%). Mostra ainda que a população com maior escolaridade é 42,3% (FUNDAP, 2013). A relação dos paulistanos com os parques atualmente se encontra tão rotineira que, o Parque do Ibirapuera, o mais famoso e premiado parque da capital, autointitulado como a *“praia do paulistano”* onde seus visitantes têm refúgio, descanso e lazer (O PARQUE IBIRAPUERA, 2013).

Em 2014, o Parque do Ibirapuera foi premiado como o 8º melhor parque do mundo pelo *Travellers’ Choice 2014*, onde a avaliação se baseou nos pontos turísticos e parques de todo o mundo, durante o período de um ano. Em 2015, o jornal britânico *The Guardian* publicou uma matéria intitulada *“Os 10 melhores parques do mundo”*, onde o Ibirapuera estava entre eles, destacando-se por sua diversidade paisagística dentro da metrópole (THE GUARDIAN 2014).

O município de São Paulo possui mais de 100 parques municipais administrados pela Secretaria do Verde e Meio Ambiente do município, sendo eles distribuídos por todas as zonas e áreas da cidade, proporcionando um espaço de convivência da população em sua região (LIMNIOS e FURLAN 2013).

Os parques devem possuir infraestrutura para oferecer conforto e bem-estar aos usuários tais como sanitários e bebedouros¹ de uso público. Os parques mais novos e de maior concentração de público também contam com vaporizadores² (também chamados de aspersores, nebulizadores e *totems*). Ambos instalados em diversos parques da cidade de São Paulo, bebedouros e aspersores são abastecidos com água proveniente da rede de abastecimento público, para consumo de água potável e o outro com a formação de aerossóis para refrescamento conferindo conforto térmico (PREFEITURA, 2011).

A portaria brasileira 2914, que dispõe dos critérios de potabilidade de água, estabelece padrões microbiológicos, físicos, químicos e radioativos (BRASIL, 2011). A legislação brasileira, por meio do Anexo 1 da Portaria de Consolidação GM/MS 5 de 28/09/2017 do Ministério da Saúde (MS) (Origem: PRT MS/GM 2914/2011), determina que a qualidade bacteriológica da água para consumo humano seja avaliada mediante análise de bactérias indicadoras de contaminação fecal como *Escherichia coli* que deve estar ausente na água potável.

A mesma Portaria determina padrões para o monitoramento de bactérias heterotróficas na água que não deve exceder a 500 unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro (mL), em 20% das amostras mensais analisadas. As bactérias heterotróficas são consideradas como um grupo de bactérias indicadoras de formação de biofilme (BRASIL, 2011). A legislação ainda preconiza parâmetros quanto ao teor de cloro residual, cujo valor mínimo é de 0,2 mg/L de cloro residual livre ou 2 mg/L de cloro residual combinado ou ainda de 0,2 mg/L de dióxido de cloro em toda a extensão do sistema de distribuição, incluindo reservatório e rede, e o valor máximo em qualquer ponto do sistema de abastecimento seja de até 2 mg/L (Quadro 1).

¹ O Bebedouro pode ser definido como um dispositivo ligado à rede de água especificamente utilizado para o consumo de água potável.

² Os aspersores são equipamentos com aproximadamente 2,35 metros de altura, com mecanismo de climatização com micro aspersão de água com acionamento individual

Quadro 1-Padrão microbiológico da água para consumo humano.

Critério microbiológicos para água de consumo humano				
Tipo de água		Parâmetro		VPM ¹
Água para consumo humano		Escherichia coli ²		Ausência em 100ml
Água tratada	Na saída de tratamento	Coliformes totais ³		
	No sistema de distribuição: reservatório e rede	Escherichia coli		Apenas uma amostra, entre as amostras examinadas no mês, poderá apresentar resultado positivo
		Coliformes totais ⁴	Sistemas que abastecem menos de 20.000 habitantes	
			Abastecem a partir de 20.000 habitantes	Ausência em 100ml em 95% das amostras analisadas

Notas: ¹Valor máximo permitido; ² Indicador de contaminação fecal;

³ Indicador de eficiência de tratamento; ⁴Indicador de integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede).

Fonte: Adaptado da Portaria de Consolidação GM/MS 5 de 28/09/2017 do Ministério da Saúde (MS) (Origem: PRT MS/GM 2914/2011).

O biofilme em tubulações na rede de distribuição de água potável pode ser composto de uma vasta comunidade microbiana (MORITZ; FLEMMING; WINGENDER; 2010) e dentre os micro-organismos presentes, pode ocorrer micro-organismos oportunistas com capacidade (SUN et al., 2014). Esses micro-organismos quando encontro condições ambientais (nutrientes, temperatura) ideais, para sua sobrevivência criam-se condições ideais para a formação de biofilmes nas redes de distribuição (WHO, 2017).

O biofilme se caracteriza pela formação de agregados polimicrobianos e sua matriz é o material extracelular, produzida pela variedade de organismos presentes, compondo um conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros, conhecidos como *substâncias poliméricas extracelulares (EPS)* (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

O EPS é responsável pela adesão às superfícies e pela afinidade das moléculas no biofilme. O modo de vida de cada biofilme depende da concentração microbiana, afinidade, capacidade de interação, especificidade e da natureza dos componentes individuais, o que contribui a biodiversidade dessas comunidades microbianas (LASA; PENADÉS, 2006).

Biofilmes compostos por bactérias oportunistas, em questão, por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) podem ser preocupantes, devido ao seu caráter

patogênico e de virulência, que podem desencadear processos infecciosos (DAROUICHE, 2004).

Reconhecido como um dos principais agentes bacterianos em comunidade no mundo, *S. aureus*, destaca-se como bactéria oportunista devido a reprodução de clones epidêmicos, fatores de virulência reforçada (IWATSUKI et al., 2006) e a multirresistência a antimicrobianos em escala global (WHO, 2017).

2. *Staphylococcus aureus*: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é uma bactéria do gênero *Staphylococcus* que atualmente (2018), segundo a *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* compreende cerca de 53 espécies e 28 subespécies incluídas no gênero (EUZÉBY, 2010).

S. aureus é diferenciado de outras espécies estafilocócicas com base nos resultados positivos para os testes de coagulase, catalase, manitol e desoxiribonuclease (DNase) (LEVY et al., 2004). O genoma estafilocócico consiste em um cromossomo circular (de aproximadamente 2,8kb) (IANDOLO; STEWART, 1998), os genes que expressam a virulência e a resistência aos antimicrobianos são encontrados tanto no cromossomo (FITZGERALD; HOLDEN, 2016; HOLDEN et al., 2004) como também nos elementos extracromossômicos (FISCHETTI, 2006).

A composição genética é responsável pelos fatores de virulência e auxiliam na transferência horizontal de genes (DAVIES; DAVIES, 2010), que cria semelhança entre cepas distintas, na transferência de material genético, as características adquiridas podem ser provocadas por mutações pontuais em genes existentes, podendo evoluir independentemente da linhagem (OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000), especialmente se tratando de resistência a antimicrobianos (DAVIES; DAVIES, 2010). Essa transferência genética pode ocorrer entre cepas estafilocócicas, cepas da mesma espécie ou até mesmo outras espécies Gram positivas por via extracromossomal (GIEDRAITIENĖ et al., 2011; SCHABERG, ZERVOS, 1986).

A parede celular bacteriana estafilocócica é composta por peptídeoglicano que atua semelhante a uma endotoxina. As proteínas ligadas à parede celular bacteriana desempenham um papel importante na capacidade de colonização no

tecido do hospedeiro (DIDELOT; WALKER; PETO; CROOK; WILSON, 2016), proteínas que atuam como sensores ambientais, regulando o fluxo de nutrientes e íons através da membrana citoplasmática, como também o efluxo de toxinas e outras moléculas (KOVACS-SIMON et al., 2011; BUIST et al., 2008). Atuam na adesão superficial (adesinas), participando na síntese, degradação e remodelação enzimática do envelope celular durante o crescimento e reprodução (divisão) bacteriana, e também como resposta ao estresse ambiental (KOVACS-SIMON et al., 2011; ZHEN et al., 2009; BUIST et al., 2008; STOCK et al., 2000; NAVARRE e SCHNEEWIND, 1999).

A maioria dos estafilococos produzem microcápsulas, tratam-se de polissacarídeos capsulares, glicopolímeros altamente variáveis que estão ligados a parede de peptídeoglicano (CHAN et al., 2014; YOTHER, 2011). Estão presentes em todos os micro-organismos Gram-positivos, encontrado na maioria das cepas patogênicas (RAJAGOPAL; WALKER, 2015), além de promoverem o aumento da virulência da bactéria, tornando-a resistente à fagocitose (O'RIORDAN e LEE, 2004).

A virulência de *S. aureus* é definida por diversos fatores de virulência, dentre eles, as toxinas destacam-se pela capacidade de lesionarem as membranas biológicas, levando à morte celular, dificultando a cascata do sistema complemento ao reconhecimento pelas células de defesa do hospedeiro (OTTO, 2014).

S. aureus produz uma variedade de toxinas, cuja finalidade é evitar a morte bacteriana pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Essas toxinas podem ser codificadas em elementos genéticos móveis (por exemplo, transposons, bacteriófagos e plasmídeos) (FROST, et al., 2005), podendo levar uma diversidade de toxinas em diferentes isolados (OTTO, 2014). As leucotoxinas clássicas de *S. aureus* funcionam mediadas pelo receptor, atacando os leucócitos do hospedeiro e a leucocidina *Panton-Valentine* (*PVL*, constituída por proteínas *LukS* e *LukF*), estão associadas por infecções de cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina associadas à comunidade (VANDENESCH et al., 2003) e a infecções cutâneas graves (SHALLCROSS et al., 2013; LÖFFLER et al., 2013; GILLET et al., 2002). Porém, estudos posteriores ainda discutem o papel da *PVL* no desfecho em comunidade e clínico. Isso porque, a intensidade da *PVL* entre isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina varia, dependendo da origem (ambiente ou clínico) e área geográfica. (BHATTA et al., 2016).

As enterotoxinas são toxinas que se destacam por interferirem na função de receptores, especialmente no funcionamento gastrointestinal provocando vômitos e diarreia, quando secretadas (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012). As enterotoxinas estafilocócicas (SEs: *sea*, *see*, *seg*, *sei*, *ser* e *a set*) estão envolvidas nas principais causas de intoxicação alimentar (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). A enterotoxinas *sea* é a causa mais comum de intoxicações alimentares estafilocócicas em todo o mundo (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010) e está comumente associada ao processo inflamatório em intoxicações agudas (ORTEGA et al., 2010). Já a expressão da enterotoxinas *seg* até o momento não está muito bem esclarecido (POCSFALVI et al., 2008).

Muitas enzimas são secretadas por *S. aureus* cujo efeito é a degradação celular do hospedeiro, as quais interferem nas cascatas metabólicas ou em mecanismos de sinalização do sistema imune (OTTO, 2014). *S. aureus* produz duas coagulases: estafilo-coagulase e o fator *von Willebrand* (vWF). Ambas auxiliam na formação de coágulos de fibrina após a ligação à protrombina³ com diversas proteínas plasmáticas.

A reação enzimática converte o fibrinogênio em fibrina (OTTO, 2014; THOMER; SCHNEEWIND; MISSIAKAS, 2013) resultando na formação de coágulos de fibrina na superfície das células de *S. aureus*, dificultando a fagocitose, resultando na formação de abscesso no hospedeiro (CHENG et al., 2010; VANASSCHE et al., 2013). A nucleasse, enzima específica de *S. aureus*, tem suas funções associadas a patogênese, no que se refere a redução da atividade antibacteriana dos mecanismos extracelulares dos neutrófilos (CAO et al, 2017; BRINKMANN e ZYCHLINSKY, 2012; NOVICK, 1991).

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças americano (do inglês: *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)), *S.aureus* é uma bactéria da microbiota humana e de outros mamíferos, que na maioria das vezes, não provoca danos à saúde. Entre tanto, algumas vezes pode causar infecções graves ou fatais (CDC, 2008).

Essas infecções incluem:

- Bacteremia ou sepses: disseminação do patógeno pela corrente sanguínea;
- Pneumonia;

³ Formação de um complexo denominado estafilotrombina.

- Endocardite: infecções que acometem epitélio e/ou válvulas cardíacas, podendo agravar a uma condição de insuficiência cardíaca ou acidente vascular cerebral;
- Osteomielite: infecção que acomete o tecido ósseo, que pode ser desencadeada pelo patógeno já instalado na corrente sanguínea ou transmissão por contato direto com material, objeto ou mamífero contaminado pelo mesmo;
- Dermatites: infecções de pele, eczema;
- Diarréias e vômitos, provocados pela ingestão de *S. aureus* e/ou suas toxinas. (CDC, 2008).

Em 2012, um registro epidemiológico idealizado pela Organização Mundial da Saúde, realizou um levantamento de infecções causadas por influenza e outras condições clínicas em diversos países. Observou-se o agravamento da saúde em quadros de gripe e infecções secundárias por *S. aureus*, a progressão da doença em alguns casos levando a fascite necrosante (WHO, 2012).

2.1. *S. aureus*: Resistência a antimicrobianos

A resistência a múltiplos antimicrobianos entre patógenos, como *Staphylococcus aureus* é reflexo da evolução de espécies bacterianas. Essa evolução quanto a resistência antimicrobiana é originada por múltiplos fatores (LOWY, 2003). Esses fatores podem ser desencadeados por mecanismos que consequentemente contribuem para a resistência de *S. aureus*, estes que podem ser mediante a inativação do fármaco, exclusão do antimicrobiano por sistemas de efluxo ou outros mecanismos que modifiquem o alvo (MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010).

Os diversos mecanismos que contribuem para aquisição de resistência em cepas de *S. aureus*, podem se originar da mutação de gene cromossomal e aquisição da resistência através de genes de outros micro-organismos como a conjugação, transdução ou transformação (ITO et al., 2003).

A parede celular é o alvo de numerosos antimicrobianos, a maioria dos quais está envolvida no bloqueio ou ruptura da biossíntese de peptídeoglicano que mantém a forma e o crescimento celular. Algumas das reações enzimáticas extracelulares que ocorrem na síntese da parede celular são associadas as proteínas de ligação à penicilina (PBPs), que são o principal alvo dos

antimicrobianos beta-lactâmicos e os glicopeptídeos (MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010).

Os beta-lactâmicos são conhecidos pela presença, em sua estrutura química, do anel beta-lactâmico, uma classe farmacológica amplamente utilizada e conhecida por interferir na estrutura da parede celular bacteriana como parte de seu modo de ação (PARK e STROMINGER, 1957). A variação de antimicrobianos beta-lactâmicos se deve a alterações nas cadeias laterais do anel beta-lactâmico e constam dessa classe: i) Penicilinas: Penicilinas semi-sintéticas, Aminopenicilinas, Carboxipenicilinas, Ureidopenicilinas e, ii) Monobactâmicos e Carbapenêmicos (WILLIAMS, 1999).

As cefalosporinas são antimicrobianos beta-lactâmicos que foram introduzidos inicialmente para o tratamento de infecções estafilocócicas resistentes à penicilinase. Estruturalmente o anel beta-lactâmico das cefalosporinas está ligado a um anel de di-hidrotiazina, conferindo maior resistência a beta-lactamases comparado à penicilina. Em geral desempenham boa atividade contra proteínas alvo (PBPs), e invasão nas células bacterianas. Possuem ampla diversidade, quanto a suas propriedades antimicrobianas, a cada geração de cefalosporinas introduzida, trazia vantagens sobre a geração anterior:

- Primeira geração: atividade microbiana contra bactérias Gram-positivas;
- Segunda geração: atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Terceira geração: diminuição da atividade antimicrobiana de bactérias Gram-positivas, porém aumento da atividade antimicrobiana em bactérias Gram-negativas;
- Quarta geração: aumento da atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (PRESCOTT, 2013).

O gene codificador da beta-lactamase, localizado em um grande plasmídeo, geralmente está associado com genes adicionais de resistência a antimicrobianos (por exemplo, gentamicina e eritromicina) (LOWY, 2003). Mecanismos de resistência de *S. aureus* à penicilina são mediados pelo gene *blaZ*, que codifica a beta-lactamase, sintetizada quando o micro-organismo está exposto a antimicrobianos do grupo beta-lactâmico. A beta-lactamase hidrolisa o anel beta-lactâmico da penicilina, tornando inativo ao antimicrobiano (PEACOCK; PATERSON, 2015).

Outro mecanismo de resistência a beta-lactâmicos é mediado pelo gene *mecA*, componente móvel genético, do cassete estafilocócico que codifica a síntese em específico da proteína de ligação à penicilina 2a (PBP2a) (DAUM et al., 2002; CHAMBERS; DELEO, 2009). A PBP2a codificada por *mecA* mantém a biossíntese da parede celular tornando-a resistentes aos beta-lactâmicos (DAUM et al., 2002; DELEO, 2009). O PBP2a possui baixa afinidade por antimicrobianos beta-lactâmicos, o que permite a sobrevivência do micro-organismo a altas concentrações desses agentes. Assim, como a resistência à meticilina é determinada pela presença de *mecA*, o que confere resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, incluindo as cefalosporinas (PEACOCK; PATERSON, 2015). A meticilina foi a primeira penicilina semissintética, resistente a degradação diante a ação da beta-lactamase e sua finalidade era o tratamento de infecções por cepas produtoras de penicilinase (AL-MEBAIRIK et al., 2016). As proteínas de ligação à penicilina (PBPs) são essenciais nas funções enzimáticas ligadas à membrana as quais estimulam a reação de transpeptidação, fazendo a ligação cruzada de cadeias de peptidoglicano da parede bacteriana. A PBP2a destaca-se das demais PBPs não apenas por seu papel na resistência microbiana como também na reação de transpeptidação (LIM e STRYNADKA, 2002).

A vancomicina é um glicopeptídeo utilizado no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina e beta-lactâmicos, porém suscetíveis à vancomicina (WALSH e HOWE, 2002). O mecanismo de resistência pode ser variável, entretanto se resume na inibição da biossíntese da parede celular (TOMASZ, 2014). Embora nos últimos anos, outros medicamentos mais recentes tenham mostrado boa resposta contra as cepas MRSA, a vancomicina continua sendo o antimicrobiano de escolha para o tratamento de infecções graves por MRSA (MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017).

A resistência a antimicrobianos de *S. aureus* tem sido uma importante preocupação em saúde pública em todo o mundo (ORTEGA et al., 2010). No primeiro semestre de 2017, divulgou-se a primeira lista de patógenos prioritários em caráter global de resistência a antimicrobianos, a classificação de prioridade se deve a urgência de novos antimicrobianos e foi organizado em três categorias de prioridade: crítica, alta ou média. A categoria crítica inclui bactérias multirresistentes,

com alta periculosidade em instituições de assistência à saúde, cujos pacientes fazem uso de dispositivos de suporte respiratório e cateteres intravenosos. As categorias de prioridade alta e média incluem bactérias que estão cada vez mais resistentes a antimicrobianos utilizados em infecções comuns. *S. aureus* foi classificado na prioridade alta, a qual inclui bactérias que estão cada vez mais ampliando resistência as opções de antimicrobianos disponíveis, sendo micro-organismos responsáveis por doenças de baixa complexidade, mas que podem evoluir para doenças mais graves (WHO, 2017).

Aspectos referentes aos riscos associados à resistência microbiana em achados ambientais têm sido discutidos (MANAIA, 2017). Outros aspectos interessantes que vem sendo discutidos são: (i) transferência de genes que possam conferir resistência microbiana, os quais possam ser transferidos a outros micro-organismos; (ii) e o risco de genes de resistência a antimicrobianos do ambiente serem transmitidos para seres humanos (FERRI et al., 2017). Aspectos como estes necessitam serem abordados para que se possa compreender melhor como diversos processo, em especial o tratamento de diversos tipos de água e a utilização dos recursos ambientais estão de alguma forma contribuindo para a presença de micro-organismos resistentes a antimicrobianos no ambiente (MANAIA, 2017; KAESEBERG et al., 2018). A resistência microbiana é estimulada por alguns mecanismos, como a produção de enzimas que inativam ou transformam o princípio ativo dos antimicrobianos, alteração do sítio de ação bacteriano, alterações na bomba de fluxo celular da bactéria, adaptação da permeabilidade da membrana bacteriana (GUIMARÃES et al., 2010).

2.2. *S. aureus*: biofilme

A presença de estafilococos em superfícies sólidas resulta da estrutura de ácido teicóicos que atuam como receptores de ligação associando-se a outros micro-organismos (GROSS et al., 2001) e proteínas de superfície envolvidas na aderência de superfícies estáticas (CUCARELLA et al., 2001). *S. aureus* possui um grupo de proteínas associadas a formação do biofilme (*bap*), codificadas pelo gene *bap*, sendo que diversos dos seus componentes proteicos já foram

detectados em vários habitats incluindo lagos de água doce, água salobra, reservatórios de água potável e estações de tratamento de águas residuais (OTZEN; NIELSEN, 2008). Mecanismos que conferem patogenicidade a *S. aureus*, presentes em biofilmes, ocorrem pela capacidade de aderência às células do hospedeiro pela atuação de proteínas de superfície celular e maturação do biofilme (OTTO, 2006). Biofilmes contendo bactérias do gênero *Staphylococcus sp*, são resistentes a alterações ambientais, portanto quando invadem as células do hospedeiro são capazes de se disseminar, proliferando-se e desenvolvendo processos infecciosos (OTTO, 2006; HØIBY, 2010).

Diversos estudos têm evidenciado o aumento da presença de micro-organismos oportunistas em tubulações de água potável, sugerindo o risco de infecções por esses agentes patogênicos (MARRAS et al., 2007; BILLINGER et al., 2009; CDC, 2011; COLLIER et al., 2012; WANG et al., 2014; VAN DER WIELEN et al., 2016). Micro-organismos com capacidade patogênica, como *S. aureus* e outras espécies de *Staphylococcus* podem ser transportados nas tubulações, adaptando-se a água potável, aumentando as condições de multiplicação em todo sistema de tubulações (FALKINHAM; PRUDEN; EDWARDS; 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*, WHO), o risco à saúde humana no consumo de água potável, contendo *S. aureus* é desconhecido (WHO, 2017), já que são raros os estudos sobre a presença desses micro-organismos sobrevivendo em água de consumo humano. No entanto, outras fontes de água potável já têm sido relacionadas a infecções por *S. aureus* (ARMSTRONG et al., 1981; KESSIE et al., 1998; KAZAKOVA, 2005; SEYEDMONIR; YILMAZ; ICGEN; 2015), como em águas de piscinas, de hidromassagens, de spas e de esgoto (ARMSTRONG et al., 1981; KESSIE et al., 1998; HARAKEH et al., 2006; PAPADOPOULOU et al., 2008).

Diante do exposto, dada a importância que os parques adquiriram ao longo do desenvolvimento urbano na cidade para a sociedade, sendo ambientes de convívio em comunidade, de aglomeração de pessoas onde pode haver problemas de saúde e a escassez de dados referente a *S. aureus* em bebedouros e aspersores, justifica-se o presente estudo como forma de auxiliar na prevenção de eventuais agravos à saúde da população usuária dos parques.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo desta pesquisa foi detectar a presença de *Staphylococcus aureus* na água de bebedouro e no biofilme dos aspersores dos parques municipais da cidade de São Paulo.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar ocorrência de *S. aureus* nas amostras de água de bebedouro e biofilme dos aspersores nos parques públicos da cidade.
- ✓ Verificar a ocorrência de cepas de *S. aureus* nas amostras de água de bebedouro e biofilme dos aspersores nos parques públicos da cidade resistentes a antimicrobianos;
- ✓ Quantificar *E. coli* e bactérias heterotróficas nas amostras de água de bebedouro e biofilme dos aspersores nos parques públicos da cidade;
- ✓ Verificar a concentração de cloro residual nas amostras de água de bebedouros nos parques públicos da cidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

As fontes de água para consumo humano e de biofilmes de aspersores, foram avaliadas em quatro parques municipais da cidade de São Paulo, escolhidos com base na localização, frequência de usuários, utilização de bebedouros e aspersores (Tabela 1).

A coleta das amostras de água de bebedouros e de biofilme dos vaporizados ocorreu de março de 2017 até março de 2018, com frequência quinzenal, perfazendo um total de 552 amostras, incluindo água dos bebedouros (468) e biofilme dos aspersores (84).

O estudo de campo teve o apoio da Secretaria do Verde e Meio Ambiente (SVMA) da Cidade de São Paulo, cuja autorização cedida pelo Departamento de Parques e Áreas Verdes (DEPAVE -5), corresponde ao processo administrativo de nº 2017-0.021.265-2 (Anexo 1).

Tabela 1-Características dos parques municipais selecionados para estudo.

Parques	Ano de Implantação	Área (m²)	Quantidade de bebedouros	Quantidade de Aspersores
Aclimação	1986	112.000	6	1
Buenos Aires	1987	25.000	3	1
Ibirapuera	1954	1.584.000	3	3
Piqueri	1976	97.200	6	0

FONTE: DEPAVE -5 (2017).

4.1.1. Locais de coletas

Parque da Aclimação

O Parque da Aclimação (Figura 1), localizado no bairro que leva o mesmo nome ocupa uma área de cerca de 112.000 m² composto por um lago central artificial, diversas espécies de aves, vegetação de diversas espécies nativas e pequenos bosques (SCHOENLEIN; MOREIRA; GOMES, 2015).

Parque Buenos Aires

Criado inicialmente como praça em 1987 foi considerado parque apenas em 1992 (Figura 3).

Figura 3- Mapa satélite do parque Buenos Aires.

Fonte: Google Earth (2017).

Localizado na área nobre da região central da cidade, no bairro Higienópolis, possui jardins e gramados. Segundo o guia de parques da Prefeitura (2014), o parque recebe diariamente cerca de 4.000 pessoas de diferentes idades e interesses.

O Parque possui três bebedouros que estão distribuídos próximos a um dos portões de acesso a Av. Angélica, dentro do parquinho infantil e a praça de apresentações do local, sendo que nenhuns dos bebedouros estão localizados próximo aos sanitários. O parque possui um aspersor que está localizado próximo aos equipamentos de exercício ao ar livre.

Parque do Ibirapuera

O Parque do Ibirapuera (Figura 4), localizado na zona sul da cidade, no bairro de Vila Mariana, compõe a área verde e de lazer de maior importância para a população paulistana desde 1988 (Centro de Pesquisas de História Natural, 1988). O local possui aproximadamente 1.584.000 m², contendo três grandes lagos ao longo da área total (SCHOENLEIN; MOREIRA; GOMES, 2015).

Figura 4- Mapa satélite do Parque do Ibirapuera.

Fonte: Google Earth (2017).

O parque possui três bebedouros localizados próximos a portões de acesso, e distantes dos sanitários, além de três aspersores distribuídos entre as pistas de corrida e ciclovia (Figura 5).

Figura 5- Bebedouro e aspersor localizados no Parque Ibirapuera.

Fonte: Autor (2017).

Parque do Piqueri

O parque (Figura 6) situado na zona leste da cidade, no bairro do Tatuapé, foi fundado em 1976, em uma chácara que trazia o mesmo nome, a qual faz referência à comunidade indígena que habitava aquela região.

Figura 6- Mapa satélite do Parque Piqueri.

Fonte: Autor (2017).

Possui área de aproximadamente 97.200 m², que recebe cerca de 2 mil pessoas por semana de acordo com a prefeitura do município (PREFEITURA, 2014). O parque possui cerca de oito bebedouros, localizados ao longo da pista principal de caminhada, sendo que dois destes estão próximos aos sanitários (Figura 7).

Figura 7- Bebedouro localizado no Parque do Piqueri.

Fonte: Google Earth (2017).

A coleta e preservação das amostras foram realizadas segundo os *Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater* (AWWA 2012).

As amostras foram coletadas em frascos de polipropileno esterilizados (em autoclave a 121 °C por 15 minutos), contendo 0,1ml de tiosulfato de sódio a 1,8%. Depois de coletadas, as amostras foram devidamente acondicionadas e analisadas em um período máximo de 24 horas. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Resistência a Antimicrobianos (MicroRes), do Departamento de Saúde Ambiental, na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP). O biofilme dos aspersores foi coletado por *swab*⁴ com meio de conservação *Stuart* (*Stuart Agar Gel Medium*) (COPAN®, Califórnia – EUA), para a preservação e transporte adequado até o laboratório.

4.2. Determinação de cloro residual livre

A análise de cloro residual livre nas amostras de água dos bebedouros foi realizada pelo o método colorimétrico (PoliControl®, 2015) (São Paulo – BRA). A determinação de cloro residual livre se dá pela comparação visual de cor característica da solução tampão (água destilada) e da amostra adicionada ao reagente são observadas com auxílio de disco colorimétrico (Figura 8). A indicação da presença de cloro residual livre, na água através da comparação visual, é expressada em uma escala de: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/L.

Figura 8- Avaliação de Cloro pelo método colorimétrico.

Fonte: Autor (2017).

⁴ Haste flexível com algodão estéril

4.3. Indicadores de qualidade de água

4.3.1. Bactérias Heterotróficas

Para a quantificação de bactérias heterotróficas na água de bebedouro, a técnica utilizada foi a de *Pour Plate* (AWWA 2012) a qual consiste na inoculação de 0,1 e 1,0 mL das amostras em placa de Petri, em seguida adicionado à placa o meio *Plate Count Agar* (PCA) (Difco®, Michigan-EUA). As placas foram incubadas a $35\pm0,5$ °C por 48 horas. Após o período de incubação, observou o crescimento bacteriano (Figura 9) e realizado a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados para bactérias heterotróficas foram expressos por UFC/ml.

Figura 9- Crescimento bacteriano em meio *Plate Count Agar*.

Fonte: Autor (2017).

4.3.2. *Escherichia coli*

A quantificação de *Escherichia coli* em água de bebedouro, foi realizada a partir da técnica de membrana filtrante (AWWA, 2012). O volume de 100 mL da amostra foi concentrado em membrana de 0,45µm de porosidade e 47 mm de diâmetro, e transferida para o meio de cultura *M -Endo Agar* (Difco®, Michigan-EUA).

Para análise do biofilme coletado dos aspersores, o material contido no *swab* em meio *Stuart* (*Stuart Agar Gel Medium*) (COPAN®, Califórnia – EUA), foi

inoculado em placa com meio de cultura *M -Endo Agar* (Difco®, Michigan-EUA) por método de esgotamento.

As amostras inoculadas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após período de incubação, foi observada a presença de colônias típicas⁵ e em seguida, transferidas para tubo contendo caldo seletivo *EC-MUG (EC Medium with MUG)* (Difco®, Michigan-EUA) para a confirmação de *E. coli*. Os tubos contendo as colônias inoculadas foram incubados a $44 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Após o período de incubação foi realizada a leitura da metabolização da 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide, enzima B-glucoronidase (MUG) (Difco®, Michigan-EUA), que evidencia a emissão da fluorescência, observada no material inoculado em câmara de luz ultravioleta (365nm), assim confirmando um resultado positivo para a presença de *E.coli*. Os resultados para *E. coli* e coliformes termotolerantes na água e para o biofilme dos aspersores são expressos em Presença (P) e Ausência (A).

4.4. Detecção de *S. aureus*

4.4.1. Investigação Bacteriológica

A detecção de *Staphylococcus aureus* em água de bebedouro foi realizada a partir da técnica de membrana filtrante (AWWA, 2012). O volume de 100 mL de amostra foi concentrado em membrana de 0,45 μm de porosidade e 47mm de diâmetro e transferido para o meio de cultura seletivo *Baird Parker Agar* (Difco®, Michigan-EUA).

Para análise do biofilme coletado dos aspersores, o material contido no *swab* em meio Stuart (*Stuart Agar Gel Medium*) (COPAN®, Califórnia – EUA), foi inoculado em placa com meio de cultura *Baird Parker Agar* (Difco®, Michigan-EUA) por método de esgotamento.

As amostras inoculadas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Após período de incubação foi observada colônias típicas⁶ (Figura 10). Nesta primeira etapa de análise os resultados na água foram expressos em UFC/mL e para o

⁵ Colônias típicas de *Escherichia coli*, apresentam colônias esverdeadas com brilho metálico (Difco®).

⁶ Os estafilococos produzem colônias cinzentas escuras a preto, podendo formar um halo em torno da colônia esbranquiçado (Difco®).

biofilme dos aspersores, os resultados foram expressos em Presença (P) e Ausência (A).

Figura 10- Colônias típicas de *Staphylococcus aureus* em Agar BairdParker de amostra de água de bebedouro.

Fonte: Autor (2017).

As colônias típicas foram observadas inoculadas em placas contendo meio de enriquecimento de Agar BHI (do inglês: Brain Heart Infusion Agar) (Difco®, Michigan-EUA) e incubada “overnight” a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

As provas microbiológicas complementares para confirmação da espécie *Staphylococcus aureus*, foram baseadas no manual de “*Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde: Detecção e identificação de bactérias de importância médica*” (ANVISA, 2013).

O crescimento bacteriano foi submetido a análise por microscopia óptica para caracterização morfotintorial pelo método de GRAM (Figura 11). A observação de cocos GRAM positivos com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados de forma irregular em aspecto de “cachos de uvas”, sugerem colônias pertencerem ao gênero bacteriano *Staphylococcus*, determinando a continuidade do rastreamento. Mediante a essas

características morfológicas, foi realizado testes complementares, descritos a seguir (ANVISA, 2004):

Figura 11- Análise microscópica de amostra submetida a coloração de GRAM.

Fonte: Autor (2016).

- **Catalase:** As bactérias do gênero *Staphylococcus* produzem catalase, e o teste é realizado, pela adição de peróxido de hidrogênio, a uma colônia bacteriana. A produção de catalase pode ser observada pelo surgimento de bolhas de oxigênio (TORTORA, 2012).
- **Coagulase⁷:** o crescimento bacteriano em Agar *BHI* (*Brain Heart Infusion Agar*) (Difco®, Michigan-EUA) de cada amostra, foi inoculado em tubo de ensaio contendo 0,5 mL de plasma de coelho (Coagu-plasma) (Laborclin®, Paraná – BRA), por 4 a 12 horas à 35°C e mantido em inclinação de 90° (Figura 12).
- **Teste DNase:** o crescimento bacteriano em Agar *BHI* (*Brain Heart Infusion Agar*) (Difco®, Michigan-EUA) de cada amostra, foi inoculado em meio diferencial contendo DNA (DNase Test Agar) (Difco®, Michigan-EUA) e incubado a 35 ± 2°C por um período de 18 a 24 horas. Após o período de incubação, foi adicionado ao Agar *HCl* (Ácido Clorídrico) a uma concentração de 1N de concentração, sobre o crescimento bacteriano durante ± 30 segundos.

⁷ A presença da coagulase livre bacteriana em contato com o plasma do teste, reage com o fibrinogênio formando a fibrina, que é observada com a formação de coágulo (Figura 13). Esta característica é específica do *Staphylococcus aureus* e o diferencia dos demais estafilococos não produtores de coagulase (ANVISA, 2004).

Figura 12- Formação de fibrina em teste de coagulase de amostra.

Fonte: Autor (2017).

S. aureus contém a enzima desoxiribonuclease, que em contato com o ácido, degrada o DNA contido neste meio de cultura, podendo ser observado através da formação de um halo (Figura 13) em torno do crescimento bacteriano, diferenciando *S. aureus* dos estafilococos coagulase negativa (SCoN). (ANVISA, 2004).

Figura 13- Formação de halo transparente em torno de crescimento bacteriano em Ágar DNase, caracterizando presuntivo para *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Autor (2017).

- **Teste Manitol:** o crescimento bacteriano em Agar *BHI* (*Brain Heart Infusion Agar*) (Difco®, Michigan-EUA), foi inoculado em *Mannitol Salt Agar* (Difco®, Michigan-EUA), incubado a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 18 a 24 horas (ANVISA, 2004).

A presença de *S. aureus* acidifica o manitol, alterando o pH, resultando na alteração de cor do meio de cultura de vermelho para amarelo (Figura 14) (Difco®, Michigan-EUA).

Figura 14- Crescimento bacteriano em Agar Manitol.

Fonte: Autor (2017).

Criopreservação

Após a identificação presuntivamente como *S. aureus*, os isolados das amostras de água dos bebedouros (104) e biofilme dos aspersores (15), os mesmos foram encaminhados para armazenamento em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Difco®, Michigan-EUA) (20µl) e glicerol (70%) em micro tubo em freezer a -80°C.

4.4.2. Confirmação da espécie *S. aureus*

Para a identificação dos isolados suspeitos de pertencer à espécie *S. aureus*, houve a colaboração da Dr.^a Rosemeire C. Zanella do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Adolf Lutz (IAL), que cedeu as cepas controles de *S. aureus* (Tabela 2) para padronização dos ensaios. Todos os ensaios de PCR foram realizados juntamente com os controles positivos, além de repetidos e revisados mais de uma vez.

Tabela 2- Cepas padrão, utilizadas como controle de qualidade do ensaio deste estudo.

Cepas controle	Gene alvo
<i>S. aureus</i> (ATCC 2832)	<i>Luk - PV</i>
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213 ABP)	<i>nuc</i> e <i>seg</i>
<i>S. aureus</i> (ATCC 43300)	<i>coa</i> e <i>mecA</i>
<i>S. aureus</i> (ATCC 13565)	<i>sea</i>

Extração de DNA

Os isolados crioconservados, foram inoculados em caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) (Difco®, Michigan-EUA) e incubados “*overnight*” a 35°C ± 0,2 °C.

A extração do DNA bacteriano dos isolados, foi baseado na metodologia usada por COSTA et al., 2005. Foram transferidos 1000µL do inóculo crescido no caldo de enriquecimento para um microtubo esterilizado e submetido a centrifugação a 13.0000 rpm por 10 minutos. Após o processo de centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensão em 25 µL de enzima lítica lisostafina (1µg/mL) (Sigma®, Missouri- EUA) e 25 µL de água ultrapura, incubado por 10 minutos a 37° ± 0,2 °C em banho com agitação. Em seguida foi adicionado 50 µL de proteinase K (20 mg / mL em água deionizada esterilizada (Roche®, California-EUA) e 150 µL de tampão Tris (0,1 M, pH 7,5) (USB Corp.®, Ohio - EUA) e incubada a 37 ° C por dez minutos em banho com agitação, seguido de incubação em banho-Maria a 95 ° C por dez minutos. Após a incubação final, a solução foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado.

Reação em Cadeia da Polimerase: PCR Convencional

Para amplificação dos genes de interesse (descritos a seguir), foi utilizado o ensaio de PCR- Convencional. Para a realização do ensaio foi utilizado 5 µL de DNA de cada amostra adicionado a um volume de 25µL da solução da reação:15,8µL de Água ultrapura livre de DNase irradiada a 30KGray (LGC Biotecnologia ®, São Paulo – BRA); 2,5µL de Solução tampão 5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega®, Madison - EUA), 1,0µL de Cloreto de magnésio (MgCl₂) a 25 mM (Promega®, Madison - EUA); 1,0µL de cada um dos iniciadores 10µM; 0,5µL de solução de dntps a 200 uM (dCTP, dTTP, dGTP e dATP a 100mM, 25 µmol)

(Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts – EUA) e 0,2µL de GoTaq® Flexi DNA Polymerase na concentração de 5u/µL (Promega®, Madison - EUA).

Os produtos obtidos no ensaio de PCR convencional foram submetidos ao ensaio de Eletroforese em gel de Agarose. O produto final da PCR convencional, foi distribuído em gel de Agarose a 1,5% (Bio-Rad®, California - EUA) em 1 x tampão Tris-borato-EDTA (Tris-borato 0,05 M, EDTA 0,03 M) contendo 2 µL de etídio brometo (10 mg / mL) (Biotech®, Suécia - SWE) correndo a 70 V durante 40 minutos e visualizado com auxílio de câmara de luz UV.

Iniciadores e condições da reação

Os iniciadores utilizados na identificação dos isolados com características compatíveis a *S. aureus* está descrita na Tabela 3. Os genes *coa* utilizado no estudo de Nagaraj (2014), cujo gene alvo, codifica coagulase, e o gene *nuc* utilizado por Barski (1996)⁸, corresponde a codifica nuclease, essas características são fundamentais do *S. aureus*.

Tabela 3- Iniciadores (*primers*) utilizados para detectar *S. aureus*.

Iniciadores	Sequencia (5' -3')	Fonte	Amplicon (pb)
<i>Coa</i>	F- CGTTACAAGGTGAAATCGTT	NAGARAJ et al. 2014.	247
	R- CCATATTGAGAAGCTTCTGTTG		
<i>Nuc</i>	F- GCGATTGATGGTGATACGGTT	BARSKI et al. 1996.	278
	R- AGCCAAGCCTTGACGAATAAGC		

As condições de ciclagem (Tabela 4) utilizadas no ensaio de PCR – Convencional para amplificação dos genes *coa* e *nuc* foram às mesmas, totalizando 3 horas e 22 minutos de reação.

⁸ Barski(1996) descreve o iniciador *nuc* de seu estudo, com um amplicon de 447pb, entretanto, verificamos através do software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, CA – EUA), o alinhamento dessa sequência e o programa nos revelou uma sequência de 278 bp.

Tabela 4- Etapas da PCR para detecção dos genes *coa* e *nuc*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94	00:05:00	1
Desnaturação	94	00:01:00	30
Anelamento	55	00:01:00	
Extensão	72	00:01:30	
Extensão final	72	00:08:00	1
Imersão	10	Indefinido	1

Os iniciadores utilizados para verificar a virulência dos isolados de *S. aureus* foram os utilizados por Jarraud (2002). Os genes alvo (Tabela 5): *sea* que codifica enterotoxinas; *seg* que codifica toxinas em processos inflamatórios e *luk-PV* que codifica resposta inflamatória.

Tabela 5- Iniciadores (*primers*) utilizados para detectar virulência nos isolados de *S. aureus*.

Iniciadores	Sequencia (5' -3')	Fonte	Amplicon (pb)
<i>Sea</i>	F- GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA	JARRAUD, et al., 2002.	560
	R- CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTC		
<i>Seg</i>	F- AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC	JARRAUD, et al., 2002.	642
	R- AAAGTTATATGGAACAAAAGGTACTAGTTC		
<i>lukS-PV</i> <i>lukF-PV</i>	F- ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA R- GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	JARRAUD, et al., 2002.	433

As condições de ciclagem (Tabela 6) utilizadas no ensaio de PCR – Convencional para amplificação do gene *sea* totalizou 2 horas de reação.

Tabela 6- Etapas da PCR para detecção do gene *sea*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94	00:01:00	1
Desnaturação	94	00:00:45	30
Anelamento	55	00:01:00	
Extensão	72	00:01:00	
Extensão final	72	00:01:00	1
Imersão	10	Indefinido	1

As condições de ciclagem (Tabela 7) utilizadas no ensaio de PCR – Convencional para amplificação dos genes *seg* e *luk-PV* foram as mesmas totalizando 1 hora de 37 minutos de reação.

As condições de ciclagem (Tabela 7) utilizadas no ensaio de PCR – Convencional para amplificação dos genes *seg* e *luk-PV* foram as mesmas totalizando 1 hora de 37 minutos de reação.

Tabela 7- Etapas da PCR para detecção dos genes *seg* e *luk-PV*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94	00:05:00	1
Desnaturação	94	00:00:45	30
Anelamento	55	00:00:45	
Extensão	72	00:00:45	
Extensão final	72	00:05:00	1
Imersão	10	Indefinido	1

Para determinar a identificação da espécie (Tabela 8) *S. aureus*, o gene *mecA* utilizado no estudo de Okuma (2002)⁹ cujo gene alvo, presente em MRSA (*do inglês: Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*), que codifica a resistência microbiana a Meticilina.

Tabela 8- Iniciador utilizado para detecção do gene *mecA*.

Iniciadores	Sequencia (5' -3')	Fonte	Amplicon (pb)
<i>mecA</i>	F- CTATCCACCCTCAAACAGG	OKUMA, 2002.	280
	R- CGTTGTAACCAACCCAAGA		

As condições de ciclagem (Tabela 9) utilizadas no ensaio de PCR – Convencional para amplificação dos genes *mecA* foram as mesmas totalizando 3 horas e 30 minutos de reação.

⁹ O iniciador proposto para o gene alvo foi do estudo de Nagaraj (2014), entretanto não houve reprodutibilidade em nossos ensaios, por tanto optamos pelo utilizado por Okuma (2002) que atingiu todos os objetivos.

Tabela 9- Etapas da PCR para detecção do gene *mecA*

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	00:05:00	1
Desnaturação	95	00:00:30	40
Anelamento	50	00:01:00	
Extensão	72	00:02:22	
Extensão final	72	00:05:00	1
Imersão	10	Indefinido	1

Eletroforese em gel de Agarose

Os produtos obtidos no ensaio de PCR convencional, foram distribuídos em gel de Agarose a 1,5% (Bio-Rad®, California - EUA) em 1 x tampão Tris-borato-EDTA (Tris-borato 0,05 M, EDTA 0,03 M) contendo 2 µL de etídio brometo (10 mg / mL) (Biotech®, Suécia - SWE) correndo a 70 V durante 30 minutos e visualizado com auxílio de câmara de luz UV (Figura 15).

Figura 15- Eletroforese dos controles positivos de identificação para *S. aureus*.

Fonte: Autor (2018).

4.4.3. Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

4.4.3.1. Método de disco-difusão

A resistência microbiana das cepas de *S. aureus* foi realizada através do método clássico de Kirby e Bauer (1966) de difusão de disco em Agar. As cepas cultivadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) (Difco®, Michigan-EUA) a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, tiveram a densidade ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) através da suspensão direta das colônias (CLSI, 2017) em caldo Mueller Hinton (*Mueller Hinton Broth*) (Difco®, Michigan-EUA). Os inóculos devidamente preparados, foram semeados em placas de Petri (150 mm x 20 mm), contendo Ágar Muller Hinton (*Muller Hinton Agar*) (Difco®, Michigan-EUA), seguido da aplicação dos discos dos antimicrobianos (DME®, São Paulo, BRA) selecionados (Tabela 10) e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Tabela 10- Antimicrobianos selecionados para teste de sensibilidade em difusão de disco para cepas de *S. aureus*.

Antimicrobianos	Concentração (µg)	Zonas de inibição (mm)			Grupo farmacológico
		S	I	R	
Cefoxitina	30	≥ 22	N/A	≤ 21	Cefamicinas
Ciprofloxacino	5	≥ 21	16-20	≤ 15	Fluoroquinolona
Clindamicina	2	≥ 21	15-20	≤ 14	Lincosamida
Cloranfenicol	30	≥ 18	13-17	≤ 12	Cloranfenicol
Eritromicina	15	≥ 23	14-22	≤ 13	Macrolídeo
Gentamicina	10	≥ 15	13-14	≤ 12	Aminoglicosídeo
Penicilina-G	10	≥ 29	N/A	≤ 18	Penicilina
Rifampicina	5	≥ 20	17-19	≤ 16	Rifamicina
Sulfazotrim	25	≥ 16	11-15	≤ 10	Sulfonamida
Tetraciclina	30	≥ 19	15-18	≤ 14	Tetraciclina
Oxacilina*	1	≥ 22	N/A	≤ 21	Penicilina

* os parâmetros usados para a Oxacilina, são com base na utilização de Cefoxitina (30µ g).

Fonte: Adaptado de CLSI (2017). N/A= Não Avaliado.

Após o período de incubação a leitura do antibiograma foi realizada pela medição (mm) de halo de inibição do crescimento bacteriano em torno de cada disco antimicrobiano, com o auxílio de paquímetro. A determinação do perfil de sensibilidade dos isolados de *S. aureus* foi realizada com base no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2017.

4.4.3.2 Microdiluição em caldo

A sensibilidade antimicrobiana à Vancomicina se baseou nos padrões do CLSI (2017), técnica de microdiluição em caldo em microplaca. Para a execução da técnica, as cepas de *S. aureus* foram inoculadas em caldo *BHI* (*Brain Heart Infusion Broth*) (Difco®, Michigan-EUA) a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, tiveram a densidade ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland (5×10^5 UFC/mL) através da suspensão direta das colônias (CLSI, 2017) em caldo Mueller Hinton (*Mueller Hinton Broth*) (Difco®, Michigan-EUA). Dos inóculos devidamente preparados, 100 µL foram distribuídos de cada um nos poços de microplacas estéreis, contendo as concentrações de vancomicina, seguido de incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Além disso, foi utilizada a cepa de controle ATCC29213 como controle positivo e como controle negativo a incubação apenas do antimicrobiano e o caldo, sem adição de cultura conforme ilustrado na figura 16.

A resistência à vancomicina foi testada em concentrações de 0,5 a 32 µg/mL, e os CIMs foram lidos manualmente após 24 h de incubação.

A análise dos resultados do teste e o critério interpretativo (Tabela 11) da CIM para definir a sensibilidade de *S. aureus* se basearam no CLSI (2017).

Tabela 11- Interpretação da concentração inibitória mínima (CIM) de teste sensibilidade ao agente antimicrobiano vancomicina por método de diluição para isolados de *S. aureus*.

Interpretação	Faixa de CIMs
Cepas sensíveis à Vancomicina	0,5-2 µg /mL
Sensibilidade reduzida à Vancomicina	4-8 µg/mL
Cepas resistentes à Vancomicina	≥ 32 µg/mL

Fonte: Adaptado de CLSI (2017).

Figura 16- Ilustração da distribuição de vancomicina para a técnica de microdiluição em microplaca.

CMH* = Caldo Mueller Hinton.

Fonte: Autor (2018).

5. RESULTADOS

Para a investigação de água de bebedouro e de biofilme de aspersores de água foram analisadas 552 amostras das quais 468 de água dos bebedouros e 84 de biofilme dos aspersores.

Os padrões bacteriológicos de qualidade – *E. coli* e bactérias heterotróficas - de água para consumo humano atenderam os valores estabelecidos pela Portaria de Consolidação GM/MS 5 de 28/09/2017 do Ministério da Saúde (MS) (Origem: PRT MS/GM 2914/2011). Os valores de cloro residual livre ($\geq 0,2\text{mg/L}$) atenderam ao estabelecido pela Portaria de Consolidação GM/MS 5 de 28/09/2017 em 84% (393/468) das amostras avaliadas. No parque do Ibirapuera 94,8% (74/78) das amostras atenderam o valor de cloro residual estabelecido pela portaria de potabilidade vigente, seguido das amostras do parque do Piqueri com 90,3% (141/156), do parque Buenos Aires com 83,3%(65/78) e do parque da Aclimação com 79,4%(124/156).

Das 468 amostras de água dos bebedouros foram isoladas 104 cepas (22,2%) presuntivamente caracterizadas como pertencentes à espécie *S. aureus*, enquanto que nas amostras de biofilme dos aspersores foram 17,8% dos isolados (15/84). Do total dos 119 isolados presuntivamente caracterizados como *S. aureus*, 19,3% (23/119) foram confirmados por PCR convencional como *S. aureus*. Estes isolados eram 95,6% (22/23) das amostras de água provenientes dos bebedouros de água e 1 isolado proveniente de biofilme de aspersor.

A tabela 12 apresenta as provas bioquímicas na caracterização presuntiva de *S. aureus* e da PCR para confirmação dos isolados das amostras avaliadas em parques localizados no município de São Paulo.

Os dados amostrais (tabela 13) obtidos pelo teste de qui-quadrado, não indicam evidência estatística que a presença de cloro está associada a inibição de crescimento de *S. aureus* nas amostras de água.

Tabela 12- Características fenotípica dos isolados de *S. aureus* das amostras avaliadas e confirmação por PCR.

Parque	Dispositivo	Ponto	Gram	Testes Bacteriológicos					PCR	
				Coagulase 4h	Coagulase 12h	Catalase	DNase	Mannitol	nuc	coa
Aclimação	B	1	+	+	+	+	+	+	+	+
Aclimação	B	1	+	+	+	+	+	+	+	+
Aclimação	B	1	+	+	-	+	+	+	+	+
Aclimação	B	1	+	+	+	+	+	+	+	+
Aclimação	B	1	+	-	-	+	+	+	+	+
Aclimação	B	1	+	+	+	+	+	+	+	+
Aclimação	B	1	+	+	+	+	+	+	+	+
Aclimação	B	1	+	+	+	+	+	+	+	+
Aclimação	B	2	+	+	+	+	+	-	+	+
Aclimação	B	4	+	+	+	+	+	+	+	+
Aclimação	B	6	+	+	+	+	+	+	+	+
Aclimação	B	6	+	+	-	+	-	+	+	+
Aclimação	B	6	+	+	+	+	-	+	+	+
Buenos Aires	B	2	+	-	-	+	+	+	+	+
Buenos Aires	B	3	+	+	+	+	+	-	+	+
Buenos Aires	B	3	+	+	+	+	+	-	+	+
Ibirapuera	A	1	+	+	+	+	+	+	+	+
Ibirapuera	B	2	+	+	+	+	+	+	+	+
Ibirapuera	B	3	+	-	-	+	+	+	+	+
Piqueri	B	2	+	+	+	+	+	-	+	+
Piqueri	B	3	+	+	-	+	+	-	+	+
Piqueri	B	3	+	+	-	+	+	-	+	+
Piqueri	B	5	+	+	+	+	+	+	+	+

B: Bebedouro; A: Aspersor.

Tabela 13- Avaliação da associação de crescimento de *S. aureus* teor de cloro na água, teste do qui-quadrado ($p < 0,05$).

Dados observados

Aclimação		<i>S. aureus</i>		Total	Buenos Aires		<i>S. aureus</i>		Total	Ibirapuera		<i>S. aureus</i>		Total	Piqueri		<i>S. aureus</i>		Total
Cloro	Negativo	Positivo	Cloro		Negativo	Positivo	Cloro	Negativo		Positivo	Cloro	Negativo	Positivo						
Ausente	19	13	32	Ausente	10	3	13	Ausente	2	2	Ausente	11	4	15					
Presente	124	0	124	Presente	65	0	65	Presente	74	0	74	Presente	141	0	141				
Total	143	13	156	Total	75	3	78	Total	76	2	78	Total	152	4	156				

Dados esperados

Ausente	29,33	2,67	32	Ausente	12,50	0,50	13	Ausente	3,90	0,10	4	Ausente	14,62	0,38	15
Presente	113,67	10,33	124	Presente	62,50	2,50	65	Presente	72,10	1,90	74	Presente	137,38	3,62	141
Total	143	13	156	Total	75	3	78	Total	76	2	78	Total	152	4	156

p=1,22**p=7,83****p=7,21****p=5,27**Valor de referência para evidências de associação (p) no teste de qui-quadrado = **p < 0,05**.**Aclimação** **Buenos Aires** **Ibirapuera** **Piqueri**

A maior frequência de *S. aureus* nas amostras de água coletadas ocorreu no parque da Aclimação, representando 59,15% (13/22) dos isolados de *S. aureus*, seguido do parque do Piqueri com 18,2% (4/22) dos isolados, do parque Buenos Aires com 13,6% (3/22) dos isolados e do parque do Ibirapuera com 4,5% (1/22) dos isolados. Destaca-se que nas 22 amostras (100%) cuja presença de *S. aureus* foi confirmada os valores de cloro residual estiveram abaixo do preconizado pela portaria de potabilidade. A persistência de *S. aureus* ao longo das coletas, que ocorreram em treze meses, com duas coletas por mês totalizando 26 coletas pode ser observada na tabela 14, bem como a persistência de *S. aureus* nos meses detectados e a persistência em determinado parque ou bebedouro.

As amostras de água positivas para *S. aureus* apresentaram variação quanto a concentração do crescimento bacteriano sobre a membrana. As amostras de água do parque da Aclimação variaram de 1 a 32 UFC/100mL, 5 a 11 UFC/100mL nas amostras do parque Buenos Aires, nas amostras do parque do Ibirapuera e Piqueri foi de 1 a 2 UFC/100mL.

Em relação ao estudo da presença de genes de virulência estudados como *sea*, *seg* e *luk-PVL*, estes não foram detectados nos isolados das amostras de água e no biofilme.

Tabela 14- A persistência de *S. aureus* detectados em bebedouros.

Bebedouros		Datas das coletas							
Parques	Pontos	24/04/17	08/05/17	22/05/17	05/06/17	26/06/17	04/12/17	05/03/17	19/03/17
A	1	+	-	+	+	-	+	-	-
	2	-	-	-	+	-	-	-	-
	3	-	-	-	+	-	-	-	-
	4	+	-	-	+	-	-	-	-
	5	-	-	-	+	-	-	+	-
	6	-	-	+	+	-	-	+	-
B. A	1	-	—	-	-	-	-	-	-
	2	-	+	-	-	-	-	-	-
	3	+	—	-	+	-	-	-	-
I	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
P	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	+
	3	-	-	-	-	-	+	-	-
	4	-	-	-	-	-	+	-	-
	5	+	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-

A= Aclimação; B.A= Buenos Aires; I= Ibirapuera; P= Piquerí.

Perfil de resistência microbiana: Detecção de gene de resistência *mecA* e perfil de sensibilidade antimicrobianos

O gene de resistência a meticilina *mecA* esteve presente em 60,8% (14/23) dos isolados de *S. aureus*. O gene *mecA* que confere resistência aos antimicrobianos meticilina e oxacilina foi detectado em 73,9% (17/23) de *S. aureus* isolados, dentre as quais 72,7% (16/22) das amostras de água e 100% (1/1) do biofilme (Tabela 15). Dos isolados de amostras de água que carregavam o gene *mecA*, 50% (11/22) eram de amostras do parque do Aclimação, 9,1% (2/22) do parque Buenos Aires, 9,1% (2/22) do parque do Piqueri e 4,54% do parque do Ibirapuera (Tabela 15).

O perfil antimicrobiano mostrou que do total dos isolados (n=23) 56,5% (13/23) apresentaram resistência a antimicrobianos em disco de difusão (item 4.4.3.1 do capítulo de Métodos), como ilustra a tabela 15.

Nenhum dos isolados de *S. aureus* apresentou sensibilidade reduzida à vancomicina na avaliação de concentração inibitória mínima.

Tabela 15- Perfil de sensibilidade microbiana dos isolados de *S. aureus* e presença do gene *mecA*.

Parque	Ponto	ID	PCR		Antibiograma									
			gene <i>mecA</i>	Cefoxitina	Ciprofloxacina	Clindamicina	Cloranfenicol	Eritromicina	Gentamicina	Penicilina	Rifampicina	Tetraciclina	Sulfazotrim	Oxacilina
Aclimação	B	1	-	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
Aclimação	B	1	+	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
Aclimação	B	1	+	S	S	I	S	R	S	R	S	S	S	S
Aclimação	B	1	+	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Aclimação	B	1	+	S	S	I	I	I	S	S	S	S	S	S
Aclimação	B	1	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Aclimação	B	1	+	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
Aclimação	B	1	+	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S
Aclimação	B	2	+	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S
Aclimação	B	4	-	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S
Aclimação	B	6	+	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R
Aclimação	B	6	+	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
Aclimação	B	6	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Buenos Aires	B	2	+	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S
Buenos Aires	B	3	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Buenos Aires	B	3	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Ibirapuera	A	1	+	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
Ibirapuera	B	2	-	S	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S
Ibirapuera	B	3	+	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
Piqueri	B	2	+	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S
Piqueri	B	3	+	S	S	I	S	I	S	R	S	S	S	S
Piqueri	B	3	-	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S
Piqueri	B	5	-	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S

A= aspersor; B= bebedouro; R= resistente; I= intermediário; S= sensível.

6. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem a necessidade de melhorias na prática de vigilância da qualidade de água em dispositivos públicos de água para consumo humano. Não se detectou a presença de *E. coli* e as concentrações de bactérias heterotróficas estiveram dentro do limite considerado tolerável (500 UFC/mL) pela portaria de potabilidade vigente. Para as amostras de biofilme de aspersores, não há uma regulamentação que discuta as condições higiênicas sanitárias desses dispositivos, porém investigamos a presença de *E. coli* nessas amostras nas quais não se detectou o indicador de contaminação fecal. Em relação aos teores de cloro residual, 16% (75/468) das amostras não atendeu ao preconizado pela portaria de potabilidade, que estabelece, concentração mínima de cloro residual livre em toda a rede de distribuição de 0,2 mg/L (BRASIL, 2011).

A presença de *Staphylococcus aureus* foi constada nas amostras de água potável para consumo humano em bebedouros e biofilme de dispositivos dos bocais dos aspersores dos parques públicos, representando 19,3% (23/119) dos isolados. O teor de cloro estava abaixo do limite preconizado na portaria de potabilidade em todas as amostras de água contaminadas por *S. aureus*. A ausência ou concentrações baixas de cloro na água contribuem para a proliferação de micro-organismos e o crescimento de bactérias oportunistas, como *S. aureus* (BERRY e RASKIN, 2006). A distribuição espacial das torneiras, o tempo do fluxo de vazão e frequência de uso da água bem como diferenças em sua temperatura, são fatores que podem contribuir para que a água fique estagnada fornecendo assim condições favoráveis para a proliferação de micro-organismos como também o decaimento de cloro (FELFÖLDI et al., 2010). Aspectos estruturais e de manutenção dos dispositivos (tubulações antigas, p. ex.) assim como características intrínsecas dos micro-organismos e dos nutrientes disponíveis no ambiente também favorecem o crescimento bacteriano, inclusive de patógenos oportunistas (THOMAS et al., 2006).

A evidência de *S. aureus* na água de beber e no aspersor dos parques pode ser devido ao manuseio desses dispositivos de acesso. Em 2011, o guia de água potável da OMS não relatava, por falta de evidências, que este patógeno pudesse desenvolver infecções, no entanto destaca que as mãos seriam a principal fonte de transmissão da bactéria (WHO, 2011). Na revisão desse mesmo guia foi realizado

em 2017, essas diretrizes foram revistas e mantidas no que se refere a *S. aureus* e seus potenciais riscos à saúde humana (WHO, 2017). Embora o guia de água potável da OMS reconheça que a manipulação das torneiras e aparatos constantes nos dispositivos que fornecem água sejam determinantes para a presença desse oportunista, são escassos os estudos que investiguem sua presença em água de consumo humano e, ademais que demonstrem os processos de colonização neste tipo de ambiente.

Outro fator que poderia contribuir para a presença da bactéria na água potável seria a formação de biofilme nos dispositivos ou nas tubulações. Biofilmes compostos por *Staphylococcus*, têm resistência sob condições ou mudanças drásticas no ambiente, potencializando sua disseminação e capacidade de causar doenças (OTTO, 2006; OTZEN et al., 2008; HØIBY, 2010; FALKINHAM et al., 2015). Em 2014, foi detectado o patógeno em biofilme de torneiras de bebedouro e também na água desses bebedouros de uma instituição de ensino do Distrito Federal. A frequência de ocorrência do patógeno foi de 25% nas amostras analisadas (ARRUDA et al., 2014). Em 2016, Silva et al. (2016), detectaram *S. aureus* no biofilme de doze bebedouros de uma instituição de ensino em Anápolis (GO). Os autores relataram que o patógeno esteve presente em 70% das amostras. Estes dois estudos mostram que o patógeno é capaz de sobreviver no biofilme formado na saída das torneiras e na água.

Nesse estudo, detectou-se *S. aureus* em uma amostra de biofilme (1/15), proveniente de aspersor. Embora, estudos como o de Cucarella et al. (2001), o de Potts (2001) e o de Rossi et al. (2008), relataram ser característica de *S. aureus* a capacidade de sobrevivência em superfícies tanto úmidas como secas, com recursos nutricionais limitados, isso não se refletiu nos achados desse estudo.

Os genes de virulência – *sea*, *seg* e *luk-pv* - pesquisados nos isolados de *S. aureus* identificados nas amostras não foram detectados. A ausência desses genes não descarta a possibilidade dessas cepas possuírem outros elementos móveis que confirmem virulência ou demais características genotípicas de virulência (COUTO et al., 2015). Há outros genes de virulência como os genes *sei*, *ser* e a *set* que não foram pesquisados neste estudo. Esses genes estão envolvidos nas principais causas de intoxicação alimentar como demonstrado por Argudín et al. (2010), sendo

a enterotoxina sea a causa mais comum de intoxicações alimentares estafilocócicas em todo o mundo.

S. aureus persistem como um dos principais micro-organismos a apresentarem resistência microbiana diversificada. Fenotipicamente, cerca de 60% (14/23) dos isolados mostrou resistência a pelo menos um dos onze antimicrobianos testados e 21,7% (5/23) eram resistentes a dois antimicrobianos. Do grupo dos beta-lactâmicos 8,69% (2/23) dos isolados foram resistentes a três antimicrobianos testados (Tabela 10). O mesmo foi constatado em Boa Vista (Roraima), em 2011, por Pessoa (2011) que pesquisaram isolados de *S. aureus* (13,5%) de amostras de água potável de torneiras de copas e de bebedouros de escolas públicas mostraram múltipla resistência a antimicrobianos: ampicilina, amoxicilina, clindamicina, meropenem, oxacilina, penicilina e vancomicina; usualmente utilizados para o tratamento de infecções provocadas por este patógeno.

Os isolados de *S. aureus* desse estudo foram submetidos à sensibilidade microbiana à vancomicina, fármaco adotado na terapêutica de infecções por MRSA, os quais apresentaram sensibilidade ao antimicrobiano. Esse resultado está de acordo com Howden et al. (2010) que relataram que a disseminação de resistência à vancomicina é pontual em *S. aureus*.

Cepas bacterianas possuem diversos mecanismos de resistência clássicos, os processos ecológicos que contribuem para a sobrevivência e disseminação de genes de resistência, além da descarga de antimicrobianos e outras substâncias que possam existir, resistir e evoluir em sistemas aquáticos são um desafio cada pouco explorado neste tipo de ambiente e não esclarecido. Os isolados de *S. aureus* em que se detectou o gene *mecA* também apresentaram resistência a beta-lactâmicos (Tabela 14), correspondendo a 35,2% (6/17) dos isolados para resistência a penicilinas. A resistência a cefoxitina e oxacilina correspondeu a 17,6% (3/17) dos isolados e 11,7% (2/17) expressaram resistência a todos os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos testados, sendo um isolado de amostra de água e o outro do biofilme do aspersor.

Dos isolados de *S. aureus* isolados 74% (17/23) carregavam o gene *mecA*, gene responsável pela codificação da proteína *mecA* que confere a bactéria a resistência a meticilina/oxacilina no patógeno. Segundo ANVISA (2005) e CLSI (2017) para a identificação de cepas de *S. aureus* resistentes a oxacilina/meticilina

(SARM) deve-se realizar o teste fenotípico (antibiograma) e a identificação do gene codificador de *PBP2a* ou *mecA*. Os nossos isolados que carregam o gene *mecA* que expressaram resistência fenotípica corresponderam a 13% (3/23), desses 8,7% (2/23) também apresentaram resistência aos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, epidemiologicamente a prevalência de *mecA* em isolados estafilocócicos é compatível com isolados de *Staphylococcus Coagulase Negativos* (SCN) (CAMARGO et al., 2012). Este achado até o momento não havia sido observado na literatura, o que dificulta a comparação de nossos resultados com dados nacionais e/ou internacionais, devido à escassez de estudos que envolvam o patógeno - alvo, metodologias adotadas e tipo de amostra.

A presença de bactérias oportunistas como *S. aureus* apresentando características de resistência a antimicrobianos em dispositivos de acesso a água potável é pouco explorado e preocupante já que o acesso destina-se para um grande número de pessoas, podendo potencializar os fatores de risco de infecção e doença, especialmente para populações sensíveis.

Dentre os resultados do teste de disco-difusão, o dado mais interessante é observado nos isolados que carregam o gene *mecA*. A presença desse gene pode resultar em resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos em *Staphylococcus* (PEACOCK; PATERSON, 2015). Entretanto a correlação da presença do gene *mecA* dos isolados e a resistência a oxacilina ou cefoxitina não ocorreu. Das 23 cepas *mecA* positivo, 14 delas apresentaram sensibilidade aos dois antimicrobianos, fato incomum mas pode ocorrer e já relatado por Chamberse e Deleo (2009).

Mesmo que nosso estudo seja um dos poucos a explorar *S. aureus* na água potável, a investigação deste patógeno foi executada por meio de técnicas consolidadas em microbiologia e por diversos órgãos de referência em saúde e pesquisa. Com base nessas observações sugerimos a aplicação de outras técnicas moleculares. A técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Eletrophoresis* – PFGE) ou tipagem de sequência multilocus (*Multilocus sequence typing* – MLST), para caracterizar melhor esses isolados, que não foram realizados porque não fazia parte do escopo deste estudo.

Podemos levantar a hipótese que este grupo de isolados de *S. aureus* apresente clones (isolados com características intimamente ou totalmente

relacionadas) originários de ambientes de assistência à saúde ou em população em geral. Baquero et al. (2008) consideram que sistemas aquáticos são as principais rotas de intercâmbio de genes de resistência, disseminando os mesmos para vários outros ambientes aquáticos como esgotos (tratados e não tratados), resíduos hospitalares e escoamento superficial agrícola.

A ampla disseminação pode afetar um maior número de pessoas expostas a essas cepas resistentes a antimicrobianos. Fato preocupante já que O'NEILL (2016) relatou que a resistência a antimicrobianos poderá ser a causa de, aproximadamente, 10 milhões de mortes anuais até o ano de 2050. A relevância da resistência a antimicrobianos levou a OMS a desenvolver um sistema de vigilância global para se obter evidências relacionadas a resistência antimicrobiana (AMR) e assim contribuir para medidas de contenção e de redução de impactos sociais, econômicos e para a saúde. A resistência antimicrobiana é uma ameaça à segurança sanitária especialmente crítico e em países em desenvolvimento onde a infraestrutura sanitária ainda é precária. Outro fator que pode ser considerado é a presença de princípios ativos de antimicrobianos, mesmo que em baixas concentrações, em matrizes ambientais como já relatado por Cunningham (2006). Kümmerer (2004), já havia pontuado que a presença dessas substâncias pode estimular genes associados a resistência microbiana, contribuindo no processo de seleção evolutiva das espécies nas comunidades microbiológicas aquáticas. Mesmo que esses processos não sejam totalmente compreendidos, se reconhece como um mecanismo modulador na transcrição gênica em bactérias (TAYLOR, 2011 e FREITAS et al., 2017).

A população nos últimos anos tem ocupado os mais diversos espaços públicos, fazendo destes locais agentes promotores de socialização, cultura, lazer e na busca pela melhoria na qualidade de vida. Dentre esses espaços os parques urbanos favorecem as interações humanas e resulta em bem-estar individual e coletivo (ABRAHÃO, 2008; RAIMUNDO, 2014). Locais que envolvem aglomerados de pessoas estão sujeitos a questões sanitárias e conseqüentemente ao surgimento de fatores de risco à saúde humana. Bactérias oportunistas têm circulado nos mais diversos ambientes e não mais se restringem a circulação de instituições de atendimento à saúde. Medidas e estratégias sanitárias se fazem necessárias para a redução de danos e riscos à saúde.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do estudo indicaram que as amostras de água de bebedouros dos parques estavam de acordo com a legislação de potabilidade vigente em relação aos indicadores bacteriológicos de qualidade. No entanto, o teor de cloro residual livre não esteve conforme em 16% das amostras avaliadas.

A ocorrência de *Staphylococcus aureus* proveniente de amostras de água foi verificada nos quatro parques deste estudo. Os isolados de *S. aureus*, continham características fenotípicas de resistência microbiana. Em 73,9% dos isolados de *S. aureus* desse estudo carregavam em seu DNA a característica genética que confere resistência à meticilina/oxacilina e, ainda se detectou característica fenotípica de resistência indicando cepas de MRSA.

A presença da bactéria oportunista *S. aureus*, com características de resistência a antimicrobianos usualmente utilizados no combate de infecções, como meticilina/oxacilina, em dispositivos de acesso público de água potável para consumo humano, se configura em fator de risco à saúde humana.

Portanto, há a necessidade de se dar continuidade a estudos que contribuam na vigilância da circulação ambiental desses oportunistas, na avaliação de impacto na saúde relativo à presença desses patógenos em ambientes públicos e, colaborar no planejamento e desenho de medidas sanitárias e preventivas para a promoção e proteção da saúde das pessoas.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- ARGUDÍN, María Ángeles; MENDOZA, María Carmen; RODICIO, María Rosario. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.
- ARMSTRONG, JOHN L. et al. Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 277-283, 1981.
- ATTWELL, Karen. Urban land resources and urban planting—case studies from Denmark. **Landscape and Urban Planning**, v. 52, n. 2, p. 145-163, 2000.
- AWWA - AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. American. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. **Public Works Association/Water Environment Federation**, 22^o Edition, 2012.
- BARSKI, Piotr et al. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. **Molecular and cellular probes**, v. 10, n. 6, p. 471-475, 1996.
- BAUER RW, Kirby MDK, Sherris JC, Turck M (1966). Antibiotic susceptibility testing by standard single disc diffusion method. **American Journal of Clinical Pathology** 45: 493-496.
- BEDIMO-RUNG, Ariane L.; MOWEN, Andrew J.; COHEN, Deborah A. The significance of parks to physical activity and public health: a conceptual model. **American journal of preventive medicine**, v. 28, n. 2, p. 159-168, 2005.
- BERMAN, Marc G.; JONIDES, John; KAPLAN, Stephen. The cognitive benefits of interacting with nature. **Psychological science**, v. 19, n. 12, p. 1207-1212, 2008.
- BHATTA, Dharm R. et al. Association of Panton Valentine Leukocidin (PVL) genes with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Western Nepal: a matter of concern for community infections (a hospital based prospective study). **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 199, 2016.
- BILLINGER, Megan E. et al. Nontuberculous mycobacteria—associated lung disease in hospitalized persons, United States, 1998–2005. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 10, p. 1562, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº. 2914 de 12 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011.
- BYOMKESH, Talukder; NAKAGOSHI, Nobukazu; DEWAN, Ashraf M. Urbanization and green space dynamics in Greater Dhaka, Bangladesh. **Landscape and Ecological Engineering**, v. 8, n. 1, p. 45-58, 2012.
- CARLOS, Ana Fani Alessandri. São Paulo hoje: as contradições no processo de reprodução do espaço. **Scripta Nova. Revista Electrónica de Geografía y Ciencias Sociales**, v. 5, n. 79-104, 2007.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC et al. Legionellosis---United States, 2000-2009. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 60, n. 32, p. 1083, 2011.

CDC. The National Healthcare Safety Network (NHSN). Manual. Patient Safety Component Protocol. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em 17/01/2019 em http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/nhsn/NHSN_Manual_PatientSafetyProtocol_CURRENT.pdf. Published 2008.

CHAMBERS, Henry F.; DELEO, Frank R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629, 2009.

CHIESURA, Anna. The role of urban parks for the sustainable city. **Landscape and urban planning**, v. 68, n. 1, p. 129-138, 2004.

COLEY, Rebekah Levine; SULLIVAN, William C.; KUO, Frances E. Where does community grow? The social context created by nature in urban public housing. **Environment and behavior**, v. 29, n. 4, p. 468-494, 1997.

COLLIER, S. A. et al. Direct healthcare costs of selected diseases primarily or partially transmitted by water. **Epidemiology & Infection**, v. 140, n. 11, p. 2003-2013, 2012.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n.º 369, de 28 de março de 2006. Dispõe sobre os casos excepcionais, de utilidade pública, interesse social ou baixo impacto ambiental, que possibilitam a intervenção ou supressão de vegetação em Áreas de Preservação Permanente-APP. Brasília: Publicada no *Diário Oficial da União* nº 61, de 29 de março de 2006, Seção 1, p. 92-99. 150 – 151. Brasília, 2006.

COOMBES, Emma; JONES, Andrew P.; HILLSDON, Melvyn. The relationship of physical activity and overweight to objectively measured green space accessibility and use. **Social science & medicine**, v. 70, n. 6, p. 816-822, 2010.

COSTA, Anna-Maria; KAY, Ian; PALLADINO, Silvano. Rapid detection of *mecA* and *nuc* genes in *staphylococci* by real-time multiplex polymerase chain reaction. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 51, n. 1, p. 13-17, 2005.

COUTO, Natacha et al. Clonal diversity, virulence patterns and antimicrobial and biocide susceptibility among human, animal and environmental MRSA in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, p. 2483-2487, 2015.

CUCARELLA, Carme et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 9, p. 2888-2896, 2001.

CUCARELLA, Carme et al. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and immunity**, v. 72, n. 4, p. 2177-2185, 2004.

CUMMINS, Susan Kay; JACKSON, Richard Joseph. The built environment and children's health. **Pediatric Clinics of North America**, v. 48, n. 5, p. 1241-1252, 2001.

DAROUICHE, Rabi O. Treatment of infections associated with surgical implants. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 14, p. 1422-1429, 2004.

DE SOUZA ARAÚJO, Flavio et al. Influência do estilo de vida na pressão arterial de frequentadores de parque de lazer em Petrolina–PE. **Revista Brasileira de Qualidade de Vida**, v. 7, n. 3, 2015.

DE VRIES, Sijp et al. Natural environments—healthy environments? An exploratory analysis of the relationship between greenspace and health. **Environment and planning A**, v. 35, n. 10, p. 1717-1731, 2003.

DONOVAN, Geoffrey H. et al. The relationship between trees and human health: evidence from the spread of the emerald ash borer. **American journal of preventive medicine**, v. 44, n. 2, p. 139-145, 2013.

DOS SANTOS, André Luis et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

ESCOBEDO, Francisco J.; KROEGER, Timm; WAGNER, John E. Urban forests and pollution mitigation: analyzing ecosystem services and disservices. **Environmental pollution**, v. 159, n. 8, p. 2078-2087, 2011.

FALKINHAM, Joseph O.; PRUDEN, Amy; EDWARDS, Marc. Opportunistic premise plumbing pathogens: increasingly important pathogens in drinking water. **Pathogens**, v. 4, n. 2, p. 373-386, 2015.

FELFÖLDI, T. et al. Detection of potentially pathogenic bacteria in the drinking water distribution system of a hospital in Hungary. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 1, p. 89-92, 2010.

FERRI, Maurizio et al. Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2857-2876, 2017.

FLEMMING, Hans-Curt; WINGENDER, Jost. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623, 2010.

FROST, Laura S. et al. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 722, 2005.

FUNDAP. Pesquisa Parques Urbanos e Praças de São Paulo. Conhecimento, uso e satisfação dos cidadãos. **Avalia SP**. São Paulo, 2013. Disponível em: http://novo.fundap.sp.gov.br/arquivos/pdf/PARQUES_URBANOS_E_PRACAS_DE_SAO_PAULO.pdf .

GROSS, Matthias et al. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. **Infection and immunity**, v. 69, n. 5, p. 3423-3426, 2001.

Guia dos Parques Municipais de São Paulo - Prefeitura. **Prefeitura de São Paulo**. Publicado em Dezembro de 2011. São José dos Campos, 2011. Acesso em 29 de Abril às 11:40. Disponível em: http://www.sjc.sp.gov.br/noticias/noticia.aspx?noticia_id=11120.

GUIMARÃES UMEDA, Kaoru et al. Molecular and epidemiological characterization of staphylococcal foodborne outbreak of *Staphylococcus aureus* harboring seg, sei, sem, sen, seo, and selu genes without production of classical enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, 2017.

HAMMES, Frederik et al. Assessing biological stability of drinking water without disinfectant residuals in a full-scale water supply system. **Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA**, v. 59, n. 1, p. 31-40, 2010.

HAN, Ke-Tsung. Influência de plantas de interior frondosas, visivelmente visíveis, sobre psicologia, comportamento e saúde de estudantes em uma escola secundária em Taiwan. **Ambiente e Comportamento**, v. 41, n. 5, p. 658-692, 2009.

HANSKI, Ilkka et al. Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 21, p. 8334-8339, 2012.

HARAKEH, Steve et al. Isolates of *Staphylococcus aureus* and *saprophyticus* resistant to antimicrobials isolated from the Lebanese aquatic environment. **Marine pollution bulletin**, v. 52, n. 8, p. 912-919, 2006.

HARTMANN, Erica M. et al. Os produtos químicos antimicrobianos estão associados a genes elevados de resistência a antibióticos no microbioma de poeira interna. **Ciência e tecnologia do meio ambiente**, v. 50, n. 18, p. 9807-9815, 2016.

HAUSER, C. et al. *Staphylococcus aureus* skin colonization in atopic dermatitis patients. **Dermatology**, v. 170, n. 1, p. 35-39, 1985.

HEILMANN, Christine. Adhesion mechanisms of staphylococci. In: **Bacterial Adhesion**. Springer Netherlands, 2011. p. 105-123.

HENNEKINNE, Jacques-Antoine; DE BUYSER, Marie-Laure; DRAGACCI, Sylviane. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.4

HØIBY, Niels et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International journal of antimicrobial agents**, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.

HOWDEN, Benjamin P. et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 1, p. 99-139, 2010.

- HU, Chunyan et al. Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 419, n. 4, p. 617-620, 2012.
- IANDOLO, John J.; STEWART, George C. *Staphylococcus aureus*. In: **Bacterial Genomes**. Springer, Boston, MA, 1998. p. 743-753.
- IWATSUKI, Keiji et al. *Staphylococcal* cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of dermatological science**, v. 42, n. 3, p. 203-214, 2006.
- JAMES, Philip et al. Towards an integrated understanding of green space in the European built environment. **Urban Forestry & Urban Greening**, v. 8, n. 2, p. 65-75, 2009.
- JARRAUD, Sophie et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. **Infection and immunity**, v. 70, n. 2, p. 631-641, 2002.
- JIM, Chi Yung; CHEN, Sophia S. Comprehensive greenspace planning based on landscape ecology principles in compact Nanjing city, China. **Landscape and urban planning**, v. 65, n. 3, p. 95-116, 2003.
- KABISCH, Nadja; QURESHI, Salman; HAASE, Dagmar. Human–environment interactions in urban green spaces - A systematic review of contemporary issues and prospects for future research. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 50, p. 25-34, 2015.
- KAESEBERG, Thomas et al. Hot spots of antibiotic tolerant and resistant bacterial subpopulations in natural freshwater biofilm communities due to inevitable urban drainage system overflows. **Environmental pollution**, v. 242, p. 164-170, 2018.
- KAPLAN, George A.; CAMACHO, Terry. Perceived health and mortality: a nine-year follow-up of the human population laboratory cohort. **American journal of epidemiology**, v. 117, n. 3, p. 292-304, 1983.
- KAZAKOVA, Sophia V. et al. A clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 5, p. 468-475, 2005.
- KESSIE, G. et al. Plasmid profile and antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci isolated from polluted water. **Journal of applied microbiology**, v. 84, n. 3, p. 417-422, 1998.
- KONG, Fanhua; NAKAGOSHI, Nobukazu. Spatial-temporal gradient analysis of urban green spaces in Jinan, China. **Landscape and urban Planning**, v. 78, n. 3, p. 147-164, 2006.
- KONIJNENDIJK, Cecil Cornelis et al. **Benefits of urban parks: a systematic review. A report for IPFRA**. IPFRA, 2013.

KREKEL, Christian; KOLBE, Jens; WÜSTEMANN, Henry. The greener, the happier? The effect of urban land use on residential well-being. **Ecological economics**, v. 121, p. 117-127, 2016.

LASA, Iñigo; PENADÉS, José R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in microbiology**, v. 157, n. 2, p. 99-107, 2006.

LEVY, Carlos Emilio et al. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. **Módulo V. Detecção e identificação das bactérias de importância médica. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde**, 2004.

LIMNIOS, Giorgia; FURLAN, Sueli Ângelo. Parques urbanos no Município de São Paulo-SP (Brasil): espacialização e demanda social. **Revista LABVERDE**, n. 6, p. 173-189, 2013.

LIN, Brenda B. et al. Opportunity or orientation? Who uses urban parks and why. **PLoS one**, v. 9, n. 1, p. e87422, 2014.

LOVASI, Gina Schellenbaum et al. Children living in areas with more street trees have lower prevalence of asthma. **Journal of Epidemiology & Community Health**, v. 62, n. 7, p. 647-649, 2008.

LOWY, Franklin D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England journal of medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

MAAS, Jolanda et al. Is green space in the living environment associated with people's feelings of social safety?. **Environment and Planning A**, v. 41, n. 7, p. 1763-1777, 2009.

MANAIA, Célia M. Assessing the risk of antibiotic resistance transmission from the environment to humans: non-direct proportionality between abundance and risk. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 3, p. 173-181, 2017.

MARRAS, Theodore K. et al. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997–2003. **Thorax**, v. 62, n. 8, p. 661-666, 2007.

MCCALLUM, Nadine; BERGER-BÄCHI, Brigitte; SENN, Maria M. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 2, p. 118-129, 2010.

MCGUINNESS, Will A.; MALACHOWA, Natalia; DELEO, Frank R. Focus: Infectious Diseases: Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 90, n. 2, p. 269, 2017.

MITCHELL, Richard; POPHAM, Frank. Effect of exposure to natural environment on health inequalities: an observational population study. **The Lancet**, v. 372, n. 9650, p. 1655-1660, 2008.

MMA- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Cidades Sustentáveis. Áreas Verdes Urbanas. Parques e Áreas Verdes. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/cidades->

sustentaveis/areas-verdes-urbanas/parques-e-%C3%A1reas-verdes>. Acesso em 29 de abril de 2016.

MORITZ, Miriam M.; FLEMMING, Hans-Curt; WINGENDER, Jost. Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 213, n. 3, p. 190-197, 2010.

NAGARAJ, S. et al. Development and evaluation of a novel combinatorial selective enrichment and multiplex PCR technique for molecular detection of major virulence-associated genes of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food samples. **Journal of applied microbiology**, v. 116, n. 2, p. 435-446, 2014.

NORTON, Briony A. et al. Planning for cooler cities: A framework to prioritise green infrastructure to mitigate high temperatures in urban landscapes. **Landscape and Urban Planning**, v. 134, p. 127-138, 2015.

NOWAK, David J.; CRANE, Daniel E.; STEVENS, Jack C. Air pollution removal by urban trees and shrubs in the United States. **Urban forestry & urban greening**, v. 4, n. 3, p. 115-123, 2006.

O PARQUE IBIRAPUERA É A PRAIA DO PAULISTANO. **Revista da Conservação**, publicado em 16 de maio de 2013. São Paulo 2013. Disponível em <<http://www.parqueibirapuera.org/ibirapuera-e-praia-de-sao-paulo/>>.

O'NEILL, Jim. The Review on Antimicrobial Resistance. 2016. **Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations**. HM Government, London, United Kingdom, 2016.

OCHMAN, Howard; LAWRENCE, Jeffrey G.; GROISMAN, Eduardo A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **nature**, v. 405, n. 6784, p. 299, 2000.

OKUMA, Keiko et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4289-4294, 2002.

ONO, Hisaya K. et al. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. **Infection and immunity**, v. 76, n. 11, p. 4999-5005, 2008.

ORTEGA, Elena et al. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 2117-2131, 2010.

OTTO, Michael. Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation. In: **Antimicrobial peptides and human disease**. Springer Berlin Heidelberg, p. 251-258, 2006.

OTTO, Michael. *Staphylococcal* infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual review of medicine**, v. 64, p. 175-188, 2013.

OTTO, Michael. Staphylococcus aureus toxins. **Current opinion in microbiology**, v. 17, p. 32-37, 2014.

OTZEN, Daniel; NIELSEN, Per Halkjær. We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 6, p. 910-927, 2008.

PAPADOPOULOU, Chrissanthy et al. Microbiological quality of indoor and outdoor swimming pools in Greece: investigation of the antibiotic resistance of the bacterial isolates. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 211, n. 3, p. 385-397, 2008.

PEACOCK, Sharon J.; PATERSON, Gavin K. Mechanisms of methicillin resistance in Staphylococcus aureus. **Annual review of biochemistry**, v. 84, p. 577-601, 2015.

PESSOA, ILZO COSTA. **Perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de amostras de água das escolas estaduais de Boa Vista-RR, 2011**. Dissertação (mestrado).

POCSFALVI, Gabriella et al. Proteomic analysis of exoproteins expressed by enterotoxigenic Staphylococcus aureus strains. **Proteomics**, v. 8, n. 12, p. 2462-2476, 2008.

PREFEITURA MANTÉM TOTEMS PARA REFRESCAR POPULAÇÃO. **Prefeitura de São José dos Campos**. Publicado em Dezembro de 2011. São José dos Campos, 2011. Acesso em 29 de Abril às 11:40. Disponível em: http://www.sjc.sp.gov.br/noticias/noticia.aspx?noticia_id=11120.

PRESCOTT, John F. Beta-lactam antibiotics: cephalosporins. **Antimicrobial therapy in veterinary medicine**, p. 153-173, 2013.

PUSPITASARI, Findya et al. Phylogenetic analysis of bacterial species compositions in sand dunes and dust aerosol in an Asian dust source area, the Taklimakan Desert. **Air Quality, Atmosphere & Health**, v. 9, n. 6, p. 631-644, 2016.

RAZAK, Mohd Ali Waliyuddin A.; OTHMAN, Noriah; NAZIR, Nurul Nazyddah Mat. Connecting People with Nature: Urban Park and Human Well-being. **Procedia-Social and Behavioral Sciences**, v. 222, p. 476-484, 2016.

ROY, Sudipto; BYRNE, Jason; PICKERING, Catherine. A systematic quantitative review of urban tree benefits, costs, and assessment methods across cities in different climatic zones. **Urban Forestry & Urban Greening**, v. 11, n. 4, p. 351-363, 2012.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, Iracema Helena; MOREIRA, Carolina Gasch; GOMES, Eduardo Pereira Cabral. Richness of ingoldian fungi and facultative aquatic fungi in the Parque Municipal da Aclimação, São Paulo, São Paulo State, Brazil. **Hoehnea**, v. 42, n. 2, p. 239-251, 2015.

SEYEDMONIR, Elnaz; YILMAZ, Fadime; ICGEN, Bulent. *mecA* gene dissemination among staphylococcal and non-staphylococcal isolates shed in surface

waters. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 95, n. 1, p. 131-138, 2015.

SUN, Huifang et al. Bacterial community of biofilms developed under different water supply conditions in a distribution system. **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 99-107, 2014.

The Guardian. **The 10 best parks**. Publicado em Agosto de 2015. Londres, 2015. Acesso em 30 de Abril às 14:30. Disponível em: <https://www.theguardian.com/culture/2015/aug/07/10-best-parks-urban-green-spaces-high-line-new-york-hampstead-london-park-guell-barcelona>

THOMAS, Vincent et al. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2428-2438, 2006.

THOMPSON COON, Jo et al. Does participating in physical activity in outdoor natural environments have a greater effect on physical and mental wellbeing than physical activity indoors? A systematic review. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 5, p. 1761-1772, 2011.

TONG, Steven YC et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

TRATALOS, Jamie et al. Urban form, biodiversity potential and ecosystem services. **Landscape and urban planning**, v. 83, n. 4, p. 308-317, 2007.

TSUNETSUGU, Yuko et al. Physiological and psychological effects of viewing urban forest landscapes assessed by multiple measurements. **Landscape and Urban Planning**, v. 113, p. 90-93, 2013.

ULRICH, Roger. View through a window may influence recovery. **Science**, v. 224, n. 4647, p. 224-225, 1984.

UMEDA, Kaoru et al. Molecular and epidemiological characterization of *staphylococcal* foodborne outbreak of *Staphylococcus aureus* harboring seg, sei, sem, sen, seo, and selu genes without production of classical enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, 2017.

VAN DEN BERG, Agnes E. et al. Green space as a buffer between stressful life events and health. **Social science & medicine**, v. 70, n. 8, p. 1203-1210, 2010.

VAN DEN BERG, Magdalena et al. Health benefits of green spaces in the living environment: A systematic review of epidemiological studies. **Urban Forestry & Urban Greening**, v. 14, n. 4, p. 806-816, 2015.

VAN DER WIELEN, Paul WJJ; LUT, Maarten C. Distribution of microbial activity and specific microorganisms across sediment size fractions and pipe wall biofilm in a drinking water distribution system. **Water Science and Technology: Water Supply**, v. 16, n. 4, p. 896-904, 2016.

WANG, Hong et al. Effect of disinfectant, water age, and pipe materials on bacterial and eukaryotic community structure in drinking water biofilm. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 3, p. 1426-1435, 2014.

WANG, M.-Y. et al. Direct detection of *mecA*, *blaSHV*, *blaCTX-M*, *blaTEM* and *blaOXA* genes from positive blood culture bottles by multiplex-touchdown PCR assay. **Letters in applied microbiology**, v. 64, n. 2, p. 138-143, 2017

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Water for health: Taking charge. In: **Water for health: taking charge**. WHO, 2000.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Guidelines for drinking-water quality: incorporating first addendum. In: **Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating first addendum**. 2017.

WHO.WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Guidelines for drinking-water quality: first addendum to the fourth edition. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Weekly Epidemiological Record, 2012, vol. 87, 47. **Weekly Epidemiological Record. Relevé épidémiologique hebdomadaire**, v. 87, n. 47, p. 461-476, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. World Health Organization, 2014.

9. ANEXOS

Anexo 1. Processo Administrativo que corresponde a autorização da execução de coletas nos parques citados neste estudo.

**PREFEITURA DE
SÃO PAULO**
VERDE E MEIO AMBIENTE

TERMO DE RESPONSABILIDADE
PROCESSO ADMINISTRATIVO Nº2017-0.021.265-2

Eu, Geysse Aparecida Cardoso dos Santos, mestrande do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública /USP, portador (a) do RG nº43925189-8, órgão Emissor SSP, CPF 323144928-62, residente à Rua Silvío Sacramento, nº62, Pinheiros, São Paulo-SP, Telefone (11)970133626, e-mail: biom.geyssecardoso@outlook.com, proponente do projeto de pesquisa científica intitulado "Detecção bacteriológica de *Staphylococcus aureus* na água de bebedouros e vaporizadores em Parques Municipais da Cidade de São Paulo, Brasil", a ser realizado nos Parques Buenos Aires, Acimação, Ibirapuera e Piqueri, firmo o presente Termo de Responsabilidade mediante as seguintes cláusulas e condições:

- Realizar o Trabalho de Graduação em tela de acordo com a documentação apresentada para análise e instrução do Processo Administrativo nº 2017-0.021.265-2.
- Cumprir a legislação brasileira em vigor e tratados internacionais de proteção dos recursos naturais, toda a legislação relativa à pesquisa, expedições científicas, patentes e segredos de indústria, todos os termos do Decreto Federal nº2.519/98 que promulga a Convenção sobre Diversidade Biológica e ainda o disposto na Medida Provisória nº2.186-16/01.
- Comunicar – se com a técnica do DEPAVE -S, responsável pela custódia do Processo Administrativo em questão.
- Requerer, quando necessário e nas hipóteses exigidas em lei, autorização para acesso a componentes do patrimônio genético.
- Entregar à divisão responsável relatórios anuais, contendo no mínimo: resumo das atividades executadas, descrição das pesquisas realizadas (localização e período) e descrição dos resultados obtidos.
- Contribuir para divulgação da Convenção sobre Diversidade Biológica no meio acadêmico, científico, técnico e popular, especialmente na região alvo da pesquisa.
- Concluir a pesquisa no prazo de 24 meses de acordo com cronograma apresentado, contados a partir de sua assinatura.
- Ao final da pesquisa, retirar dos parques todos os materiais utilizados no desenvolvimento do trabalho.

SVMA/ DEPAVE – S Rua do Paraisópolis nº387, Pinheiros, São Paulo/SP CEP 04103-000 Telefone: 31429526 / 31712305

**PREFEITURA DE
SÃO PAULO**
VERDE E MEIO AMBIENTE

- Citar no trabalho concluído a Prefeitura do Município de São Paulo, a Secretaria do Verde e do Meio Ambiente, o Departamento de Parques e Áreas Verdes, a Divisão Técnica de Gestão de Parques – DEPAVE -S, bem como os técnicos que contribuíram com a pesquisa e acompanharam o desenvolvimento do projeto.
- Entregar 01 (uma) cópia impressa e 01 (uma) cópia digital do trabalho concluído ao DEPAVE -S para ser arquivada na biblioteca da SVMA.
- A PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO fica isenta de qualquer responsabilidade decorrente de acidentes que possam ocorrer com o (a) aluno (a) ou seus auxiliares em suas dependências.
- O Processo Administrativo será encerrado no prazo indicado no item "g" e qualquer alteração deverá ser comunicada com antecedência de 30 (trinta) dias.
- Responsabilizar-se pela equipe da presente pesquisa, a saber: Solange Martone Rocha - RG 14.958.921-9 e Francisca Alzira dos Santos Peterella - RG 15.830.474-3.
- O não cumprimento das cláusulas acima ou conduta inadequada pelo pesquisador e/ou sua equipe implicará na imediata interrupção da pesquisa e da autorização para ingressar nas unidades da SVMA.

São Paulo, 31 de março de 2017.

Geysse Aparecida Cardoso dos Santos
RG 43.925.189-8

André de Almeida Bossi
Ecólogo- Analista de Meio Ambiente/DEPAVE -S
Comissão de Avaliação Técnico-Científica/SVMA
RP 800.417-0

SVMA/ DEPAVE – S Rua do Paraisópolis nº387, Pinheiros, São Paulo/SP CEP 04103-000 Telefone: 31429526 / 31712305

Anexo 2. Certificado de participação em congresso

10. CURRÍCULO LATTES

Geyse Aparecida Cardoso dos Santos

Bolsista de Mestrado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0760929911862659>

Última atualização do currículo em 06/02/2019

Biomédica, habilitada em Análise Patológica e Farmacologia pela Universidade Mogi das Cruzes(2015), estagiária em análises clínicas pela Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP) atuando nas áreas de hematologia microbiologia, parasitologia, citologia, bioquímica, imunossorologia e biologia molecular (2015), bolsista CNPq/IC no Instituto Butantan na área de farmacologia (2014-2015), no estudo de ação de toxinas relacionadas a peçonhas de escorpiões no Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS). Aprimorada do programa de aprimoramento profissional da Secretaria de Saúde em laboratório de Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP (2016), atuando em atividades nas áreas de Microbiologia, Parasitologia e Biologia Molecular na análise de microrganismos de relevância à Saúde Pública em colaboração com a Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente - SMVMA - SP, no estudo bacteriológico de água de consumo humano em parques públicos. Atualmente (2018) mestranda, bolsista/CNPq no programa de pós graduação em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP, atuando na identificação, mecanismos de patogenidade e resistência bacteriana de bactérias Gram positivas, de importância a saúde pública em água de consumo humano. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Geyse Aparecida Cardoso dos Santos
Nome em citações bibliográficas	Nenhuma;Santos-Cardoso GA;G.A. Cardoso, S.;SANTOS, CAG;SANTOS, C. G. Ap.;S Cardoso, Ap. Geyse

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública - Laboratório de Microbiologia Ambiental e Resistência a antimicrobianos ? MicroRes Pacaembu 01246904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617890 URL da Homepage: http://www.fsp.usp.br
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2017	Mestrado em andamento em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: DETECÇÃO BACTERIOLÓGICA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS NA ÁGUA DE BEBEDOUROS E VAPORIZADORES EM PARQUES MUNICIPAIS DA CIDADE DE SÃO PAULO, BRASIL.,Orientador: Profª Drª Maria Tereza Pepe Razzolini. Coorientador: Profª Drª Solange Martone Rocha. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Palavras-chave: Saúde Pública; Bacteriologia; Staphylococcus aureus; Qualidade da Água; Resistência bacteriana; Virulência. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Biologia e Fisiologia dos Microorganismos / Especialidade: Bacteriologia. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Molecular e de Microorganismos. Setores de atividade: Atividades de atenção à saúde humana; Captação, tratamento e distribuição de água; Pesquisa e desenvolvimento científico. Aperfeiçoamento em Aprimoramento em Laboratório de Saúde Pública. (Carga Horária: 40h). Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP-USP, Brasil. Título: Avaliação bacteriológica da água de bebedouros e vaporizadores em parques
2016 - 2017

Maria Tereza Pepe Razzolini

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8467049839493963>
Última atualização do currículo em 04/01/2019

Possui graduação em Biologia pela Universidade Presbiteriana Mackenzie (1986), mestrado em Saneamento Ambiental pela Universidade Presbiteriana Mackenzie (1998) e doutorado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (2003). Atualmente é professora associada do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Atuando na área de Microbiologia Ambiental, especialmente na avaliação da qualidade microbiológica de águas e avaliação quantitativa de risco microbiológico. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Maria Tereza Pepe Razzolini
Nome em citações bibliográficas	RAZZOLINI, M. T. P.; Maria Tereza Pepe Razzolini; RAZZOLINI, MARIA TEREZA PEPE

Endereço

Endereço Profissional	Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Avenida Dr Arnaldo 715 1o andar Departamento de Saúde Ambiental Cerqueira César 01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617712 Ramal: 210 Fax: (11) 30617732 URL da Homepage: http://www.fsp.usp.br
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

2000 - 2003	Doutorado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Avaliação sanitária de águas residuárias provenientes de lagoas de estabilização para irrigação de culturas agrícolas no Estado de São Paulo., Ano de obtenção: 2003. Orientador: Wanda Maria Rizzo Gunther. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: Irrigação agrícola; Escherichia coli; reuso de esgoto; colifagos; helmintos; Salmonella.
1995 - 1998	Grande área: Ciências Biológicas Mestrado em Saneamento Ambiental. Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, Brasil. Título: Ocorrência de Aeromonas e suas toxinas em águas de consumo humano provenientes de caixas d'água e bebedouros., Ano de Obtenção: 1998. Orientador: Petra Sanchez Sanchez. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: Aeromonas; Água de consumo; Toxinas; Caixa de água; Bebedouros.
1990 - 1991	Grande área: Ciências Biológicas Especialização em Técnicos Del Agua. Universidad Politécnica de Cataluña, UPC, Espanha. Título: Microbiología de filtros percoladores de industrias de papel e celulose. Orientador: Francisco Gutierrez Lucena.
1983 - 1986	Graduação em Biologia. Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, Brasil.

Pós-doutorado e Livre-docência

2013	Livre-docência. Faculdade de Saúde Pública/USP, FSP/USP, Brasil. Título: Circulação de patógenos em águas de consumo e estimativa do risco de infecção na região Metropolitana de São Paulo, Ano de obtenção: 2013.
2010	