



ARTIGO

Diversidade e perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados das águas do Arroio Dilúvio - Porto Alegre, RS, Brasil

Gisele Nachtigall¹, Alyne Gonçalves de Jesus¹, Dejoara de Angelis Zvoboda¹, Naiara Aguiar Santestevan¹, Elisandra Minotto¹, Tiane Martin de Moura¹, Pedro d'Azevedo², Jeverson Frazzon³, Sueli Van Der Sand¹ e Ana Paula Guedes Frazzon^{1*}

Recebido: 24 janeiro de 2013 Recebido após revisão: 21 de maio de 2013 Aceito: 3 de junho de 2013

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2490>

RESUMO: (Diversidade e perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados das águas do Arroio Dilúvio - Porto Alegre, RS, Brasil). O objetivo do presente trabalho foi determinar a frequência das espécies de enterococos das águas do arroio Dilúvio, em Porto Alegre, RS, bem como avaliar o perfil de susceptibilidade frente a antimicrobianos de importância clínica e veterinária. No período de março a dezembro de 2009, foram coletadas amostras de águas do arroio em cinco pontos distintos, as quais foram submetidas à avaliação microbiológica. Trezentos e quarenta e oito enterococos foram isolados das amostras de água coletadas nos cinco pontos ao longo do curso do arroio Dilúvio e identificados em nível de espécie por provas bioquímicas e PCR. A espécie *E. faecium* (68,67%) foi a mais frequente, seguida de *E. faecalis* (16,09%), *E. casseliflavus* (12,07%), *E. hirae* (2,58%) e *E. gallinarum* (0,57%). Nos pontos 1 e 3 não houve diferença significativa entre as espécies. Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em disco revelaram que a maioria das bactérias era resistente a eritromicina (81,07%), nitrofurantoína (37,26%), norfloxacin (34,82%), ciprofloxacina (32,55%), cloranfenicol (4,73), tetraciclina (2,23%) e vancomicina (0,28%). Foi observada uma diferença significativa nos pontos 4 e 5 quanto ao número médio de enterococos resistentes aos antibióticos testados ($P=0,0174$). Todos os isolados foram sensíveis a ampicilina e a gentamicina. Espécies multiresistentes aos antimicrobianos foram observadas. Os resultados do presente estudo demonstram que as águas do arroio Dilúvio podem ser uma fonte de disseminação e persistência de enterococos resistentes e de seus genes de resistência aos antimicrobianos para os seres humanos e meio ambiente, representando riscos à população.

Palavras-chaves: enterococos resistentes, águas residuárias.

ABSTRACT: (Antimicrobial susceptibility profile of *Enterococcus* sp. isolated from Dilúvio stream waters, Porto Alegre, RS, Brazil). The aim of this study was to determine the frequency of enterococci species from Dilúvio stream, in Porto Alegre, RS, and the antimicrobial susceptibility profiles of the isolates to antibiotics of human and veterinary importance. From March to December 2009, water samples were collected from the stream into five distinct points. Three hundred and forty eight enterococci were isolated from water samples collected at five points along the course of the creek flood and identified to the species level through their phenotypic profiles and PCR. The most frequent species was *E. faecium* (68.67%), followed by *E. faecalis* (16.09%), *E. casseliflavus* (12.07%), *E. hirae* (2.58%) and *E. gallinarum* (0.57%). Points 1 and 3 showed no significant differences between the species. The antimicrobial susceptibility tests revealed that isolates were resistant to erythromycin (81.07%), nitrofurantoin (37.26%), norfloxacin (34.82%), ciprofloxacin (32.55%), chloramphenicol (4.73), tetracycline (2.23%) and vancomycin (0.28%). There was a significant difference in the prevalence of antibiotic-resistant enterococci in the Points 4 and 5 ($P<0.0174$). All isolates were susceptible to ampicillin and gentamicin. Species multiresistant to antibiotics were observed. The results of this study demonstrate that the flood waters of the stream can be a source of spread and persistence of resistant enterococci and their antibiotic resistance genes to humans and the environment, representing risks to the population.

Key words: resistant enterococci, wastewater.

INTRODUÇÃO

O Arroio Dilúvio situado na cidade de Porto Alegre, RS, apresenta área total de cerca de 80 quilômetros quadrados e extensão canalizada de aproximadamente 12 quilômetros estando localizado em áreas urbanas com grande trânsito de pessoas e veículos. O Arroio recebe água de afluentes como os Arroios dos Marianos, Beco do Salso, São Vicente, Mato Grosso, Moinho, Cascata

e Águas Mortas, além de receber anualmente cerca de 50 mil metros cúbicos de lixo e terra, esgoto doméstico, laboratorial e hospitalar de vários bairros da cidade, para finalmente, desaguar no Afluente Guaíba, que, por sua vez, serve de fonte de abastecimento de água para a população de Porto Alegre (Faria & Morandi 2002).

A contaminação das águas naturais representa um dos principais riscos à saúde pública, uma vez que existe a estreita relação entre a qualidade da água e as inúmeras

1. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Sarmento Leite 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

2. Laboratório de Cocos Gram-Positivos, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Av. Sarmento Leite 245, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

3. Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500. Campus do Vale. Prédio 43.212, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: ana.frazzon@ufrgs.br

enfermidades que acometem as populações, especialmente aquelas não atendidas por serviços de saneamento. Tanto que a baixa qualidade da água consumida e o contato direto, ou indireto com água contaminada tem sido responsáveis pela maior parte das doenças endêmicas em diversos países (Macedo *et al.* 2011). Neste sentido, a qualidade da água tem gerado muitas preocupações e dúvidas no que diz respeito ao seu papel na transmissão e disseminação de microrganismos, muitos destes resistentes aos antimicrobianos tanto de uso na comunidade como hospitalar.

Vários estudos têm demonstrado a presença de um elevado número de bactérias resistentes a antibióticos presentes em águas de esgotos hospitalares e de matadouros, que posteriormente são misturados aos esgotos municipais em estações de tratamento. Os tratamentos a que os esgotos são submetidos reduzem a carga bacteriana, mas não a elimina totalmente, o que pode resultar na disseminação de cepas resistentes através de córregos, rios e oceanos (Novais *et al.* 2005, Martins da Costa *et al.* 2006, Abriouel *et al.* 2008, Moore *et al.* 2008).

O gênero *Enterococcus* compreende bactérias Gram-positivas que habitam o trato gastrointestinal (TGI) de humanos e de vários outros animais, sendo também encontradas em solo, água e alimentos. Atualmente, o gênero compreende mais de 41 espécies, sendo *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus raffinosus* e *Enterococcus hirae* as mais importantes. *Enterococcus* são típicos patógenos oportunistas, constituindo a terceira causa de infecção adquirida no ambiente hospitalar, sendo *E. faecalis* a espécie predominante seguida de *E. faecium* (Euzéby 2011). As infecções por enterococos podem se originar da microbiota normal do paciente, da transferência de microrganismos de paciente para paciente ou da aquisição dos patógenos através do consumo de água ou alimentos contaminados.

O gênero *Enterococcus* tem sua relevância clínica baseada não somente na sua crescente prevalência nas últimas décadas, mas também no elevado índice de cepas resistentes aos antibióticos. *Enterococcus* são intrinsicamente resistentes a penicilinas semi-sintéticas, cefalosporinas, baixos níveis de aminoglicosídeos e clindamicina, além disso, também possuem a capacidade de aquisição de genes de resistência, o que pode ocorrer por conjugação ou mutações no DNA apresentando resistência adquirida a antibióticos como clo-ranfenicol, eritromicina, altos níveis de clindamicina e aminoglicosídeos, tetraciclina, fluorquinolonas e vancomicina (Giraffa 2002, Franz *et al.* 2003). Enterococos resistentes aos antimicrobianos já foram isolados de amostras clínicas, alimentos, águas e solo (D'Azevedo *et al.* 2004, Riboldi *et al.* 2009, Frazzon *et al.* 2010, Cassenego *et al.* 2011). Estudos têm mostrado que alimentos podem servir de reservatórios de enterococos resistentes, e assim, contribuir para a propagação da

resistência antimicrobiana à população humana via cadeia alimentar (Bertrand *et al.* 2000, Riboldi *et al.* 2009, Frazzon *et al.* 2010).

Os objetivos do presente estudo foram: (i) observar a diversidade de cepas de *Enterococcus* sp. isoladas de amostras de água coletadas em diferentes pontos no arroio Dilúvio durante o ano de 2009 e (ii) avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dessas cepas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de águas coletadas em cinco pontos do Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Rio Grande do Sul durante o ano de 2009: Ponto 1, Nascente do arroio, Parque Saint Hilaire; Ponto 2, esquina das Avenidas Ipiranga com Antônio de Carvalho; Ponto 3, esquina da Av. Ipiranga com a Rua Guilherme Alves; Ponto 4, esquina da Av. Ipiranga com a Rua Ramiro Barcelos; Ponto 5, esquina das Avenidas Ipiranga com Borges de Medeiros.

As amostras foram coletadas num volume mínimo de 1 L em frascos de vidro previamente esterilizados. Após o procedimento de coleta, as garrafas foram acondicionadas em caixas de material isotérmico e transportadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Um mililitro de amostra de água coletada foi inoculado em 9 mL de meio Caldo Azida Dextrose (Himedia Laboratories Ltda., Índia), seletivo para enterococos. Em seguida foram realizadas diluições seriadas até 10^{-5} e incubadas por 24 horas à 35 °C. Após o período de incubação, 100 µL de cada diluição foram semeados em placas contendo meio Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (Himedia Laboratories Ltda., Índia), acrescidos de 6,5% de NaCl e incubadas, por 24 horas à 35 °C. Foram selecionadas aleatoriamente 20 colônias de cada placa (método dos quatro quadrantes em placa) e inoculadas por esgotamento em Agar BHI. Para confirmação do gênero, os isolados crescidos em meio BHI foram caracterizados com base em sua morfologia, comportamento tintorial pelo método de coloração de Gram, ausência de produção de catalase e hidrólise da esculina em presença de 40% de sais biliares. A identificação das espécies foi realizada por meio dos seguintes testes bioquímicos: fermentação dos carboidratos arabinose, manitol, rafinose, sacarose, metil-alfa-D-piranosídeo (MGP) e sorbitol, hidrólise da arginina, utilização do piruvato a 1% e produção de pigmento amarelo. Os resultados obtidos foram analisados segundo Teixeira e Facklam (2003).

Os isolados que não puderam ser identificados em nível de espécies pelas as provas bioquímicas, foram submetidos à técnica reação em cadeia da polimerase (PCR) empregando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específico. As extrações de DNA dos isolados foram realizadas pela técnica de fervura (Hagen *et al.* 2002). Para *E. faecalis* foram empregados os iniciadores *ddl*_{*E. faecalis*} com produto esperado de 475 pb (Depardieu

et al. 2004), para *E. faecium* os iniciadores *EMI_{A/B}* (Cheng et al. 1997), e com produto esperado de 658 pb, para *E. casseliflavus* os iniciadores *CA_{1/2}* (Jackson et al. 2004) com produto esperado de 288 pb e para *E. gallinarum* os iniciadores *GA_{1/2}* (Jackson et al. 2004) com produto esperado de 173 pb. As reações de PCR foram realizadas com o volume de 10 µL contendo: 1 µL de DNA, 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 1,25 µM de cada iniciador, 0,1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1x tampão de PCR (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (ABgene®) e água desionizada (Milli QPlus, Millipore®). As reações foram realizadas em *Eppendorf Mastercycler Thermal Cycler*. Os ciclos foram os seguintes: 5 min. a 94 °C, seguido por 40 ciclos de 1 min. a 94 °C, 1 min. a 52 °C (*ddl_{E. faecalis}* e *EMI_{A/B}*) ou 50 °C (*CA_{1/2}* e *GA_{1/2}*), 1 min. a 72 °C, seguido de 7 min. a 72 °C. As cepas *E. faecalis* ATCC 51299, *E. faecium* ATCC 53519, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* PAD71 foram utilizadas como controle positivo.

Todos os isolados foram submetidos ao teste de suscetibilidade pelo método de Kirby e Bauer em Agar Mueller Hinton (Himedia Laboratories Ltda., Índia) conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2010). Foram testados os seguintes antimicrobianos: ampicilina (10 µg), ciprofloxacino (5 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (120 µg), nitrofurantoina (300 µg), norfloxacina (10 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg). Como controles foram utilizados as cepas de *E. faecalis* ATCC 51299 e *E. faecium* ATCC 53519, respectivamente.

Os dados foram submetidos à análise da variância e ao teste de Tuckey ($\alpha = 0,05$) para comparação das médias utilizando-se o programa estatístico Statistica, quando necessário.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trezentos e quarenta e oito enterococos foram isolados das amostras de água coletadas nos cinco pontos ao longo do curso do arroio Dilúvio e identificados em nível de espécie através de seus perfis fenotípicos (Tab. 1). Trinta e quatro isolados apresentaram variabilida-

des fenotípicas que dificultaram a identificação pelos métodos bioquímicos clássicos. As atípicas fenotípicas detectadas neste estudo podem ser justificadas, uma vez que as chaves de identificação empregadas para as espécies de enterococos utilizam dados baseados, principalmente, no perfil fenotípico de enterococos oriundos de amostras clínicas. Atípicas fenotípicas já foram observadas em outros trabalhos que analisaram enterococos de origem clínica (Resende 2012); bem como, em estudos com enterococos isolados de alimentos de origem animal, esse fato pode ser explicado, pelo menos em parte, pela adaptação metabólica ao substrato oferecido (Riboldi et al. 2009, Fracalanza et al. 2007). As 34 amostras com variabilidades fenotípicas foram avaliadas quanto às suas atípicas e submetidas à reação de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos (Tab. 1).

A espécie mais frequente isoladas nas amostras de água coletadas no arroio Dilúvio foi *E. faecium* (68,67%), seguida de *E. faecalis* (16,09%), *E. casseliflavus* (12,07%), *E. hirae* (2,58%) e *E. gallinarum* (0,57%). Estas frequências estão de acordo com dados relatados em outros estudos, onde demonstram uma predominância de *E. faecium* em águas residuais. Manero et al. (2002) detectaram a frequência entre 41% e 44% de *E. faecium* nas amostras de águas de esgoto urbano e hospitalar, respectivamente. Em estudo realizado na Eslováquia por Pangallo et al. (2004), foi relatada a prevalência de 39,34% de *E. faecium* em amostras de água do rio Danúbio, estações de tratamento de esgoto, efluentes de indústrias de derivados lácteos e excrementos de ovelhas. Saifi et al. (2008), encontraram 64% de *E. faecium* e 29% de *E. faecalis*, em três estações de tratamento de esgoto no Irã. Recentemente, Furukawa et al. (2011), no Japão, ao analisarem genotipicamente isolados de enterococos de amostras de água de uma estação de tratamento de esgoto e de um rio com contaminação fecal, identificaram 73,75% de *E. faecium* e apenas 5% de *E. faecalis*.

Analisando a distribuição das espécies por ponto de coleta observou-se que na nascente do arroio (Ponto 1), houve predomínio da espécie *E. casseliflavus* (61,36%), seguida de *E. faecalis* (38,64%) (Tab. 1). No ponto

Tabela 1. Distribuição e frequência das espécies de *Enterococcus* sp. isoladas nos diferentes pontos de coleta.

Ponto (n)	Nº de isolados (%)			
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	Outros enterococos ^a
1 (44)	0	17 (38,64)	27 (61,36)	0
2 (67)	48+4 ^a (77,61)*	1 (1,49)*	13 (19,41)*	1 ^b (1,49)*
3 (76)	44+6 ^a (65,78)	17+6 ^c (30,26)	2 (2,63)	1 ^d (1,31)
4 (77)	56+10 ^a (85,71)*	9+1 ^c (12,98)*	0*	1 ^d (1,29)*
5 (84)	68+3 ^a (84,52)*	3+2 ^c (5,95)*	0*	7 ^d +1 ^b (9,52)*
Total (348)	239 (68,67)	56 (16,09)	42 (12,07)	11 (3,16)

a. Isolado de *E. faecium* com atipia fenotípicas e identificado por PCR.

b. Isolado de *E. gallinarum* com atipia fenotípicas e identificado por PCR.

c. Isolado de *E. faecalis* com atipia fenotípicas e identificado por PCR.

d. *E. hirae*.

* diferença significativa entre as espécies dentro de cada ponto ($P < 0,05$).

1 não houve diferença significativa entre o número de espécies coletadas. A elevada concentração de *E. casseliflavus* é preocupante uma vez que esta espécie é de grande importância médica, pois se encontra causando diversas doenças em humano. A presença dessa espécie neste Ponto pode ser justificada porque *E. casseliflavus* são mais frequentes em plantas e vegetais e a nascente do Arroio Dilúvio está localizada em uma área composta de plantas nativas que são depositários de folhas e resíduos de origem vegetal (Collins *et al.* 1984). A espécie *E. faecalis* é membro da microbiota do TGI de animais de sangue quente, e o isolamento desta espécie no Ponto 1, justifica-se pelo fato de que neste local vivem muitos animais silvestres, cães e cavalos utilizados pelos guardas florestais. A ação antrópica restringe-se a circulação de poucos visitantes e dos funcionários do próprio parque. Com isso, a água que nasce no arroio é isenta de esgoto de qualquer natureza, os detritos encontrados são basicamente a matéria orgânica produzida pela própria mata e animais que nela vivem. No Ponto 2, as espécies mais frequentemente detectadas foram *E. faecium* (77,61%) e *E. casseliflavus* (19,40%), seguidas de *E. faecalis* (1,49%) e *E. gallinarum* (1,49%) (Tab. 1). A grande quantidade de esgoto e vegetação neste local pode explicar a presença dessas espécies, uma vez que o ponto de coleta fica localizado em uma área já urbanizada apresentando o predomínio de casas, sendo que muitas delas não se encontram ligadas ao sistema de esgotamento sanitário da cidade de Porto Alegre, além disso, muitos moradores nesta região criam animais, como galinhas e cavalos, sem instalações adequadas, contaminando o solo com lixo e excrementos. Todos esses contaminantes acabam sendo liberados direta ou indiretamente no arroio e interferem na qualidade de suas águas e diversidade dos microrganismos que nele vivem. Os Pontos 3, 4 e 5 correspondem à parte do arroio Dilúvio já canalizada e encontram-se em áreas densamente urbanizadas sendo, portanto, bastante impactadas. No Ponto 3 foi detectado um predomínio de *E. faecium* (65,78%), seguido de *E. faecalis* (30,26%), *E. casseliflavus* (2,63%), *E. hirae* (1,31%). Não foi observada diferença significativa entre a frequência destas espécies neste ponto ($P=0,0659$). Nos pontos 4 e 5, não foram isoladas cepas de *E. casseliflavus*. A ausência dessa espécie nesses pontos pode ser justificada pela menor quantidade de resíduos de origem vegetal nesses locais. Nos pontos 4 e 5 foi observada a maior prevalência de *E. faecium*, sendo que a frequência desta espécie no Ponto 4 foi estatisticamente significativamente quando comparada com as demais espécies neste ponto ($P<0,05$). A ocorrência dessa espécie nestes pontos pode ser devido ao fato de que, o sistema de esgotamento sanitário de muitos domicílios mantém-se ligado à rede pluvial, contribuindo de forma significativa para a contaminação do arroio, além de diferentes resíduos que vão se acumulando ao longo de todo o trajeto do arroio, acrescido de contaminantes provenientes do lixo, que são descartados diretamente

no solo e carregado com a água da chuva.

A localização geográfica, o clima e o tipo de efluente descartado são fatores que influenciam muito a distribuição das espécies de enterococos. Em relação ao período da coleta, a espécie *E. faecium* apresentou a maior prevalência (93,67%) no período do inverno. Esse dado pode ser justificado devido à grande precipitação de chuva que ocorreu em Porto Alegre nos períodos que antecederam a coleta. O excesso de chuva promoveu a suspensão de sedimentos do arroio, tendo assim favorecido a espécie *E. faecium*. Em estudo realizado no litoral sul da Califórnia (EUA) por Ferguson *et al.* (2005), com amostras de água e sedimentos marinhos de regiões entre marés, uma elevada prevalência de *E. faecium* foi detectada em todas as amostras sedimentares. Na coleta de outono, realizada no mês de abril, houve uma distribuição mais homogênea das espécies, onde *E. faecium* correspondeu a 53,63%, *E. casseliflavus* a 27,83%, *E. faecalis* a 13,40%, *E. hirae* 5,15%. A baixa precipitação ocorrida nesse período poderia explicar o resultado obtido. Segundo o Inmet – 8º Distrito, a precipitação pluvial foi de 31,0 mm, enquanto que o esperado era de 95,2 mm. Portanto, as chuvas interferem diretamente nas concentrações de microrganismos no manancial. No momento que a chuva incide diretamente sobre a superfície da água, ocorre uma melhora nas condições sanitárias, devido ao processo de diluição. Entretanto, se a precipitação for duradoura e muito intensa, poderá ocorrer o carregamento de contaminantes existentes nas superfícies urbanas e/ou agrícolas do solo, provocando assim a contaminação dos corpos aquáticos. As diferenças na frequência dessas espécies nos períodos do ano podem também estar relacionadas com a presença de matéria orgânica na água e quantidade de radiação UV emitida, dados que não foram avaliados no presente estudo.

Os resultados do perfil de suscetibilidade das espécies de *Enterococcus* sp. isoladas de água do Arroio Dilúvio estão apresentados na tabela 2. Uma elevada frequência de cepas apresentou perfil de resistência a eritromicina (81,07%), seguidos por, nitrofurantoína (37,26%), norfloxacina (34,82%), ciprofloxacina (32,55%) ao cloranfenicol (4,73%), tetraciclina (2,23%) e vancomicina (0,28%). Todos os isolados foram susceptíveis à ampicilina e a gentamicina. Enterococos resistentes a antimicrobianos isolados de águas têm sido relatados em estudos no Brasil e também em outros países (Chee-Sanford *et al.* 2001, Da Silva *et al.* 2006, Malavazi 2007, Abrioul *et al.* 2008, Macedo *et al.* 2011). Enterococos resistentes a eritromicina é muito preocupante, uma vez que esta droga é a principal alternativa para o tratamento de infecções por enterococos em pacientes alérgicos à penicilina. Cepas resistentes a este antibiótico foram detectadas em outros estudos com amostras de águas residuais e não tratadas (Blanch *et al.* 2003, Martins da Costa *et al.* 2006, Saifi *et al.* 2008, Luczkiewicz *et al.* 2010, Macedo 2011). A presença de enterococos resistentes a nitrofurantoína, ciprofloxacina e norflo-

Tabela 2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Enterococcus* sp. nos diferentes pontos de coleta.

Ponto (n)	Percentual de enterococos resistentes ao antibiótico								
	AMP	CIP	CLO	ERI	GEN	NIT	NOR	TET	VAN
1 (44)	0	25	0	75	0	0	36	0	0
2 (67)	0	32,83	0	64	0	35	29	0	0
3 (76)	0	11,84	3,94	73,68	0	27,63	23,68	1,31	0
4 (77)	0	44,30*	11,39*	97,46*	0	58,22*	35,44*	6,3*	0*
5 (84)	0	48,80*	8,33*	95,23	0	65,47*	50*	3,57*	1,19*
Total (348)	0	32,55	4,73	81,07	0	37,26	34,82	2,23	0,28

Abreviaturas (antibióticos): AMP, ampicilina (10 µg); CIP, ciprofloxacina (5 µg); CLO, cloranfenicol (30 µg); ERI, eritromicina (15 µg); GEN, gentamicina (120 µg); NIT, nitrofurantoína (300 µg); NOR, norfloxacina (10 µg); TET, tetraciclina (30 µg); VAN, vancomicina (30 µg).

* diferença significativa entre os pontos de coleta ($P < 0,05$).

xacina nas amostras de água do Arroio Dilúvio pode ser justificada pelo fato de que estes antimicrobianos são muito empregados no tratamento de infecções do trato urinário causadas por enterococos. Os dados de isolados resistentes à nitrofurantoína identificados no presente estudo são semelhantes aos determinados em amostras de enterococos em outros trabalhos. Em Portugal, Martins da Costa *et al.* (2006) detectaram 34% de enterococos resistentes entre isolados de amostras ambientais, e Luczkiewicz *et al.* (2010) constataram uma frequência de 53% de cepas resistentes em águas residuais de uma estação de tratamento de esgoto na Polônia. Cepas de enterococos susceptíveis a ampicilina já foram isoladas de alimentos e fezes de frangos (Riboldi *et al.* 2009, Cassenego *et al.* 2011). Da mesma forma a sensibilidade gentamicina foi observado por Martins da Costa *et al.* (2006), com águas residuais e amostras de matadouros de aves. Um dado muito interessante foi a identificação de um *E. faecium* resistentes à vancomicina no Ponto 5. O isolamento de enterococos resistentes à vancomicina é uma preocupação frequente dos epidemiologistas hospitalares, pelo seu potencial de disseminação pelo contato (Furtado *et al.* 2005).

Quanto ao fenótipo de resistência dos isolados em relação aos pontos de coleta da água, foi identificado um aumento no perfil de resistência à medida que os pontos de coleta foram avançando. Os Pontos 1 e 2, que apresentaram isolados resistentes a 3 e 4 antimicrobianos testados, respectivamente, ficam localizados em áreas pouco urbanizadas, enquanto que os demais pontos, que apresentaram o isolados resistentes a 6 dos antimicrobianos testados localizam-se numa área muito urbanizada que acumula esgoto residencial e efluentes de diversas origens que vão sendo descartados ao longo de todo o percurso do arroio. O percentual de 77,61% de cepas resistentes encontrado no Ponto 2, pode refletir a realidade, uma vez que este ponto fica próximo à diversas vilas e loteamentos irregulares, cujo descarte de lixo, esgoto e todo o tipo de material tóxico, ou não, no arroio, é uma prática comum. A prevalência de cepas resistentes encontradas no Ponto 3, quando comparado com os Pontos 4 e 5, foi consideravelmente baixa ($P < 0,05$). Esta diminuição no percentual de resistência pode estar relacionada com o fato de que, nesse ponto foram realizadas obras de melhoria no esgotamento sa-

nitário, sendo que a contribuição mais significativa foi à desvinculação dos efluentes do Complexo Hospitalar que eram lançados diretamente no arroio (Faria & Morandi 2002). Os Pontos 4 e 5 apresentaram as mais elevadas taxas de resistência, nestes pontos foi observada uma diferença significativa entre o número médio de isolado resistentes aos antibióticos testados ($P < 0,05$) quando comparados aos demais, sendo o perfil de resistência a eritromicina o mais relevante. Esses valores são justificáveis, por corresponderem a pontos localizados em áreas muito urbanizadas, compreendendo dois hospitais de grande porte e grande concentração de pessoas. O Ponto 5, acumula esgoto residencial e efluentes de diversas origens, além disso, esse ponto corresponde à porção terminal do arroio, sendo próximo à sua foz, no lago Guaíba. Vários estudos relatam o impacto de antimicrobianos presentes no meio ambiente, registrando a presença de várias moléculas (tetraciclina, macrólidos, glicopeptídeos e aminoglicosídeos), em amostras de água, solo e vegetais (Chee-Sanford *et al.* 2001). A pressão seletiva exercida por esses elementos presentes no meio contribui para a seleção e disseminação de microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos de uso comum.

O perfil de multirresistência observado neste estudo demonstrou que 44,25% das cepas eram resistentes a duas classes, 19,83% a três classes e 2,01% a quatro classes de antimicrobianos. Espécies de enterococos multirresistentes estão amplamente descritos na literatura (Martins da Costa *et al.* 2006, Riboldi *et al.* 2009, Cassenego *et al.* 2011). Saifi *et al.* (2008) relataram *E. faecium* e *E. faecalis* multirresistentes isolados de água de estações de tratamento de esgoto. Recentemente, Macedo *et al.* (2011) observaram uma frequência de 57% de cepas de enterococos multirresistentes isolados de água não tratada para consumo humano. A capacidade de microrganismos adquirirem resistência a várias classes de antimicrobianos pode estar relacionada à exposição sequencial a diferentes antimicrobianos ou a aquisição de elementos genéticos móveis, levando a consequências importantes, com efeitos diretos na problemática das infecções hospitalares.

Este estudo mostrou que a microbiota predominante de enterococos isolados das águas do arroio Dilúvio consiste, principalmente, das espécies *E. faecium*,

E. faecalis e *E. casseliflavus*, das quais *E. faecium* foi a mais prevalente. Todos os isolados estudados foram sensíveis à ampicilina e gentamicina, o perfil de resistência mais frequente foi para eritromicina, seguido de nitrofurantoína, norfloxacin e ciprofloxacino. Este é o primeiro estudo que relata a distribuição e o perfil de resistência aos antimicrobianos de amostras de enterococos isoladas das águas do arroio Dilúvio na cidade de Porto Alegre. A presença de enterococos nas águas não é apenas um indicador de contaminação de origem fecal, mas também representa um problema de saúde pública, uma vez que as águas do arroio podem ser uma fonte de disseminação e persistência de enterococos resistentes para os seres humanos e o meio ambiente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- ABRIOUEL, H., OMAR, N.B., MOLINOS, A.C., LOPEZ, R.L., GRANDE, M.A., MARTINEZ-VIEDMA, E., ORTEGA, E., CANAMERO, M.M & GAVEZ, A. 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 38-49.
- BERTRAND, X., MOULIN, B., VIEL, J.F., THOUVEREZ, M. & TALON, D. 2000. Common PFGE patterns in antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* from humans and cheeses. *Food Microbiology*, 17: 543-551.
- BLANCH, AR., CAPLIN, J.L., IVERSEN, A., KÜHN, L., MANERO, A., TAYLOR, H.D. & VILANOVA, X. 2003. Comparison of enterococcal populations related urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 994-1002.
- CASSENEGO, A. P. V., RIBEIRO, A., FRAZZON, J., VAN DER SAND, S. T., D'AZEVEDO, P. & FRAZZON, A. P. G. 2011. Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp. and fed with diets containing different supplements. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 480-488.
- CHEE-SANFORD, J.C., AMINOV, R.I., KRAPAC, I.J., GARRIGUES-JEANJEAN, N. & MACKIE, R.I. 2001. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 1494-1502.
- CHENG, S., MCCLESKEY, F.K., GRESS, M.J., PETROZIELLO, J.M., LIU, R., NAMDARI, H., BENINGA, K., SALMEN, A. & DEL VECCHIO, V.G. 1997. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 49-56.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2010. *Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing*, Tables M100 – S18 2008 e MS 100 – 15, v. 25.
- COLLINS, M.D., JONES, D., FARROW, J.A.E., KILPPER-BALZ, R. & SCHLEIFER, K.H. 1984. *Enterococcus avium* nom. rev., com. nov., *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov., *E. durans* nom. rev., comb. nov., *E. gallinarum* comb. nov., *E. malodoratus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34:220-223.
- D'AZEVEDO, P.A., DIAS, C.A.G., LEMOS, S.K., BITTENCOURT, J.A.F. & TEIXEIRA, L.M. 2004. Antimicrobial susceptibility among *Enterococcus* isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35:199-204.
- DA SILVA, M.F., TIAGO, L., VERÍSSIMO, A., BOAVENTURA, R.A., NUNES, O.C. & MANAIA, C.M. 2006. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 55:322-329.
- DEPARDIEU, F., PERICHON, B. & COURVALIN, P. 2004. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 5857-5860.
- EUZÉBY, J.P. 2011. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Enterococcus*. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/>>. Acesso em: 15 mai. 2011.
- FARIA, C.M. & MORANDI, I.C. 2002. A Difícil Recuperação de Arroios em Áreas Urbanas. *Pesquisa Ecosistema Revista*, 3: 38-52.
- FRACALANZZA, S.A.P., SCHEIDEGGER, E.M.D., DOS SANTOS, P.F., LEITE, P.C. & TEIXEIRA, L.M. 2007. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 853-859.
- FERGUSON, D.M., MOORE, D.F., GETRICH, M.A. & ZHOWANDAI, M.H. 2005. Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 598-608.
- FURUKAWA, T., TAKAHASHI, H., YOSHIDA, T. & SUZUKI, Y. 2011. Genotypic analysis of enterococci isolated from fecal-polluted water from different sources by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for application to microbial source tracking. *Microbes Environmental*, 26: 181-183.
- FRANZ, C.M., STILES, M.E., SCHLEIFER, K.H. & HOLZAPFEL, W.H. 2003. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 105-122.
- FRAZZON, A.P.G., GAMA, B.A., HERMES, V., BIERHALS, C.G., PEREIRA, R.I., GUEDES, A.G., D'AZEVEDO, P.A. & FRAZZON, J. 2010. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tetM* and *tetL* genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 26: 365-370.
- FURTADO, G.H.C., MARTINS, S.T., COUTINHO, A.P., SOARES, G.M.M., WEY, S.B. & MEDEIROS, E.A.S. 2005. Incidência de *Enterococcus* resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil. *Revista de Saúde Pública* 39: 41-46.
- GIRAFFA, G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 163-171.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C. & WINN, W. C. J. 2001. *Diagnóstico Microbiológico-Texto e Atlas Colorado*. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI. 1465 p.
- HAGEN, R.M., GAUTHIER, Y.P., SPRAGUE, L.D., VIDAL, D.R., ZYSK, G., FINKE, E.J. & NEUBAUER, H. 2002. Strategies for PCR based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in paraffin wax embedded tissues. *Molecular Pathology*, 55: 398-400.
- JACKSON, C.R., FEDORKA-CRAY, P.J. & BARRETT, J.B. 2004. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 3558-3565.
- LUCZKIEWICZ, A., JANKOWSKA, K., FUDALA-KSIAZEK, S. & OLANCZUK-NEYMAN, K. 2010. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, 44: 5089-5097.
- MACEDO, A.S., FREITAS, A.R., ABREU, C., MACHADO, E., PEIXE, L., SOUSA, J.C. & NOVAIS, C. 2011. Characterization of antibiotic resistant enterococci isolated from untreated Waters for human consumption in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 315-319.
- MALAVAZI, B. C. G. 2007. *Enterococos em amostras de alimentos e águas: avaliação da virulência e do desempenho como indicadores de higiene*. 167f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, 2007.

- MANERO, A., VILANOVA, X., CERDÀ-CUÉLLAR, M. & BLANCH, A.R. 2002. Characterization of sewage waters by biochemical fingerprinting of Enterococci. *Water Research*, 36: 2831-2835.
- MARTINS DA COSTA, P., VAZ-PIRES, P. & BERNARDO, F. 2006. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research*, 40: 1735-1740.
- MOORE, D.F., GUZMAN, J.A. & MCGEE, C. 2008. Species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from surface and ocean water. *Journal of Applied Microbiology*, 105: 1017-1025.
- NOVAIS, C., COQUE, T.M., FERREIRA, H., SOUSA, J.C. & PEIXE, L. 2005. Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3364-3368.
- PANGALLO, D., HARICHOVÁ, J., KARELOVÁ, E., DRAHOVSKÁ, H., CHOVANOVÁ, K., FERIANC, P., TURNA, J. & TIMKO, J. 2004. Molecular investigation of enterococci isolated from different environmental sources. *Biologia, Bratislava*, 59: 829-837.
- RESENDE, M.C.C. 2012. Caracterização fenotípica e molecular de *Enterococcus* isolados na cidade de Porto Alegre. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2012.
- RIBOLDI, G.P., FRAZZON, J., D'AZEVEDO, P.A. & FRAZZON, A.P.G. 2009. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 125-128.
- SAIFI, M., DALLAL, M.M.S., POURSHAFIE, M.R., ESHRAGHIAN, M.R., POURMAND, M.R., SALARI, M.H. & SHIRAZI, M.H. 2008. High level resistance of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* isolates from municipal sewage treatment plants to gentamicin. *Iranian Journal of Public Health*, 37: 103-107.
- STATSOFT, INC. 2007. Statistica (data analysis software system). version 8.0. <<http://www.statsoft.com>>.
- TEIXEIRA, L.M. & FACKLAM, R.R. 2003. *Enterococcus*. In: MURRAY, P. R., BARON, E. J., PFALLER, M., TENOVER, F. C. & YOLKEN, R. H. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. 8. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. p. 422-433.