

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**IDENTIFICAÇÃO DE *Enterococcus* sp. E RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE REGIÕES COSTEIRAS
DA LAGOA DOS PATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

WALDIR EMILIO HENKES

ORIENTADORA: Gertrudes Corção

Julho, 2010.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**IDENTIFICAÇÃO DE *Enterococcus* sp. E RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE REGIÕES COSTEIRAS
DA LAGOA DOS PATOS**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Área de concentração: Microbiologia de Ambientes Naturais e Antropogênicos), na Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia.

WALDIR EMILIO HENKES

Biólogo / PUCRS

ORIENTADORA: Gertrudes Corção

Professor Associado II – Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS

Catálogo na Publicação

UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

H513i Henkes, Waldir Emilio

Identificação de Enterococcus sp. e resistência a antimicrobianos em amostras de regiões costeiras da Lagoa dos Patos / Waldir Emilio Henkes. – 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

Orientação: Prof. Gertrudes Corção

1. Enterococcus 2. Resistência microbiana a drogas 3. Degradação ambiental 4. Lagoa dos Patos (RS) I. Corção, Gertrudes, orient. II. Título.

CDU 579.86 (043)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Molecular Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dedico aos amores de minha vida, minha esposa Lisiane, que me iluminou em dias de escuridão e ao meu filho Noah que irá nascer em Agosto, com futuro brilhante.

Agradecimentos.

Agradeço em especial a minha orientadora Dra. Gertrudes Corção pela amizade, confiança e dedicação.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Molecular Ambiental – ICBS/UFRGS, sala 166, doutorando Giuliano Hikenbick, a Dra. Daiane B. Fuentefria, a Dra. Alessandra Eisenfeldt Ferreira, a Ms. Natalia Canal, Ms. Aline Spindler e Ms. Kelly F. Priotto.

As alunas de iniciação científica Gabriela Rosa da Cunha e Desirèe Padilha Marchetti pela contribuição e colaboração.

Ao guarda parque Jairo, do Parque Itapuã, pelo acompanhamento nas coletas.

Agradeço também a Dra. Brisa Fernandes pela contribuição na análise estatística.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

IDENTIFICAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* SP. E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE REGIÕES COSTEIRAS DA LAGOA DOS PATOS.

Autor: Waldir Emilio Henkes

Orientador: Dra. Gertrudes Corção

Resumo¹

O meio ambiente aquático vem recebendo grande carga de poluição fecal, sendo este um dos fatores que contribuem para sua degradação. O objetivo deste trabalho foi identificar bactérias do gênero *Enterococcus* em oito pontos ao longo da Lagoa dos Patos – RS, com diferentes níveis de degradação ambiental e verificar a resistência a antimicrobianos nestes isolados. Foi observado que nos pontos situados no Parque Itapuã e na praia do Cassino as contagens de *Enterococcus* sp. foram baixas. Os pontos situados em Tapes e São Lourenço do Sul apresentaram níveis elevados de contagens de *Enterococcus* sp no verão e na primavera e os pontos na região estuarina de Rio Grande apresentaram valores elevados no outono e inverno. Dentre os antimicrobianos testados a resistência a tetraciclina e a doxamicina foram verificadas em todos os pontos de coleta, sendo que as maiores percentagens de isolados resistentes foram na região estuarina de Rio Grande. Os *Enterococcus* spp também apresentaram suscetibilidade diminuída para ampicilina, gentamicina (120µg/ml) e estreptomicina (300 µg/ml) e nenhuma para vancomicina. Entre os isolados resistentes a tetraciclina, as duas espécies mais frequentemente identificadas foram *E. faecalis* e *E. faecium*. O nível de resistência à tetraciclina, verificada através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), variou de 16µg/ml a 256µg/ml nas duas espécies. Isolados de *E. faecalis* foram encontrados mais em Tapes e São Lourenço do Sul e *E. faecium* na região estuarina de Rio Grande, os últimos apresentaram os maiores níveis de resistência a tetraciclina e gentamicina. Os resultados do presente estudo indicam que a contaminação fecal pode estar relacionada ao descarte de dejetos humanos e de animais nestes locais.

Keywords: *Enterococcus* sp., Degradação ambiental, resistência a antimicrobianos

1 Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Ambientes Naturais e Antropogênicos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (44p). Julho, 2010.

IDENTIFICATION OF *Enterococcus* sp AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN SAMPLES OF COASTAL REGIONS OF LAGOA DOS PATOS IN THE SOUTH OF BRAZIL.

Author : Waldir Emilio Henkes

Supervisor : Dra Gertrudes Corção

Abstract

The aquatic environment has been receiving a great amount of fecal pollution and this is one of the factors that contribute to its degradation. The aim of the present study was to identify *Enterococcus* sp in eight collection points with different levels of environmental degradation at Lagoa dos Patos/RS and to verify the antimicrobial resistance among these isolates. We verified low numbers of *Enterococcus* sp in Parque Itapuã e Praia do Cassino collection points. In Tapes and São Lourenço do Sul, higher counting of *Enterococcus* were observed during summer and spring seasons and at the estuarine area of Rio Grande, higher numbers were observed during autumn and winter. Among the antimicrobial drugs tested, the resistance to tetracycline and doxycycline was detected in all collection sites and the highest percentages of resistant isolates were in the estuarine area of Rio Grande. The *Enterococcus* spp have also presented diminished susceptibility to ampicillin, gentamicin (120µg/ml) and streptomycin (300 µg/ml) and none to vancomycin. Among the isolates resistant to tetracycline, *E. faecalis* e *E. faecium* were the most identified species. The resistance level to tetracycline, verified by MIC analysis, varied from 16µg/ml to 256µg/ml in both species. *E. faecalis* isolates were found mostly in Tapes and São Lourenço and *E. faecium*, in the estuarine area of Rio Grande and among these, the higher level of resistance to tetracycline and gentamycin was verified. The results from the present study indicate that the fecal contamination from this sampling points can be related to the discharge of human and animal waste.

Keywords: *Enterococcus* sp., environmental degradation, antimicrobial resistance

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS.....	IX
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	X
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XI
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Objetivo Geral.....	2
1.2 - Objetivos específicos.....	2
2 -REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 - Poluição Fecal de corpos d'água.....	5
2.2 - A Lagoa dos Patos.....	7
2.3 - Bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> sp.....	8
2.4 - <i>Enterococcus</i> sp. versus resistência a antimicrobiano.....	15
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 - Pontos de Coletas e amostragem.....	15
3.2 - Isolamento e Identificações de <i>Enterococcus</i> sp.....	20
3.3 - Antibiograma de isolados do gênero <i>Enterococcus</i> sp.....	20
3.4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) para tetraciclina e gentamicina para isolados de <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	21
3.5 - Identificação molecular das espécies de <i>Enterococcus</i> resistentes a tetraciclina.....	22
3.6 - Análise estatística.....	23
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 - Caracterização dos pontos de coleta em relação à contagem de <i>Enterococcus</i> sp e a resistência a antimicrobianos entre os isolados.....	24
4.2 - Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> e análise do CIM para tetraciclina e gentamicina.....	32
5 - CONCLUSÕES.....	37
6 - RECOMENDAÇÕES E PERSPECTIVAS.....	38
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1	Médias de UFC de Enterococcus spp. por ponto de coleta e período sazonal no ano de 2008.....pg 25
Tabela 2	Perfis de suscetibilidade diminuída dos de isolados de Enterococcus sp. por ponto de coleta e estação do ano....pg 27
Tabela 3	Percentuais de isolados de Enterococcus sp.resistentes em relação ao total de 248 isolados por meses quentes e frios e pontos de coleta na lagoa dos Patos, RS.....pg 28
Tabela 4	Distribuição de Enterococcus faecalis (1) e Enterococcus faecium (2) em relação as variáveis meses quente e frio e pontos de coleta na Lagoa dos Patos - RS, Brasil.....pg 32
Tabela 5	Nível de resistência dos 86 isolados de Enterococcus spp.em relação a CIM de tetraciclina e gentamicina, nos diferentes pontos de coleta.....pg 34

RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1 Mapa com os pontos de coleta: Parque Estadual Itapuã: (P1) – Praia de fora e (P2) – Praia da Pedreira; Tapes (P3); São Lourenço do Sul (P4); Rio Grande: Museu (P5), Saco da Mangueira(P6) e Barra (P7) e por último a Praia do Cassino (P8). (Adaptado de Matthiensen *et al.*, 1999).....pg 18
- Figura 2 Esquema de coleta e identificação de *Enterococcus* sp.....pg 19
- Figura 3 Esquema de identificação pelo método de Gram e de provas bioquímicas de isolados do gênero *Enterococcus* spp.....pg 20

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAC-6' - 6'-acetiltransferase

ADN – Ácido desoxirribonucléico

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APH-2 - 2-fosfotransferase

ATCC - American Type Culture Collection

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

EPA – Environmental Protection Agency

VER – *Enterococcus* Resistentes a Vancomicina

ETE – Estação de Tratamento de Esgotos

EUA – Estados Unidos da América

MLSA – Multilocus Sequence Analysis

MLS - Macrolídeos, Lincosaminas e Estreptograminas

MRS -

NaCl – Cloreto de sódio

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Panamericana de Saúde

PBP – Proteínas de ligação às penicilinas

PCR - Polymerase reaction chain

pheS – Penilalanina sintetase

PYR - Hidrólise L-pirrolidonil-beta-naftilamida

RM – Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em
Serviços de Saúde

RMD – Resistentes a multiplas Drógas

RS – Rio Grande do Sul

TSA - Ágar tripticaseína de soja

TSB - Caldo tripticaseína de soja

UFC – Unidade formadora de colônia

UTIs – Unidades de Tratamento Intensivo

µg/mL – Microgramas por mililitro

µL – Microlitro

1 - INTRODUÇÃO

A poluição das águas é utilizada como indicador de qualidade de vida das populações em todo o mundo. Na América do Sul e no Brasil, rios e lagos vêm recebendo grande quantidade de esgoto sem nenhum tipo de tratamento, sendo o esgoto cloacal de humanos e animais, um dos que mais contribuem para esta realidade. A poluição fecal é uma importante fonte de contaminação bacteriana em rios e lagos, pois possibilita a proliferação e a contaminação dos mananciais hídricos por várias bactérias como as do grupo coliforme e as do gênero *Enterococcus*, colocando em risco a saúde das populações tanto humanas como de animais.

Essa abordagem ainda não é explorada no Brasil, já que a legislação não preve a pesquisa de *Enterococcus* sp em água doce, somente em água marinha. Indicadores de contaminação fecal vêm sendo estudada desde o final da década de 90 pelo grupo de pesquisa do laboratório de Microbiologia Molecular Ambiental do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Este grupo vem pesquisando a diversidade genética e a resistência a antibióticos em bactérias Gram positivas e negativas em águas servidas, como no rio Guaíba e o arroio Feijó, em estações de tratamento de esgotos (ETE) e águas residuais hospitalares em Porto Alegre. Bactérias do gênero *Enterococcus* sp., isoladas de fezes de animais de humanos, também vêm sendo estudadas quanto a diversidade genética e resistência a antimicrobianos.

Atualmente no laboratório estão sendo desenvolvidas pesquisas com amostras de água superficial de áreas da Lagoa dos Patos para a identificação de microrganismos indicadores de contaminação, como *E coli* e *Enterococcus* sp.

A emergência de *Enterococcus* sp. multirresistentes é um grande desafio à terapia antimicrobiana, já que nas últimas duas décadas, a resistência a drogas entre os cocos Gram-positivos aumentou. Portanto é de grande relevância a pesquisa destes cocos Gram-positivos no meio ambiente aquático, juntamente com a pesquisa do perfil de resistência a antimicrobianos, uma vez que estas bactérias proporcionam a disseminação de genes de resistência no meio ambiente.

1.1 - Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo quantificar *Enterococcus* sp. em diferentes pontos da Lagoa dos Patos - RS, identificar as espécies de *Enterococcus* resistentes e relacioná-las com o nível de poluição fecal encontrado nos diferentes locais de coleta.

1.2 - Objetivos específicos

a) Identificar os locais e estações do ano com maiores níveis de contaminação por bactérias do gênero *Enterococcus* sp. ;

b) Analisar o perfil de resistência e multiresistência a antimicrobianos entre os isolados de *Enterococcus* sp. e correlacioná-lo com os diferentes pontos de coleta;

c) Verificar a predominância das espécies de *Enterococcus* entre os isolados resistentes a antimicrobianos nos diferentes locais de coleta, por métodos moleculares.

2 - Revisão Bibliográfica

2.1 - Poluição fecal de corpos d'água

Em todo o mundo indicadores microbiológicos são utilizados para verificar a contaminação fecal de águas superficiais e subterrâneas. Geralmente são utilizados microrganismos encontrados em elevadas concentrações em fezes de animais e de humanos, como os coliformes totais, coliformes fecais, *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. (Shibata *et al.* 2004; Baums *et al.*, 2007).

A poluição fecal pode ser verificada pela presença de bactérias do grupo coliformes. A presença deste grupo de microrganismos indica se um local foi contaminado por fezes de humanos ou de outros mamíferos e se apresenta um risco em potencial para transmitir doenças aos seres humanos como as gastroenterites intestinais (Wade *et al.* 2003; Scott *et al.* 2005).

Segundo Barrell *et al.* (2002), o critério para que as bactérias sejam consideradas indicadoras de poluição de origem fecal, é que estejam presentes em grande número nas fezes humanas e de animais; também devem estar presentes em efluentes residuais, serem detectáveis por métodos simples, não devem estar presentes em água limpa e serem exclusivamente de origem fecal.

Wade *et al.* (2003) comentam que *Enterococcus* spp., conforme diretrizes da Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA, são indicadores de poluição fecal em águas salinas, concordando com as Resoluções nº 274 (2002) e nº 357 (2005) do Conselho Nacional do Meio ambiente (CONAMA) do Brasil, as quais classificam os padrões brasileiros de balneabilidade e uso humano das águas superficiais e subterrâneas, sendo que o uso de *Enterococcus* sp deve ser considerado apenas para água salina, sendo considerada satisfatória quando encontrado até 100 *Enterococcus* sp por 100 mililitros de água.

Segundo Barrell *et al.* (2002), as bactérias do gênero *Enterococcus* sp. normalmente não excedem 10^6 por grama de fezes em humanos, esta observação pode fornecer indícios da elevada concentração destas bactérias em águas servidas sem tratamento, que normalmente tem como destino final rios e lagos (Vasconcellos *et al.* 2006).

Sabendo que as fezes de animais e humanos têm proporções diferentes de espécies do gênero *Enterococcus*, que aparentemente vive por mais tempo em ambientes aquáticos que outras espécies, a presença de *E. faecalis* e *E. faecium* podem indicar uma contaminação recente por dejetos humanos (Devriese *et al.* 1993; Petersen e Dalsgaard, 2003; Kühn *et al.* 2005). Em estudo realizado na Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio de Janeiro, Gonzalez *et al.* (2009) foram encontradas bactérias do gênero *Enterococcus*, associadas à possível poluição fecal.

2.2 - A Lagoa dos Patos

O complexo lagunar Patos-Mirim é a feição dominante na planície costeira do extremo sul do Brasil, sendo a maior lagoa costeira do Atlântico Sul e se destaca também pela sua importância econômica e social. A Lagoa dos Patos é uma lagoa costeira do tipo estrangulada de micromaré, situada no sul do Brasil entre as coordenadas de 30 °S e 32 °S, e tem uma circulação dirigida principalmente pelo sistema de ventos NE-SW e descarga de água doce (Möller *et al.*, 2001). Ela possui uma superfície de aproximadamente 10.227 Km², estendendo-se na direção NE-SW desde o delta do lago Guaíba até sua conexão com o oceano Atlântico próximo a cidade de Rio Grande (Asmus, 1998).

Contém diversos tipos de dejetos urbanos, industriais e agroindustriais, liberados por indústrias situadas na região metropolitana de Porto Alegre e da cidade de Rio Grande, a quais possuem uma ocupação desordenada do espaço. A grande utilização de agrotóxicos nas plantações próximas às suas margens, também causa neste ecossistema um elevado grau de degradação (*apud* Silva, 2002).

Bonilha & Asmus (1994) dividem a Lagoa dos Patos em cinco unidades biológicas: lago Guaíba que apresenta um delta de deposição sedimentar e é o maior tributário de água doce ao sistema; Enseada de Tapes e Lagoa do Casamento, ambas são corpos de água semi-aberto; o corpo central

lagunar que representa aproximadamente 80% da área da lagoa e o estuário no seu extremo sul. Os estuários são ecossistemas caracterizados por intensas trocas de água e energia, que ocorre do encontro entre ambiente marinho e de água doce. Os impactos ao estuário da Lagoa dos Patos têm se intensificado nas últimas décadas, pelos lançamentos de efluentes domésticos e industriais (Seeliger & Costa, 2002). Contaminações orgânicas, bacterianas de origem fecal e um aumento excessivo de compostos químicos como amônio e fosfato conduzem a processos de eutrofização, modificando a dinâmica local (Almeida *et al.*, 1993).

Os impactos na região estuarina da Lagoa dos Patos também têm se intensificado nas últimas décadas, pelos lançamentos de efluentes domésticos e industriais (Seeliger & Costa, 2002). Contaminações bacterianas de origem fecal, o aumento excessivo de compostos químicos como amônio e fosfato, causado pelos despejos de esgoto doméstico *in natura* ao longo de boa parte da margem oeste desta lagoa, têm gerado processos de eutrofização (Almeida *et al.*, 1993).

Devido à ampla utilização das águas da Lagoa dos Patos pelo homem, é de extrema importância que, juntamente com avaliações físico-químicas, sejam feitas avaliações microbiológicas para determinar possíveis riscos à saúde.

2.3 – Bactérias do gênero *Enterococcus* sp.

Os *Enterococcus* são cocos Gram-positivos que podem ser observados como células individuais ou em arranjos de dois ou mais cocos formando cadeias, com morfologia ovóide (Schleifer & Klipper-Bälz, 1984). São comensais e benignas do meio gastrintestinal do ser humano e dos animais. Quando ocorrem fora de seu habitat normal, podem ser patogênicos, causando infecções do trato urinário e de feridas e doenças como bacteremia, endocardites subagudas e meningites (Scott *et al*, 2002; Henrique, 2007).

Os *Enterococcus* toleram altas concentrações de sal (6,5% de NaCl), toleram sais biliares a 40% e podem hidrolisar a esculina, sendo que estas propriedades básicas podem ser utilizadas para distinguir os enterococos de outros cocos Gram-positivos catalase-negativos. São caracterizados também por sua habilidade de crescer em temperaturas entre 10°C e 45°C, em pH 9,5, além de sobreviverem por até 30 minutos a 60° C (Holt, 1994; Ruoff, 1995; Facklam *et al*. 1999; Teixeira e Facklam, 2004). São conhecidas cerca de trinta (30) espécies de *Enterococcus*, sendo as mais comuns *E. faecalis* e *E. faecium* (Naser *et al*. 2005a). Em cerca de 25% dos adultos saudáveis, as fezes contêm altas concentrações de *E. faecalis*, enquanto que *E. faecium* é encontrada em concentrações menores (Hayden *et al*, 1993). Dentre as espécies de enterococos, o *E. faecalis* é responsável por aproximadamente 80 a 90% das infecções em humanos, enquanto que o *E. faecium* por menos de 5% das infecções enterocócicas (Ruoff 1995; Tavares, 2000).

A diversidade dos enterococos está diretamente relacionada aos ambientes onde podem ser encontradas, como solo, plantas, água e em diversas espécies do domínio Eucarya, incluindo mamíferos, répteis, aves e insetos (Aerstrup, *et al.* 2002). Fuentefria *et al.* (2006) observaram em um estudo com isolados de *Enterococcus* sp. de origem humana e não humana, que os primeiros apresentaram menor diversidade genética.

2.4 - *Enterococcus* spp. versus resistência a antimicrobianos

Em todo o mundo existe uma preocupação em conter a disseminação de microrganismos resistentes a antimicrobianos. Diversas organizações públicas como a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) vêm buscando através de redes de monitoramento, verificar a crescente resistência a antimicrobianos em diversos microrganismos (Lopes *et al.*, 2006).

Os *Enterococcus* são algumas das bactérias com alta resistência aos antibióticos. Possuem genes de resistência aos antibióticos do grupo dos macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas (MLS), aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina), β – lactâmicos (penicilina e ampicilina), tetraciclina e glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina). A resistência à vancomicina, do grupo dos glicopeptídeos, é particularmente preocupante para as equipes de controle de infecção hospitalar e à comunidade médica, uma vez que é utilizado como um dos últimos recursos contra infecções bacterianas

severas causadas por cocos Gram-positivos. (Tavares, 2000; Fluit, 2001; Rice *et al.* 2003; Remonato *et al.*, 2005; Henrique, 2007).

Muitos estudos mostram a importância dos *Enterococcus* como um reservatório de genes de resistência aos antibióticos no ambiente e em animais. O uso de antimicrobianos como a gentamicina, tetraciclina e a eritromicina associados a rações de animais, podem gerar uma pressão seletiva resultando em cepas multiresistentes, as quais podem ser liberadas no ambiente e contribuir para a disseminação destes genes (Vallar, 2002; Kretsinger *et al.*, 2003; Corrêa *et al.*, 2005; Macovei e Zurek, 2006).

São conhecidas duas rotas importantes de transferência de bactérias resistentes a antimicrobianos de animais aos seres humanos, uma maneira direta e outra indireta. A transmissão direta da resistência ocorre quando as bactérias resistentes infectam seres humanos. Na maneira indireta, bactérias resistentes que estão presentes no trato gastrointestinal de animais, transferem seus genes de resistência horizontalmente à população bacteriana humana pela cadeia alimentar, isto é, alimentos e água contaminados. Isto ocorre também quando as populações bacterianas resistentes podem sobreviver, ao menos temporariamente, em locais como águas de rios e lagoas, onde seres humanos captam água para consumo ou a utilizam para agricultura e recreação (De Leener *et al.*, 2005).

Devido a preocupação mundial em ter o acesso constante a informações precisas e ao mesmo tempo poder monitorá-las, entrou em

funcionamento no Brasil em 2006, a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (RM), vinculada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e parceria da Organização OPAS, a qual tem como objetivo geral “*Aumentar a efetividade da assistência à saúde, por meio do uso racional de antimicrobianos e da detecção tempestiva, prevenção e controle da emergência e disseminação da resistência microbiana em serviços de saúde no país*” (Lopes,2006).

A resistência a antibióticos em *Enterococcus* spp. pode ser natural e adquirida. A resistência natural ocorre com diversos antimicrobianos, como as cefalosporinas e os aminoglicosídeos. A resistência intrínseca ou natural a moderadas concentrações de aminoglicosídeos ocorre devido à baixa penetração do antimicrobiano pela parede bacteriana (Jett *et al.*, 1994; Zarrili *et al.*, 2005) e aos β -lactâmicos devido à presença de proteínas de ligação às penicilinas (PBP) com baixa afinidade por este grupo de antimicrobianos (Teixeira *et al.*, 2003; Hörner *et al.*, 2005). A resistência adquirida pode ocorrer através de plasmídeos e transposons carreadores de genes de resistência e mutações cromossômicas (Cetinkaya *et al.*, 2000).

Existem três mecanismos distintos para que os enterococos adquiram resistência aos aminoglicosídeos: 1) quando ocorre a alteração do sítio-alvo no ribossomo; 2) na interferência no transporte do antibiótico e 3) na modificação enzimática do antibiótico. Os dois primeiros são mutações cromossomais e o terceiro geralmente é mediado por plasmídeo, com exceção da sequência AAC-

6' do *E. faecium* que é cromossomicamente codificada (Couvarlin *et al.*, 1980; Leclercq *et al.*, 1992).

O aparecimento de *Enterococcus* sp. resistentes a altas doses de aminoglicosídeos decorre geralmente da produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, como a 2-fosfotransferase (APH-2") e a 6'-acetiltransferase (AAC-6'). A presença desta enzima leva à perda de sinergismo com antimicrobianos beta-lactâmicos e glicopeptídeos, podendo não ocorrer o efeito bactericida em tratamentos de infecções graves por enterococos (Shepard & Gilmore, 2002).

Enterococos penicilina-resistente foram descritos por Murray (1983) nos EUA, cujo mecanismo é devido à produção de β -lactamases por plasmídios transferíveis. Posteriormente, foram descritas cepas resistentes por modificações das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), sobretudo em *E. faecium*, tornando-se freqüente o isolamento de enterococos ampicilina/aminoglicosídeo resistentes em infecções hospitalares no mundo todo. Sader *et al* (1999) encontraram no Brasil níveis elevados de resistência à gentamicina/ampicilina em enterococos isolados de hemoculturas em três laboratórios de referência. O elevado nível de resistência dos enterococos à gentamicina neutraliza o efeito bactericida resultante da associação ampicilina/gentamicina, diminuindo, por sua vez a eficácia desta associação contra estes patógenos. Portanto, a resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos e β -lactâmicos tem levado ao desenvolvimento de novas

drogas capazes de contornar estes problemas (Rice *et al.*, 2003; Facklam *et al.*, 2007).

A resistência aos glicopeptídeos pode ser induzível e transferível, sendo que os genes de resistência localizam-se no cromossoma, em plasmídios e em transposons. O mecanismo bioquímico desta resistência consiste em modificações na estrutura da parede celular, sendo observado que os enterococos com elevada resistência aos glicopeptídeos utilizam precursores do peptidoglicano alterados, codificados geneticamente, de tal modo que são produzidos precursores com terminação em *D-alanil- D-lactato* em lugar de *D-alanil-D-alanina*. Desta maneira, estes precursores modificados não são reconhecidos pela vancomicina e outros antibióticos do grupo (Tavares, 2000).

O aumento da resistência a antimicrobianos em todo o mundo, tem provocado o surgimento de novos agentes antimicrobianos, como quinupristina-dalfopristina (Synercid; King Pharmaceuticals, EUA) e linezolida (Zyvox; Pfizer, EUA). No entanto, poucos anos após a venda comercial destes dois medicamentos, já foram encontradas bactérias resistentes. Em geral, tem sido relatado que quinupristina-dalfopristina possui atividade inibitória contra *E. faecium*, incluindo os *Enterococcus* sp. resistentes à vancomicina (ERV), os quais são resistentes a outros agentes clinicamente disponíveis. No entanto, dois genes já foram descobertos em *E. faecium* como responsáveis pela resistência à quinopristina-dalfopristina: *vatD* e *vatE*. *E. faecalis* é resistente à

associação destas drogas devido à expressão do gene *lsa*, ou por possuírem o gene *vat E* (Hershberger *et al.*, 2003).

A incidência de enterococos resistentes a antibióticos isolados de amostras clínicas em vários países vem aumentando já há alguns anos. Segundo Hershberger *et al.* (2003), dados do estudo de vigilância multiestadual do CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA) relataram uma percentagem de 1 a 2% de resistência à quinupristina-dalfopristina em *E. faecium* isolados de amostras de fezes humanas. Jones *et al.* (2004), em um estudo sobre resistência bacteriana entre patógenos bacterianos em UTIs nos EUA e Europa do período entre 2000 e 2004, verificaram que entre as amostras dos EUA, o *Enterococcus* sp aparece em sexto lugar representando 5,4% dos patógenos isolados.

No Brasil, estudos sobre a resistência antimicrobiana em *Enterococcus* demonstram que é crescente o problema com VRE, como mostra um estudo sobre a incidência de VRE de 2000 até 2002, em um hospital em São Paulo (Furtado *et al.* 2005). Neste estudo os autores demonstraram a incidência progressiva de VRE: 9,5% das amostras de *Enterococcus* sp eram VRE em 2000, em 2001 aumentou para 14,7% e para 15,8% em 2002. Mashieto *et al.* (2004) em um estudo com isolados do intestino de pacientes de um hospital universitário brasileiro encontraram níveis significativos de resistência aos aminoglicosídeos gentamicina e/ou estreptomicina. Também Bender *et al.* (2009), em um estudo em dois hospitais da cidade de Porto Alegre – RS sobre a

identificação, resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica de *Enterococcus* sp., encontraram altas taxas de isolados deste gênero resistentes à tetraciclina.

Muitas pesquisas com *Enterococcus* sp. em ambientes aquáticos buscam encontrar possíveis causas do aumento de doenças diarréicas em populações que têm contato com águas de rios, lagos e águas marinhas no mundo todo. Wiggins (1996) buscou padrões de resistência a antimicrobianos nos estreptococos fecais de fontes humanas e animais em águas naturais, encontrando taxas elevadas de resistência à oxitetraciclina em várias fontes como humanos, frangos, perus e animais silvestres. Outras pesquisas sobre diversidade de enterococos resistentes a antimicrobianos em lagoas, rios, águas residuais, águas servidas e marinhas têm verificado sua presença nestes ambientes (Chee-Sanford *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2007; Sapkota *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2008). No Chile, Silva *et al.* (2005) verificaram alta prevalência de *Enterococcus* sp. resistentes à gentamicina e estreptomicina em águas servidas, além de resistência à penicilina, ampicilina e vancomicina. No sudeste do Brasil, Oliveira & Pinhata (2007) encontraram grande frequência de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à aminoglicosídeos em amostras de água marinha e areia de praia.

3. - Materiais e Métodos

3.1 – Caracterização dos pontos de Coletas e amostragem

Foram realizadas quatro coletas de amostras de águas superficiais numa profundidade de 50 cm (centímetros) em quatro períodos sazonais (Verão, Outono, Inverno e Primavera) no ano de 2008, em oito pontos da margem ocidental da Lagoa dos Patos (Fig. 01), partindo de um local com menor degradação ambiental, o Parque Estadual Itapuã.

Parque de Itapuã (pontos 01 e 02): O Parque Estadual de Itapuã, localizado no município de Viamão, a 57 quilômetros de Porto Alegre, é uma unidade de conservação de proteção integral. O parque foi criado em 1973 e ficou fechado por mais de 10 anos para que pudesse haver a recuperação da área, por ser uma região onde ocorria extração de granito e ocupação urbana desordenada (Rio Grande do Sul, 1997). No parque estão localizadas oito praias, sendo seis banhadas pelo Lago Guaíba (Pombas, Pedreira, Onça, Araçá, Sítio e Prainha) e duas banhadas pelas águas da Lagoa dos Patos (Tigre e de Fora). Os pontos de coleta nesta reserva estão localizados na Praia de Fora (PF – ponto 01) (Lat. 30° 23' 14,7" S Long. 51° 01' 12,4" W) e na Praia da Pedreira (PP – ponto 02) (Lat. 30° 21' 33,8" S Long. 51° 02' 47,8" W).

Enseada de Tapes (T - ponto 03): O município de Tapes faz parte da região Centro-Sul do estado, situando-se a sudoeste da capital a uma distância de 73 km. Sua população total é de aproximadamente 18000

habitantes. Apresenta um clima temperado onde a temperatura média anual é de 18 °C. O município é banhado pela Lagoa dos Patos no sentido Norte/Sul, em uma extensão de aproximadamente 80 km. A lagoa nesta região é utilizada para transporte lacustre, pesca, irrigação, lazer e turismo. O ponto de coleta está localizado junto a “Prainha Municipal”, situada a rua João Atalia Wolf (lat. 30° 40’ 18,4” S long. 51° 23’ 30,9” W).

Trapiche de São Lourenço do Sul (SL - ponto 04): São Lourenço do Sul localiza-se na parte Centro-Sul do estado do Rio Grande do Sul na Serra dos Tapes, fazendo parte da microregião da “Lagoa dos Patos”. Situa-se junto a margem oeste da lagoa que forma um litoral de aproximadamente 69 km de extensão. A população total do município está em torno dos 45000 habitantes. A temperatura média anual é de 17,5 °C. Neste município o coleta será realizada de um trapiche localizado em frente ao “Lar dos Velinhos Santo Antônio” na avenida Getúlio Vargas (lat. 31° 22’ 06,6” S long. 51° 57’ 36,3” W).

Estuário da lagoa dos Patos (pontos 05 e 06): O estuário situa-se na região sul da lagoa e é formado por barreiras com uma superfície média de 971 Km² (aproximadamente 10% da lagoa). Mais de 80% da região estuarina tem menos que dois metros de profundidade. Atividades humanas como dragagem, navegação, aterros e atividades agrícolas em suas margens, também contribuem em muito para a deterioração do estuário. Os pontos estão localizados junto ao Museu Oceanográfico “Prof. Eliézer Rios” (M – ponto 05) (lat. 32° 01’ 31,38” S long. 52° 05’ 20,54” W) e na quarta secção da Barra (B –

ponto 07) próximo a raiz do molhe oeste (lat. 32° 08' 56,46" S long. 52° 06' 04,09" W).

Saco da Mangueira (SM - ponto 07): É uma enseada semi-fechada localizada no sudoeste do estuário da Lagoa dos Patos, com 27 km² e uma profundidade média de 0,5 m. Este local vem sendo intensamente degradado ao longo dos anos, como conseqüência dos lançamentos de efluentes contendo resíduos ricos em compostos nitrogenados e fosfatados, provenientes das indústrias de fertilizantes que o margeiam. Os emissários clandestinos de esgoto doméstico são outro fator de impacto no Saco da Mangueira, tornando este ambiente altamente eutrofizado, com concentrações de nutrientes de duas a três vezes maiores que no restante do estuário (Almeida *et al.*, 1993) (lat. 32° 03' 35,13" S long. 52° 05' 20,54" W).

Área costeira adjacente à desembocadura da lagoa (Praia do Cassino) (P - ponto 08): Esta região da costa riograndense sofre uma forte influência das descargas de água doce provenientes do sistema lagunar, principalmente nos meses chuvosos quando estas descargas são mais intensas, recebendo um grande aporte de nutrientes e matéria orgânica. Por outro lado, nos meses de veraneio, a vazão de vários pequenos córregos que desembocam ao longo da praia aumenta, despejando grandes quantidades de matéria orgânica antropogênica. A população da praia do Cassino chega a quadruplicar no período de verão (200.000 pessoas) (lat. 32° 12' 18,09" S long. 52° 10' 23,09" W).

Em cada ponto amostral foram coletados 3 a 4 litros de água em frascos plásticos estéreis e acondicionados à baixa temperatura ($\pm 10^\circ \text{C}$), sendo que um litro foi reservado para a caracterização microbiológica, que foi processada cerca de quatro horas depois das coletas.

Nos diferentes locais de coleta foram realizadas contagens de *Enterococcus* sp. de forma direta pelo método da membrana filtrante (APHA,1999) em duplicata. Foram realizadas diluições em água peptonada e filtradas sem diluição e nas diluições 10^{-1} a 10^{-3} . Após homogeneização, 100 mL das diluições foram filtradas em membranas filtrantes de ésteres mistos com porosidade de 0,45 μm . Estas membranas foram transferidas para Ágar *m-Enterococcus* Modificado (Himedia) e incubadas a 42°C por 48h, posteriormente foram transferidas para o Ágar Ferro Esculina (Himedia) e incubadas por 20 minutos a 35°C , para verificar a formação de precipitados no meio de cor escura e foi utilizado como controle positivo o ATCC 29212 *E. faecalis*. As colônias que apresentaram esta característica foram contadas como *Enterococcus* spp e transferidas para o meio Ágar Bile Esculina (Himedia) e incubadas por 24h a 35°C , para confirmação. As sementeiras dos meios Ágar *m-Enterococos* e Ágar Ferro Esculina foram feitas em duplicata. Após 18 - 24 horas, as colônias que hidrolisaram a esculina, foram semeadas em placas de ágar tripticaseína de soja (TSA) (Himedia).

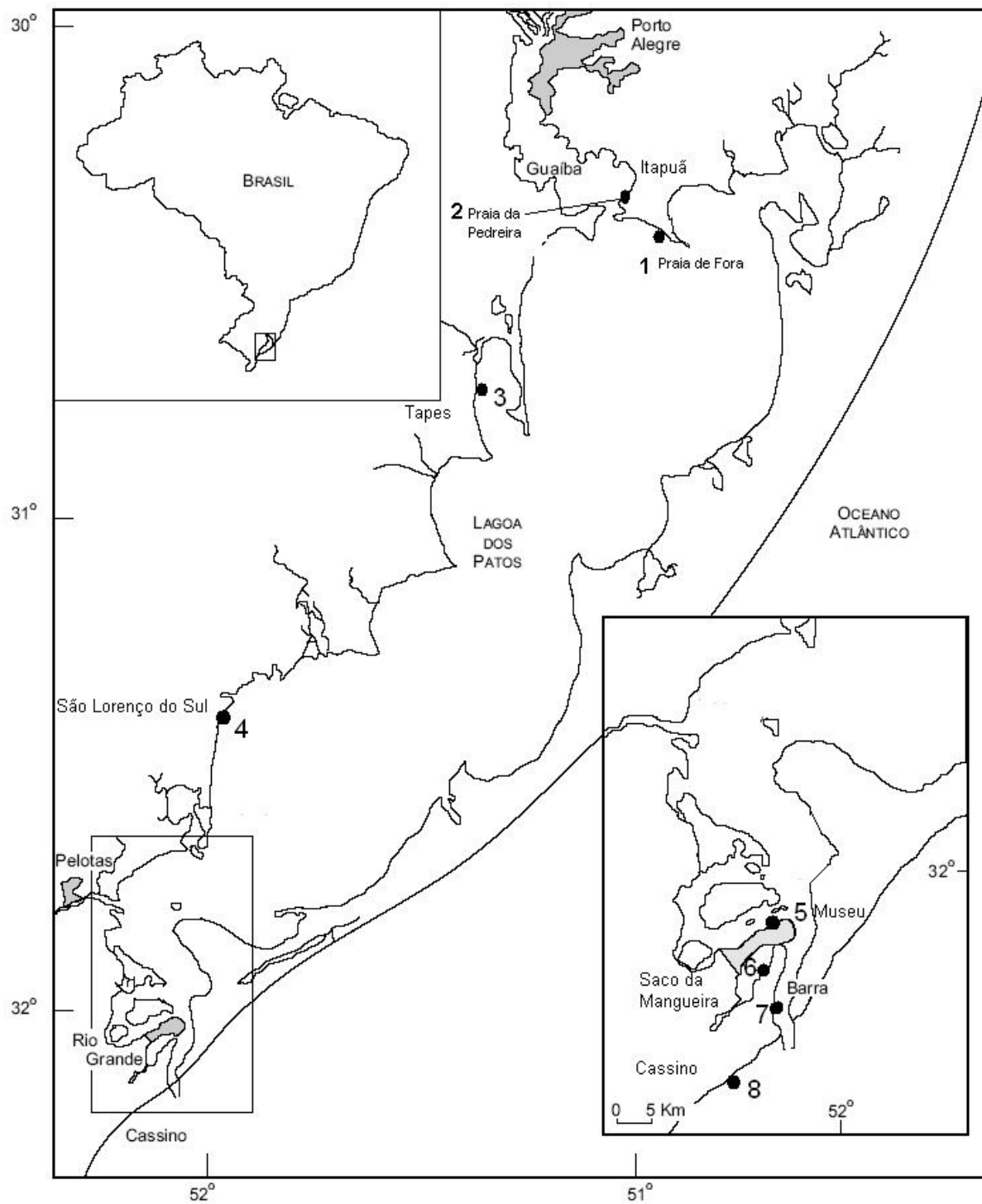


Figura 1. Mapa com os pontos de coleta: Parque Estadual Itapua: (P1) – Praia de fora e (P2) – Praia da Pedreira; Tapes (P3); São Lourenço do Sul (P4); Rio

Grande: Museu (P5), Saco da Mangueira(P6) e Barra (P7) e por último a Praia do Cassino (P8). (Adaptado de Matthiensen *et al.*, 1999).

3.2 - Isolamento e Identificações de *Enterococcus* sp.

Para identificação do gênero *Enterococcus* spp, foi realizada coloração de Gram e as seguintes provas bioquímicas: produção de catalase, hidrólise L-pirrolidoni-beta-naftilamida (PYR), crescimento em caldo TSB com 6,5% de NaCl, crescimento em caldo tripticaseína de soja (TSB) a 45°C e 10°C e em caldo MRS para produção de gás a partir da glicose (Figura 2). Depois de identificados os isolados foram mantidos em ágar conservação (fórmula em anexo) e caldo glicerol 15%.

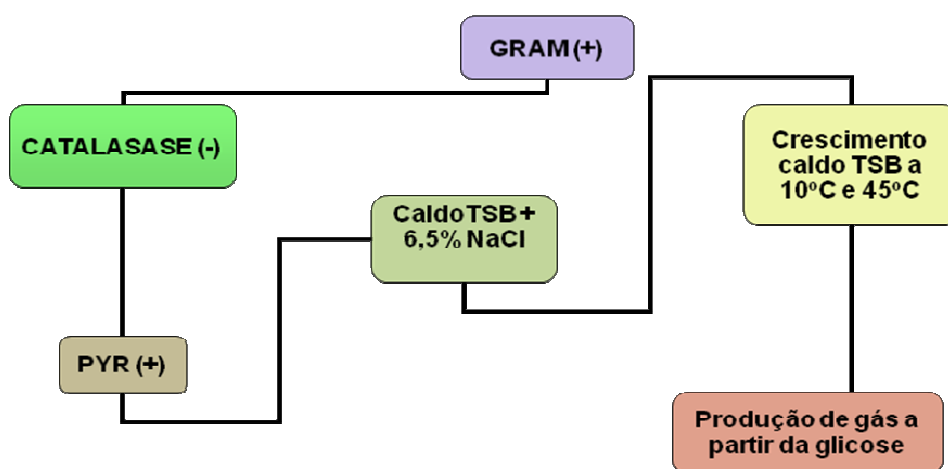


Figura 2 - Esquema de identificação pelo método de Gram e de provas bioquímicas de isolados do gênero *Enterococcus* spp.

3.3 - Antibiograma de isolados do gênero *Enterococcus*.

Foram realizados testes de suscetibilidade a antimicrobianos por disco difusão em ágar, conforme CLSI (2005). Foram utilizados os seguintes

antimicrobianos: tetraciclina (30 µg/mL), doxacilina (30 µg/mL), vancomicina (30 µg/mL), ampicilina (10 µg/mL), gentamicina (120 µg/mL) e estreptomicina (300 µg/mL). A cepa *E. faecalis* ATCC® 29212 (sensível) foi utilizada como controle de qualidade. Os fenótipos resistentes e intermediários foram considerados como suscetibilidade diminuída.

3.4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) para tetraciclina e gentamicina para isolados de *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. durans*

Foram realizados testes para determinar a concentração inibitória mínima para tetraciclina e gentamicina, conforme CLSI (2005), para os isolados resistentes a estes antimicrobianos, previamente submetidos a antibiograma em disco difusão em agar. Para tetraciclina foram utilizadas as seguintes concentrações: 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL, 128 µg/mL e 256 µg/mL, sendo considerados como resistentes a partir de 16 µg/mL. Para gentamicina foram utilizados as seguintes concentrações: 500 µg/mL, 600 µg/mL, 700 µg/mL, 800 µg/mL e 900 µg/mL, sendo considerado como resistente a partir da concentração de 500mg/ml. Foram utilizados como controle de qualidade *E. faecalis* ATCC® 29212 – Sensível e *E. faecalis* ATCC® 51299 – Resistente.

3.5 – Identificação molecular das espécies de *Enterococcus* resistentes a tetraciclina

O DNA genômico bacteriano foi extraído diretamente das culturas puras bacterianas do estoque por kit *NucleoSpin® Tissue* (Macherey-Nagel). A qualidade e a integridade do DNA foram verificadas em géis de agarose 0,8%, corados com brometo de etídeo.

Para identificação das espécies de *Enterococcus* foi utilizada amplificações do gene *pheS-21-F* CAYCCNGCHCGYGAYATGC posição 557 e *pheS-22-R* CCWARVCCRAARGCAAARCC posição 1031, segundo metodologia por Naser, *et all* (2005 a,b). As condições da PCR foram: 5 µl de Tampão 10 X, 1 µl (10 µM) DNTPs, 0,5 µM de cada oligo *Phes* (F) e oligo *Phes* (R), Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen) (1U), MgCl₂ (2,5 µM), água *Mili* Q e 5 µl DNA genômico. Os controles positivos foram realizados com a cepa *E. faecalis* ATCC® 29212.

A purificação dos produtos da PCR foi realizada pelo kit *NucleoSpin® Extract II* (Macherey-Nagel) e sua concentração foi verificada em gel de agarose 1.3% corado com brometo de etídeo e quantificado pelo programa KODAK 1D Image Analysis software. O sequenciamento foi realizado com o oligo *pheS – 21-F* nos sequenciadores automáticos MEGABACE 1000 (GE healthcare) com Kit Dyenamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing (GE healthcare) e sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems) com Kit Big Bye v. 3.1 (Applied

Biosystems), da empresa Ludwig Biotecnologia, no Centro de Biotecnologia da UFRGS.

As sequências foram submetidas ao programa *Blast* no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, para identificação das espécies de *Enterococcus* sp.

3.6 - Estatística

Para adequar os dados nas análises estatísticas, utilizamos os seguintes critérios: dados dos pontos 1 e 2, por estarem localizados dentro do Parque Estadual de Itapuã – RS – Brasil e terem um histórico de preservação ecológica, foram unidos sob o código 12. Os pontos 3 e 4 por representarem locais totalmente lagunares e em área urbana foram unidos sob o código 34. Os pontos 5, 6, e 7 por estarem em uma região estuarina e também urbana foram unidos sob o código 567, e o ponto 8 por ser exclusivamente de ambiente marinho foi mantido separadamente sob o código 8. As estações do ano foram padronizadas como sendo estações quentes (verão e primavera) sob o código 14 e a estação fria (outono e inverno) sob código 23. O critério de utilizar dois períodos se fez necessário devido às variações de temperaturas atípicas dentro de cada estação em separado. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de *qui-quadrado* e teste *T* (Student) pelo software SPSS 16.0, sendo considerados significativos os valores de *p* inferiores a 0,05.

4. - RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 - Caracterização dos pontos de coleta em relação à contagem de *Enterococcus* spp e resistência a antimicrobianos entre os isolados

Verificamos uma contagem superior à 100 UFC/100mL de *Enterococcus* sp. nos pontos Tapes (3) e São Lourenço do Sul (4), nas coletas do verão e da primavera, nos pontos Museu (5) e Saco da Mangueira (6) no outono, inverno e primavera e no ponto Canal da Barra (7) no inverno. Os pontos Praia de Fora (1), Praia da Pedreira (2) e Praia do Cassino (8) apresentaram contagens menores que 100 UFC/100 mL em todas as estações do ano indicando que a qualidade da água para balneabilidade (contato primário) é satisfatória segundo resolução nº 274 do CONAMA (2000) (Tabela 1). Conforme diz na resolução no seu artigo 2º, § 2º “Quando for utilizado mais de um indicador microbiológico, as águas terão as suas condições avaliadas, de acordo com o critério mais restritivo”, isso confirma nossos dados de que é importante o uso de mais de um indicador microbiológico para garantir uma melhor qualidade da água ambientais.

A presença de UFC de *Enterococcus* spp. (Tabela 1) pode indicar que a qualidade da água está comprometida no verão e na primavera em Tapes e São Lourenço do Sul, pontos. Estas cidades possuem balneários muito frequentados nestes períodos e espécies como *E. faecalis* e *E faecium* são

bactérias que estão presentes em grande número nas fezes de humanos e animais (Devriese *et al.*, 1993; Pinto *et al.*, 1999; Kühn *et al.*, 2005).

Tabela 1. Médias de UFC de *Enterococcus* spp. por ponto de coleta e período sazonal no ano de 2008.

Pontos de coleta	Verão/2008		Outono/2008		Inverno/2008		Primavera/2008	
	Média UFC/100mL	DP *	Média UFC/100mL	DP	Média UFC/100mL	DP	Média UFC/100mL	DP
Praia de Fora	<100 *	0	<100	0	<100	0	<100	0
Praia da Pedreira	<100	0	<100	0	<100	0	<100	0
Tapes	1,38x10 ²	5,66	<100	0	<100	0	1,03 x10 ²	17,68
São Lourenço do Sul	1,04x10 ²	19,8	<100	0	<100	0	1,12 x10 ²	1,41
Museu	<100	0	1,80x10 ²	4,95	2,28 x10 ²	26,16	2,62 x10 ²	36,06
Saco da Mangueira	<100	0	1,85x10 ²	3,54	1,08 x10 ²	15,5	1,23 x10 ²	23,33
Canal da Barra	<100	0	<100	0	1,03 x10 ²	9,9	<100	0
Praia do Cassino	<100	0	<100	0	<100	0	<100	0

* DP = desvio padrão; <100 Qualidade da água SATISFATÓRIA; >100 Qualidade da água INSATISFATÓRIA

Vasconcellos *et al.*, (2006) afirmam que devido ao aumento populacional da cidade de São Lourenço do Sul nos meses de verão ocorre um aumento na eliminação de esgoto doméstico lançado no rio São Lourenço, que tem sua foz na Lagoa dos Patos, verificado pelo alto índice de coliformes total e termotolerantes. Esses dados estão de acordo com os apresentados neste estudo, pois no verão houve aumento da presença de *Enterococcus* sp. no ponto de coleta analisado neste município, verificando que pode ter ocorrido por um descarte de esgoto doméstico sem tratamento neste local.

Os dois pontos localizados no Parque Estadual de Itapuã; Praia de Fora e Praia da Pedreira, apresentaram baixas contagens para *Enterococcus*, sendo possível inferir que houve baixa intensidade de descargas de esgotos domésticos neste local, além de ser um local protegido. Isto corrobora com Singer *et al* (2006) que relatam que a localização geográfica e a presença de aglomerados populacionais estão relacionadas à presença de bactérias patogênicas no ambiente.

Conforme Santos *et al.*, (1996) na região estuarina de Rio Grande, pontos localizados no Museu, Saco da Mangueira e Canal da Barra, o aumento de coliformes fecais pode estar relacionado ao aumento da pluviosidade. De acordo com Geldreich (1998), Amaral *et al.* (2003) e Vasconcellos *et al.*, (2006), as chuvas têm papel fundamental no arraste de fezes humanas e de animais para os rios e lagos contribuindo, assim, para a menor qualidade da água destes ambientes. Esta observação corrobora com nossos dados, pois as contagens observadas no outono, inverno e primavera nos pontos do Museu e Saco da Mangueira e Canal da Barra, somente no inverno, podem ter sido elevadas porque as coletas foram realizadas após dias chuvosos.

A partir de 786 colônias com identificação presuntiva para *Enterococcus* sp. do início do estudo, foram identificados, por provas bioquímicas, um total de 248 *Enterococcus* sp. Estes isolados foram submetidos a testes de suscetibilidade a antimicrobianos pelo método de disco difusão em ágar. Os resultados foram analisados por local de coleta e nos períodos

considerados como meses quentes (verão e primavera) e meses frios (outono e inverno).

Dos 248 isolados identificados, 138 (55,7%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, 110 (54,3%) tiveram suscetibilidade diminuída a pelo menos um antimicrobiano. Dentre os que tiveram suscetibilidade diminuída a pelo menos um antimicrobiano, 103 (41,5%) tiveram um perfil de suscetibilidade diminuída à tetraciclina, 95 (38%) à doxaciclina, 22 (8,9%) à ampicilina, 5 (2%) à gentamicina, 4 (1,6%) à estreptomicina e nenhum isolado resistentes à vancomicina. Isolados resistentes a duas ou mais classes diferentes de antimicrobianos foram considerados resistentes a múltiplas drogas (RMD) e dos 110 isolados com alguma resistência, 22 (20,6%) foram RMD.

Tabela 2. Perfis de suscetibilidade diminuída dos de isolados de *Enterococcus* sp. por ponto de coleta e estação do ano

Pontos de coleta	TET+DOX		TET+AMP		TET+AMP+GEN		TET+AMP+GEN+EST		TET+EST		RMD		Isolados sensíveis a todos antimicrobianos	
	Meses quentes	Meses frios	Meses quentes	Meses frios	Meses quentes	Meses frios	Meses quentes	Meses frios	Meses quentes	Meses frios	Meses quentes	Meses frios	Meses quentes	Meses frios
Praia de Fora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Praia da Pedreira	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tapes	10	5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	26
São Lourenço do Sul	20	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	38
Museu	4	26	30	19	0	19	0	3	3	0	0	19	19	21
Saco da Mangueira	7	6	13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	18
Canal da Barra	2	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27
Praia do Cassino	5	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
Total	48	43	19	3	0	5	0	3	0	1	3	19	19	141

Tetraciclina (TET); Doxamiclina (DOX); Ampicilina (AMP); Gentamicina (GEN); Estreptomicina (EST) e Resistente a múltiplas drogas (RMD)

Os isolados dos pontos Praia de Fora, Praia da Pedreira e na Praia do Cassino, em Rio Grande, foram resistentes apenas a tetraciclina e doxiciclina. O maior número de isolados resistentes foi observado entre os isolados no ponto do Museu, na cidade de Rio Grande.

Os percentuais de isolados com suscetibilidade diminuída para tetraciclina e doxiciclina foram muito semelhantes em ambos os períodos estudados não sendo significativos estatisticamente. Para ampicilina, gentamicina, estreptomicina e MDR uma diferença significativa ($p < 0,05$) nos percentuais foi observada, onde os meses frios apresentaram o maior número de resistentes (Tabela 3).

Tabela 3. Percentuais de isolados de *Enterococcus* sp. resistentes em relação ao total de 248 isolados por meses quentes e frios e pontos de coleta na lagoa dos Patos, RS.

Antibióticos *	Meses Quentes (n= 139)	Meses Frios (n= 109)	valor p	Praia de Fora/ Praia da Pedreira (n= 3)	Tapes/ São Lourenço do Sul (n= 109)	Museu/ Saco da Mangueira/ Canal da Barra (n= 120)	Praia do Cassino (n= 16)	valor p
TET *	36,7%	49,5%	0,144	66,7%	36,7%	44,2%	37,5%	0,527
AMP	2,2%	17,4%	0,001	0,0%	2,8%	15,8%	0,0%	0,003
GEN	0,0%	4,6%	0,011	0,0%	0,0%	4,2%	0,0%	0,142
EST	0,0%	3,7%	0,023	0,0%	0,0%	3,3%	0,0%	0,227
DOX	36,7%	40,4%	0,554	66,7%	34,9%	41,7%	31,3%	0,479
RMD	1,4%	18,3%	0,001	0,0%	1,8%	16,7%	0,0%	0,001

Tetraciclina (TET); Doxiciclina (DOX); Ampicilina (AMP); Gentamicina (GEN); Estreptomicina (EST) e Resistente a múltiplas drogas (RMD)

Ao analisar a resistência por ponto de coleta, observou-se que os isolados dos pontos do Museu, Saco da Mangueira e Canal da Barra em Rio

Grande foram os mais resistentes, com valores de $p < 0,05$ para ampicilina e MDR. Para os antimicrobianos tetraciclina, doxaciclina, gentamicina e estreptomicina não foram observados valores de p significativos por locais de coleta (Tabela 3).

Um estudo de ambientes com diferentes níveis de degradação antrópica e resistência a antimicrobianos na Lagoa dos Patos – RS até o momento, é inédito. Portanto, o papel dos *Enterococcus* na manutenção e disseminação de genes de resistência, poderá contribuir para o aperfeiçoamento da legislação sanitária no Brasil, devido a importância da disseminação de microrganismos resistentes no ambiente aquático.

A resistência à tetraciclina pode frequentemente ser encontrada nos *Enterococcus* sp, é codificada pelos diferentes genes *tet* que são responsáveis pela proteção ribossomal (redução da afinidade) ou os mecanismos de efluxo. (Klere *et al.*, 2003). Esta observação vai ao encontro dos resultados deste trabalho que observou a presença de *Enterococcus* sp. resistentes à tetraciclina em sete dos oito pontos de coleta e nos dois períodos estudados, assim como relatados em estudos de Sapkota *et al.* (2007) realizado em amostras de água superficiais nos EUA, assim como por Garcia *et al.* (2007) em amostras de água de estações de tratamento de esgotos nos EUA.

Oliveira & Pinhata (2009) encontraram taxas elevadas de *Enterococcus* sp. resistentes à tetraciclina em amostras de água marinha e amostras de areia da praia, no litoral de São Paulo. Resultado semelhante foi

observado por Hörner *et al.*, (2005) em amostras clínicas provenientes de um hospital de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Hayes *et al.* (2004), em amostras de fezes de galinhas, verificou altas taxas de resistência a tetraciclina em isolados de *Enterococcus* sp. Corrêa *et al.*, (2005) detectaram bactérias do gênero *Enterococcus* resistentes à tetraciclina em fezes de suínos tratados com ração, o que pode sugerir que o uso de tetraciclinas em animais para consumo humano, podem disseminar bactérias resistentes no ambiente através do descarte de dejetos de animais sem tratamento em ambientes aquáticos.

A resistência dos *Enterococcus* sp à ampicilina encontrada em nosso estudo na Lagoa dos Patos (21,35%) foi superior aos valores encontrados por outros autores em amostras de água ambientais e de esgotos (Moore *et al.* 2008), em amostras clínicas (Jones *et al.*, 1995 e Mcnamara *et al.*, 1995). Por outro lado, foi semelhante aos resultados encontrados por Stern *et al.* (1994), no Rio de Janeiro, que estudando diferentes espécies de enterococos isolados de fontes humanas, animais e do meio ambiente, observaram 22,7% de resistência a este antibiótico entre isolados de *E. faecium*.

Ao analisarmos por local de coleta, verifica-se *Enterococcus* sp. resistentes à ampicilina (15,8%) e RMD (16,7%) nos pontos do Museu, Saco da mangueira e Canal da Barra (567), na região estuarina de Rio Grande, local de grande impacto antrópico. Estudos já relataram que pode ocorrer transferência de plasmídeos entre as bactérias encontradas em ambientes ricos em matéria

orgânica (Sandaa, 1993), reafirmando a importância dos *Enterococcus* sp. como reservatórios de genes de resistência a antimicrobianos.

Em relação aos aminoglicosídeos, os isolados da Lagoa dos Patos analisados mostraram-se pouco resistentes à gentamicina e à estreptomicina, quando comparados aos detectados em estudos clínicos por d'Azevedo *et al.* (1998) e Bender *et al.* (2008) em hospitais brasileiros. Por outro lado, Moore *et al.* (2008) em amostras de água marinha e de esgotos, não encontraram *Enterococcus* sp. resistentes a gentamicina.

Em nosso trabalho encontramos cinco isolados de *Enterococcus* spp. resistentes à gentamicina e 22 à ampicilina nos pontos localizados no Museu, Saco da Mangueira e Canal da Barra (567). As modificações das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), sobretudo no *E. faecium*, neutralizam o efeito sinérgico desses antimicrobianos para o tratamento das infecções enterocócicas sérias (Rhinehart *et al.*, 1990; De Jonge, 1996; Cereda *et al.*, 1997) tornando-se freqüente o isolamento de enterococos ampicilina/aminoglicosídeo resistentes em infecções hospitalares (Oster *et al.*, 1990; Rhinehart *et al.*, 1990; Herman & Gerding, 1991).

4.2 - Identificação das espécies de *Enterococcus* spp. e análise do CIM para tetraciclina e gentamicina.

Para a identificação através de sequenciamento foram escolhidos os 92 isolados resistentes à tetraciclina, uma vez que este foi o perfil mais

observado e é o mais disseminado entre os enterococos de origem animal e humana. Com a amplificação utilizando o oligo *pheS*, os 92 isolados apresentaram um fragmento amplificado com 455 pares de bases. As sequências geradas destes isolados foram submetidas ao programa Blast, no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, do qual tivemos a confirmação das espécies para 86 isolados, 49 (56,98%) foram identificados como *E. faecalis*, 36 (41,85%) como *E. faecium* e um (1,16%) *E. durans* (Tabela 4). Quatro foram inconclusivos e dois apresentaram parâmetros iguais para *E. faecium* e *E. hirae*. O fato de termos quatro isolados inconclusivos e dois com parâmetros iguais, nos remete à necessidade de repetir a caracterização molecular utilizando outros genes como o *rpoA* e o *atpA*, conforme referido por Nasser *et al* (2005 ab).

O predomínio de isolados de *E. faecalis* e *E. faecium*, indicam que a fonte de contaminação nos locais de coleta podem ser de origem humana e/ou animal, já que as proporções de espécies deste gênero nas fezes de animais e humanos são diferentes e a presença elevada destes em regiões com maior concentração de sais na água como na região estuarina de Rio Grande, o que propicia uma vantagem competitiva as bactérias deste gênero, pois são mais tolerantes a presença de sais (Kühn *et al.*, 2005; Petersen & Dalsgaard, 2003).

Tabela 04. Distribuição de *Enterococcus faecalis* (1) e *Enterococcus faecium* (2) em relação as variáveis meses quente e frio e pontos de coleta na Lagoa dos Patos - RS, Brasil

Variáveis	Espécies		Valores de p
	1 (n= 49)	2 (n= 36)	
Meses Quentes (n= 44)	31,80%	20%	0,516
Meses Frios (n= 41)	25,90%	22,30%	0,516
Total	57,70%	42,30%	
Pontos de coleta	1 (n= 49)	2 (n= 36)	Valores de p
Praia Fora/ Praia Pedreira (n= 1)	1,20%	0,00%	0,003
Tapes/ São Lourenço do Sul (n= 32)	28,20%	9,40%	0,003
Museu/Saco da Mangueira/Canal Barra (n= 47)	22,40%	32,90%	0,003
Praia do Cassino (n= 5)	5,90%	0,00%	0,003
Total	57,70%	42,30%	

Também avaliamos a distribuição das duas espécies mais frequentes em relação às estações quentes (verão e primavera) e frias (outono e inverno) e aos locais de coleta (Tabela 04). Não houve diferença significativa entre as duas espécies relacionando-as com as estações quentes e frias. No comparativo entre as duas espécies mais frequentes e os locais de coleta, observamos que a presença de *E. faecalis* foi estatisticamente mais significativa que *E. faecium* nos pontos Praia da Fora e Praia da Pedreira (12), Tapes e São Lourenço do Sul (34) e Praia do Cassino (8) e *E. faecium* foi mais frequente nos pontos do Museu, Saco da Mangueira e Canal da Barra (567) ($p < 0,003$) (Tabela 04).

O nível de resistência à tetraciclina, verificado através da CIM variou de 16µg/ml a 256µg/ml nas duas espécies, sendo a maior concentração de CIM

igual a 128µg/ml (Tabela 05), o que vai ao encontro do estudo de Sapkota *et al.* (2007) que encontrou valores aproximados para *Enterococcus* sp. em amostras de água superficial nos EUA.

Entre os 22 isolados de *Enterococcus* resistentes à ampicilina, em 3 isolados não foi identificada a espécie. Nos demais encontramos 15 de *E. faecium* e 4 de *E. faecalis*, corroborando os estudos de Stern *et al.* (1994) e Kresken *et al.*, (2000), que verificaram a maior prevalência de *E. faecium* resistentes à ampicilina em relação ao *E. faecalis*.

Também verificamos que os 5 isolados de *Enterococcus* ssp. com CIM superior a 500µg de gentamicina eram *E. faecium*, confirmando resultados encontrados nos trabalhos de Shepard & Gilmore (2002), que relataram resistência à ampicilina/gentamicina entre os isolados de *E. faecium*. O maior nível de resistência para tetraciclina e gentamicina foi observado em isolados dos pontos do Museu, Saco da Mangueira e Canal da Barra (567) no estuário de Rio Grande. Os isolados dos pontos de Tapes e São Lourenço do Sul (34) apresentaram níveis médios de resistência à tetraciclina. Estes resultados sugerem a hipótese que estes isolados sejam de origem principalmente humana ou animal e de lugares mais densamente povoados (Wade 2003).

Tabela 5. Nível de resistência dos 86 isolados de *Enterococcus* spp. em relação a CIM de tetraciclina e gentamicina, nos diferentes pontos de coleta

Espécies	tetraciclina							gentamicina				
	< 16µg/mL	16µg/mL	32µg/mL	64µg/mL	128µg/mL	256µg/mL	500µg/mL	600µg/mL	700µg/mL	800µg/mL	900µg/mL	
<i>E. faecalis</i>	5	1	9	13	17	6	0	0	0	0	0	
<i>E. faecium</i>	2	0	6	6	18	4	0	5	0	0	0	
<i>E. durans</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
Total	7	1	15	20	33	10	0	5	0	1	4	
Pontos de coleta												
Praia de Fora/												
Praia da Pedreira	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
Tapes/São Lourenço do Sul	2	0	5	13	9	4	0	0	0	0	0	
Museu/Saco da Mangueira/ Canal da Barra	2	1	9	5	24	6	0	0	0	1	4	
Praia do Cassino	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
Total	7	1	15	20	33	10	0	0	0	1	4	

5. – CONCLUSÕES

- 1 - Nas contagens de UFC, a distribuição de *Enterococcus* sp. obedece um gradiente de degradação ambiental observado na Lagoa dos Patos;
- 2 - Os antimicrobianos tetraciclina e doxamiclina foram os que mais apresentaram resistência entre os isolados de *Enterococcus* sp., em todas os locais e estações estudadas;
- 3- *E. faecalis* e *E. faecium* foram as espécies mais frequentes. Foi identificado apenas 01 *E. durans*;
- 4 - A espécie *E. faecalis* foi mais observada em Tapes e São Lourenço do Sul e *E. faecium*, na região estuarina de Rio Grande;
- 5 - O valor da CIM mais frequente para tetraciclina foi de 128 µg/ml, nos pontos do Museu/Saco da Mangueira/Canal da Barra (567) no estuário de Rio Grande. Para gentamicina, o valor da CIM mais frequente foi de 900µg/ml nos mesmos pontos.

6. – RECOMENDAÇÕES E PERSPECTIVAS

A presença de *Enterococcus* spp resistentes a antimicrobianos na Lagoa dos Patos deve servir de alerta as autoridades sanitárias e de saúde pública do estado do Rio Grande do Sul, pois indicam a necessidade de monitoramento das águas superficiais.

Conforme diz na Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000, no seu artigo Art. 2º, inciso § 2º, sugerimos a utilização de critérios mais restritivos, com a inclusão do *Enterococcus* sp. como segundo indicador microbiológico em águas superficiais.

Como perspectivas, faremos a complementação da técnica MLSA, com amplificação de fragmentos e posterior seqüenciamento, utilizando os oligos ***rpoA*** e ***atpA***. Também será realizada a pesquisa de genes ***tet*** nos isolados resistentes a tetraciclina.

7. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, M.T.; Baumgarten, M.G.Z.; Rodrigues, R.M.S. Identificação das possíveis fontes de contaminação das águas que margeiam a cidade do Rio Grande - RS. *Documento Técnico da FURG*, no 6, 36p, 1993.

Amaral, L.A.; Nader Filho, A.; Rossi Junior, O.D.; Ferreira, F.L.A.; Barros, L.S.S. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. *Revista de Saúde Pública*, v.37, n.4, p.510-514, 2003

Andrews Jr, R.E.; Johnson, W.S.; Guard, A.R. and Marvin, J.D. Survival of enterococci and Tn916-like conjugative transposons in soil. *Can. J. Microbiol.* 2004. 50:957–966, 2004.

Asmus, M.L. A Planície Costeira e a Lagoa dos Patos. In: Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. U. Seeliger, C. Odebrecht e J.P. Castello. Editora Ecocientia. Rio Grande – RS. 1998.

Baums, I.B.; Goodwin, K.D.; Kiesling, T.; Wanless, D. and Fell, J.W. Luminex detection of fecal indicators in river Samples, marine recreational water, and beach sand. *Mar Pollut Bull.* 54(5): 521–536, 2007.

Bender, E.A.; Freitas, A.L.P.; Reiter, K.C.; Lutz, L. e Barth, A.L. Identification, antimicrobial resistance and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated in Porto Alegre, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* [online], vol.40, n.3, pp. 693-700. ISSN 1517-8382, 2009.

Casetta, A. Hoi, A.B. Cespe'de's, G. and Horaund, T. Diversity of Structures Carrying the High-Level Gentamicin Resistance Gene (*aac6-aph2*) in *Enterococcus faecalis* Strains Isolated in France, 1998.

Cereda, R.; Pignatari, A.C.; Hashimoto, A. and Sader, H. In vitro antimicrobial activity against Enterococci isolated in an University Hospital in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 1:83-90, 1997.

Cetinkaya, Y.F.P. and Mayhall, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:686 – 707, 2000.

Chee-Sanford, J.C. Aminov, R.I. Krapac, I.J. Garrigues-Jeanjean, N. and Mackie, R.I. Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and

Franz, C.M.A.P.; Holzapfel, W.H. and Stiles, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47(1): 1–24, 1999.

Furtado, G.H, Martins, S.T, Coutinho, A.P, Soares, G.M, Wey S.B, Medeiros, E.A. Incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus* at a university hospital in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2005;39;41-6.

Garcia, S. Wade, B. Bauer, C. Craig, C. Nakaoka, K. and Lorowitz, W. The Effect of Wastewater Treatment on Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. *Water Environment Research*, Volume 79, Number 12. 2007.

Gevers, D., Huys, G. Swings, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett*, 205, 31–36. 2001.

Gonzalez, A.M., Paranhos, R., Lutterbach, M.S. Relationships between fecal indicators and pathogenic microorganisms in a tropical lagoon in Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Monitoring Assessment*. DOI 10.1007/s10661-009-0886-9., 14.04. 2009.

Hayes, J.R. English, L.L Carr, L.E. Wagner, D.D. And Joseph S.W. Multiple-Antibiotic Resistance of *Enterococcus* spp. Isolated from Commercial Poultry Production Environments *Applied and Environmental Microbiology*, p. 6005–6011 Vol. 70, No. 10, 2004.

Hershberger, E.; Donabedian, S.; Konstantinou, K. and Zervos, M.J. Quinupristin-Dalfopristin resistance in Gram-positive bacteria: Mechanism of resistance and epidemiology. *Clin Infect Dis*. v. 38, p. 92-98, 2003.

Henrique, P.M. Caracterização molecular de elementos Van A em *Enterococcus* em genótipo e fenótipo discrepantes relativos à resistência aos glicopeptídeos. Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, p.70, 2007

Herman D, Gerding D. Antimicrobial resistance among enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 35:1-4, 1991

Holt J.G (editor). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9th ed., Williams & Wilkins, 1994.

HORNER, Rosmari *et al* . Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 6, Dec. 2005 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-

24442005000600004&lng=en&nrm=iso>. access on 19 July 2010. doi: 10.1590/S1676-24442005000600004.

Jensen L.B, Fridodt-Møller N, Aarestrup F.M. Presence of *erm* gene classes in gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiol. Lett.* 170:151-158.1999.

Jones, M.E., Draghi, D.C., Thornsberry, C., Karlowsky, J.A., Sahm, D.F. and Wenzel, R.P. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit – a European and North America surveillance study (2000-2002). *Annal of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 3:14, 2004.

Jones, R.N.; Sader, H.S.; Erwin, M.E. and the Enterococcus Study Group. Emerging multiply resistant enterococci (MRE) among clinical isolates: prevalence data from 97 medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 21: 85-93. 1995.

Kapoor L, Randhawa V.S, Deb M. Antimicrobial resistance of enterococcal blood isolates at a pediatric care hospital in India. *Jpn J Infect Dis;* 58 : 101-3, 2005.

Kresken, M., Hafner, D., Studiengruppe: Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Chemotherapeutika in Mitteleuropa. Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Resistenz“ in der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus dem Jahre 1998. *Chemother J9* 51-86, 2000.

Leclercq, R.; Dutka-Malen, S.; Brisso-Noël, A.; Molinas, C.; Derlot, E.; Arthur, M.; Duval, J.; Couvarlin, P. – Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clin. Infect. Dis.;* 15: 4 5-501, 1992.

Lopes, F.F.P, Santos, A.A.M.S, Dantas, M.C.S. e Stempliuk, V.A., *Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde.* Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). 2006. http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controle/rede_rm/index.htm Acessado em 22/06/2008

Luna, V.A., Heiken, M., Kathleen Judge, Ulep,C., Kirk,N.V., Luis, H., Bernardo,M., Leitao,J. and Roberts, M.C. Distribution of the *mef* (A) gene in gram-positive bacteria from healthy Portuguese children. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:2513-2517. 2002.

Macovei L. and Zurek L. Ecology of Antibiotic Resistance Genes: Characterization of Enterococci from Houseflies Collected in Food Settings. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 6 p. 4028–4035. 2006.

Maschieto, A.; Martinez, R.; Palazzo, I.C.V.; Darini, A.L.C. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* sp. Isolated from the intestinal tract of patients from a University Hospital in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v. 99, p. 763-767, 2004.

McNamara, E.B.; King, E.M.; Smyth, E.G. A survey of antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Enterococcus* spp. from Irish hospitals. *J Antimicrob Chemother*, v. 35, n. 1, p. 185-9, 1995

Miranda, C.D.; Zemelman, R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Sci. Total Environ.*, v.293, p.207-218, 2002.

Mohanty, S. Jose, S. Singhal, R. Sood, S. Dhawan, B. Das, B.K. Species prevalence and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated in a tertiary care hospital of north India. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 36 : 962-5.20005.

Moore, D.F. Guzman, J.A. and McGee, C. Species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from surface and ocean water. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1017–1025, 2008.

Naser, S.M. Thompson, F.L. Hoste, B. Gevers, D. Dawyndt, P. Vancanneyt, M. and Swings, J. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology*, 151, 2141–2150.(a). 2005.

Naser, S.M. Thompson, F.L. Hoste, B. Gevers, D. Vandemeulebroecke, K. Cleenwerck, I. Thompson, C.C. Vancanneyt, M. and Swings, J. Phylogeny and Identification of Enterococci by *atpA* Gene Sequence Analysis. *J Clin Microbiol*. 43(5): 2224–2230.(b). 2005.

Oliveira, A.J.F.C. Pinhata, J.M.W. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Research*, v. 42, p. 2242-2250, 2008.

Oster S.E, Chirurugi V.A, Goldberg A.A, Aiken S, McCabe R.E. Ampicillin-resistant enterococcal species in an acute-care-hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34:1821-1823, 1990.

Petersen, A., & Dalsgaard, A., Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. *Environmental Microbiology*, 5 (5), 395–402, 2003

Randall S.S, Ward MP, Maldonado G: Can landscape ecology untangle the complexity of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 4(12):943-952. 2006.

Remonato, G. Bolzan, V. Zanchi, A.C. e D'azevedo, P.A. Detecção Molecular da Resistência Bacteriana - Ênfase para *Enterococcus* e *Streptococcus*. *NewsLab*, edição 70, p. 100-112. 2005.

Rhinehart, E. Smith, N.E. Wennersten, C. Gorss, E. Freeman, J. Eliopoulos, G.M. Moellering Jr., R.C. Goldmann, D.A. Rapid dissemination of b-lactamase-producing aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecalis* among patients and staff on an infant-toddler surgical ward. *New England Journal of Medicine* 323:1814-1817, 1990.

Rice, E.W. Boczek, L.A. Johnson, C.H. Messer, J.W. Detection of intrinsic vancomycin resistant enterococci in animal and human feces. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003 Jun; 46(2):155-8.

Roberts, M.C. Sutcliffe, J. Courvalin, P. Jensen, L.B. Rood, J. Seppala, H. Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 1999, p. 2823–2830.

Ruoff, K. L. *Streptococcus*. In: Murray, P. R. (ed.) *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington DC: ASM Press, p. 299-307. 1995.

Sader, H.S. Sampaio, J.L.M. Zoccoli, C. Jones, R.N. Results of the 1997 SENTRY antimicrobial surveillance programn three brazilian medical centers. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 3:63-79, 1999.

Sandaa, R.-A. 1993. Transfer and maintenance of the plasmid RP4 in marine sediments. *Microb. Releases*. 2:115-119.

Santos, E.D. Abreu, P.C. Thompson, F.L. Hickenbick, G.R. Almeida, M.T.A. e Baumgarten, M.G. 1997. Poluição orgânica e condições sanitárias das águas próximas à cidade do Rio Grande - RS, Brasil (verão de 1996). *Atlântica* 19: 5-18.

Sapkota, A.R. Curriero, F.C. Gibson, K.E. and Schwab, K.J. Antibiotic-Resistant Enterococci and Fecal Indicators in Surface Water and Groundwater Impacted by

a Concentrated Swine Feeding Operation. Environmental Health Perspectives Volume 115, Number 7, 2007

Schleifer, K.H. & Klipper-Bälz, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom.rev. as *Enterococcus faecalis* comb.nov. and *Enterococcus faecium* comb.nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 34: 31-34, 1984.

Schouten, M.A.; Hoogkamp-Korstanje, J.A.A. Meis, J.F. G; Voss, A. The European VRE Study Group. Prevalence of vancomycin-resistant Enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v.19, p. 816-822, 2000.

Scott, T.M., Jenkins, T.M. Lukasik, J. and Rose, J.B.. Potential Use of a Host Associated Molecular Marker in *Enterococcus faecium* as an Index of Human Fecal Pollution. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 283-287. 2005.

Scott, T.M., Rose, J.B. Jenkins, T.M. Farrah, S.R. and Lukasik, J. Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 5796-5803. 2002.

Seeliger, U. and Costa, C.S.B. . The patos-mirim basins, lagoons and estuary. natural and human forcing factors. *Loicz. reports studies*, 21: 105 – 112. 2002.

Shepard, B.D. Gilmore, M.S. Antibiotic-resistant enterococci: mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection*, v. 4, p. 215-224, 2002.

Silva, T.S. Bases técnicas para o ordenamento territorial na costa oeste da Lagoa dos Patos, planície costeira do Rio grande do Sul. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 224p. 2002.

Silva, A.J. Loyola, P.S, Galleguillos, .O.J. Rodríguez, G.Y. Colque-Navarro, P. Möllby, R. e, Kühn, I. Prevalencia de enterococos resistentes a antibióticos en aguas servidas en el norte de Chile. *Rev Méd Chile*, 133: 1201-1210. 2005.

Standard methods for the examination of water and waste water, 19th edition. Washington D.C., American Public Health Association (APHA). 1995.

Stern, C.S. Carvalho, M.G S. Teixeira, L.M. Characterization of enterococci isolated from human and nonhuman sources in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 20:61-67, 1994.

Tavares, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 33(3): 281-301. 2000.

Teixeira, L.M.; Facklam, R.R. Special phenotypic methods for detecting antibacterial Resistance, In: MURRAY, P.R. et al. (eds.) Manual of Clinical Microbiology. 8. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 1178-81. 2003.

Teixeira, L. and Facklam, R. In: Murray, P.R.; et all. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington, ASM Press, p. 422. 2004.

Toldo Jr, E.E. Sedimentação, predição do padrão de ondas e dinâmica sedimentar da antepraia e zona de surfe do sistema lagunar da Lagoa dos Patos Curso de pós graduação em Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese do doutorado.183p. 1994

U.S. EPA: Improved Enumeration Methods for the Recreational Water Quality Indicators: *Enterococci* and *Escherichia coli*. <http://www.epa.gov/microbes/RecManv.pdf>] *webcite EPA/821/R-97/004* Washington, DC:U.S. Environmental Protection Agency; 2000.

U.S. EPA: Bacterial Water Quality Standards for Recreational Waters (Freshwater and Marine Waters). [<http://www.epa.gov/waterscience/beaches/>

[local/statrept.pdf](http://www.epa.gov/waterscience/beaches/local/statrept.pdf)] *webcite EPA-823-R-03-008* Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency; 2003.

Vallar, C.,. Caracterização de isolados de *Enterococcus spp.* provenientes de amostra de água. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – UFRGS. 2002, p.92. 2002.

Van den Bogaard, A.E., Willems, R., London, N. Top, J. Stobbering, E.E. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. J. Antimicrob. Chemother. 49, 497–505. 2002.

Vasconcellos, F.C.S. Iganci, J.V.R. Ribeiro, G.A. Qualidade microbiológica da água do Rio São Lourenço, São Lourenço do Sul, Rio Grande do Sul. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.73, n.2, p.177-181, abr./jun., 2006.

Wade, T.J. Pai, N. Eisenberg, J.N.S. and Colford Jr, J.M. Do. U.S. Environmental Protection Agency Water Quality Guidelines for Recreational Waters Prevent

Gastrointestinal Illness? A Systematic Review and Meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*. VOLUME 111, NUMBER 8, 2003.

Wiggins, B.A. Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3997–4002.1996.