

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

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS, GENES DE ENTEROTOXINAS E
FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DO
ARROIO DILÚVIO**

ANA PAULA BASSO
Bacharel em Biomedicina

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março de 2013

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

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS, GENES DE ENTEROTOXINAS E
FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DO
ARROIO DILÚVIO**

ANA PAULA BASSO
Bacharel em Biomedicina

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente
como um dos requisitos para a
obtenção do Grau de Mestre em
Microbiologia do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março de 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Em primeiro lugar a Deus, que acompanha minha trajetória, me iluminando, protegendo e dando forças para seguir adiante.

À minha família toda, especialmente meus pais Paulo e Erenita, pelo amor, pela minha criação, investimento de tempo e dinheiro na minha educação e apoio na realização deste trabalho. À minha irmã Gabriela, pela companhia e apoio nos últimos dias de dissertação. Obrigada por acreditarem em mim e me incentivarem.

Ao meu namorado, Marcelo, pelo suporte emocional incondicional, pelo apoio durante os experimentos, quando muita coisa não dava certo. Agradeço por me ajudar também durante a dissertação, me ouvindo com paciência, me acordando para escrever e me oferecendo carinho para tornar tudo mais fácil. Marcelo, obrigada pelo teu amor.

Às minhas amigas desde a Biomedicina, Mila, Ju, Fê e Scheila, obrigada pela amizade de vocês, que faz minha vida mais feliz e dá coragem para seguir em frente. Agradeço em especial a Paula, que teve participação fundamental nesse trabalho, ajudando com os experimentos no laboratório, além de conversas e risadas. Tua amizade e apoio são muito importantes na minha vida pessoal e profissional e continuarão sendo, mesmo longe.

À minha orientadora Ana Frazzon, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela confiança depositada em mim, por todo suporte dado e conhecimentos adquiridos.

Às colegas de laboratório, Jaque, Ana, Dani, Themis, Tiele pelas risadas e conversas que faziam o tempo passar rápido dentro do laboratório, pela ajuda e parceria, pelos tubos emprestados, pelos ensinamentos transmitidos.

À colega Tiane, por toda ajuda com protocolos, dicas, reagentes. Agradeço pela tua atenção e dedicação.

À IC Taiane, que trabalhava com a Paula, mas que nunca hesitou em ajudar no que fosse preciso. Obrigada por ser tão querida e prestativa.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS, GENES DE ENTEROTOXINAS E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DO ARROIO DILÚVIO¹

Autor: Ana Paula Basso

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon

RESUMO

A água é um recurso essencial para manutenção da vida. Entretanto, a ingestão de água de baixa qualidade está associada com um dos maiores problemas de saúde pública no mundo: doenças de veiculação hídrica. O Arroio Dilúvio é um dos principais córregos de Porto Alegre-RS e recebe grandes volumes de terra, lixo e águas residuais, o que contribui para deterioração das suas águas. *Staphylococcus* podem causar intoxicação alimentar devido à ingestão de Enterotoxinas Estafilocócicas (SEs). Enterotoxinas são proteínas termoestáveis com atividade de superantígeno. Esses microrganismos também estão envolvidos em diversas outras patologias e sua multirresistência a antimicrobianos é motivo de preocupação. *Staphylococcus* são capazes de formar biofilme, o que confere lhes proteção tanto no ambiente quanto no hospedeiro. Esse estudo objetivou identificar 88 isolados de *Staphylococcus* provenientes da água de cinco pontos do Arroio Dilúvio e analisar alguns de seus fatores de virulência. Os isolados foram identificados em nível de espécie através de testes bioquímicos e o perfil de resistência a antimicrobianos foi determinado pelo teste de disco-difusão. Foram também submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase para detecção dos genes das enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) e ao teste de formação de biofilme em microplaca. 94,32% dos isolados foram classificados como Estafilococos Coagulase Negativa e as espécies mais frequentemente identificadas foram *S. cohnii*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus*. 43,18% dos isolados apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado, sendo resistência a penicilina, eritromicina e oxacilina os fenótipos mais observados. A maior ocorrência de isolados resistentes foi no ponto C de coleta. 36,36% dos isolados apresentaram um ou mais genes de enterotoxinas, sendo *sec* o mais prevalente. No ponto B foi encontrado o maior número de isolados carregando genes de SEs. Dez isolados mostraram capacidade de formar biofilme *in vitro*, sendo dois fortes formadores. Conclui-se que as águas do Arroio Dilúvio estão contaminadas com estafilococos potencialmente virulentos, os quais apresentam resistência a antimicrobianos, genes de enterotoxinas e formam biofilme, o que confere risco à população do município.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (79 p.) Março, 2013.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE, ENTEROTOXINS GENES AND BIOFILM FORMATION IN *Staphylococcus* spp. ISOLATED FROM ARROIO DILÚVIO²

Author: Ana Paula Basso

Supervisor: Ana Paula Guedes Frazzon

ABSTRACT

Water is an essential resource for life maintenance. However, intake of low quality water is associated with one of the biggest public health problems in the world: the waterborne diseases. Arroio Dilúvio is a major stream of water in Porto Alegre-RS, which receives large volumes of earth, rubbish and waste water, contributing to water deterioration. *Staphylococcus* can cause food poisoning due to ingestion of Staphylococcal Enterotoxins (SEs). Enterotoxins are thermostable proteins with superantigen activity. These microorganisms are also involved in several other pathologies and their multidrug resistance to antibiotics is a concern. *Staphylococci* are able to form biofilm, which provide protection on both environmental and host. This study aimed to identify 88 *Staphylococcus* isolated from five points of Arroio Dilúvio water and analyze some of their virulence factors. Isolates were identified to species level by biochemical tests and antimicrobial resistance profile was determined by disk diffusion test. They were also submitted to Polymerase Chain Reaction to detect genes of classical enterotoxins (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*) and to biofilm formation test. 94.32% of the isolates were classified as Coagulase Negative Staphylococci and the most frequent species were *S. cohnii*, *S. haemolyticus* and *S. saprophyticus*. 43,18% of isolates were resistant to at least one antimicrobial tested, and resistance to penicillin, erythromycin, and oxacillin was the phenotype most observed. The increased occurrence of resistant isolates was at point C. 36,36% of the isolates had one or more enterotoxin genes, *sec* being the most prevalent. At point B was found the largest number of isolates carrying genes SEs. Ten isolates showed ability to form biofilm in vitro, being two strong formers. We conclude that the water of the Arroio Dilúvio are contaminated with potentially virulent staphylococci, which are resistant to antibiotics, had enterotoxin genes and form biofilms, which confers risk for the city population.

²Master of Science dissertation in Environment Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (79 p.) March, 2013.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| LISTA DE TABELAS | viii |
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | x |
| 1 – INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 – Objetivo geral | 3 |
| 1.2 – Objetivos específicos..... | 3 |
| 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 2.1 – Água | 4 |
| 2.1.1 – Arroio Dilúvio..... | 4 |
| 2.1.2 – Qualidade da água..... | 6 |
| 2.1.3 – Efluente hospitalar | 8 |
| 2.2 – Estafilococos | 10 |
| 2.2.1 – Estafilococos Coagulase Negativa..... | 11 |
| 2.3 – Resistência a antimicrobianos | 12 |
| 2.4 – Enterotoxinas Estafilocócicas | 15 |
| 2.4.1 – Aspectos moleculares das enterotoxinas estafilocócicas..... | 16 |
| 2.4.1 – Intoxicação alimentar estafilocócica..... | 18 |
| 2.5 – Biofilme bacteriano | 21 |
| 3 – MATERIAIS E MÉTODOS | 26 |
| 3.1 – Amostras utilizadas | 26 |
| 3.2 – Reativação das amostras | 27 |
| 3.3 – Identificação fenotípica | 27 |
| 3.3.1 – Teste para detecção da enzima coagulase..... | 27 |
| 3.3.2 – Teste de Vogues-Proskauer (VP) | 28 |
| 3.3.3 – Teste de fermentação de açúcares..... | 28 |
| 3.3.4 – Teste para detecção da enzima urease | 29 |
| 3.3.5 – Detecção da redução de nitrato | 29 |
| 3.3.6 – Detecção da enzima oxidase | 29 |
| 3.3.7 – Susceptibilidade à Polimixina B e Novobiocina..... | 30 |
| 3.4 – Teste de susceptibilidade a antimicrobianos | 30 |
| 3.5 – Extração de DNA total | 30 |
| 3.6 – Reação em Cadeia da Polimerase para detecção dos genes das enterotoxinas A (<i>sea</i>) e D (<i>sed</i>)..... | 31 |
| 3.7 – Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex para detecção dos genes das enterotoxinas B (<i>seb</i>), C (<i>sec</i>) e E (<i>see</i>)..... | 32 |
| 3.8 – Eletroforese em gel de agarose..... | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 3.9 – Formação de biofilme | 33 |
| 4 – RESULTADOS | 35 |
| 4.1 – Identificação fenotípica | 35 |
| 4.2 – Resistência a antimicrobianos | 37 |
| 4.3 – Enterotoxinas Estafilocócicas | 38 |
| 4.4 – Formação de biofilme em microplaca | 40 |
| 5 – DISCUSSÃO | 42 |
| 5.1 – Identificação fenotípica | 42 |
| 5.2 – Resistência a antimicrobianos | 45 |
| 5.3 – Enterotoxinas Estafilocócicas | 47 |
| 5.4 – Formação de biofilme em microplaca | 49 |
| 6 – CONCLUSÕES..... | 51 |
| 7 – PERSPECTIVAS | 52 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 53 |
| ANEXOS..... | 64 |
| VITA..... | 68 |

LISTA DE TABELAS

| | | Página |
|----------|---|--------|
| TABELA 1 | Características moleculares das enterotoxinas estafilocócicas clássicas..... | 18 |
| TABELA 2 | Descrição dos <i>primers</i> , temperaturas de anelamento e tamanho dos produtos relativos aos ensaios de PCR | 33 |
| TABELA 3 | Distribuição das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. entre os diferentes pontos de coleta do Arroio Dilúvio..... | 36 |
| TABELA 4 | Número de isolados de cada espécie que apresentou perfil de resistência a antimicrobianos..... | 37 |
| TABELA 5 | Distribuição dos isolados resistentes a antimicrobianos entre os pontos de coleta do Arroio Dilúvio..... | 38 |
| TABELA 6 | Número de isolados que apresentaram genes de enterotoxinas por espécie..... | 39 |
| TABELA 7 | Distribuição dos genes de enterotoxinas estafilocócicas entre os pontos de coleta do Arroio Dilúvio..... | 40 |
| TABELA 8 | Distribuição dos estafilococos formadores de biofilme entre as espécies encontradas..... | 41 |
| TABELA 9 | Distribuição dos estafilococos formadores de biofilme entre os pontos de coleta do Arroio Dilúvio..... | 41 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| FIGURA 1 Imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando a formação de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> em uma prótese vascular..... | 22 |
| FIGURA 2 Modelo de formação de biofilme em <i>Staphylococcus epidermidis</i> . Os passos incluem ligação à superfície, acumulação, maturação e destacamento. A ligação inicial pode ocorrer de forma direta à superfície de um polímero ou depender da interação de proteínas ligadoras da bactéria com proteínas do hospedeiro..... | 23 |
| FIGURA 3 Pontos de coleta das amostras de água ao longo do curso do Arroio Dilúvio em Porto Alegre-RS. Ponto A: Nascente do Arroio, Parque Saint'Hilaire. Ponto B: Esquina Avenidas Ipiranga e Antonio de Carvalho. Ponto C: Esquina Avenida Ipiranga e Rua Guilherme Alves. Ponto D: Esquina Avenidas Ipiranga e Ramiro Barcelos. Ponto E: Esquina Avenidas Ipiranga e Borges de Medeiros..... | 26 |
| FIGURA 4 Perfil de amplificação dos genes das enterotoxinas. L1: marcador de peso molecular; L2: <i>sea</i> ; L3: <i>sed</i> ; L4: <i>seb</i> , <i>sec</i> e <i>see</i> | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: Porcentagem
°C: Graus Celsius
µg: micrograma
µL: microlitro
µm: micrômetro
µM: micromolar
3D: Tri Dimensional
aa: Aminoácido
ATCC: "American Type Culture Colletion"
ATP: Adenosina Tri Fosfato
BHI: "Brain Heart Infusion"
CDC: "Centers for Disease Control and Prevention"
CLI: Antibiótico Clindamicina
CLO: Antibiótico Cloranfenicol
CIP: Antibiótico Ciprofloxacina
CLSI: "Clinical and Laboratory Standards Institute"
DEP: Departamento de Esgotos Pluviais
DMAE: Departamento Municipal de Águas e Esgotos
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
DO: Densidade Óptica
ECoN: Estafilococos Coagulase Negativa
ECoP: Estafilococos Coagulase Positiva
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPS: Matriz Extracelular Polissacarídica
ERI: Antibiótico Eritromicina
EUA: Estados Unidos da América
FEPPS: Fundação Estadual de Pesquisa e Proteção a Saúde
g: Unidade gravitacional
GEN: Antibiótico Gentamicina
Gene *sea*: Gene da enterotoxina A
Gene *seb*: Gene da enterotoxina B
Gene *sec*: Gene da enterotoxina C
Gene *sed*: Gene da enterotoxina D
Gene *see*: Gene da enterotoxina E
h: Horas
IAE: Intoxicação Alimentar Estafilocócica
ica: Adesão intracelular
Kb: Kilobase
KDa: Kilodalton
Km: Kilômetro
Km²: Kilômetro quadrado
m³: Metro cúbico
mg: Miligramas

MgCl₂: Cloreto de Magnésio
MIC: Concentração Inibitória Mínima
min: Minutos
mL: Mililitros
mM: Milimolar
N: Normal
ng: Nanogramas
NOR: Antibiótico Norfloxacina
OMS: Organização Mundial da Saúde
OXA: Antibiótico Oxacilina
Pb: Pares de Bases
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PEN: Antibiótico Penicilina
PF: Oligonucleotídeo “Forward”
pH: Potencial de Hidrogênio Iônico
PIA: Adesina Polissacarídica Intracelular
Pmol: Picomol
PR: Oligonucleotídeo “Reverse”
PSA: Adesina Polissacarídica Capsular
RNA: Ácido Ribonucleico
rRNA16S: RNA ribossomal da subunidade 16s do ribossomo
RS: Rio Grande do Sul
s: segundo
SDS Dodecil Sulfato de Sódio
SE: Enterotoxina Estafilocócia
SEA: Enterotoxina Estafilocócia A
SEB: Enterotoxina Estafilocócia B
SEC: Enterotoxina Estafilocócia C
SED: Enterotoxina Estafilocócia D
SEE: Enterotoxina Estafilocócia E
SUT: Antibiótico Sulfametoxazol com Trimetropim
VAN: Antibiótico Vancomicina
TAE: Tampão Tris-Acetato-EDTA
Taq polimerase: Enzima polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*
TE: Tampão Tris-EDTA
TSST-1: Toxina da Síndrome do Choque Tóxico
U: Unidade de atividade de enzima
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VP: Vogues-Proskauer

1 – INTRODUÇÃO

A água é o principal elemento que constitui os seres vivos, sendo de suma importância para sobrevivência do homem. Os recursos hídricos tem importância fundamental no desenvolvimento de diversas atividades socioeconômicas. Por outro lado, a água serve como veículo de transmissão de doenças causadas por vírus, bactérias e parasitas. A contaminação dos recursos hídricos representa um dos principais riscos à saúde pública, sendo que a baixa qualidade da água está diretamente relacionada com diversas enfermidades, especialmente em países em desenvolvimento.

O Arroio Dilúvio nasce na cidade de Viamão, tendo sua maior área localizada na cidade de Porto Alegre. É considerado um dos principais córregos de água desse município, devido à abrangência territorial de sua bacia. Esse arroio é frequentemente contaminado por resíduos domésticos, industriais e hospitalares. Recebe anualmente toneladas de lixo, terra e esgoto cloacal de diversos bairros da cidade, podendo ser fonte de microrganismos potencialmente patogênicos.

Os estafilococos são bactérias anaeróbicas facultativas, com forma de cocos Gram-positivos e arranjo em cachos, medem aproximadamente 1 µm e estão distribuídos de forma ubíqua na natureza. Podem colonizar humanos e animais e são, muitas vezes, reconhecidos como patógenos oportunistas. O gênero *Staphylococcus* é composto de 45 espécies divididas em dois grupos:

Estafilococos Coagulase Positiva (ECoP) e Estafilococos Coagulase Negativa (ECoN). *Staphylococcus aureus* é a principal espécie dos ECoP. Seu reservatório é o trato nasal inferior de mamíferos e aves. Estão envolvidos em diversas patologias, incluindo infecções nosocomiais, sinusite, infecção do trato urinário e intoxicação alimentar. As espécies de ECoN fazem parte da microbiota de humanos e animais. Entretanto, nos últimos anos, tem havido uma conversão desses microrganismos de simbioses a patógenos causadores de infecções graves, principalmente em indivíduos imunocomprometidos.

Staphylococcus produzem inúmeros fatores de virulência que promovem sua sobrevivência e disseminação. Tais fatores incluem produção de enterotoxinas, desenvolvimento de resistência a antimicrobianos e capacidade de formação de biofilme. As Enterotoxinas Estafilocócicas (SEs) são proteínas termorresistentes que apresentam atividade de superantígeno. Elas subvertem o sistema imune do hospedeiro e desencadeiam uma série de respostas. A Intoxicação Alimentar Estafilocócica (IAE) caracteriza-se principalmente por vômito, diarreia e dor abdominal, sendo causada pela ingestão de alimentos contaminados com SEs. Estafilococos isolados de diversas fontes apresentam altos níveis de resistência a antimicrobianos. Dessa forma, conseguem sobreviver ao tratamento com antibióticos, mantendo sua capacidade de causar doença e morte. A formação de biofilme é vista como um mecanismo de sobrevivência da bactéria, uma vez que provê proteção a estresse térmico, força mecânica e compostos tóxicos, como antimicrobianos.

A falta de estudos que investiguem a presença de estafilococos e suas características de virulência nas águas residuais do Arroio Dilúvio justifica a

realização deste trabalho, dada a importância ambiental, econômica e de saúde do Arroio para o município de Porto Alegre.

1.1 – Objetivo geral

Este estudo objetivou identificar e avaliar isolados de estafilococos de água do Arroio Dilúvio quanto ao seu perfil de resistência a antimicrobianos, capacidade enterotoxigênica e de formação de biofilme.

1.2 – Objetivos específicos

A - Identificar os estafilococos em nível de espécie através de testes bioquímicos.

B - Avaliar o perfil de susceptibilidade dos isolados a dez antimicrobianos.

C - Detectar a presença dos cinco genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*).

D - Avaliar a capacidade dos isolados de formar biofilme em microplacas.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Água

2.1.1 – Arroio Dilúvio

Arroios são pequenos corpos d'água que se formam, principalmente, a partir do escoamento preferencial de águas superficiais em uma bacia hidrográfica. O Arroio Dilúvio é um dos principais córregos de água de Porto Alegre-RS (30° 1' 40" Sul, 51° 13' 43" Oeste), devido à abrangência territorial de sua bacia, a qual engloba cerca de 50% da população da cidade (Dmae, 2009). Entre as décadas de 1930 e 1940 foram iniciadas obras de canalização do Arroio Dilúvio, as quais se prolongaram por 20 anos, mas livraram diversos bairros das problemáticas inundações. O nome atual do Arroio deve-se a estas frequentes inundações que provocava. Atualmente, as nascentes localizam-se no Parque Saint'Hilaire, na Lomba do Sabão e o deságue ocorre no Lago Guaíba (Morandi e Faria, 2000).

A bacia do Dilúvio recebe a contribuição pluvial de mais de 36 bairros, representando uma parcela significativa do sistema de drenagem da cidade. O Arroio Dilúvio percorre uma extensão de 17.605 metros, das nascentes a foz, atravessando a cidade no sentido leste-oeste e sendo o escoadouro das águas pluviais de uma bacia com 83,74 km². Da área total da bacia, 83% pertencem ao município de Porto Alegre e 17% ao município de Viamão (Young, 2010).

O Arroio Dilúvio recebe o maior percentual de redes coletoras de esgoto sanitário, do tipo separador absoluto, em relação às demais bacias da cidade. Entretanto, recebe ainda grandes volumes de águas residuais (devido à deficiência nas redes cloacais ou clandestinidade), o que contribui para deterioração da qualidade da água, comprovada através do monitoramento realizado pela divisão de pesquisas do DMAE. Pode ser observado também o acúmulo de sedimentos no canal do Arroio, cuja causa principal é a expansão da cidade em direção às cabeceiras e topos de morros. De acordo com dados do relatório de atividades do DEP 2005-2008, o Arroio Dilúvio recebe, anualmente, em torno de 50.000 m³ de sedimentos produzidos por erosão natural; degradação das margens e sólidos urbanos. De sua extensão total, 11,3 km necessitam de constante assoreamento (Young, 2010).

O Arroio Dilúvio vem sofrendo uma progressiva degradação da qualidade de suas águas, que pode ser atribuída ao desequilíbrio existente entre a expansão populacional e a implantação de obras de saneamento (Morandi e Faria, 2000). Dessa forma, os impactos da ocupação urbana e a carência histórica de investimentos em obras de saneamento fazem do Arroio Dilúvio um dos córregos d'água mais poluído e, ao mesmo tempo, com maior demanda em termos de responsabilização pública pela sua despoluição (Dmae, 2009).

Alguns estudos que avaliaram a qualidade microbiológica da água do Arroio Dilúvio foram recentemente realizados. Oliveira (2011) isolou bactérias da família *Enterobacteriaceae*, entre as quais prevaleceu a espécie *Escherichia coli*, e observou a presença de resistência a antimicrobianos como cefalotina,

amoxicilina com ácido clavulânico e ampicilina na água do Arroio. A presença de bactérias Gram-positivas na água do Arroio Dilúvio também é significativa, como visto no estudo desenvolvido por Nachtigall (2011). *Enterococcus* resistentes a eritromicina, nitrofurantoína e norfloxacin foram isolados de diversos pontos do Arroio e identificados, em sua maioria, como *E. faecium*.

O Lago Guaíba tem ligação com a Lagoa dos Patos, a segunda maior laguna do Brasil, que tem importância econômica e cultural para a população local, no que diz respeito a transporte aquático, irrigação, pesca. Entretanto, está ocorrendo uma degradação da água da lagoa, devido à poluição gerada por indústrias petroquímicas, agropecuária e despejo de material orgânico. Estudos mostram a ocorrência de microrganismos, como *Escherichia coli* e espécies de *Enterococcus*, classificados como multirresistentes na água da laguna (Canal, 2010; Henkes, 2010).

2.1.2 – Qualidade da água

A água é considerada a essência da vida e o acesso à água potável é um direito básico de extrema importância para todos. Apesar de a água ser necessária para o bem-estar da humanidade e desenvolvimento sustentável, uma grande parcela da população mundial não tem acesso a fontes de água microbiologicamente seguras (Who e Unicef, 2004).

Áreas esparsamente habitadas ou comunidades periféricas normalmente não possuem acesso ao abastecimento público de água e a sistemas de esgotamento. Os habitantes dessas áreas acabam por fazer uso de poços para prover suas necessidades de água e de latrinas para lançar seu esgoto doméstico. Poços e fossas são construídos pelos próprios habitantes, sem

nenhum suporte de agências de saúde pública ou instituições governamentais. O abastecimento de água, se mal gerido, pode facilmente ser contaminado por patógenos, que causam doenças de veiculação hídrica na população (Suhogusoff, Hirata *et al.*, 2013). Dessa forma, a baixa qualidade da água é decorrente do crescimento populacional exacerbado; baixo desenvolvimento socioeconômico; limitadas fontes de água; falta de saneamento (Khan, Maria *et al.*, 2012); disposição inadequada de cadáveres humanos e animais; desconhecimento sobre práticas de higiene pessoal (Omari e Yeboah-Manu, 2012 ; Olajuyigbe, Alinaitwe *et al.*, 2013).

A contaminação biológica da água potável é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em torno de 1,1 bilhão de pessoas no mundo bebem água não segura e a grande maioria das doenças diarreicas (88%) são atribuídas à água, sanitização e higiene. Essas doenças são especialmente importantes em crianças, uma vez que mais de três milhões de crianças com menos de cinco anos morrem anualmente devido à ingestão de água contaminada (Omari e Yeboah-Manu, 2012). Em um parâmetro geral, de acordo com a OMS, em torno de 3,4 milhões de pessoas em todo o mundo morrem diariamente por doenças de veiculação hídrica.

O problema é muito maior em países em desenvolvimento. Nesses países, em torno de 80% de todas as doenças e mais de um terço das mortes são causadas por água contaminada (Olajuyigbe, Alinaitwe *et al.*, 2013). No Brasil, cerca de 80% dos leitos nos hospitais da rede pública são ocupados por indivíduos com problemas de saúde relacionados às doenças de veiculação

hídrica. Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, entre 2000 e 2007, em torno de 40.000 pessoas morreram em decorrência de diarreia e gastroenterite. No RS, no período de 1999 a 2008, ocorreram 1.626 óbitos notificados, num total de 884.487 casos da doença (Saúde., 2013).

O maior risco associado ao consumo de água é a contaminação com excretas de humanos e animais. A maior parte das bactérias patogênicas responsáveis por doenças de veiculação hídrica são disseminadas através da via fecal-oral (Suthar, Chhimpia *et al.*, 2009). Os coliformes podem ocorrer na água devido à contaminação fecal e incluem membros da família *Enterobacteriaceae* (como *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* e *Klebsiella*) (Omari e Yeboah-Manu, 2012). Essas bactérias enteropatogênicas na água são responsáveis por uma variedade de doenças, como por exemplo, cólera, febre tifoide, disenteria e salmonelose (Omari e Yeboah-Manu, 2012).

2.1.3 – Efluente hospitalar

Hospitais representam uma fonte de liberação de muitos compostos químicos no ambiente aquático, devido à atividade laboratorial ou excreção de remédios na rede de esgoto. Esses centros de saúde consomem uma enorme quantidade de água por dia e geram quantidades igualmente significativas de esgoto, o qual é contaminado por microrganismos, medicamentos, metais pesados, elementos radioativos, desinfetantes e antissépticos (Gupta, Mathur *et al.*, 2009). O esgoto hospitalar tem potencial risco de transmissão de doenças e a contaminação de água tratada com efluente hospitalar pode

causar graves infecções na comunidade. Chitnis (2004) detectou altas taxas de *Salmonella* e *Shigella* no esgoto hospitalar, o que constitui uma ameaça à saúde da comunidade (Chitnis, Chitnis *et al.*, 2004). Além de microrganismos patogênicos, o efluente hospitalar contém elevadas concentrações de antibióticos, os quais são excretados nas fezes e urina. Isso contribui para a seleção de bactérias multirresistentes (Pauwels e Verstraete, 2006).

Um dos principais problemas ambientais causados pelo efluente hospitalar é a sua descarga no sistema de esgoto urbano sem tratamento preliminar. Por conter poluentes perigosos, o esgoto hospitalar requer tratamento *in situ* para prevenir a contaminação do sistema de esgotamento da cidade e de rios (Gupta, Mathur *et al.*, 2009). Infelizmente, esse tratamento não é efetivo e, muitas vezes, nem ocorre. Em países em desenvolvimento como a Índia, o lixo hospitalar líquido é frequentemente drenado no sistema de esgotamento municipal sem nenhum tratamento e este termina em corpos d'água como lagos, rios e oceanos (Chitnis, Chitnis *et al.*, 2004).

No Brasil, Vecchia e colaboradores (2009) realizaram um estudo que visava identificar quantos hospitais possuíam sistema de tratamento de esgoto, através de um questionário respondido pelos próprios hospitais. De 127 hospitais consultados, em todas as regiões do país, apenas oito instituições enviaram suas respostas e, destas, apenas três estavam dotadas de uma estação própria de tratamento de esgoto (Vecchia, Thewes *et al.*, 2009). Em Porto Alegre, segundo a Associação dos Hospitais do Rio Grande do Sul, 61% dos hospitais lançam seus despejos "in natura" na rede coletora de esgotos da

sub-bacia do Arroio Dilúvio, tendo como destino final, o Lago Guaíba. Porto Alegre possui uma geração estimada de 142.996 m³ de resíduos líquidos hospitalares por mês que são lançados sem tratamento, diretamente no corpo receptor (La Rosa, Tolfo *et al.*, 2000).

2.2 – Estafilococos

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae*, que inclui quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus* (Boone, Castenholz *et al.*, 2001). Os *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos que tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva. Apresentam diâmetro entre 0,5 e 1,5 µm, são imóveis e não formam esporos. São anaeróbios facultativos e produzem a enzima catalase (Varnam e Evans, 1996).

Staphylococcus spp. possuem uma distribuição ubiqüitária na natureza, sendo isolados de pele e mucosas de animais de sangue quente (Jorgensen, Mork *et al.*, 2005); alimentos (Gündogan, Ataol *et al.*, 2012; Rahimi e Alian, 2013); água (Harakeh, Yassine *et al.*, 2006) e esgotos (Serapicos, 2008). Esse gênero compreende mais de 70 espécies e subespécies, divididas em dois grupos baseado na habilidade de coagular o plasma: Estafilococos Coagulase Positivos (ECoP) e Estafilococos Coagulase Negativos (ECoN). Os ECoP formam um grupo pequeno, o qual inclui 7 espécies: *Staphylococcus aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. intermedius* e *S. pseudointermedius* (Euzéby, 2012). Dentro desse grupo, a espécie proeminente é *S. aureus*, que reside no nariz de aproximadamente 30% da população humana. Essa espécie é usualmente

assintomática, mas tem capacidade de causar inúmeras doenças, desde lesões superficiais até sérias infecções em quase todos os tecidos, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Prax, Lee *et al.*, 2013).

Os estafilococos são capazes de expressar uma ampla variedade de fatores de virulência, que são secretados ou associados à célula. Os fatores secretados incluem enzimas (hemolisinas, nucleases, proteases, lipases, hialuronidasas, collagenases, fibrolisina, coagulase, β -lactamase) citotoxinas, exotoxinas (enterotoxinas e toxina da síndrome do choque tóxico) e toxinas esfoliativas. Essas propriedades fazem do estafilococo um patógeno versátil, capaz de uma ampla gama de infecções (Dinges, Orwin *et al.*, 2000; Pinchuk, Beswick *et al.*, 2010). As enzimas e citotoxinas podem ser encontradas em elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e prófagos (Novick, Schlievert *et al.*, 2001).

2.2.1 – Estafilococos Coagulase Negativa

Os Estafilococos Coagulase Negativa (ECoN) abrangem a maioria das espécies existentes, sendo *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus* importantes representantes do grupo. A maior parte das espécies são microrganismos comensais da pele, mas também podem ser importante causa de infecções em indivíduos imunossuprimidos (Oppenheim, 1998).

A maioria dos ECoN isolados de humanos pertencem à espécie *S. epidermidis*, a qual reside em uma ampla variedade de sítios anatômicos, incluindo membranas mucosas, virilha ou axila e superfícies expostas da pele, onde as contagens normalmente são muito mais baixas. *S. epidermidis* é um

patógeno oportunista, estando associado com altos índices de infecções sanguíneas relacionadas ao cateter (Prax, Lee *et al.*, 2013). A segunda espécie mais predominante em humanos é *S. hominis*, que pode ser isolada da pele dos braços, pernas e tronco (Huebner e Goldmann, 1999).

Algumas espécies são consideradas patógenos emergentes, como *S. lugdunensis* (endocardite, abscesso, artrite séptica) e *S. caprae* (endocardite, sepse, infecções do trato urinário, infecção em ossos) (Livermore, 2000). Outras espécies são menos frequentemente isoladas ou mais difíceis de identificar: *S. auricularis*, *S. capitis subsp. urealyticus*, *S. cohnii*, *S. saccharolyticus*, *S. simulans*, *S. pasteurii*, *S. warneri*, *S. xylosus* e *S. equorum* (Irlinger, 2008). Nem todos os estafilococos são patogênicos e alguns vêm sendo explorados na indústria de alimentos e biotecnologia. *S. carnosus*, *S. xylosus* e *S. equorum* contribuem para maturação de queijo e fermentação de carne (Prax, Lee *et al.*, 2013).

2.3 – Resistência a antimicrobianos

O efeito indesejável do crescimento microbiano tem sido controlado através do uso de antimicrobianos, tais como antibióticos (Samra, Naseem *et al.*, 2009). Aproximadamente cinquenta anos atrás os antibióticos foram introduzidos no mercado para o tratamento de doenças microbianas. Desde então, a maior ameaça para o uso desse tipo de medicamento na terapia contra infecções bacterianas é o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos nas bactérias. Estudos demonstram que após introdução de um determinado composto antimicrobiano pode-se observar a emergência de bactérias resistentes a esse antimicrobiano (Mathur e Singh, 2005).

A introdução da penicilina no começo da década de 1940 melhorou drasticamente o prognóstico de pacientes com infecções estafilocócicas. Entretanto, em 1942 foi descrito o primeiro caso de estafilococo resistente à penicilina, inicialmente em hospitais e depois na comunidade. Em 1946, em torno de 6% dos *Staphylococcus aureus* produziam a enzima penicilinase (β -lactamase), que degrada o anel β -lactâmico, apresentando resistência à penicilina. Em 1948, esse número subiu para mais de 50% e, na década de 1960, cresceu para 80-90%. Atualmente, mais de 90% dos estafilococos produzem penicilinase, independente do cenário clínico. Em 1961, esse quadro levou a introdução de uma nova droga, a meticilina, um derivado semissintético da penicilina não susceptível a hidrólise por penicilinasas. Porém, a chegada da meticilina ao mercado foi rapidamente seguida pela descrição de isolados resistentes. A propagação de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) fez lembrar a emergência da resistência a penicilina em 1940, sendo primeiro detectada em hospitais e depois amplamente reconhecida na comunidade (Livermore, 2000; Lim e Strynadka, 2002; Lowy, 2003).

A evolução e disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos são o resultado da pressão seletiva, seja pela prescrição necessária dessas drogas ou pelo uso incorreto em tratamentos sem diagnóstico estabelecido, automedicação, desperdício de restos de antimicrobianos no meio ambiente e emprego desses fármacos como promotores de crescimento em animais de produção (Tavares, 2000).

A pressão seletiva imposta pelo uso de agentes antimicrobianos desempenha um papel chave na emergência da resistência bacteriana. Sempre que uma população bacteriana mista é exposta a agentes antimicrobianos, é suposto que existam bactérias resistentes a respectiva droga e concentração aplicada. Sobre pressão seletiva, o número desses microrganismos vai aumentar e alguns podem passar seus genes de resistência a outros membros da população (Mathur e Singh, 2005).

Entretanto, é provável que o mecanismo de resistência tenha sido desenvolvido antes do uso clínico de antibióticos. Os genes de resistência podem ter sido originados a partir de espécies produtoras de antimicrobianos que carregam tais genes de resistência para proteção dos seus próprios produtos antimicrobianos (Mathur e Singh, 2005).

A resistência a um determinado antibiótico pode estar naturalmente presente em determinadas espécies ou gêneros bacterianos (resistência inerente ou intrínseca), o que resulta na capacidade do microrganismo crescer na presença de um agente antimicrobiano. Esse tipo de resistência é herdada pelos organismos da mesma espécie através da divisão celular (transferência vertical) e não pode ser transferida. A resistência intrínseca ocorre devido a fatores fisiológicos e bioquímicos específicos do microrganismo, como no caso da *Pseudomonas aeruginosa*, a qual é naturalmente resistente a penicilina G. (Kuemmerer, 2009).

Em contraste, a resistência adquirida ou secundária está presente em algumas linhagens dentro de espécies usualmente susceptíveis a dado antibiótico e pode ser horizontalmente transferida entre as bactérias. Essa

resistência pode surgir a partir de mutações no genoma da bactéria ou através da aquisição de genes que codificam para o mecanismo de resistência (Mathur e Singh, 2005).

No caso da transferência gênica horizontal, existem três possíveis mecanismos: transformação natural, envolvendo a captação e incorporação de DNA livre do meio extracelular; conjugação, um contato celular dependente de mecanismo de transferência de DNA; e transdução, uma transferência mediada por bacteriófagos. A evolução da resistência a antibióticos em comunidades microbianas é aumentada pela transferência horizontal de genes de resistência através de plasmídeos conjugativos, transposons, integrons e elementos de inserção, bem como bacteriófagos líticos e temperados (Mathur e Singh, 2005).

Os mecanismos de resistência descritos são: mudança na permeabilidade da membrana; inativação enzimática do antibiótico (β -lactamases, transferases); transporte ativo do antibiótico (sistemas de efluxo dependentes de ATP inseridos na membrana); modificação do alvo (metilação do rRNA 23S, mutação da sequência de um aminoácido) ou mudanças de rotas metabólicas (Mathur e Singh, 2005).

2.4 – Enterotoxinas Estafilocócicas

Enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são proteínas membros de uma família com mais de 20 diferentes toxinas estafilocócicas e estreptocócicas, as quais são estruturalmente e funcionalmente relacionadas e compartilham homologia de aminoácidos. Essas proteínas bacterianas são conhecidamente pirogênicas e estão ligadas a significativas doenças humanas, que incluem intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico, doenças alérgicas e

autoimunes (Pinchuk, Beswick *et al.*, 2010). Essas toxinas são, na maior parte, produzidas por *Staphylococcus aureus*, apesar de que outras espécies como *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. xylosus* e *S. epidermidis* também podem expressá-las (Bhatia e Zahoor, 2007).

As SEs são classificadas como superantígenos, os quais tem a capacidade de estimular populações de células T, levando a produção de grandes quantidades de citocinas. Pelo menos 20 superantígenos estafilocócicos sorologicamente distintos já foram descritos até o momento e incluem enterotoxinas denominadas de SEA a SEV e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1). Essas proteínas têm em torno de 220 a 240 aminoácidos; peso molecular de aproximadamente 25 kD e significativa variabilidade de sequência, com estrutura 3D similar (Pinchuk, Beswick *et al.*, 2010). As SEs são proteínas termorresistentes, não podendo ser completamente desnaturadas por cozimento brando do alimento contaminado. A estabilidade térmica é uma das propriedades mais importantes das SEs em termos de segurança alimentar e parece ser dependente do pH, concentração de sal e outros fatores ambientais relacionados com o nível de desnaturação da toxina (Balaban e Rasooly, 2000). Também são resistentes a inativação por proteases gastrointestinais, incluindo pepsina, tripsina, renina e papaína e compartilham a capacidade de induzir êmese e gastroenterite (Pinchuk, Beswick *et al.*, 2010).

2.4.1 – Aspectos moleculares das enterotoxinas estafilocócicas

Os nomes dos diferentes genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas iniciam com as letras *se* (*staphylococcal enterotoxin*). Os genes

sed e *sej* estão presentes em plasmídeos (Bayles e landolo, 1989; Zhang, landolo *et al.*, 1998); *sea* e *see* são carregados por prófagos (Betley, Lofdahl *et al.*, 1984; Betley e Mekalanos, 1988; Couch, Soltis *et al.*, 1988; Jarraud, Peyrat *et al.*, 2001; Letertre, Perelle *et al.*, 2003); *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sem*, *sen*, e *seo* são encontrados no cromossomo (Jarraud, Peyrat *et al.*, 2001; Letertre, Perelle *et al.*, 2003) e *sel* e *sek* estão em ilhas de patogenicidade (Fitzgerald, Monday *et al.*, 2001). O gene *seb* já foi encontrado no cromossomo, em plasmídeos e em transposons (Shalita, Hertman *et al.*, 1977; Shafer e landolo, 1978).

As SEs são proteínas globulares solúveis em água, monoméricas, ricas em lisina, ácido aspártico e ácido glutâmico e apresentam cisteínas, que formam pontes dissulfeto (Bergdoll, Crass *et al.*, 1981; Prevost, Couppie *et al.*, 1995; Osterlund, Kahlmeter *et al.*, 2002). As SEs foram divididas em grupos por identidade gênica com base em sequências de aminoácidos. SEA, SED e SEE compartilham de 53 a 81 % de identidade; entre SEB e SEC a identidade é de 50 a 66 %. Em um panorama geral, as sequências de aminoácidos variam muito em termos de homologia: há 15,5% de homologia entre SEB e SEK e 90% entre SEA e SEE. Entretanto, todas possuem uma sequência de assinatura característica que pode ser encontrada no banco de dados PROSITE: Lis-x(2)-[Leu-Ile-Val-Fen]-x(4)-[Leu-Ile-Val-Fen]-Asp-x(3)-Arg-x(2)-Leu-x(5)-[Leu-Ile-Val]-Tir (PS00278) (Proft e Fraser, 2003). As características moleculares das enterotoxinas clássicas estão sumarizadas na tabela 1.

TABELA 1. Características moleculares das enterotoxinas estafilocócicas clássicas.

| SE | Tamanho do Gene (pb ^a) | Tamanho da Proteína (aa ^b) | Peso Molecular (KDa ^c) | Referência |
|------------------|------------------------------------|--|------------------------------------|--------------------------------------|
| SEA | 771 | 257 | 27.1 | (Betley e Mekalanos, 1988) |
| SEB | 798 | 266 | 31.4 | (Johns e Khan, 1988) |
| SEC ₁ | 801 | 239 | 27.4 | (Bohach e Schlievert, 1987) |
| SEC ₂ | 801 | 239 | 26.0 | (Bohach e Schlievert, 1989) |
| SEC ₃ | 798 | 238 | 27.4 | (Couch e Betley, 1989) |
| SED | 27.6 Kb ^d | 228 | 26.3 | (Bayles e Iandolo, 1989) |
| SEE | 771 | 257 | 29.3 | (Couch, Soltis <i>et al.</i> , 1988) |

a: pares de base; b: aminoácidos; c: Kilodaltons; d: O gene *sed* foi encontrado em um plasmídeo de 27.6 Kilo bases.

Apesar de existir mais de 20 diferentes enterotoxinas, somente as chamadas clássicas são bem estudadas e incluem: SEA, SEB, SEC, SED e SEE (Goto, Hayashidani *et al.*, 2007). SEA e SEB são toxinas associadas à intoxicação alimentar relacionada com estafilococos. O gene da enterotoxina SEC é o mais frequentemente reportado em *Staphylococcus aureus* isolado de leite (Valihrach, Alibayov *et al.*, 2013). SED é conhecida por ser a segunda enterotoxina estafilocócica mais comumente associada com intoxicação alimentar no mundo. Ela é importante porque muito pouca quantidade é necessária para induzir intoxicação. SEE também está documentada em alguns casos de intoxicação (Pinchuk, Beswick *et al.*, 2010).

2.4.1 – Intoxicação alimentar estafilocócica

Intoxicação alimentar estafilocócica resulta da ingestão de alimentos

contaminados com SEs, sendo o segundo caso mais comumente reportado de doença de veiculação alimentar, onde 10% dos indivíduos afetados visitam ou são internados em hospitais. Doenças de veiculação alimentar (DTAs) têm grande impacto na saúde pública. Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), estima-se que as enterotoxinas estafilocócicas afetem aproximadamente 80 milhões de indivíduos nos Estados Unidos, resultando em 32.500 hospitalizações e mais de 5.000 mortes. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em torno de dois milhões de pessoas morrem no mundo devido a surtos alimentares causadores de doenças diarreicas. O impacto econômico gerado por doenças transmitidas por alimentos também é alto. Nos EUA, os custos estimados podem chegar a 35 bilhões de dólares anualmente (Balaban e Rasooly, 2000; Pinchuk, Beswick *et al.*, 2010).

No Brasil, entre 1999 e 2009, 6.349 surtos de DTAs foram registrados, dos quais 20,5% foram causados por *Staphylococcus*. No estado do Rio Grande do Sul, entre 1999 e 2005, 1.275 surtos foram notificados, dos quais *Salmonella* foi responsável por 64,2% e *S. aureus* por 11,7% (Saúde, 2009). No estado de Minas Gerais, um grande surto de infecção alimentar em uma festa comunitária ocorreu em 1998. Dentre as 8.000 pessoas presentes, 4.000 pessoas adoeceram de intoxicação alimentar estafilocócica. Análises moleculares revelaram a presença de *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *seh* e identificaram *S. aureus* como agente etiológico. Dos 4.000 doentes, 2.000 buscaram ajuda médica, 396 foram internados e, destes, 81 foram para a Unidade de Tratamento Intensivo (UTI). Destes 81 pacientes, 16 faleceram, sendo 6

crianças de 0 a 5 anos de idade e 10 idosos de 65 a 90 anos (Do Carmo, Cummings *et al.*, 2004).

As principais causas das elevadas incidências de intoxicação alimentar estafilocócica são a insuficiente pasteurização ou descontaminação de fontes produtoras originalmente contaminadas ou a contaminação durante preparo e manipulação por indivíduos que carregam o microrganismo. Uma vez que *Staphylococcus aureus* suporta diferentes condições de temperatura e pH, ele pode crescer em uma ampla variedade de alimentos. Dessa forma, um alimento contaminado com linhagens produtoras de SEs e mantido a uma temperatura que permita o rápido crescimento da bactéria (refrigeração inadequada) é uma fonte comum de intoxicação. Em condições apropriadas uma bactéria pode se multiplicar por fissão binária até gerar quatro milhões de células em oito horas (Bhatia e Zahoor, 2007; Pinchuk, Beswick *et al.*, 2010). Em um estudo de intoxicação alimentar realizado na Inglaterra, os alimentos causadores mais frequentes (75%) foram carne, frango e seus produtos. Outros alimentos contaminados incluem peixe e marisco (7%), além de produtos lácteos (8%) (Balaban e Rasooly, 2000).

O aparecimento dos sintomas de intoxicação alimentar varia de acordo com a concentração, tipo e toxicidade da enterotoxina. A doença tem curto período de incubação (de 2 a 6 h) após a ingestão das toxinas pré-formadas. Os sintomas gastrintestinais podem ser de moderados a severos e incluem cólicas abdominais, náusea, vômito, diarreia, febre e desidratação. A doença é auto limitante, raramente letal, porém grave em indivíduos idosos. A quantidade de enterotoxina necessária para causar intoxicação é inferior

a 1 µg. Por exemplo, em um surto de gastroenterite relatado nos EUA, devido a ingestão de leite com chocolate contendo SEA, a quantidade média de enterotoxina detectada em recipiente de 400 mL foi 0,5 ng/mL e a dose total foi 200 ng/mL. Enterotoxinas são detectáveis com pequeno inóculo de 10³/g. Algumas linhagens estafilocócicas produzem quantidades detectáveis de enterotoxinas após 24h. Dentre os tipos de enterotoxinas, a SEA é responsável por aproximadamente 80% dos casos de surtos de intoxicação alimentar nos EUA, enquanto que a SEB é responsável por somente 10% (Pinchuk, Beswick *et al.*, 2010).

2.5 – Biofilme bacteriano

A formação de biofilme é uma importante estratégia usada por muitas bactérias para sobreviver no ambiente (Hou, Sun *et al.*, 2012). Um biofilme bacteriano é definido como uma comunidade complexa de células embebidas dentro de uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) produzida por ela, anexada a superfícies biológicas e não biológicas (Figura 1) (Souza Antunes, Bonfanti *et al.*, 2011; Diccico, Neethirajan *et al.*, 2012). Biofilmes podem ser compostos de uma cultura pura, mas comumente compreende uma comunidade de espécies microbianas mistas (Huq, Whitehouse *et al.*, 2008). O estudo de biofilmes microbianos tem recebido significativa atenção ao longo das últimas décadas. Microrganismos associados ao biofilme são fundamentalmente diferentes de populações de células suspensas (Stepanovic, Vukovic *et al.*, 2007).

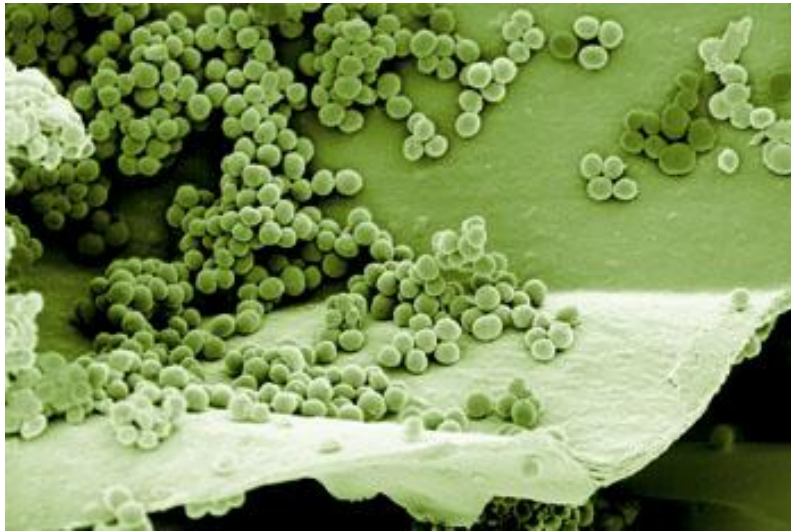


FIGURA 1: Imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* em uma prótese vascular.

Bactérias embebidas no biofilme entram em um estado sésil, o qual pode ser visto como um importante mecanismo de defesa. A matriz extracelular polissacarídica do biofilme protege os microrganismos contra resposta imune do hospedeiro (Dicicco, Neethirajan *et al.*, 2012) e predação por outros organismos (Huq, Whitehouse *et al.*, 2008). Fornece resistência a estresse térmico, força mecânica (Otto, 2004), desinfetantes (Stepanovic, Vukovic *et al.*, 2007) e antimicrobianos.

Bactérias vivendo dentro de um biofilme podem ser altamente resistentes a antimicrobianos que são efetivos contra seus homólogos de vida livre. A concentração inibitória mínima (MIC) para uma bactéria sésil pode ser de 10 a 1000 vezes maior que para sua forma planctônica (Dicicco, Neethirajan *et al.*, 2012). A formação de biofilme contribui para o sucesso da colonização de tecidos hospedeiros, dispositivos médicos e outras superfícies (Otto, 2004), sendo importante em contextos médicos, ambientais e industriais (Stepanovic, Vukovic *et al.*, 2007). A habilidade de formar biofilme é um dos mais

conhecidos fator de virulência em *Staphylococcus* (Saising, Singdam *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de um biofilme ocorre através de um processo complexo e sequencial, que envolve quatro fases e inclui a adesão inicial, acumulação de células, maturação e desprendimento (Figura 2) (Otto, 2004).

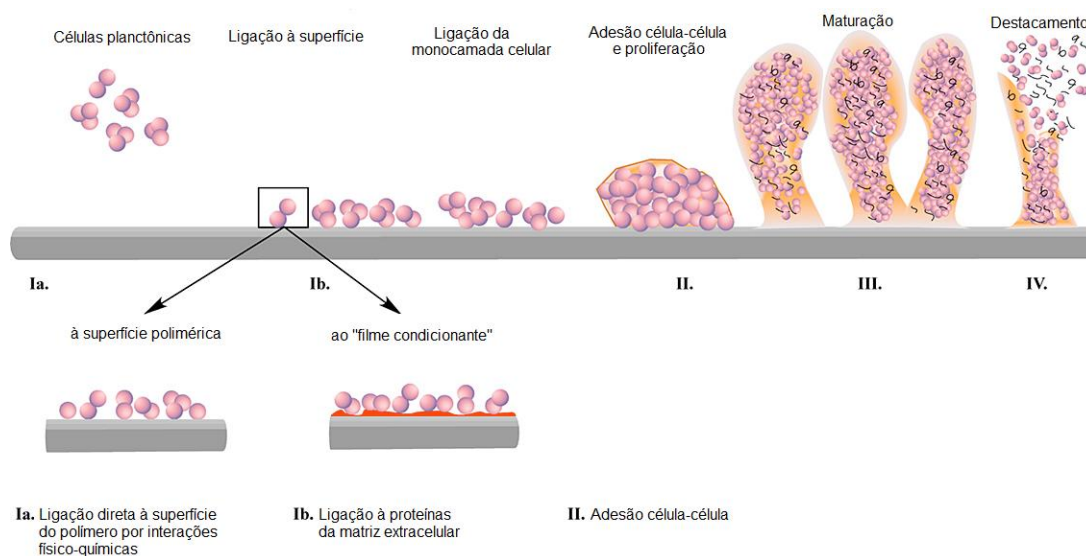


Figura 2: Modelo de formação de biofilme em *Staphylococcus epidermidis*. Os passos incluem ligação à superfície, acumulação, maturação e desprendimento. A ligação inicial pode ocorrer de forma direta à superfície de um polímero ou depender da interação de proteínas ligadoras da bactéria com proteínas do hospedeiro. Adaptado de Otto, 2004.

A adesão da bactéria à superfície é um dos passos iniciais na formação do biofilme e começa quando células bacterianas anexadas a uma superfície secretam uma substância viscosa que serve para ancoragem das células (O'gara e Humphreys, 2001). A adesão bacteriana à superfície é influenciada por diversos fatores, incluindo: características físico-químicas da bactéria, propriedades da superfície do material (composição química, carga da superfície, hidrofobicidade, rugosidade, textura) e fatores ambientais (temperatura, pH, tempo de exposição, concentração bacteriana, tratamento

químico ou presença de antimicrobianos). Propriedades biológicas da bactéria, tais como presença de fímbrias, flagelos e produção de EPS também influenciam na ligação à superfície (Simoès, Simoès *et al.*, 2010).

Adesinas polissacarídicas desempenham papel essencial na aderência bacteriana inicial e na adesão intracelular. Adesina polissacarídica intracelular (PIA) e adesina polissacarídica capsular (PSA) são os principais componentes do EPS em *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. Propõe-se que a aderência inicial seja mediada por PSA e/ou outras proteínas (incluindo autolisinas) e a acumulação de células por PIA (O'gara e Humphreys, 2001). Estudos mostram que o *locus* de adesão intracelular (*ica*), particularmente o gene *icaA*, codifica a produção de PSA e PIA (Hou, Sun *et al.*, 2012)

O segundo passo para formação do biofilme consiste na aglomeração de bactérias em estruturas multicamadas. O principal fator responsável pela formação desse aglomerado de células é o PIA. Após a união de células em camadas, ocorre a maturação do biofilme. O biofilme não é simplesmente uma aglomeração amorfa de células; ele possui uma estrutura bem definida, com canais entre comunidades de células em forma de cogumelos. Tais canais são preenchidos por fluido, possivelmente para entregar nutrientes e retirar resíduos metabólicos. Obviamente, são necessários diversos processos regulatórios para o crescimento desta estrutura e, acredita-se que, o regulador *quorum sensing* desempenhe papel importante nesse processo (Otto, 2004).

O crescimento de um biofilme é relativo à perda causada pelo destacamento e diminuição da manutenção (Boyle, Ford *et al.*, 1991). Eles podem ser dispersos pelo desligamento de células filhas como resultado de

baixos níveis de nutrientes; regulação por *quorum sensing*; remoção contínua de pequenas porções do biofilme devido a efeitos de fluxo ou remoção por forças físicas. Enzimas polissacarídicas específicas do EPS de diferentes organismos podem ser produzidas durante diferentes fases do crescimento dos organismos e auxiliar no desprendimento do biofilme. Esse processo provê um mecanismo para as células migrarem de áreas fortemente colonizadas, onde houve depleção dos nutrientes da superfície, para áreas com melhores condições de crescimento (Donlan, 2002).

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Amostras utilizadas

Oitenta e oito amostras de estafilococos isolados de água do Arroio Dilúvio foram utilizadas neste estudo. As amostras de água haviam sido previamente coletadas em cinco pontos diferentes ao longo do curso do Arroio, desde a sua nascente (Parque Saint´Hilaire – Viamão, RS) até a sua foz (Lago Guaíba – Porto Alegre, RS), durante o ano de 2009 (Figura 3) (Nachtigall, 2011). A metodologia de coleta e isolamento empregadas está descrita no Anexo 1 (ANEXOS).

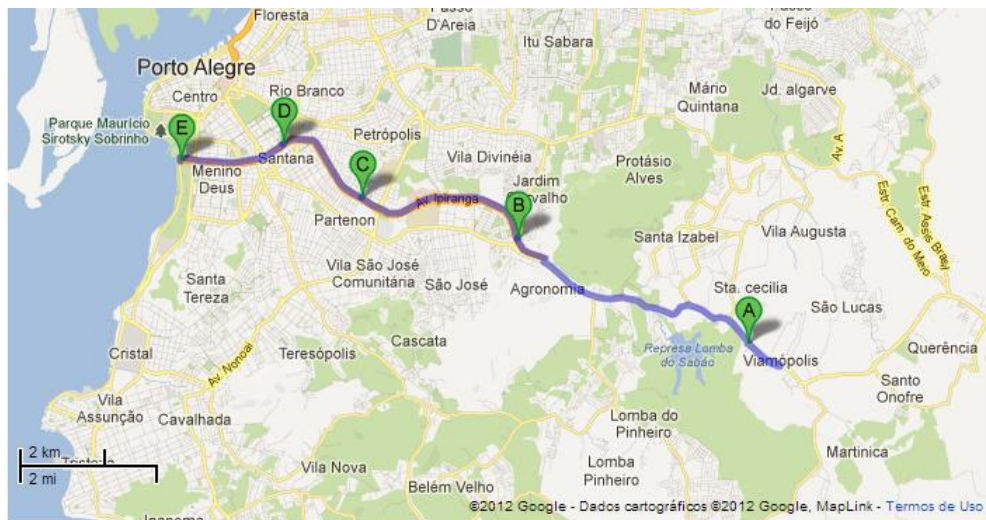


FIGURA 3: Pontos de coleta das amostras de água ao longo do curso do Arroio Dilúvio em Porto Alegre-RS. Ponto A: Nascente do Arroio, Parque Saint´Hilaire. Ponto B: Esquina Avenidas Ipiranga e Antonio de Carvalho. Ponto C: Esquina Avenida Ipiranga e Rua Guilherme Alves. Ponto D: Esquina Avenidas Ipiranga e Ramiro Barcelos. Ponto E: Esquina Avenidas Ipiranga e Borges de Medeiros. Fonte: Google Maps.

Todos os isolados estavam estocados em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI - Oxoid) com de 20% de glicerol sob a temperatura de -20°C. Eles foram anteriormente identificados como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* por apresentarem características morfo-tintoriais de cocos Gram positivos arranjados em cachos, crescimento em Ágar Sal Manitol, produção da enzima catalase e fermentação da glicose na ausência de oxigênio.

3.2 – Reativação das amostras

Para reativação das amostras, 10 µL de cada cultura estoque foram inoculados em 5 mL de caldo BHI e incubados a 35°C durante 24 h. Após o período de incubação, uma pequena alíquota de cultura foi semeada em Ágar Sal Manitol (Himedia) através de esgotamento com alça de platina. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 h e as colônias isoladas e características foram utilizadas para os testes subsequentes.

3.3 – Identificação fenotípica

Para identificar fenotipicamente as espécies de *Staphylococcus* spp., foram empregados testes bioquímicos de acordo com MacFaddin, 2000.

3.3.1 – Teste para detecção da enzima coagulase

A enzima extracelular estafilo-coagulase foi detectada através do teste da coagulase em tubo (coagulase livre), no qual 500 µL de cultura foram adicionados a 500 µL de plasma de coelho reconstituído (NewProv) e incubados a 35°C durante 6 horas. Foram realizadas leituras de 30 em 30 minutos durante todo o período de incubação para verificar a formação de coágulo. Em caso de resultado negativo, as amostras foram mantidas sob 35°C

até 24 h. Os isolados que apresentaram a enzima extracelular estafilo-coagulase foram classificados como estafilococos coagulase positivo (ECoP) e os que não apresentaram como estafilococos coagulase negativo (ECoN).

3.3.2 – Teste de Vogues- Proskauer (VP)

O teste de VP permite detectar a produção de acetoina a partir da degradação da glicose. Para isso, cada cultura foi inoculada em 3 mL de caldo Vermelho de Metila - Voges Proskauer (VM-VP Himedia) e incubada a 35°C por 48 horas. Após a incubação, adicionou-se 3 gotas da Solução I do Reativo de Barritt [Alfa Naftol (6,0 mL), Álcool Etílico 95 % (100 mL q.s.p.)] e 2 gotas da Solução II do Reativo de Barritt [Hidróxido de potássio (16 mL), água destilada (100 mL q.s.p.)]. A solução foi agitada e, após 15 minutos de repouso à temperatura ambiente, visualizou-se a formação de um anel vermelho na superfície do caldo, significando resultado positivo. A ausência do anel indicou resultado negativo.

3.3.3 – Teste de fermentação de açúcares

Para a determinação da capacidade de utilização do manitol, trealose, lactose, frutose, manose e rafinose os isolados foram inoculados em meio contendo 1 mL de água peptonada, 100 µL de indicador de pH [Indicador de Andrade: 5g de Fucsina Ácida, 1 L de água estéril deionizada e 160 mL de NaOH (Synth) 1N] e 0,01 g do açúcar a ser testado. Posteriormente, os tubos foram incubados a 35°C por 24h. A alteração de cor do meio, de amarelo para púrpura, indicou fermentação dos referidos carboidratos, devido à produção de ácidos e consequente redução de pH.

3.3.4 – Teste para detecção da enzima urease

As culturas foram inoculadas em 3 mL de caldo uréia (Vetec) e incubadas a 35°C durante 4 dias. Leituras foram realizadas a cada 24 h. Foram considerados positivos os tubos que alteraram a cor original do meio (de laranja para rosa), devido à alcalinização do mesmo em função da liberação de amônia resultante da degradação de ureia.

3.3.5 – Detecção da redução de nitrato

A capacidade de reduzir nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) pelas amostras bacterianas foi verificada através da detecção de nitrito no meio de cultura. Para isso, as amostras foram inoculadas em Caldo Nitrato (Himedia) e incubadas a 35°C por 24 h. Transcorrido o período de incubação, foi adicionado aos tubos 2 gotas do Reagente de Nitrato A [N,N-Dimetil-alfa-naftilamina (0,6 mL), Ácido Acético 5N (100 mL)], 2 gotas do reagente de Nitrato B [Ácido Sulfanílico (0,8 mg), Ácido Acético 5N (100 mL)] e homogeneizado. O aparecimento de coloração avermelhada, em até 2 minutos, indicou teste positivo. A não alteração da cor do meio indicou a incapacidade do microrganismo em reduzir NO_3^- ou a transformação deste em azoto (N_2). Neste caso, adicionou-se uma pequena quantidade de zinco em pó ao tubo. Se o meio permaneceu inalterado, assumiu-se que a amostra é capaz de reduzir os compostos nitrogenados até N_2 . Se o meio adquiriu a cor marrom, a amostra é negativa para o teste.

3.5.6 – Detecção da enzima oxidase

Este teste é capaz de detectar atividade citocromo-oxidase, através da oxidação do reativo. Para realização da prova, foram utilizadas tiras de papel filtro impregnadas em solução contendo N-N-dimetil-para-fenileno-diamina e

alfa-naftol (NewProv). Primeiramente, as tiras foram umedecidas com água destilada estéril e, em seguida, colônias foram transferidas com ajuda de um palito em madeira para a tira. O aparecimento de coloração púrpura indica positividade do teste.

3.3.7 – Susceptibilidade à Polimixina B e Novobiocina

Os testes de susceptibilidade à Polimixina B (300 µg - NewProv) e Novobiocina (5 µg - NewProv) foram realizados através do método de disco-difusão, o qual será detalhado na sessão 3.4.

3.4 – Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

A susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados foi testada através do método de disco-difusão em ágar (Bauer, Kirby *et al.*, 1966), padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2011). Foram testados os seguintes antimicrobianos (NewProv): oxacilina 1 µg, penicilina 10 U, eritromicina 15 µg, clindamicina 2 µg, sulfazotrim 25 µg, vancomicina 30 µg, cloranfenicol 30 µg, ciprofloxacina 5 µg, gentamicina 10 µg e norfloxacina 10 µg. Culturas diluídas a 0,5 na escala McFarland foram semeadas com *swab* estéril em Ágar Müller-Hinton (Himedia) e discos impregnados com os antimicrobianos supracitados foram aplicados. Após incubação a 35°C por 24h, os halos de inibição foram medidos e interpretados de acordo com as normas do CLSI (2011). A cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo.

3.5 – Extração de DNA total

O DNA total dos isolados foi extraído de acordo com Fredricks e Helman (1998), com algumas modificações. Uma colônia foi semeada em 5 mL de

caldo BHI (Himedia) e incubada sob agitação a 35°C por 18 h. A cultura foi centrifugada por 5 min a 18.000 g e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado 3 vezes com 1 mL de tampão TE-1X [Tris 10 mM (Invitrogen), EDTA 1 mM (Invitrogen) – pH 7,8], ressuspendido em 200 µL do mesmo tampão e adicionado a 60 µg de Lisozima (Sigma), incubando-se a 37°C por 30 minutos. Então, 200 µL de solução TE⁵N [TE 5x, NaCl (Nuclear) 5M], 100 µg de Proteinase K (USB Corporation) e 20 µL de SDS 1% (Promega) foram adicionados à mistura e incubados a 55°C por 1 hora. Em seguida, 30 µL de NaCl 5M e 400 µL de fenol (Isofar) – clorofórmio (Synth) 1:1 foram adicionados. A mistura foi centrifugada a 14.000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Este passo foi repetido três vezes. Então, 400 µL de clorofórmio – álcool isoamílico (Synth) 9:1 foram adicionados à mistura e novamente centrifugados. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado a 1 mL de etanol absoluto, e mantido a -20°C por 18h. Finalmente, a mistura foi centrifugada a 14000 g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 30 µL de TE 1x (Fredricks e Relman, 1998). A quantidade de DNA foi determinada em gel de agarose 0,8% (Invitrogen) corado com brometo de etídio [0,5 µg/mL (Promega)], comparando-se com quantidades conhecidas de lambda DNA (Fermentas). Para a realização das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizadas quantidades de, aproximadamente, 20 ng de DNA.

3.6 – Reação em Cadeia da Polimerase para detecção dos genes das enterotoxinas A (*sea*) e D (*sed*)

As reações foram realizadas segundo Moura e colaboradores, 2012. As amostras foram testadas para a presença dos genes *sea* e *sed* utilizando os pares de *primers* demonstrados na tabela 2. As PCRs foram otimizadas em 25 µL e continham 1 mM MgCl₂ (Invitrogen), 10 pmol de cada *primer* (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 200 µM de desorriboxinucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As amplificações foram realizadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94°C, 40 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 54°C e 45 s a 72°C, a 5 min a 72°C (Moura, Campos *et al.*, 2012).

3.7 – Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex para detecção dos genes das enterotoxinas B (*seb*), C (*sec*) e E (*see*)

As reações foram realizadas segundo Moura e colaboradores, 2012. As amostras foram testadas para a presença dos genes da enterotoxinas B (*seb*), C (*sec*) e E (*see*) utilizando os pares de *primers* demonstrados na tabela 2. As reações da PCR foram otimizadas em 25 µL e continham 3 mM MgCl₂ (Invitrogen), 5 pmol de cada *primer* (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 300 µM de desoxirribonucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As amplificações foram feitas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94°C, 40 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 55°C e 45 s a 72°C, a 5 min a 72°C (Moura, Campos *et al.*, 2012). As seguintes cepas foram utilizadas como controle positivo: ATCC 13565 (*sea*), ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), ATCC 23235 (*sed*) e ATCC 27664 (*see*).

TABELA 2. Descrição dos *primers*, temperaturas de anelamento e tamanho dos produtos relativos aos ensaios de PCR.

| <i>Primers</i> | Sequência Nucleotídica (5' - 3') | Temperatura de Anelamento | Tamanho do Produto |
|------------------|---|---------------------------|--------------------|
| SEA ^a | CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG CTG AAC CTT CCC ATC AAA AAC | 54 °C | 126 bp |
| SEB ^b | GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC TTC GCA TCA AAC TGA CAA ACG | 55 °C | 475 bp |
| SEC ^c | AGA ACT AGA CAT AAA AGC TAG G TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC | 55 °C | 267 bp |
| SED ^d | TTT GGT AAT ATC TCC TTT AAA CG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC CCT ATA GAT AAA GTT AAA ACA AGC | 54 °C | 309 bp |
| SEE ^e | TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC TAA GTC AAA CGT TAA CAT ACG | 55°C | 173 bp |

a: enterotoxina estafilocócica A; b: enterotoxina estafilocócica B; c: enterotoxina estafilocócica C; d: enterotoxina estafilocócica D; e: enterotoxina estafilocócica E.

3.8 – Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação por PCR foram analisados por eletroforese em tampão TAE 1X pH 8,0 (40 mM Tris-HCl, 20 mM acetato de sódio, 1 mM EDTA) em gel de agarose 1,5 % (Invitrogen) corado com brometo de etídio [0,5 µg/mL (Promega)], comparando-se com marcador molecular de 50 pb e 100 pb Ladder (Invitrogen).

3.9 – Formação de biofilme

O ensaio para determinação da capacidade de formação de biofilme pelos isolados foi realizado de acordo com Stepanovic, 2007. Os isolados foram inoculados em Ágar BHI (Oxoid) e cultivados a 35°C durante 24 h. Em uma microplaca de poliestireno com 96 poços de fundo chato (TPP 92096) foram adicionados 180 µL de caldo TSB (Himedia) suplementado com 1% de glicose. Em seguida, foram adicionados 20 µL de inóculo bacteriano ajustado para 0,5 na escala McFarland. A placa foi incubada a 35°C durante 18 h e, em

seguida, as células suspensas (ou planctônicas) foram retiradas e os poços lavados três vezes com 200 µL de solução salina estéril. As células bacterianas aderidas à superfície polimérica da placa foram fixadas com 150 µL de metanol absoluto durante 20 minutos. Transcorrido esse tempo, o metanol foi retirado e a placa foi seca a temperatura ambiente durante 30 minutos.

As células bacterianas aderidas foram coradas com cristal violeta 0,5% durante 15 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente. Após o período de secagem de 24 h, o cristal violeta foi eluído em etanol 95% durante 30 minutos e quantificado através da densidade óptica (DO) a 450 nm, medida em leitor de microplacas (EZ Reader 400). A cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, classificada como forte formadora de biofilme, foi usada como controle positivo e caldo TSB (Himedia) com glicose como controle negativo.

A interpretação das leituras obtidas foi realizada como descrito por Stepanovic, 2007. Primeiramente, foi calculada a média das DO das amostras e controles, sendo seis replicatas. Então, o valor de *cut-off* (DOc) foi calculado através da seguinte fórmula:

$DOc = \text{média da DO controle negativo} + 3 \times \text{desvio padrão do controle negativo}$. O valor final de DO das amostras testadas (DOf) é dado por $DOf = \text{média da DO de cada amostra} - DOc$.

As amostras foram divididas em categorias, da seguinte forma:

$DOf \leq DOc$ = não formadora de biofilme;

$DOc < DOf \leq 2 \times DOc$ = fraca formadora de biofilme;

$2 \times DOc < DOf \leq 4 \times DOc$ = moderada formadora de biofilme;

$4 \times DOc < DOf$ = forte formadora de biofilme.

4 – RESULTADOS

4.1 – Identificação fenotípica

Todos os 88 estafilococos selecionados apresentaram crescimento no meio Ágar Sal Manitol. A partir do teste da coagulase em tubo realizado, 94,32% (83/88) dos isolados não reagiram com o plasma de coelho, sendo classificados como Estafilococos Coagulase Negativa (ECoN). Apenas 5,68% (5/88) dos isolados apresentaram a capacidade de reagir com o plasma de coelho e foram classificados como Estafilococos Coagulase Positiva (ECoP).

De acordo com os resultados dos testes bioquímicos, os ECoN foram classificados dentro de 11 espécies, sendo *Staphylococcus conhii* (25/80) a espécie mais prevalente, seguida de *S. haemolyticus* (18/80), *S. saprophyticus* (8/80), *S. carnosus* (4/80), *S. hominis* (3/80), *S. muscae* (2/80), *S. gallmarium* (2/80), *S. caprae* (2/80), *S. cromogenes* (2/80), *S. felis* (1/80) e *S. lentus* (1/80). Apenas um isolado não pôde ser identificado em nível de espécie e oito isolados foram enquadrados dentro de duas possíveis espécies [*S. psifermentans*/*S. pasteurii* (3/80) e *S. sciuri*/*S. vitulus* (5/80)]. Os ECoP foram classificados dentro de 3 espécies: *S. aureus* subsp. *aureus* (1/5), *S. delphini* (1/5) e *S. intermedius* (1/5). Três ECoP (3/5) não foram classificados em nível de espécie. Todos os testes utilizados para identificação fenotípica dos

isolados e seus respectivos resultados estão sumarizados no Anexo 2 (ANEXOS).

Ao comparar o número de isolados obtidos em cada ponto de coleta, pode-se observar que no ponto A, localizado próximo a nascente do Arroio, não foi isolado nenhum *Staphylococcus* spp. Por outro lado, no ponto C, onde o Arroio Dilúvio está canalizado e encontra-se em áreas densamente urbanizadas, cercado de hospitais, obteve-se a maior diversidade de isolados, sendo a maior parte *S. cohnii*. De forma geral, os pontos B, D e E apresentaram equivalência na diversidade de espécies (Tabela 3).

TABELA 3: Distribuição das espécies de *Staphylococcus* spp. entre os pontos de coleta do Arroio Dilúvio.

| Espécie | Total | Número de isolados por ponto de coleta | | | | |
|---|-----------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | Ponto A | Ponto B | Ponto C | Ponto D | Ponto E |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | 3 | - | - | - | 3 | - |
| <i>S. cohnii</i> | 25 | - | 6 | 10 | 5 | 4 |
| <i>S. haemolyticus</i> | 18 | - | 6 | 6 | 3 | 3 |
| <i>S. saprophyticus</i> | 8 | - | 2 | - | 2 | 4 |
| <i>S. carnosus</i> | 10 | - | 1 | 2 | 2 | 5 |
| <i>S. hominis</i> | 3 | - | - | - | 1 | 2 |
| <i>S. muscae</i> | 2 | - | 1 | 1 | - | - |
| <i>S. gallinarum</i> | 2 | - | - | 1 | 1 | - |
| <i>S. caprae</i> | 2 | - | - | 2 | - | - |
| <i>S. chromogenes</i> | 2 | - | 1 | 1 | - | - |
| <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> | 1 | - | - | 1 | - | - |
| <i>S. delphini</i> | 1 | - | - | - | 1 | - |
| <i>S. intermedius</i> | 1 | - | - | - | - | 1 |
| <i>S. felis</i> | 1 | - | - | - | 1 | - |
| <i>S. lentus</i> | 1 | - | 1 | - | - | - |
| <i>S. psifermentans</i> / <i>S. pasteurii</i> | 3 | - | - | - | 1 | 2 |
| <i>S. sciuri</i> / <i>S. vitulus</i> | 5 | - | 2 | 1 | 2 | - |
| Total | 88 | 0 | 20 | 25 | 22 | 21 |

Ponto A: Nascente do Arroio, Parque Saint-Hilaire. **Ponto B:** Esquina Avenidas Ipiranga e Antonio de Carvalho. **Ponto C:** Esquina Avenida Ipiranga e Rua Guilherme Alves. **Ponto D:** Esquina Avenidas Ipiranga e Ramiro Barcelos. **Ponto E:** Esquina Avenidas Ipiranga e Borges de Medeiros.

4.2 – Resistência a antimicrobianos

A tabela 4 apresenta o perfil de resistência dos isolados encontrado para cada antimicrobiano testado. Foi observada elevada frequência de isolados resistentes à penicilina (27,27%), eritromicina (14,77%) e oxacilina (11,36%). Pelo menos um isolado apresentou resistência para cada antimicrobiano testado, com exceção da vancomicina, gentamicina e ciprofloxacina. Em parâmetros gerais, 40,9% dos isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, 7,8% apresentaram resistência a duas classes de antimicrobianos e 2,7% a 3 ou 4 classes. Isolados resistentes a duas ou mais classes foram classificados como multirresistentes e totalizaram 10,2%.

TABELA 4: Número de isolados de cada espécie que apresentou perfil de resistência a antimicrobianos.

| Espécie | Número de isolados resistentes por antimicrobiano | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|---|------------------------------|---|---|--|-------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| | OXA | PEN | ERI | CLI | SUT | VAN | CLO | CIP | GEN | NOR |
| <i>Staphylococcus spp.</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. conhii</i> | - | 5 | 1/6 ^a | 1 ^b | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. haemolyticus</i> | 5 | 6 | 3/2 ^a | 1/2 ^b | 3 | - | 1 | - | - | 1 ^d |
| <i>S. saprophyticus</i> | - | 1 | 3 | - | 1 ^c | - | 1 | - | - | - |
| <i>S. carnosus</i> | 2 | 4 | 2/5 ^a | 4 ^b | 1 | - | 2 | - | - | - |
| <i>S. hominis</i> | 1 | 2 | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - |
| <i>S. muscae</i> | - | - | 1 ^a | - | - | - | - | - | - | 1 ^d |
| <i>S. gallmarium</i> | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - |
| <i>S. caprae</i> | 1 | 1 | 1 ^a | 1 | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. cromogenes</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. aureus subsp. aureus</i> | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. delphini</i> | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. intermedius</i> | - | 1 | 1 ^a | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. felis</i> | - | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. lentus</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. psifermentans/S. pasteurii</i> | 1 | 1 | 2 ^a | 1 ^b | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri/S. vitulus</i> | - | 1 | 1/2 ^a | - | - | - | - | - | - | - |
| Total | 10 (11,36%) | 24 (27,27%) | 13/20^a (14,77%) | 3/8^b (3,4%) | 5/1^c (5,68%) | 0 (0%) | 5 (5,68%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 2^d (0%) |

OXA: oxacilina 1 µg; PEN: penicilina 10 UI; ERI: eritromicina 15 µg; CLI: clindamicina 10 µg; SUT: trimetoprim – sulfametoxazol 25 µg; ; VAN: vancomicina 30 µg; CLO: cloranfenicol 30 µg; CIP: ciprofloxacina 5 µg; GEN: gentamicina 10µg; CLI: clindamicina 2 µg; NOR: norfloxacina 10 µg.

^a: resistência intermediária a eritromicina; ^b: resistência intermediária a clindamicina; ^c: resistência intermediária a trimetoprim – sulfametoxazol; ^d: resistência intermediária a norfloxacina.

Na tabela 5 estão demonstrados os dados obtidos em relação à distribuição dos microrganismos resistentes em cada ponto de coleta. A maior ocorrência de isolados resistentes foi no ponto D (95,45%), seguido pelo ponto C (80%). Os pontos B e E apresentaram frequências semelhantes de microrganismos resistentes (em torno de 45%). A penicilina foi o antimicrobiano com maior frequência de resistência em todos os pontos de coleta analisados.

TABELA 5: Distribuição dos isolados resistentes a antimicrobianos entre os pontos de coleta do Arroio Dilúvio.

| Antimicrobianos | Número de isolados resistentes por ponto de coleta | | | | |
|-----------------|--|--|--|--|---|
| | Ponto A | Ponto B | Ponto C | Ponto D | Ponto E |
| Oxacilina | - | 1 | 5 | 3 | 1 |
| Penicilina | - | 4 | 8 | 9 | 3 |
| Eritromicina | - | 3/3 ^a | 2/6 ^a | 4/4 ^a | 4/7 ^a |
| Clindamicina | - | 1/1 ^b | 1/3 ^b | 1/2 ^b | 2 ^b |
| Sulfazotrim | - | - | 3 | 2 | 1 ^c |
| Vancomicina | - | - | - | - | - |
| Cloranfenicol | - | - | 1 | 2 | 2 |
| Ciprofloxacina | - | - | - | - | - |
| Gentamicina | - | - | - | - | - |
| Norfloxacina | - | - | 2 ^d | - | - |
| Total | 0 (0%) | 9/4^{a,b} (45%) | 20/11^{a,b,d} (80%) | 21/6^{a,b} (95,45%) | 10/10^{a,b,c} (47,61%) |

Ponto A: Nascente do Arroio, Parque Saint-Hilaire. **Ponto B:** Esquina Avenidas Ipiranga e Antonio de Carvalho. **Ponto C:** Esquina Avenida Ipiranga e Rua Guilherme Alves. **Ponto D:** Esquina Avenidas Ipiranga e Ramiro Barcelos. **Ponto E:** Esquina Avenidas Ipiranga e Borges de Medeiros.

^a: resistência intermediária a eritromicina; ^b: resistência intermediária a clindamicina; ^c: resistência intermediária a trimetoprim – sulfametoxazol; ^d: resistência intermediária a norfloxacina.

4.3 – Enterotoxinas Estafilocócicas

Dos 88 isolados testados, 32 (36,36%) foram positivos para um ou mais genes de enterotoxinas (Tabela 6). O gene *sec* foi o mais prevalente, estando presente em 21,59% dos isolados, seguido por *sea* (7,95%), *sed* (3,4%), *see* (3,4%) e *seb* (2,27%). Duas cepas de *Staphylococcus conhii*. foram positivas para mais de um gene de *se*. Nenhuma espécie apresentou todos os genes de enterotoxinas simultaneamente e a espécie que englobou o maior número de

genes foi *S. conhii*. A figura 4 mostra o perfil de bandas observado a partir da amplificação dos genes que codificam as enterotoxinas clássicas.

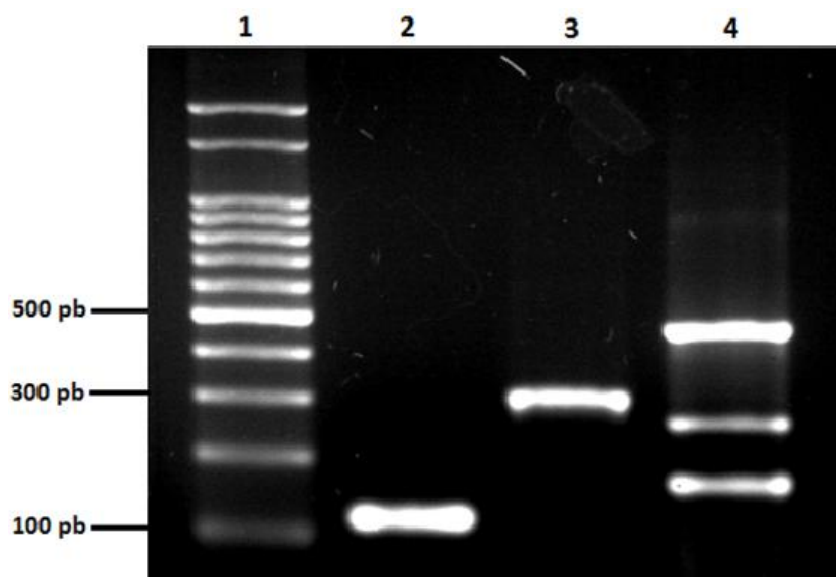


FIGURA 4: Perfil de amplificação dos genes das enterotoxinas. L1: marcador de peso molecular; L2: *sea*; L3: *sed*; L4: *seb*, *sec* e *see*.

TABELA 6: Número de isolados que apresentaram genes de enterotoxinas por espécie.

| Espécie | Presença de genes de enterotoxinas | | | | | | |
|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | <i>sea</i> | <i>seb</i> | <i>sec</i> | <i>sed</i> | <i>See</i> | <i>sec+see</i> | <i>sed+see</i> |
| <i>Staphylococcus spp.</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. conhii</i> | 3 | - | 12 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| <i>S. haemolyticus</i> | 1 | 1 | 3 | 1 | - | - | - |
| <i>S. saprophyticus</i> | - | - | 1 | - | - | - | - |
| <i>S. carnosus</i> | 2 | - | 1 | - | 1 | - | - |
| <i>S. hominis</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. muscae</i> | - | - | - | 1 | - | - | - |
| <i>S. gallinarum</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. caprae</i> | 1 | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. chromogenes</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. aureus subsp. aureus</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. delphini</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. intermedius</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. felis</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. lentus</i> | - | - | 1 | - | - | - | - |
| <i>S. psifermentans/S. pasteurii</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri/S. vitulus</i> | - | 1 | 1 | - | - | - | - |
| Total | 7/88 (7,95%) | 2/88 (2,27%) | 19/88 (21,59%) | 3/88 (3,4%) | 3/88 (3,4%) | 1/88 (1,13%) | 1/88 (1,13%) |

No ponto C foi detectada a presença de todos os genes das enterotoxinas; no ponto B os genes para enterotoxinas *seb*, *sec* e *sed*; no ponto D os genes para enterotoxinas *sea*, *sec* e *see* e no ponto E os genes para enterotoxinas *sea* e *see*. Os pontos D e E apresentaram distribuições muito próximas dos genes *se*. Tais dados estão descritos na tabela 7.

TABELA 7: Distribuição dos genes das enterotoxinas entre os pontos de coleta do Arroio Dilúvio.

| SEs | Número de isolados com genes SEs por ponto de coleta | | | | |
|--------------|--|------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Ponto A | Ponto B | Ponto C | Ponto D | Ponto E |
| <i>sea</i> | - | - | 2 | 1 | 4 |
| <i>seb</i> | - | 1 | 1 | - | - |
| <i>sec</i> | - | 11 | 5 | 3 | - |
| <i>sed</i> | - | 1 | 2 | - | - |
| <i>see</i> | - | - | 1 | 1 | 1 |
| Total | 0/0 (0%) | 13/20 (65%) | 11/25 (44%) | 5/22 (22,72%) | 5/21 (23,80%) |

Ponto A: Nascente do Arroio, Parque Saint-Hilaire. **Ponto B:** Esquina Avenidas Ipiranga e Antonio de Carvalho. **Ponto C:** Esquina Avenida Ipiranga e Rua Guilherme Alves. **Ponto D:** Esquina Avenidas Ipiranga e Ramiro Barcelos. **Ponto E:** Esquina Avenidas Ipiranga e Borges de Medeiros.

SEs: enterotoxinas estafilocócicas

4.4 – Formação de biofilme em microplaca

Os isolados de *Staphylococcus* foram avaliados quanto à capacidade de formação de biofilme *in vitro* através da adesão em placas de poliestireno. Dos 88 isolados analisados, dez apresentaram capacidade de formar biofilme; destes, dois foram classificadas como fortes formadores (1 *S. carnosus* e 1 *S. haemolyticus*); dois como moderados formadores (1 *S. cohnii* e 1 *S. saprophyticus*) e seis como fracos formadores (2 *S. sciuri/S. vitulus*, 2 *S. haemolyticus*, dois *S. cohnii*).

TABELA 8: Distribuição dos estafilococos formadores de biofilme entre as espécies encontradas.

| Biofilme | Número de isolados formadores de biofilme por espécie | | | | |
|-------------------|---|------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------|
| | <i>S. carnosus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. conii</i> | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. sciuri/ S. vitulus</i> |
| Forte formador | 1 | 1 | - | - | - |
| Moderado formador | - | - | 1 | 1 | - |
| Fraco formador | - | 2 | 2 | - | 2 |
| Total | 1/10 (10%) | 3/10 (30%) | 3/10 (30%) | 1/10 (10%) | 2/10 (20%) |

Quando comparada a capacidade de formação de biofilme dos isolados e o ponto de coleta, observou-se que nos pontos B e E, estavam as duas cepas fortes formadoras. Todas as cepas moderadas foram isoladas do ponto B. Dentre as 6 amostras fracas formadoras de biofilme, 4 foram isoladas no ponto B e 2 no ponto C de coleta de água (Tabela 9).

TABELA 9: Distribuição dos estafilococos formadores de biofilme entre os pontos de coleta do Arroio Dilúvio.

| Biofilme | Número de isolados formadores de biofilme por ponto de coleta | | | | |
|-------------------|---|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Ponto A | Ponto B | Ponto C | Ponto D | Ponto E |
| Forte formador | - | 1 | - | - | 1 |
| Moderado formador | - | 2 | - | - | - |
| Fraco formador | - | 4 | 2 | - | - |
| Total | 0/0 (0%) | 7/20 (35%) | 2/25 (8%) | 0/22 (0%) | 1/21 (4%) |

Ponto A: Nascente do Arroio, Parque Saint-Hilaire. **Ponto B:** Esquina Avenidas Ipiranga e Antonio de Carvalho. **Ponto C:** Esquina Avenida Ipiranga e Rua Guilherme Alves. **Ponto D:** Esquina Avenidas Ipiranga e Ramiro Barcelos. **Ponto E:** Esquina Avenidas Ipiranga e Borges de Medeiros.

5 – DISCUSSÃO

5.1 – Identificação fenotípica

Staphylococcus são bactérias ubíquas, descritas como parte da microbiota normal do ar, solos, água, humanos e outros animais, além de produtos alimentares. Sua estrutura celular de cocos Gram-positivos é responsável por uma alta tolerância à desidratação e baixa atividade de água, o que explica, em parte, sua ampla distribuição e persistência no ambiente (Kloos, Schleifer *et al.*, 1992). No presente estudo foram analisados 88 estafilococos isolados de água proveniente do Arroio Dilúvio, em Porto Alegre. Destes, 94,32% (83/88) foram classificados como Estafilococos Coagulase Negativa (ECoN) e 5,68% (5/88) como Estafilococos Coagulase Positiva (ECoP). Estudos semelhantes realizados em águas residuais também mostram alta prevalência de isolados ECoN. Serapicos (2008) encontrou 97,4% (38/39) de ECoN e Faria e colaboradores (2009) reportou uma frequência de 98,3% (238/242) isolados coagulase negativa.

Observou-se elevada frequência das espécies *Staphylococcus cohnii*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus* nas amostras de água do Arroio Dilúvio, a qual pode ser justificada pela origem dessa água. O Arroio recebe esgoto cloacal da cidade, com escoamento de dejetos advindos tanto de áreas residenciais da cidade quanto de hospitais, o que faz com que haja descarga de

microrganismos dessas espécies, reconhecidas como patógenos oportunistas envolvidas em infecções de trato urinário (Orrett, 1998).

Essa predominância de espécies de estafilococos coagulase negativa também foi encontrada por Serapicos (2008), que demonstrou uma maior frequência de *S. saprophyticus*/*S. xylosus* em amostras de águas residuais e tratadas, em Portugal. Outras espécies encontradas em águas residuais foram *S. conhii*, *S. pettenkoferi*, *S. haemolyticus* e *S. succinus* e, em águas tratadas, *S. arlettae*, *S. equorum* e *S. aureus* (Serapicos, 2008). Resultados semelhantes foram descritos por Faria e colaboradores (2009), sendo as espécies prevalentes em águas residuais *S. saprophyticus* e *S. xylosus*; em uma planta tratamento de água *S. epidermidis* e *S. pasteurii* e em uma rede de distribuição de água *S. epidermidis*, *S. capitis* e *S. pasteurii* (Faria, Vaz-Moreira *et al.*, 2009).

Alguns estudos avaliando a presença de estafilococos em amostras de águas demonstram resultados diferentes ao observado no presente trabalho. Nestes estudos, *Staphylococcus aureus* foi a espécie predominantemente isolada, tanto em amostras de água do mar em Israel (Yoshpepurer e Golderman, 1987) e no Líbano (Harakeh, Yassine *et al.*, 2006), quanto em água potável em áreas rurais nos Estados Unidos (Lechevallier e Seidler, 1980).

Houve diferenças em relação à quantidade de isolados e espécies encontradas nos diferentes pontos de coleta de água no Arroio Dilúvio. No ponto A não foi isolado nenhum estafilococo. Esse ponto está localizado dentro do Parque Saint´Hilaire, onde a água do arroio está isenta do despejo de

esgoto e da ação antrópica. Já no ponto C, situado entre a Avenida Ipiranga e Rua Guilherme Alves, foi encontrado o maior número de isolados (25/88). Essa área do Arroio é densamente urbanizada, englobando diversas vilas (Morro da Cruz, Morro da Tuca e João Pessoa), edifícios residenciais e comerciais. Também inclui o prédio Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) – Lacen, o que faz com que haja grandes despejos de efluentes no arroio.

Nos pontos B, C e D a espécie mais frequentemente isolada foi *Staphylococcus cohnii*. Essa espécie pode ser encontrada no ambiente hospitalar, inclusive na pele e cavidade nasal de pacientes e médicos (Szewczyk e Rózska, 2000; Mak, Maszewska *et al.*, 2008). Atualmente, tem sido reportado como um patógeno oportunista, causador de infecções nosocomiais, como bacteremias (Okudera, Kobayashi *et al.*, 1991; Fernandes, Tm *et al.*, 1996; Basaglia, Moras *et al.*, 2003), meningites (Okudera, Kobayashi *et al.*, 1991), endocardites, pneumonias, infecções do trato urinário, abscessos cerebrais, artrites sépticas, entre outras (D'azevedo, Antunes *et al.*, 2008). Desta forma, a presença de *S. cohnii* na água é facilmente justificada, uma vez que há o despejo de efluentes provenientes de hospitais encontrados na área.

No ponto E houve predomínio de *Staphylococcus hominis*, o qual é comumente encontrado em amostras clínicas, principalmente isoladas de pele humana. *S. hominis* não é usualmente causador de doença em humanos, mas vem sendo reconhecido como patógeno oportunista e nosocomial, podendo causar infecções em pacientes imunocomprometidos. Estudos já demonstraram a presença de *S. hominis* em endocardite infecciosa,

endoftalmite (Jiang, Zheng *et al.*, 2012) e infecções do urinarias (Orrett, 1998). Apesar deste ponto de coleta localizar-se próximo ao deságue do Arroio no Lago Guaíba e não receber efluentes hospitalares diretamente, ele recebe o acúmulo de água contaminada dos pontos anteriores. Isso pode justificar a presença de microrganismos oriundos do ambiente hospitalar, os quais são excretados pelos pacientes contaminados e liberados na rede de esgoto.

5.2 – Resistência a antimicrobianos

A análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos mostrou que 43,18% dos isolados apresentaram fenótipo de resistência a pelo menos um antimicrobiano testado. Isolados resistentes a penicilina, (27,27%), eritromicina (14,77%) e oxacilina (11,33%) foram os mais frequentemente detectados entre as amostras. No presente estudo todos os isolados foram susceptíveis a vancomicina, gentamicina e ciprofloxacina. Os dez antibióticos eleitos para os testes de susceptibilidade realizados nesse estudo são as drogas preferencialmente usadas para tratamento de infecções estafilocócicas na clínica (CLSI, 2011).

Uma grande parte dos antibióticos consumidos pela comunidade acaba em águas residuais e podem exercer uma pressão seletiva nesses locais. Bactérias resistentes aos antibióticos e genes de resistência a antibióticos são geralmente detectadas em águas residuais, muitas vezes em taxas mais elevadas do que nas águas de superfície. Águas residuais também podem proporcionar condições favoráveis para o crescimento de uma comunidade diversa de bactérias, o que constitui uma base para a seleção e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos.

Estudos anteriores também reportam a presença de estafilococos resistentes em águas residuais. Serapicos (2008) observou uma alta frequência de resistência a lincomicina, eritromicina e clindamicina; baixa frequência de isolados resistentes a penicilina e nenhum microrganismo resistente a vancomicina (Serapicos, 2008). Faria e colaboradores (2009) também não encontraram fenótipo de resistência a vancomicina e somente intermediários para ciprofloxacina, sendo resistência a eritromicina o fenótipo mais frequentemente observado.

Em água do mar, água doce e sedimento na costa do Líbano, também se observou a existência de estafilococos resistentes a antimicrobianos, sendo que 51% das bactérias estudadas foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados (Harakeh, Yassine *et al.*, 2006). Isolados de estafilococos multirresistentes também foram encontrados em água potável em Lahore, Paquistão e Estados Unidos (Armstrong, Shigeno *et al.*, 1981; Samra, Naseem *et al.*, 2009).

Os microrganismos resistentes a antimicrobianos entram no ambiente, em parte, através de dejetos de animais e humanos. As bactérias do trato gastrointestinal são capazes de espalhar seus genes para microrganismos indígenas da água. Além disso, muitos antibióticos de origem industrial circulam no ambiente aquático, potencialmente alterando os ecossistemas microbianos (Baquero, Martinez *et al.*, 2008).

Em relação aos pontos de coleta analisados, a maior ocorrência de isolados resistentes foi nos pontos D (95,45%) e C (80%). Próximos desses pontos situam-se a Faculdade de Farmácia da UFRGS, onde funciona um laboratório de análises clínicas e o Hospital Ernesto Dorneles. Esses pontos podem estar funcionando como fonte de despejo de microrganismos resistentes na água, ou de antibióticos que são excretados na urina dos pacientes medicados. Os pontos B e E apresentam frequência menor de resistência, pois estão localizados em áreas mais afastadas de hospitais e centros de saúde, apesar de serem densamente habitadas. A penicilina foi o antimicrobiano com maior frequência de resistência em todos os pontos de coleta analisados. A propagação de resistência à penicilina ocorre, primeiramente, pela propagação de linhagens resistentes, considerando que o gene da β -lactamase está inserido em um plasmídeo. Ademais, o aumento de espécies bacterianas resistentes a antimicrobianos deve-se ao uso extensivo e, muitas vezes inapropriado, de antibióticos; à utilização desses agentes como promotor de crescimento animal e ao cruzamento de bactérias resistentes através das barreiras geográficas (Lowy, 2003).

5.3 – Enterotoxinas Estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são os principais agentes de intoxicação de origem bacteriana no homem e têm sido relatadas em diversos surtos de doenças de veiculação alimentar (Lamaita, Cerqueira *et al.*, 2005). Todos os cinco genes das SEs puderam ser detectados no presente trabalho, sendo 40,9% (36/88) dos ECoN positivos para um ou mais genes testados. Devido ao fato de esse ser o primeiro estudo abordando a presença de genes

de enterotoxinas em estafilococos isolados de águas residuais, os dados obtidos foram comparados com trabalhos que avaliam a presença das SEs em alimentos.

Estudos recentes têm mostrado que ECoN possuem genes de enterotoxinas e podem produzi-las. Veras e colaboradores (2008) mostraram a presença de genes de enterotoxinas em estafilococos isolados de produtos lácteos oriundos de surtos (Veras, Do Carmo *et al.*, 2008). O mesmo genótipo foi observado em amostras de morcilhas artesanais (De Moura, Campos *et al.*, 2012); produtos cárneos e derivados de leite (Da Cunha, Peresi *et al.*, 2006); queijo minas (Mores Rall, Sforcin *et al.*, 2010); leite e queijo de cabra (Rozand, Mazuy *et al.*, 1996) e diferentes tipos de alimentos (Zell, Resch *et al.*, 2008).

Por outro lado, alguns trabalhos reportam a ausência de enterotoxinas em ECoN. Rosec e colaboradores (2002) analisaram 332 estafilococos isolados de alimentos e detectaram que nenhum deles apresentava os genes das enterotoxinas clássicas (Rosec e Gigaud, 2002). Setenta e nove cepas de estafilococos isolados de produtos lácteos na França, também não apresentaram genes das SEs (Ruaro, Andrighetto *et al.*, 2013). O mesmo foi observado por Blaiotta e colaboradores (2004), em um estudo que avaliou 109 isolados de 10 diferentes tipos de alimentos (Blaiotta, Ercolini *et al.*, 2004).

Nos estafilococos provenientes de águas do Arroio Dilúvio o gene *sec* foi o mais prevalente, sendo detectado em 21,59% dos isolados. A enterotoxina SEC está relacionada com fontes animais (Pinchuk, Beswick *et al.*, 2010), o que justifica o aparecimento do seu gene nos isolados provenientes de águas do Arroio Dilúvio, onde vivem animais como peixes, aves, tartarugas.

Em relação aos pontos de coleta, os pontos B e C apresentaram a maior frequência de genes SE. O ponto B apresentou maior porcentagem de isolados com gene da enterotoxina tipo C (65%). No ponto C todas as enterotoxinas foram detectadas. Ambos os pontos sofrem ação do homem, através do descarte inadequado de lixo, alimentos contaminados, esgoto, carcaça de animais, podendo ser essas as fontes das enterotoxinas nas amostras de águas. Estafilococos enterotoxigênicos presentes em alimentos podem também transferir os seus genes através de plasmídeos para os microrganismos autóctonos do Arroio Dilúvio.

5.4 – Formação de biofilme em microplaca

No presente estudo uma baixa frequência dos isolados apresentaram capacidade de formar biofilme (11,36%) e esta característica foi observada nas espécies *Staphylococcus carnosus*, *S. haemolyticus*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus* e *S. sciuri/ S. vitulus*. Deve-se considerar que esses isolados foram obtidos a partir de água coletada da superfície do Arroio Dilúvio, a qual não favorece a formação de biofilme, ao contrário do que é esperado para microrganismos encontrado no fundo e margens do local.

A água proveniente do Arroio Dilúvio é liberada no Lago Guaíba, onde é captada e tratada para abastecimento da população de Porto Alegre (Dmae, 2012). Essa água, embora tratada, pode estar sujeita a condições deteriorantes durante armazenamento e distribuição (Momba, Kfir *et al.*, 2000). Mesmo que a maior parte das bactérias seja eliminada no tratamento, as células restantes irão entrar no sistema de distribuição e se tornar protegidas; aderir à superfície do cano e se multiplicar a partir de substâncias biodegradáveis (Flemming,

2002). Bactérias crescendo em biofilmes, ligadas à superfície de canos e reservatórios, podem formar a principal biomassa metabolicamente ativa nesses locais (Vanderkooij, Veenendaal *et al.*, 1995). Por essas razões, é importante detectar a presença de bactérias com potencial de formar biofilme na água do Arroio Dilúvio, mesmo que em número reduzido.

Estima-se que 95% da biomassa formada em um sistema de distribuição estão localizadas nas paredes dos canos e apenas 5% está na água (Wingender e Flemming, 2004). Duas características principais dos biofilmes são importantes para bioincrustação em tubulações: estabilidade mecânica da EPS, a qual faz necessária um extensivo processo de limpeza dos tubos e o aumento da resistência dos organismos do biofilme a biocidas, que pode ser de duas a três ordens de magnitude maior que células suspensas (Flemming, 2002). As bactérias inseridas nos biofilmes podem afetar a qualidade da água potável nos sistemas de distribuição, servindo de nutrientes para desenvolvimento de organismos maiores; alterando a turbidez, sabor, odor e coloração da água (Hallam, West *et al.*, 2001); acelerando fenômenos de corrosão da tubulação (Momba, Kfir *et al.*, 2000); além de liberar bactérias patogênicas da parede dos tubos e reservatórios na água potável durante distribuição (Vanderkooij, Veenendaal *et al.*, 1995).

6 – CONCLUSÕES

No presente estudo, foi possível classificar os estafilococos isolados de água do Arroio Dilúvio como ECoP ou ECoN, sendo que a grande maioria pertence ao último grupo. Além disso, foi possível identificar esses isolados em nível de espécie, sendo *S. cohnii*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus* as espécies mais frequentes.

A avaliação do perfil de resistência dos isolados a dez antimicrobianos foi satisfatória. Foi observada uma alta frequência de isolados resistentes à penicilina, eritromicina e oxacilina. Todos os isolados foram susceptíveis a vancomicina, gentamicina e ciprofloxacina.

A técnica de PCR foi uma ferramenta precisa para a avaliação da prevalência de SEs dentre os isolados. As reações de PCR multiplex foram especialmente úteis na identificação rápida destes genes, pois, em uma mesma reação, três genes foram avaliados. Uma alta prevalência de genes de enterotoxinas clássicas foi encontrada neste estudo, sendo *sec* o gene mais prevalente.

A técnica utilizada para quantificação da formação de biofilme *in vitro* foi acertada, pois permitiu classificar os isolados em diferentes categorias de acordo com a capacidade de produzir biofilme. Grande parte dos isolados foi categorizada como não formadores e apenas dois isolados são forte formadores de biofilme.

7 – PERSPECTIVAS

Avaliar a expressão dos genes de enterotoxinas através da técnica de PCR quantitativo, e assim, demonstrar que isolados de estafilococos coagulase negativa podem também ser considerados enterotoxigênicos.

Avaliar a formação de biofilme através da detecção de genes envolvidos no processo usando a técnica de PCR e, desta forma, correlacionar fenótipo e genótipo. Possíveis genes a serem investigados são os constituintes do *cluster* gênico ica, o qual contém todos os componentes necessários para a produção de adesinas polissacarídicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, J. L. et al. **ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA IN DRINKING WATER.** Applied and Environmental Microbiology, v. 42, n. 2, p. 277-283, 1981.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. **STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS.** International Journal of Food Microbiology, v. 61, n. 1, p. 1-10, Oct 1 2000.

BAQUERO, F.; MARTINEZ, J.-L.; CANTON, R. **ANTIBIOTICS AND ANTIBIOTIC RESISTANCE IN WATER ENVIRONMENTS.** Current Opinion in Biotechnology, v. 19, n. 3, p. 260-265, Jun 2008.

BASAGLIA, G. et al. ***Staphylococcus cohnii* SEPTICAEMIA IN A PATIENT WITH COLON CANCER.** Journal of Medical Microbiology, v. 52, n. 1, p. 101-102, Jan 2003.

BAUER, A. W. et al. **ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING BY A STANDARDIZED SINGLE DISK METHOD.** American Journal of Clinical Pathology, v. 45, n. 4, p. 493-&, 1966.

BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. J. **GENETIC AND MOLECULAR ANALYSES OF THE GENE ENCODING STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN-D.** Journal of Bacteriology, v. 171, n. 9, p. 4799-4806, Sep 1989.

BERGDOLL, M. S. et al. **A NEW STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN, ENTEROTOXIN F, ASSOCIATED WITH TOXIC SHOCK SYNDROME *Staphylococcus aureus* ISOLATES.** Lancet, v. 1, n. 8228, p. 1017-1021, 1981.

BETLEY, M. J. et al. **STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN A GENE IS ASSOCIATED WITH A VARIABLE GENETIC ELEMENT.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, v. 81, n. 16, p. 5179-5183, 1984.

BETLEY, M. J.; MEKALANOS, J. J. **NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE TYPE A STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN GENE.** Journal of Bacteriology, v. 170, n. 1, p. 34-41, Jan 1988.

BHATIA, A.; ZAHOOR, S. ***Staphylococcus aureus* ENTEROTOXINS: A REVIEW.** Journal of Clinical and Diagnostic Research, v. 1, p. 188-197, 2007.

BLAIOTTA, G. et al. **PCR DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN GENES IN *Staphylococcus* spp. STRAINS ISOLATED FROM MEAT AND DAIRY PRODUCTS.** Evidence for new variants of *seg* and *sei* in *S. aureus* AB-8802. Journal of Applied Microbiology, v. 97, n. 4, 2004.

BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. **NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN C1 GENE AND RELATEDNESS TO OTHER PYROGENIC TOXINS.** Molecular & General Genetics, v. 209, n. 1, p. 15-20, Aug 1987.

BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. **CONSERVATION OF THE BIOLOGICALLY-ACTIVE PORTIONS OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN-C1 AND ENTEROTOXIN-C2.** Infection and Immunity, v. 57, n. 7, p. 2249-2252, Jul 1989.

BOONE, D. R. et al. **Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology.** Springer, 2001. ISBN 9780387241456. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=9cwgo-9lyTUC> >.

BOYLE, M. et al. **BIOFILMS AND THE SURVIVAL OF OPPORTUNISTIC PATHOGENS IN RECYCLED WATER.** Waste Management & Research, v. 9, n. 5, p. 465-470, Oct 1991.

CANAL, N. **CARACTERIZAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Escherichia coli* ISOLADA DE AMOSTRAS DE ÁGUA DA LAGOA DOS PATOS, RS.** 2010. 98 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CHITNIS, V. et al. **BACTERIAL POPULATION CHANGES IN HOSPITAL EFFLUENT TREATMENT PLANT IN CENTRAL INDIA.** Water Research, v. 38, n. 2, p. 441-447, Jan 2004.

CLSI. **PERFORMANCE STANDARDS FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING** - Twenty-First Informational Supplement. <http://www.rsu.ac.th/medtech/files/CLSI%202011.pdf>, 2011. Acesso em: 03/01/2013.

COUCH, J. L.; BETLEY, M. J. **NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE TYPE C3 STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN GENE SUGGESTS THAT INTERGENIC RECOMBINATION CAUSES ANTIGENIC VARIATION.** Journal of Bacteriology, v. 171, n. 8, p. 4507-4510, Aug 1989.

COUCH, J. L.; SOLTIS, M. T.; BETLEY, M. J. **CLONING AND NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE TYPE E STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN GENE.** Journal of Bacteriology, v. 170, n. 7, p. 2954-2960, Jul 1988.

D'AZEVEDO, P. A. et al. ***Staphylococcus cohnii* spp *urealyticus*: cASE REPORT ON AN UNCOMMON PATHOGEN.** Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, v. 41, n. 2, p. 197-199, Mar-Apr 2008.

DA CUNHA, M. et al. **DETECTION OF ENTEROTOXINS GENES IN COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM FOODS.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 37, n. 1, Jan-Mar 2006.

DE MOURA, T. M. et al. **PREVALENCE OF ENTEROTOXIN ENCODING GENES AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN COAGULASE NEGATIVE AND COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCUS ISOLATES FROM BLACK PUDDING.** Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, v. 45, n. 5, Sep-Oct 2012.

DICICCO, M. et al. **EFFICACY OF CLARITHROMYCIN ON BIOFILM FORMATION OF METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus pseudintermedius*.** BMC Veterinary Research, v. 8, p. 225-231, 2012.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. **EXOTOXINS OF *Staphylococcus aureus*.** Clinical Microbiology Reviews, v. 13, n. 1, p. 16-+, Jan 2000.

DMAE. **A MELHORIA DA QUALIDADE DA ÁGUA DO ARROIO DILUVIO (SUB-BACIA D-11, PORTO ALEGRE, RS) E SUA RELAÇÃO COM AS REDES DE ESGOTO NO SISTEMA SEPARADOR ABSOLUTO DO DMAE.** Departamento Municipal de Águas e Esgotos. http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/dmae/usu_doc/laudo_diluvio_d11_n_14_2009_dvp.pdf, p.1-17. 2009

Dados de esgoto DMAE. http://www2.portoalegre.rs.gov.br/dmae/default.php?p_secao=186, 2012. Acesso em: 06/02/2012.

DO CARMO, L. S. et al. **A CASE STUDY OF A MASSIVE STAPHYLOCOCCAL FOOD POISONING INCIDENT.** Foodborne Pathogens and Disease, v. 1, nº 4, p. 241-246, 2004.

DONLAN, R. M. **BIOFILMS: MICROBIAL LIFE ON SURFACES.** Emerging Infectious Diseases, v. 8, n. 9, p. 881-890, Sep 2002.

EUZÉBY, J. P. M. **LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE.** 2012. Disponível em: < <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html> >. Acesso em: 06/25/2012.

FARIA, C. et al. **ANTIBIOTIC RESISTANCE IN COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM WASTEWATER AND DRINKING WATER.** Science of the Total Environment, v. 407, n. 12, Jun 1 2009.

FERNANDES, A.; TM, P.; HERWALDT, L. ***Staphylococcus cohnii*: A CASE REPORT ON AN UNUSUAL PATHOGEN.** Clinical Performance and Quality Health Care v. 4, p. 107-109, 1996.

FITZGERALD, J. R. et al. **CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE PATHOGENICITY ISLAND FROM BOVINE *Staphylococcus aureus* ENCODING MULTIPLE SUPERANTIGENS.** Journal of Bacteriology, v. 183, n. 1, p. 63-70, Jan 2001.

FLEMMING, H. C. **BIOFOULING IN WATER SYSTEMS - CASES, CAUSES AND COUNTERMEASURES.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 59, n. 6, p. 629-640, Sep 2002.

FREDRICKS, D. N.; RELMAN, D. A. **IMPROVED AMPLIFICATION OF MICROBIAL DNA FROM BLOOD CULTURES BY REMOVAL OF THE PCR INHIBITOR SODIUM POLYANETHOLESULFONATE.** Journal of Clinical Microbiology, v. 36, n. 10, p. 2810-2816, Oct 1998.

GOTO, M. et al. **RAPID DETECTION OF ENTEROTOXIGENIC STAPHYLOCOCCUS AUREUS HARBOURING GENES FOR FOUR CLASSICAL ENTEROTOXINS, SEA, SEB, SEC AND SED, BY LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION ASSAY.** Letters in Applied Microbiology, v. 45, n. 1, p. 100-107, Jul 2007.

GUPTA, P. et al. **GENOTOXICITY EVALUATION OF HOSPITAL WASTEWATERS.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 72, n. 7, p. 1925-1932, Oct 2009.

GÜNDOGAN, N.; ATAOL, Ö.; GÜNAL, S. **DETERMINATION OF SOME VIRULENCE FACTORS IN STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM MILK AND MEAT PRODUCTS.** Archiv für Lebensmittelhygiene, v. 63, p. 182-186, 2012.

HALLAM, N. B. et al. **THE POTENTIAL FOR BIOFILM GROWTH IN WATER DISTRIBUTION SYSTEMS.** Water Research, v. 35, n. 17, p. 4063-4071, Dec 2001.

HARAKEH, S. et al. **ISOLATES OF *Staphylococcus aureus* AND *S. saprophyticus* RESISTANT TO ANTIMICROBIALS ISOLATED FROM THE LEBANESE AQUATIC ENVIRONMENT.** Marine Pollution Bulletin, v. 52, n. 8, Aug 2006.

HENKES, V. E. **IDENTIFICAÇÃO DE *Enterococcus* sp. E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE REGIÕES COSTEIRAS DA LAGOA DOS PATOS.** 2010. 49 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

HOU, W. et al. **BIOFILM FORMING CAPACITY OF *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, AND *Pseudomonas aeruginosa* FROM OCULAR INFECTIONS.** Investigative Ophthalmology & Visual Science, v. 53, n. 9, p. 5624-5631, Aug 2012.

HUEBNER, J.; GOLDMANN, D. A. **COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI: ROLE AS PATHOGENS**. Annual Review of Medicine, v. 50, p. 223-236, 1999.

HUQ, A. et al. **BIOFILMS IN WATER, ITS ROLE AND IMPACT IN HUMAN DISEASE TRANSMISSION**. Current Opinion in Biotechnology, v. 19, n. 3, p. 244-247, Jun 2008.

IRLINGER, F. **SAFETY ASSESSMENT OF DAIRY MICROORGANISMS: COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI**. International Journal of Food Microbiology, v. 126, n. 3, p. 302-310, Sep 1 2008.

JARRAUD, S. et al. **A HIGHLY PREVALENT OPERON OF ENTEROTOXIN GENE, FORMS A PUTATIVE NURSERY OF SUPERANTIGENS IN *Staphylococcus aureus***. Journal of Immunology, v. 166, n. 1, p. 669-677, Jan 1 2001.

JIANG, S. P. et al. **WHOLE GENOME SEQUENCE OF *Staphylococcus hominis*, AN OPPORTUNISTIC PATHOGEN**. Journal of Bacteriology, v. 194, n. 17, p. 4761-4762, Sep 2012.

JOHNS, M. B.; KHAN, S. A. **STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B GENE IS ASSOCIATED WITH A DISCRETE GENETIC ELEMENT**. Journal of Bacteriology, v. 170, n. 9, p. 4033-4039, Sep 1988.

JORGENSEN, H. J. et al. **ENTEROTOXIGENIC *Staphylococcus aureus* IN BULK MILK IN NORWAY**. Journal of Applied Microbiology, v. 99, n. 1, p. 158-166, 2005.

KHAN, S. et al. **DRINKING WATER QUALITY AND HUMAN HEALTH RISK IN CHARSADEA DISTRICT, PAKISTAN**. Journal of Cleaner Production, v. 30, p. 1-9, 2012.

KLOOS, W.; SCHLEIFER, K.; GÖTZ, F. **THE GENUS *Staphylococcus***. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H., et al (Ed.). The Prokaryotes. 2^o. New York: Springer, 1992. cap. 63, p.1369-1420.

KUEMMERER, K. **ANTIBIOTICS IN THE AQUATIC ENVIRONMENT - A REVIEW - PART II**. Chemosphere, v. 75, n. 4, p. 435-441, Apr 2009.

LA ROSA, A. M. F. et al. **GESTÃO DE EFLUENTES DE SERVIÇOS DE SAÚDE EMPORIO ALEGRE**. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Porto Alegre: 1-13 p. 2000.

LAMAITA, H. C. et al. **CONTAGEM DE *Staphylococcus* SP. E DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS E TOXINA DA SÍNDROME DO CHOQUE TÓXICO EM AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 57, nº 5, p. 702-709, 2005.

LECHEVALLIER, M. W.; SEIDLER, R. J. ***Staphylococcus aureus* IN RURAL DRINKING WATER**. Applied and Environmental Microbiology, v. 39, n. 4, 1980.

LETERTRE, C. et al. **IDENTIFICATION OF A NEW PUTATIVE ENTEROTOXIN SEU ENCODED BY THE EGC CLUSTER OF *Staphylococcus aureus***. Journal of Applied Microbiology, v. 95, n. 1, p. 38-43, 2003.

LIM, D.; STRYNADKA, N. C. J. **STRUCTURAL BASIS FOR THE BETA-LACTAM RESISTANCE OF PBP2A FROM METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus***. Nature Structural Biology, v. 9, n. 11, p. 870-876, Nov 2002.

LIVERMORE, D. M. **ANTIBIOTIC RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCI**. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 16, p. S3-S10, 2000.

LOWY, F. D. **ANTIMICROBIAL RESISTANCE: THE EXAMPLE OF *Staphylococcus aureus***. Journal of Clinical Investigation, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, May 2003.

MACFADDIN, J.F. **BIOCHEMICAL TESTS FOR IDENTIFICATION OF MEDICAL BACTERIA**. 3. ed. Philadelphia, USA: Lippicott Williams and Wilkins, 2000.

MAK, P.; MASZEWSKA, A.; ROZALSKA, M. **THE AMINO ACID SEQUENCES AND ACTIVITIES OF SYNERGISTIC HEMOLYSINS FROM *Staphylococcus cohnii***. Fems Microbiology Letters, v. 287, n. 2, p. 230-235, Oct 2008.

MATHUR, S.; SINGH, R. **ANTIBIOTIC RESISTANCE IN FOOD LACTIC ACID BACTERIA - A REVIEW**. International Journal of Food Microbiology, v. 105, n. 3, p. 281-295, Dec 15 2005.

MOMBA, M. N. B. et al. **AN OVERVIEW OF BIOFILM FORMATION IN DISTRIBUTION SYSTEMS AND ITS IMPACT ON THE DETERIORATION OF WATER QUALITY**. Water Sa, v. 26, n. 1, p. 59-66, Jan 2000.

MORANDI, I.; FARIA, C. **A DIFÍCIL RECUPERAÇÃO DE ARROIOS EM ÁREAS URBANAS -ARROIO DILÚVIO - PORTO ALEGRE - RS. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Porto Alegre, Brasil: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental - Região Rio Grande do Sul 14 p. 2000.

MORES RALL, V. L. et al. **POLYMERASE CHAIN REACTION DETECTION OF ENTEROTOXINS GENES IN COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM BRAZILIAN MINAS CHEESE**. Foodborne Pathogens and Disease, v. 7, n. 9, p. 1121-1123, Sep 2010.

MOURA, T. M. D. et al. **PREVALENCE OF ENTEROTOXIN-ENCODING GENES AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN COAGULASE-NEGATIVE AND COAGULASE-POSITIVE *Staphylococcus* ISOLATES FROM BLACK PUDDING IN SOUTHERN BRAZIL.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical *in press*, p. RSBMT-1350, 2012.

NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. **PATHOGENICITY AND RESISTANCE ISLANDS OF STAPHYLOCOCCI.** Microbes and Infection, v. 3, n. 7, p. 585-594, Jun 2001.

O'GARA, J. P.; HUMPHREYS, H. ***Staphylococcus epidermidis* BIOFILMS: IMPORTANCE AND IMPLICATIONS.** Journal of Medical Microbiology, v. 50, n. 7, p. 582-587, Jul 2001.

OKUDERA, H. et al. **FATAL MENINGITIS DUE TO *Staphylococcus cohnii* - CASE REPORT.** Neurosurgical Review, v. 14, n. 3, p. 235-236, 1991 1991.

OLAJUYIGBE, A. E. et al. **VULNERABILITY AND RISK ANALYSIS OF WATER BORNE DISEASES** in Ilesha, Nigeria using GIS Techniques. v. 36, p. 436-450, 2013.

OMARI, S.; YEBOAH-MANU, D. **THE STUDY OF BACTERIAL CONTAMINATION OF DRINKING WATER SOURCES: A CASE STUDY OF MPRAESO, GHANA.** The Internet Journal of Microbiology, v. 10, p. Number1, 2012

OPPENHEIM, B. A. **THE CHANGING PATTERN OF INFECTION IN NEUTROPENIC PATIENTS.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 41, p. 7-11, Jun 1998.

ORRETT, F., SM. **SIGNIFICANCE OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI IN URINARY TRACT INFECTIONS IN A DEVELOPING COUNTRY.** Connecticut medicine, v. 62, p. 199-203, 1998.

OSTERLUND, A. et al. **INTRAFAMILIAL SPREAD OF HIGHLY VIRULENT *Staphylococcus aureus* STRAINS CARRYING THE GENE FOR PANTON-VALENTINE LEUKOCIDIN.** Scandinavian Journal of Infectious Diseases, v. 34, n. 10, p. 763-764, Oct 1 2002.

OTTO, M. **VIRULENCE FACTORS OF THE COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI.** Frontiers in Bioscience, v. 9, p. 841-863, Jan 2004.

PAUWELS, B.; VERSTRAETE, W. **THE TREATMENT OF HOSPITAL WASTEWATER: AN APPRAISAL.** Journal of Water and Health, v. 04,4, p. 405-416, 2006.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. **STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS.** Toxins, v. 2, n. 8, p. 2177-2197, Aug 2010.

PRAX, M.; LEE, C. Y.; BERTRAM, R. **AN UPDATE ON THE MOLECULAR GENETICS TOOLBOX FOR STAPHYLOCOCCI**. Microbiology Papers in Press, p. 1-29, 2013.

PREVOST, G. et al. **EPIDEMIOLOGIC DATA ON *Staphylococcus aureus* STRAINS PRODUCING SYNERGOHYMENOTROPIC TOXINS**. Journal of Medical Microbiology, v. 42, n. 4, p. 237-245, Apr 1995.

PROFT, T.; FRASER, J. D. **BACTERIAL SUPERANTIGENS**. Clinical and Experimental Immunology, v. 133, n. 3, p. 299-306, Sep 2003.

RAHIMI, E.; ALIAN, F. **PRESENCE OF ENTEROTOXIGENIC *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN COW, CAMEL, SHEEP, GOAT, AND BUFFALO BULK TANK MILK**. VETERINARSKI ARHIV, v. 1, p. 23-30, 2013.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. **STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN GENES OF CLASSICAL AND NEW TYPES DETECTED BY PCR IN FRANCE**. International Journal of Food Microbiology, v. 77, n. 1-2, Jul 25 2002.

ROZAND, C. V. et al. **IDENTIFICATION OF MICROCOCCACEAE ISOLATED FROM GOAT'S MILK AND CHEESE IN THE POITOU-CHARENTES REGION**. International Journal of Food Microbiology, v. 30, n. 3, p. 373-378, Jul 1996.

RUARO, A. et al. **BIODIVERSITY AND CHARACTERIZATION OF INDIGENOUS COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM RAW MILK AND CHEESE OF NORTH ITALY**. Food Microbiology, v. 34, p. 106-111, 2013

SAISING, J. et al. **LIPASE, PROTEASE, AND BIOFILM AS THE MAJOR VIRULENCE FACTORS IN STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM ACNE LESIONS**. Bioscience Trends, v. 6, n. 4, p. 160-164, 2012.

SAMRA, Z. Q. et al. **PCR TARGETING OF ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA IN PUBLIC DRINKING WATER OF LAHORE METROPOLITAN, PAKISTAN**. Biomedical and Environmental Sciences, v. 22, n. 6, Dec 2009.

SAÚDE, M. D. S. S. D. V. E. **ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DOS SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS NO BRASIL, 1999 – 2009**. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf 2009. Acesso em: 21/01/2013.

SAÚDE., M. D. S. S. D. V. E. **EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS DIARREICAS AGUDAS**. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1549, 2013. Acesso em: 20/01/2013.

SERAPICOS, E. S. **PREVALÊNCIA DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS, METAIS E DESINFECTANTES EM ISOLADOS DE *Staphylococcus***

PROVENIENTES DE UMA ETAR MUNICIPAL. 2008. 97 (Mestrado). Departamento de química, Universidade do Porto, repositório-aberto.up.pt/bitstream/10216/.../2/Texto%20integral.pdf.

SHAFER, W. M.; IANDOLO, J. J. **CHROMOSOMAL LOCUS FOR STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN-B.** Infection and Immunity, v. 20, n. 1, p. 273-278, 1978.

SHALITA, Z.; HERTMAN, I.; SARID, S. **ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A PLASMID INVOLVED WITH ENTEROTOXIN-B PRODUCTION IN *Staphylococcus aureus*.** Journal of Bacteriology, v. 129, n. 1, p. 317-325, 1977.

SIMOES, L. C.; SIMOES, M.; VIEIRA, M. J. **ADHESION AND BIOFILM FORMATION ON POLYSTYRENE BY DRINKING WATER ISOLATED BACTERIA.** Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, v. 98, n. 3, p. 317-329, Oct 2010.

SOUZA ANTUNES, A. L. et al. **HIGH VANCOMYCIN RESISTANCE AMONG BIOFILMS PRODUCED BY *Staphylococcus* SPECIES ISOLATED FROM CENTRAL VENOUS CATHETERS.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 106, n. 1, p. 51-55, Feb 2011.

STEPANOVIC, S. et al. **QUANTIFICATION OF BIOFILM IN MICROTITER PLATES: OVERVIEW OF TESTING CONDITIONS AND PRACTICAL RECOMMENDATIONS FOR ASSESSMENT OF BIOFILM PRODUCTION BY STAPHYLOCOCCI.** Apmis, v. 115, n. 8, p. 891-899, AUG 2007

SUHOGUSOFF, A. V.; HIRATA, R.; FERRARI, L. C. K. M. **WATER QUALITY AND RISK ASSESSMENT OF DUG WELLS: A CASE STUDY FOR A POOR COMMUNITY IN THE CITY OF SÃO PAULO, BRAZIL.** Environmental Earth Sciences v. 68, p. 899-910, 2013.

SUTHAR, S.; CHHIMPA, V.; SINGH, S. **BACTERIAL CONTAMINATION IN DRINKING WATER: A CASE STUDY IN RURAL AREAS OF NORTHERN RAJASTHAN, INDIA.** Environmental Monitoring and Assessment, v. 159, n. 1-4, p. 43-50, Dec 2009.

SZEWCZYK, E. M.; RÓZALSKA, M. ***Staphylococcus cohnii* - RESIDENT OF HOSPITAL ENVIRONMENT: CELL-SURFACE FEATURES AND RESISTANCE TO ANTIBIOTICS.** Acta Microbiologica Polonica, v. 49, p. 121-133, 2000.

TAVARES, W. **BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS PROBLEMAS: RESISTÊNCIA DO ESTAFILOCOCO, DO ENTEROCOCO E DO PNEUMOCOCO AOS ANTIMICROBIANOS.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 33, p. 281-301, 2000.

VALIHRACH, L.; ALIBAYOV, B.; DEMNEROVA, K. **PRODUCTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN C IN MILK**. International Dairy Journal, 2013.

VANDERKOOIJ, D. et al. **BIOFILM FORMATION ON SURFACES OF GLASS AND TEFLON EXPOSED TO TREATED WATER**. Water Research, v. 29, n. 7, p. 1655-1662, Jul 1995.

VARNAM, A. H.; EVANS, G. **FOODBORNE PATHOGENS: AN ILLUSTRATED TEXT**. <http://books.google.com.br/books?id=sPBFAAAAYAAJ>: University of Cornell: Manson, 1996.

VECCHIA, A. D. et al. **DIAGNÓSTICO SOBRE A SITUAÇÃO DO TRATAMENTO DO ESGOTO HOSPITALAR NO BRASIL**. Revista Saúde e Ambiente, v. 10, p. 65-70, 2009.

VERAS, J. F. et al. **A STUDY OF THE ENTEROTOXIGENICITY OF COAGULASE-NEGATIVE AND COAGUTASE-POSITIVE STAPHYLOCOCCAL ISOLATES FROM FOOD POISONING OUTBREAKS IN MINAS GERAIS, BRAZIL**. International Journal of Infectious Diseases, v. 12, n. 4, Jul 2008.

WHO; UNICEF. **JOINT MONITORING PROGRAMME FOR WATER SUPPLY AND SANITATION; MEETING THE MDG DRINKING WATER AND SANITATION TARGET: A MID-TERM ASSESSMENT OF PROGRESS**. UNICEF, New York, USA. 2004.

WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. **CONTAMINATION POTENTIAL OF DRINKING WATER DISTRIBUTION NETWORK BIOFILMS**. Water Science and Technology, v. 49, n. 11-12, p. 277-286, 2004.

YOSHPEPURER, Y.; GOLDBERMAN, S. **OCCURRENCE OF *Staphylococcus aureus* AND *Pseudomonas aeruginosa* IN ISRAELI COASTAL WATER**. Applied and Environmental Microbiology, v. 53, n. 5, May 1987.

YOUNG, F. **CARACTERIZAÇÃO DE AREIAS DE DRAGAGEM DE ARROIO URBANO PARA AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL DE USO COMO AGREGADO MIÚDO EM ARGAMASSAS**. 2010. 147 Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, <http://hdl.handle.net/10183/28840>.

ZELL, C. et al. **CHARACTERIZATION OF TOXIN PRODUCTION OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM FOOD AND STARTER CULTURES**. International Journal of Food Microbiology, v. 127, n. 3, p. 246-251, Oct 31 2008.

ZHANG, S. P.; IANDOLO, J. J.; STEWART, G. C. **THE ENTEROTOXIN D PLASMID OF *Staphylococcus aureus* ENCODES A SECOND**

ENTEROTOXIN DETERMINANT (sej). Fems Microbiology Letters, v. 168, n. 2,
p. 227-233, Nov 15 1998.

ANEXOS

ANEXO 1: Metodologias de coleta e isolamento empregadas.

Amostras de água superficial (em torno de um metro de profundidade) foram coletadas no período de janeiro a dezembro de 2009. Quatro coletas foram realizadas, uma em cada estação do ano. Dois litros de água foram coletados em cinco diferentes pontos ao longo do Arroio Dilúvio. As amostras foram mantidas sob refrigeração e imediatamente encaminhadas para processamento no Departamento de Microbiologia da UFRGS.

No laboratório, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) das amostras e 100 μ L de cada diluição foram semeadas em meio seletivo para estafilococos (Ágar Sal Manitol) através da técnica de espalhamento em superfície com alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 35°C por 24-48 h e, após esse período, foram selecionadas aleatoriamente vinte colônias de cada ponto de coleta (através do método dos quatro quadrantes). As colônias retiradas foram novamente esgotadas em Ágar Sal Manitol e incubadas por 24h a 35°C. Após incubação, as colônias foram transferidas para Ágar BHI e incubadas. Em seguida, os isolados foram submetidos a testes para confirmação da pureza e armazenadas em caldo BHI com 20% de glicerol a -20°C.

ANEXO 2: Apresentação dos resultados obtidos nos testes para identificação fonotípica.

| Isolados | Testes bioquímicos utilizados | | | | | | | | | | | | Espécies | | |
|----------|-------------------------------|----|----------|---------|---------|---------|--------|----------|--------|---------|---------|-------|----------|-----|----------------------------|
| | Manitol | VP | Trealose | Maltose | Lactose | Frutose | Manose | Rafinose | Urease | Nitrato | Oxidase | Pol B | | Nov | |
| 3SM4.1 | + | | | | | | | | | | | | | | <i>Staphylococcus spp.</i> |
| 3SM4.2 | + | | | | | | | | | | | | | | <i>Staphylococcus spp.</i> |
| 2SM3.4 | + | + | | + | | | | | | | | | | | <i>S. aureus</i> |
| 2SM4.11 | + | - | - | | + | | | | | | | | | | <i>S. delphini</i> |
| 4SM5.12 | + | - | + | | | | | | | | | S | | | <i>S. intermedius</i> |
| 3SM4.15 | + | | | | | | | | | | | | | | <i>Staphylococcus spp.</i> |
| 1SM3.7 | - | - | | | - | | | | - | | | | | | <i>S. muscae</i> |
| 3SM2.13 | - | - | | | - | | | | - | | | | | | <i>S. muscae</i> |
| 3SM4.20 | - | | | | | | | | + | | | S | | | <i>S. hominis</i> |
| 3SM5.11 | - | | | | | | | | + | | | S | | | <i>S. hominis</i> |
| 4SM5.5 | - | | | | | | | | + | | | S | | | <i>S. hominis</i> |
| 1SM2.1 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 1SM2.17 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 1SM3.1 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 1SM3.3 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 1SM3.5 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 1SM3.10 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 1SM3.12 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 1SM3.15 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 1SM3.20 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 1SM3.21 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 1SM4.1 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 1SM4.7 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 1SM4.8 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 1SM4.11 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 3SM2.1 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 3SM2.3 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 2SM3.20 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 3SM4.13 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 3SM5.3 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 3SM5.9 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 3SM5.12 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 3SM5.19 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |
| 4SM2.5 | + | | | | + | + | | | + | | | | R | | <i>S. cohnii</i> |

| | | | | | | | | | |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|--------------------------------------|
| 4SM2.14 | + | | + | + | | | | R | <i>S. cohnii</i> |
| 4SM3.1 | + | | + | + | | | | R | <i>S. cohnii</i> |
| 1SM2.8 | + | + | - | | - | | | | <i>S. saprophyticus</i> |
| 1SM5.8 | + | + | - | | - | | | | <i>S. saprophyticus</i> |
| 4SM2.12 | + | + | - | | - | | | | <i>S. saprophyticus</i> |
| 4SM4.10 | + | + | - | | - | | | | <i>S. saprophyticus</i> |
| 4SM4.14 | + | + | - | | - | | | | <i>S. saprophyticus</i> |
| 4SM5.6 | + | + | - | | - | | | | <i>S. saprophyticus</i> |
| 4SM5.7 | + | + | - | | - | | | | <i>S. saprophyticus</i> |
| 4SM5.19 | + | + | - | | - | | | | <i>S. saprophyticus</i> |
| 1SM3.16 | + | | - | | + | + | + | | <i>S. gallinarium</i> |
| 1SM4.4 | + | | - | | + | + | + | | <i>S. gallinarium</i> |
| 1SM5.10 | + | - | - | | - | | + | | <i>S. psifermentans/S. pasteurii</i> |
| 1SM5.13 | + | - | - | | - | | + | | <i>S. psifermentans/S. pasteurii</i> |
| 3SM4.18 | + | - | - | | - | | + | | <i>S. psifermentans/S. pasteurii</i> |
| 4SM3.6 | + | | + | | - | | + | | <i>S. caprae</i> |
| 4SM3.16 | + | | + | | - | | + | | <i>S. caprae</i> |
| 3SM4.7 | + | | + | + | | | + | S | <i>S. felis</i> |
| 1SM2.12 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 1SM2.13 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 1SM2.20 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 1SM5.4 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 1SM5.6 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 1SM5.16 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 3SM2.12 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 3SM3.7 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 3SM3.9 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 3SM3.19 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 3SM4.3 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 4SM2.4 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 4SM2.17 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 4SM3.5 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 4SM3.15 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 4SM3.20 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 4SM4.2 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 4SM4.11 | + | + | + | | | | - | | <i>S. haemolyticus</i> |
| 1SM2.15 | + | + | | | | | - | - | <i>S. sciuri/S. vitulus</i> |
| 1SM4.18 | + | + | | | | | - | - | <i>S. sciuri/S. vitulus</i> |
| 4SM2.11 | + | + | | | | | - | - | <i>S. sciuri/S. vitulus</i> |
| 4SM3.14 | + | - | | | | | - | - | <i>S. sciuri/S. vitulus</i> |
| 4SM4.4 | + | - | | | | | - | - | <i>S. sciuri/S. vitulus</i> |

| | | | | | | | |
|---------|---|---|---|---|---|---|----------------------|
| 3SM4.16 | + | + | - | - | | | <i>S. carnosus</i> |
| 3SM5.10 | + | + | - | - | | | <i>S. carnosus</i> |
| 3SM5.16 | + | + | - | - | | | <i>S. carnosus</i> |
| 4SM5.9 | + | + | - | - | | | <i>S. carnosus</i> |
| 1SM3.18 | + | + | - | - | | | <i>S. carnosus</i> |
| 1SM5.1 | + | + | - | - | | | <i>S. carnosus</i> |
| 1SM5.2 | + | + | - | - | | | <i>S. carnosus</i> |
| 3SM2.2 | + | + | - | - | | | <i>S. carnosus</i> |
| 3SM3.3 | + | + | - | - | | | <i>S. carnosus</i> |
| 3SM4.14 | + | + | - | - | | | <i>S. carnosus</i> |
| 3SM2.11 | + | + | | + | - | + | <i>S. lentus</i> |
| 3SM2.19 | + | + | | | - | + | <i>S. cromogenes</i> |
| 4SM3.3 | + | + | | | - | + | <i>S. cromogenes</i> |

VITA

I. Identificação

Nome: Ana Paula Basso

Endereço: Travessa Miranda e Castro, 21/401 - Santana, Porto Alegre/RS CEP 90040-280

Idade: 24 anos

E-mail: apbasso3@hotmail.com

Tel.: 51 9254 8644

II. Documentação

RG: 6061980311

III. Formação profissional

2011 – atual: Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela UFRGS

2007 – 2010: Graduação em Biomedicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

IV. Formação complementar

2011 – Estágio Obrigatório Supervisionado na Policlínica Militar de Porto Alegre. Carga horária 600 horas.

2010 – Estágio em Bioquímica e Microbiologia Aplicada UFRGS sob orientação do Professor Adriano Brandelli.

2008 – Estágio em Microbiologia na UFRGS sob orientação da Professora Sueli Van Der Sand.

V. Outros conhecimentos

Domínio da Língua Inglesa

VI. Apresentação de Trabalhos

2012 – “Análise do perfil de fatores de virulência em amostras de *Staphylococcus spp.* isolados do Arroio Dilúvio”, XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Santos.

2010 – “Atividade antimicrobiana de *Bacillus* contra micro-organismos isolados de cateter”, III Congresso Internacional de Bioanálises, VI Congresso Sul-Brasileiro de Biomedicina, X Semana Gaúcha de Biomedicina, Porto Alegre.

2009 – “Caracterização da linhagem LBM 5006 *Bacillus amyloliquefaciens* quanto ao seu potencial como produtora de bacteriocinas”, 55º Congresso de Genética Médica, Águas de Lindóia.

2009 – “Caracterização da linhagem LBM 5006 *Bacillus amyloliquefaciens* quanto ao seu potencial como produtora de bacteriocinas”, XX Salão de Iniciação Científica da UFRGS.