

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

**CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E
DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Escherichia coli* ISOLADA DE AMOSTRAS
DE ÁGUA DA LAGOA DOS PATOS, RS.**

Natália Canal
Bióloga- PUCRS

Abril, 2010.

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

**CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E
DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Escherichia coli* ISOLADA DE AMOSTRAS
DE ÁGUA DA LAGOA DOS PATOS, RS.**

Natália Canal

Bióloga- PUCRS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do Grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, RS, Brasil

Abril, 2010.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Gertrudes Corção pela orientação, dedicação, paciência, idéias e oportunidades oferecidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do PPGMAA que contribuíram de alguma forma para a minha formação.

As amigas do laboratório 166 Alessandra Einsfeld Ferreira, Desirée Padilha Marchetti, Carolina de Souza Gusatti, Leticia Otton e Daiane Bopp Fuentefria e aos amigos Giuliano Robertson Hickebinck e Waldir Emílio Henkes.

As estagiárias Vanuza de Lara Goulart, Susana de Oliveira Elias, Camila Lumertz e Emily de Conto pela disposição em ajudar no que fosse necessário.

A minha querida família, meus pais (Nelson e Justina) e minhas irmãs (Heloise e Alice), pelo carinho, apoio e incentivo.

Ao Marcelo, pelo amor e por acreditar sempre em mim.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isolada de amostras de água da Lagoa dos Patos, RS¹.

Resumo

Autor: Natália Canal

Orientadora: Dra. Gertrudes Corção

Estudos que avaliam a resistência aos antimicrobianos em ecossistemas naturais são de alta relevância para a identificação de reservatórios ambientais da resistência bacteriana aos antimicrobianos. O presente trabalho teve como objetivo analisar isolados *E.coli* provenientes de amostras de água da Lagoa dos Patos quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, presença de integron de classe 1, presença de bomba de efluxo e diversidade genética. As amostras de água foram provenientes de oito pontos situados ao longo da Lagoa dos Patos. A susceptibilidade foi avaliada frente a 15 antimicrobianos. A presença da região variável de integron de classe 1 foi verificada através da reação em cadeia da polimerase. A indicação da presença de bomba de efluxo foi realizada comparando a Concentração Inibitória Mínima da ampicilina na presença e ausência de um inibidor de bomba efluxo. A diversidade genética dos isolados foi avaliada através da amplificação de seqüências repetitivas. As contagens de *E. coli* variaram entre 0 (pontos situados no Parque Itapuã) e $5,4 \times 10^3$ UFC/100mL (ponto situado Enseada de Tapes). Foram identificados um total de 477 isolados de *E.coli*. As maiores percentagens de isolados resistentes foram encontrados frente à tetraciclina (22,2%) e 16,5% dos isolados foram considerados multiresistentes. Dos 157 isolados resistentes aos antimicrobianos, 39,4% apresentaram integron classe 1, sendo que destes, 42 isolados foram considerados multiresistentes. Pode-se inferir que 23 isolados multiresistentes apresentaram bombas de efluxo. Este estudo revelou diferentes padrões de susceptibilidade a antimicrobianos na Lagoa dos Patos, dependendo do grau de impacto antrópico. A presença de integron de classe 1 e bombas de efluxo pode estar contribuindo para o aparecimento de isolados multiresistentes aos antimicrobianos. Os isolados apresentaram grande diversidade pelo ERIC-PCR, indicando várias origens de contaminação nos pontos de coleta analisados.

1 Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (98p) Abril, 2010.

Characterization of antimicrobial resistance and genetic diversity in *Escherichia coli* isolated from samples of water from Lagoa dos Patos, RS¹.

Abstract

Author: Natália Canal

Adviser: Dr. Gertrudes Corção

Studies that evaluate antibiotic resistance in natural ecosystems are of great importance to identify environmental reservoirs of bacterial resistance to antibiotics. This study aimed to characterize *E.coli* strains isolated from water samples of the Lagoa dos Patos, in regards of their susceptibility profile, presence of integron class 1, presence of efflux pump and genetic diversity. Water samples were collected from eight points along the Lagoa dos Patos. Antimicrobial susceptibility was tested against 15 antibiotics. The presence of the variable region of class 1 integron was verified through Polymerase Chain Reaction. The indication of the presence of efflux pump was performed by comparing the MIC of ampicillin with and without efflux pump inhibitor. Genetic diversity of isolates was analyzed by repetitive sequences. *E. coli* counts ranged from 0 (points within the Parque Itapuã) to 5.4×10^3 CFU/100mL (point Enseada de Tapes). A total of 477 *E.coli* isolates were identified. The highest percentages of resistance were related to tetracycline, with 22.2% of resistant isolates and the multidrug resistance rates were 16.5%. Of 157 isolates resistant to antibiotics, 39.4% had class 1 integrons, and 42 isolates out of those were considered multidrug resistant. The presence of efflux pumps could be inferred on 23 resistant isolates. This study revealed different patterns of antimicrobial susceptibility in the Lagoa dos Patos, depending on the degree of human impact. The presence of integrons and efflux pumps may be contributing to antibiotic multiresistance phenotype. The isolates showed a great genetic diversity through the ERIC-PR, indicating multiple sources of contamination in the sampling points analyzed.

¹Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (98p) April, 2010.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Características gerais de <i>Escherichia coli</i>	4
2.2 Resistência a antimicrobianos no ambiente aquático	7
2.3 Resistência aos antimicrobianos através da presença de integrons	13
2.4 Bombas de efluxo.....	18
2.5 Sequências ERIC e tipificação molecular através de ERIC-PCR	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Meios de cultura e soluções	28
3.2 Caracterização dos pontos de coleta	28
3.3 Amostras	32
3.3.1 Coleta e processamento das amostras	32
3.3.2 Recuperação e manutenção dos isolados	32
3.4 Identificação de <i>Escherichia coli</i>	33
3.5 Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	33
3.6 Extração de DNA	35
3.7 Amplificação da região variável do integron de classe 1	35
3.7.1 Análise dos fragmentos amplificados da região variável de integron de classe 1.....	36
3.7.2 Análise do tamanho de fragmentos da região variável do integron classe 1.....	36
3.8 Concentração Inibitória Mínima e sistema de efluxo dependente da força próton motiva	36
3.9 Amplificação das sequências ERIC através de PCR	37
3.9.1 Análise dos fragmentos amplificados de ERIC-PCR.....	38
3.9.2 Análise dos tamanhos de fragmentos de ERIC-PCR	38
3.9.3 Análise estatística e construção do dendrograma	39
3.10 Análise estatística	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Contagens de <i>Escherichia coli</i>	41
4.2 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	45
4.3 Amplificação da região variável de integron de classe 1	53
4.4 Indicação da presença de bomba de efluxo através da Concentração Inibitória Mínima na presença e ausência do CCCP	58
4.5 Diversidade genética dos isolados <i>E.coli</i> resistentes a antimicrobianos através da técnica de ERIC-PCR	62
5. CONCLUSÕES	67
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
8. APÊNDICES	85

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1 - Antimicrobianos utilizados para a avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados <i>E.coli</i>	34
TABELA 2 - Contagens de <i>E.coli</i> em UFC/ 100 mL em amostras de água provenientes dos pontos de coleta A a H na Lagoa dos Patos e nas estações do outono ao verão.	42
TABELA 3 - Porcentagem de isolados de <i>E.coli</i> resistentes e multiresistentes a antimicrobianos em amostras de água da Lagoa dos Patos.	47
TABELA 4 - Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de <i>E.coli</i> nos diferentes pontos de coleta	50
TABELA 5 - Distribuição de isolados <i>E.coli</i> positivos para região variável de integron de classe 1 entre os perfis de susceptibilidade e por ponto de coleta	54
TABELA 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ampicilina na ausência e presença do carbonil-cianeto-m-clorofenilhidrazona (CCCP) em isolados de <i>E.coli</i> multiresistentes e resistentes a Ampicilina.....	60

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1: Localização dos pontos de coleta na Lagoa dos Patos. 1-2: Parque Itapuã, 1: H- Praia de Fora, 2: G- Praia de Pedreira Parque; 3: A- Enseada de Tapes; 4: B- Trapiche em São Lourenço do Sul; 5- 8: Rio Grande, 5: D- Museu Oceanográfico; 6: E- Barra da Lagoa; 7: C- Saco da Mangueira; 8: F- Praia do Cassino.....31

FIGURA 2 - Diferenças entre as médias Kruskal-Wallis. Os pontos de coleta apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o número de isolados resistentes ($p < 0,05$) quando comparados entre si. ns: não significativo. 1: A- Enseada de Tapes; 2: B- Trapiche de São Lourenço do Sul; 3: C- Saco da Mangueira; 4: D- Museu Oceanográfico; 5: E- Barra da Lagoa.....48

FIGURA 3: FIGURA 3: Dendrograma do percentual de similaridade entre os isolados *Escherichia coli* das diferentes estações de coleta através de ERIC-PCR. A linha vertical indica 70% similaridade. Os isolados em negrito apresentaram perfil de susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados. Alguns isolados que apresentaram valor $\leq 80\%$ similaridade foram retirados do dendrograma. A: Enseada de Tapes; B: Trapiche em São Lourenço do Sul; C: Saco da Mangueira; D: Museu Oceanográfico; E: Barra da Lagoa. Estações: 1- Outono; 2- Inverno; 3- Primavera; 4- Verão.....66

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcentual
°	Grau
°C	Graus Celsius
AAC	aminoglicosídeo acetiltransferase
AMC	Amoxicilina-ácido clavulânico
AMI	Amicina
AMP	Ampicilina
ANT	aminoglicosídeo nucleodiltransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
be	elemento base
BHI	Caldo infusão cérebro coração
CAZ	Ceftazidima
CCCP	Carbonil-cianeto-m-clorofenilidrazone
CFO	Cefoxitina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLO	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CPM	Cefepime
CTX	cefotaxima
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxiribonucleotideo trifosfato
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
EMB	Ágar Eosina Azul de Metileno
ERIC	<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
ESBL	β-lactamase-espectro-estendido
et al	e colaboradores
g	grama
GEN	Gentamicina
H'	Índice de Shannon-Weaver
H ₂ S	sulfeto de hidrogênio
IPM	Imipinem
Kb	kilobase
Km	quilômetro
L	Litro
Lat	Latitude
Long	Longitude

M	Molar
mg	miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
MDR	multiresistente
NaCl	Cloreto de sódio
NMP	Número Mais Provável
NOR	Norfloxacina
pH	logaritmo decimal do inverso da atividade de íons de hidrogênio numa solução
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Eletroforese de campo pulsado
PPT	Piperacilina-tazobactam
REP	<i>repetitive extragenic palindrome</i>
RND	resistência-nodulação-divisão
SUT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TET	Tetraciclina
TSI	Ágar Ferro Tríplice Açúcar
TSA	Ágar Triptona de Soja
TSB	Caldo Triptona de Soja
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	unidade
UPGMA	Unweighted pair-group method with average linkages
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrometro
µM	micromolar
UFC	Unidade formadoras de colonia
v	volts

1. INTRODUÇÃO

A qualidade da água dos rios e lagos sofre forte influência da urbanização e da presença de indústrias ou áreas agrícolas ao longo de suas margens. Com a falta de uma política voltada para qualidade sanitária e a preservação do ambiente que acompanhe o crescimento populacional e sem controle efetivo sobre instalações agropecuárias, os corpos aquíferos ficam vulneráveis a possíveis contaminantes que alteram o ecossistema microbiológico da região. Dentre as fontes relatadas para a contaminação das águas, observa-se o fluxo de esgotos residenciais, o acúmulo de lixo nas margens dos rios e os dejetos de animais domésticos ou de criação. Todos estes são preocupantes já que podem ser um transporte passivo de parasitas, bactérias e vírus patogênicos para a população da região.

Bactérias resistentes aos antimicrobianos e as próprias drogas, são descarregadas em quantidades variáveis no ambiente aquático, como resultado do crescente uso, e muitas vezes indiscriminado, de antimicrobianos na medicina humana e veterinária. A água dos rios é o principal receptáculo dos efluentes urbanos, e como os rios são uma das principais fontes de água, a poluição destes pode contribuir para a disseminação de resistência a antimicrobianos. A deposição de efluente dentro dos reservatórios de água,

assim como, a promoção da eutrofização, permite que esta água seja contaminada por microrganismos patogênicos, o que facilita a transferência de genes de resistência. Estes ambientes podem tornar-se importantes locais de transmissão ao humano de patógenos que poderão ser resistentes e multiresistentes às diferentes classes de antimicrobianos. A degradação das condições sanitárias dentro das comunidades pode levar a uma estabilização das rotas de disseminação dos microrganismos, e elementos genéticos móveis podem agravar este problema, contribuindo para o aumento da multiresistência bacteriana. O ambiente aquático não constitui só uma forma de disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre população humana e animal, mas também a via pelas quais genes de resistência são introduzidos em ecossistemas naturais.

Escherichia coli é considerada indicadora de contaminação fecal recente por ser habitante permanente do trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente. A resistência a múltiplas classes de antimicrobianos não é incomum em isolados de *E.coli* de animais e humanos. A pressão seletiva imposta aos membros da microbiota comensal através do uso de antimicrobianos, resulta em padrões de resistência que refletem a exposição prévia da microbiota, desta maneira estas bactérias podem servir como reservatório de genes de resistência no ambiente aquático. A resistência antimicrobiana, particularmente a multiresistência é um problema de saúde pública e a presença de organismos resistentes no ambiente aquático é um problema emergente e disseminado em todo o mundo.

Estudos que investigam a resistência aos antimicrobianos em ecossistemas naturais são de grande importância para apontar reservatórios ambientais dessa resistência bacteriana. Desta maneira, o presente trabalho teve como objetivos: analisar isolados *E.coli* provenientes de amostras de água da Lagoa dos Patos, quanto ao perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, verificar a presença da região variável de integron de classe 1 e verificar a presença de bombas de efluxo e analisar a diversidade genética dos isolados provenientes dos diferentes pontos de coletas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características gerais de *Escherichia coli*

As enterobactérias pertencem a um grupo filogenético homogêneo e são caracterizadas por serem Gram-negativas, bacilos não formadores de esporos, aeróbias facultativas, oxidase negativa, imóveis ou móveis por flagelação peritríquia. Dentre as enterobactérias são encontradas várias cepas patogênicas ao homem, aos outros animais e plantas, bem como cepas de grande importância industrial. Os membros do gênero *Escherichia* são habitantes universais do trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente. Podem estar envolvidas em vias metabólicas no trato gastrointestinal, por sintetizar vitaminas, e na manutenção do ambiente anaeróbio pelo consumo do oxigênio (Madigan et al., 2004).

As *Escherichia* são organismos pequenos e finos medindo 0,5 µm de comprimento e de 1 a 3 µm de diâmetro. Raramente apresentam exigências em relação a qualquer fator de crescimento, sendo capazes de crescer a partir de uma variedade de fontes de carbono. Crescem em temperaturas que variam de 15 a 45°C, sendo a temperatura ideal 37°C. Resistem ao calor sobrevivendo a 60°C por 15 min ou 55°C por 60 min e toleram pH na faixa 4,4 a 6,0. São organismos amplamente distribuídos no solo, água, vegetação e também

fazem parte da microbiota gastrointestinal de seres humanos e de animais (Altwegg & Bockmuhl, 1998).

Dentre os gêneros da família Enterobacteriaceae, o gênero *Escherichia* é o mais estudado. Através da comparação baseada na hibridização DNA:DNA os gêneros *Salmonella* e *Escherichia* apresentam cerca de 50% de identidade. Além disso, *Escherichia* também apresenta estreita relação genética com o gênero *Shigella*, análises de homologia de DNA demonstram a presença de 70 a 100% de homologia do DNA entre estes dois gêneros (Madigan et al., 2004).

O gênero *Escherichia* compreende as espécies *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermanii* e *Escherichia vulneris*. Devido à sua importância clínica e ambiental, a espécie *E.coli* é a mais estudada. A maioria das cepas dessa espécie não são patogênicas, porém algumas estão envolvidas com frequência em diarreias na infância, septicemia, meningite neonatal e infecções do trato urinário (Yingst et al., 2006). Cepas de *E. coli* podem ser classificados como (i) comensais, (ii) patogênicas intestinais (entérica/ causadoras de diarreia), ou (iii) *E. coli* patogênica extra-intestinais (ExPEC). *E.coli* responsáveis por causarem infecções intestinais incluem *E.coli* enteropatogênica (EPEC), *E.coli* enterohemorrágica (EHEC), *E.coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E.coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* aderente difusamente (DAEC) (Hamelin et al., 2007).

E.coli e outros gêneros como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e

Serratia são pertencentes ao grupo dos coliformes. A quantificação de coliformes é utilizada para o monitoramento da água. Coliformes totais são definidos como bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase negativos, fermentadores da lactose a 35°C com produção gás. Coliformes termotolerantes são definidos como os que fermentam a lactose com produção de gás a 44,5°C. *E.coli* e alguns gêneros como *Klebsiella* e *Enterobacter* apresentam a característica de termotolerância, mas somente *E.coli* apresenta o trato gastrointestinal de humano e animais como habitat primário (Briancesco, 2005).

Observa-se que o ciclo de vida de bactérias entéricas, tais como *E.coli* envolve a transição entre ambientes distintos. Algumas espécies se restringem a um único habitat, já outras são cosmopolitas e residem em uma variedade de habitats como solo, águas superficiais e de fundo. O trato gastrointestinal animal e humano constitui habitat primário, já as encontradas em água, solo e sedimentos estariam no secundário (Gordon, 2001; Leclerc et al., 2001).

E. coli é utilizada como indicador de poluição fecal por ser membro permanente do trato gastrointestinal e sua presença na água tem sido considerada sugestiva da presença de patógenos bacterianos. Vários microrganismos potencialmente patogênicos entéricos como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., e vírus da hepatite A já foram encontrados em águas de superfície como resultado de contaminação fecal humana. A defecação por animais domésticos poderia ainda contribuir com patógenos como *Escherichia coli* O157: H7 e *Cryptosporidium* spp. (Ahmed et al., 2005). Há, no entanto,

algumas evidências de que este indicador fecal pode se originar de outras fontes não entéricas, sobreviver por tempo significativo em águas tropicais ou temperadas, ou mesmo tornar-se parte da comunidade microbiana aquática. Determinar a origem da contaminação fecal em ambientes aquáticos é essencial para estimar os riscos de saúde associados com a poluição e para desenvolver estratégias que controlem a poluição dos recursos hídricos (Blanch et al., 2006; Kaneene et al., 2007).

2.2 Resistência a antimicrobianos no ambiente aquático

A utilização dos antimicrobianos são provavelmente uma das formas mais bem sucedida de quimioterapia na história da medicina. No passado, salvaram milhares de vidas e mantêm sob controle doenças infecciosas que atormentaram a humanidade. Inicialmente, após a sua introdução na prática clínica na década de 1940, os antimicrobianos foram extremamente eficientes no tratamento de bactérias patogênicas, levando muitos a acreditarem que as doenças infecciosas se tornariam um problema do passado. No entanto, o surgimento rápido de bactérias resistentes aos antimicrobianos, especialmente microrganismos multiresistentes, durante as últimas décadas, expôs a nossa falta de conhecimento sobre a evolução e sobre os processos ecológicos que ocorrem nos ecossistemas microbianos (Aminov, 2009).

A aquisição e propagação de determinantes de resistência aos antimicrobianos entre populações de bactérias são os problemas mais relevantes para o tratamento de doenças infecciosas (Alonso et al., 2001). Os

dois principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos são a aquisição de genes de resistência através da transferência horizontal e a mutação (Martínez, 2009). Embora as mutações em genes alvo para a ação dos antimicrobianos devessem ser a principal causa da resistência aos antimicrobianos, logo se tornou evidente que a aquisição de determinantes de resistência através da transferência horizontal de genes tem um papel importante no desenvolvimento e disseminação de resistência aos antimicrobianos entre as bactérias (Alonso et al., 2001).

O uso indiscriminado de antimicrobianos e a disseminação de resistência mediados através de incorporação de DNA livre no ambiente e elementos genéticos móveis como bacteriófagos, plasmídeos, transposons e integrons contribuem para a disseminação de resistência aos antimicrobianos entre as bactérias de diferentes grupos taxonômicos e ecológicos (Lim et al., 2009; Levy & Marshall, 2004). A ampla utilização de antimicrobianos em larga escala por humanos e na medicina veterinária acarreta na seleção de bactérias resistentes para o ambiente (Reinthal et al., 2003).

Recentemente, o monitoramento de fármacos residuais no meio ambiente vem ganhando grande interesse devido ao fato de muitas dessas substâncias serem freqüentemente encontradas em estações de tratamento de esgoto que podem atingir ou impactar os corpos d'água receptores (Bila & Dezotti, 2003).

A presença de antimicrobianos no ambiente aquático ocorre através da deposição direta da droga excedente no esgoto, como também na excreção das drogas nas fezes e na urina. A maioria dos compostos utilizados na

medicina são metabolizados parcialmente pelos pacientes sendo o restante descartado em estações de tratamento de esgoto ou diretamente em águas residuais (Kummerer, 2004). Em alguns casos estima-se que cerca de 50% a 90% da droga administrada pode ser eliminada pelo organismo na sua forma ativa (Raloff, 1998), onde podem ser encontrados em sistema de tratamento de esgoto sendo estes descartados em corpos da água receptores como rios e lagos (Kummerer, 2004).

Antimicrobianos têm sido detectados em quantidades da ordem de microgramas por litro em diferentes compartimentos ambientais como estação de tratamento de esgoto, águas residuais, águas superficiais e águas profundas (Kummerer, 2003). Um estudo realizado por Hirsh et al. (1999) identificou 18 antimicrobianos em amostras de estações de tratamento de esgoto e águas superficiais. Kolpin et al. (2002) em amostras de águas superficiais detectaram antimicrobianos de diversas classes como tetraciclina, sulfonamidas, macrolídeos, fluoroquinolonas, lincomicina e trimetoprima. Estudos demonstram que vários antimicrobianos parecem ser persistentes no meio ambiente, não sendo completamente removidos durante o processo de tratamento da água (Bila & Dezotti, 2003). Apenas alguns dos compostos foram parcialmente biodegradáveis em teste realizados em sistemas aquáticos (Kummerer, 2003).

Uma vez no esgoto, os antimicrobianos podem alcançar ambientes aquáticos naturais, mesmo quando tratados. De acordo com Baquero et al. (2008) uma estação de tratamento de esgoto só consegue eliminar parcialmente os antimicrobianos presentes. Se elevadas concentrações desses

antimicrobianos são mantidas nos efluentes e em estações de tratamento de esgoto, estes podem tornar-se uma importante fonte de seleção de bactérias resistentes (Kummerer, 2003). Este fato vem demonstrar que populações de bactérias resistentes podem prevalecer nos diversos compartimentos de estações de tratamento de esgoto com potencial risco de lançamento no meio aquático (Meirelles-Pereira et al., 2002).

O uso de corpos de água como receptáculos para efluentes urbanos aumentou com o crescimento da população, agravando o declínio das condições sanitárias em diversas comunidades humanas (Meirelles-Pereira et al., 2002). A contaminação de águas superficiais e subterrâneas com efluentes não tratados causa sérios danos ambientais. Altos níveis de nitrogênio e fósforo são descartados nessas águas causando a eutrofização, além disso, a população é exposta a patógenos através de águas para recreação (Wiggins et al., 1999). Como os rios são uma das principais fontes de água direta ou indiretamente para o consumo de humanos e de animais, a sua poluição pode contribuir para a seleção de resistência aos antimicrobianos (Goñi-Urriza et al., 2000). A água não constitui só uma forma de disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre população humana e animal, mas também a via pelas quais genes de resistência são introduzidos em ecossistemas naturais (Baquero et al., 2008).

Bactérias resistentes aos antimicrobianos têm sido observadas em diversos ambientes aquáticos incluindo esgoto hospitalar (Prado et al., 2007), esgoto doméstico (Heuer et al., 2002), lodo de esgoto (Reinthaler et al., 2003),

águas subterrâneas (Gallert et al., 2005) e águas de rios (Lima-Bittencourt et al., 2007).

A maioria das investigações sobre a resistência aos antimicrobianos no ambiente aquático estão centradas em bactérias de origem fecal, porque essas são utilizadas como indicadores de poluição e podem estar associadas a doenças infecciosas. A presença de bactérias coliformes em corpos d'água pode indicar o contato dessa água com esgotos urbanos, onde se observa a grande possibilidade de transmissão de doenças por veiculação hídrica. Na condição de bioindicadora de poluição antrópica, o grupo coliforme pode oferecer grande risco de transmissão de doenças. Entretanto, cepas dessas bactérias isoladas de ambientes apresentando perfis característicos de resistência aos antimicrobianos podem apresentar um sério risco ambiental na medida em que estas cepas de bactérias coliformes podem disseminar a resistência para outras bactérias, inclusive aquelas caracteristicamente patogênicas (Goñi-Urriza et al., 2000).

Estudos de padrões de resistência têm focado a patogenicidade das populações bacterianas estudadas, mas sabe-se que as bactérias comensais podem servir de reservatório de genes de resistência a antimicrobianos (Levy & Marshall, 2004). Portanto, as informações provenientes de estudos de bactérias patogênicas podem não ser representativas de todas as bactérias. A maioria dos estudos sobre a resistência a antimicrobianos são realizados com bactérias isoladas de ambientes altamente seletivos relacionados à clínica. Assim, estudos que avaliam a resistência aos antimicrobianos em ecossistemas naturais são de alta relevância para a identificação de

reservatórios ambientais da resistência bacteriana a antimicrobianos (Lima-Bittencourt et al., 2007).

Olayemi & Opaleye (1990) isolaram coliformes de amostras de esgoto doméstico e hospitalar, incluindo *E.coli*. Todos os isolados foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano e as taxas de resistência mais elevadas foram encontradas para ampicilina, tetraciclina e cloranfenicol.

Os padrões de resistência aos antimicrobianos tem sido utilizados para a identificação de fontes de poluição fecal. Sayah et al. (2005) identificaram padrões de resistência de antimicrobianos em isolados de *E.coli* provenientes de fossas sépticas de humanos, animais domésticos e selvagens e compararam estes com padrões de resistência de isolados *E.coli* obtidos de amostras de águas superficiais. Os autores observaram semelhanças nos padrões de resistência entre os isolados de amostras fecais e do ambiente agrícola, os índices de isolados resistentes à cefalotina foram maiores no ambiente agrícola do que nas amostras fecais. Os isolados das amostras de água foram resistentes somente à cefalotina, através desses resultados os autores sugeriram que os padrões de resistência das amostras do ambiente agrícola podem representar risco para a contaminação das águas com bactérias resistentes aos antimicrobianos. Kelsey et al. (2003) utilizando a resistência múltipla aos antimicrobianos identificaram áreas de águas superficiais afetadas por poluição fecal de origem humana, neste estudo foi comparado a resistência múltipla aos antimicrobianos e padrões de resistência de águas superficiais e esgoto local, pode ser possível identificar áreas impactadas por fontes de poluição humana fecal e sugerir soluções para esta

poluição. Harwood et al. (2000) realizaram um estudo em que analisaram os padrões de resistência aos antimicrobianos de *Enterococcus* sp e coliformes termotolerantes isolados a partir de fontes conhecidas. A análise dos padrões de resistência foi utilizada para estabelecer a relação entre padrões de resistência aos antimicrobianos e a origem bacteriana.

Estudos que visam a associação entre resistência a antimicrobianos e poluição fecal são importantes, pois facilitam o manejo dos recursos hídricos, além de fornecerem dados epidemiológicos em termos de saúde pública (Müller, 2006).

2.3 Resistência aos antimicrobianos através da presença de integrons

A disseminação de genes de resistência a antimicrobianos é um problema crescente para o tratamento de doenças infecciosas. Muitos genes de resistência aos antimicrobianos estão localizados em plasmídeos, transposons e integrons permitindo a sua transferência entre diferentes gêneros e espécies de bactérias. Genes que conferem resistência a várias classes de antimicrobianos e aos desinfetantes são encontrados em cassetes gênicos, estes, por sua vez, constituem um *pool* de genes (Partridge et al., 2009).

Na década de 1980 foi descoberto um terceiro mecanismo de disseminação de genes de resistência, que envolve a integração de genes de resistência por mecanismo de recombinação sítio-específico, este mecanismo foi chamado de integron (Lévesque et al., 1995). A definição de integrons foi

proposta por Hall e Collis (1995), sendo definidos como elementos que contêm determinantes genéticos de componentes do sistema de recombinação sitio-específico que reconhece e captura cassetes gênicos móveis (Fluit & Schmitz, 1999). Os integrons se caracterizam por serem capazes de capturar genes que codificam determinantes de resistência a antimicrobianos e determinantes de outras funções, estão amplamente disseminados em diversos membros das enterobactérias e outras bactérias Gram-negativas (*Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*) (Sabaté & Prats, 2002).

Atualmente, são conhecidas nove classes de integrons, a classificação é baseada nas diferenças das seqüências dos genes que codificam a integrase. As classes 1, 2 e 3 contêm cassetes gênicos de resistência a antimicrobianos, integrons pertencentes às classes 4, 5, 6 e 7 contêm cassetes que não codificam resistência aos antimicrobianos, a classe 9 contém um cassete gênico de resistência a antimicrobiano e outros com funções desconhecidas e o integron pertencente a classe 8 não apresenta nenhum cassete gênico. As classes 2 e 3 de integrons apresentam 40% e 61% de similaridade com integrase de classe 1, respectivamente (Sabaté & Prats, 2002; Oh et al., 2002). Integrons de classe 1 são amplamente encontrados em isolados clínicos e a maior parte dos cassetes gênicos de resistência aos antimicrobianos conhecidos são pertencentes a essa classe. Mais de 100 cassetes gênicos já foram identificados em integrons de classe 1, em contraste com integrons de classe 2, onde foram identificados seis cassetes de resistência (Mazel, 2006; Yang et al., 2009). Integrons da classe 1, por estarem presentes em plasmídeos e transposons, contribuem para a disseminação e

associação com a multiresistência aos antimicrobianos em Enterobacteriaceae entre outras Gram-negativas e em algumas bactérias Gram-positivas (Leverstein-Van Hall et al., 2003; Agersø & Sandvang, 2005).

O integrons são constituídos por três elementos que são necessários para a captura e expressão dos cassetes gênicos, um que codifica uma integrase, outro sítio de recombinação (*attI*) e um promotor para a expressão do genes presentes nos cassetes gênicos. Os integrons pertencentes a classe 1 apresentam dois segmentos conservados separados por uma região variável na qual foram integrados genes de resistência a antimicrobianos ou cassetes gênicos com função desconhecida (Sabaté & Prats, 2002). O segmento conservado 5' (5'CS) é formado por um gene *intl*, uma região promotora e um sítio de recombinação (*attI1*) e o segmento conservado 3' (3'CS) contém os genes *qacED1* e *sulI* que determinam a resistência ao brometo de etídio e compostos quaternário de amônio e sulfonamida, respectivamente (Lévesque et al., 1995).

Os cassetes gênicos do integron são expressos através de uma região promotora denominada de P_c localizada no segmento conservado 5' adjacente ao gene que codifica a integrase. O promotor P_c é constituído por duas seqüências de seis bases nas posições -35 e -10 pb. Em alguns casos, um segundo promotor é criado através da inserção de três resíduos G que aumentam o espaçamento entre os sítios entre -35 e -10 sendo intercalados por 17 pb. Diversas variações já foram identificadas em P_c e resultaram em diferentes níveis de expressão dos cassetes gênicos (Collis & Hall, 1995; Gonzáles et al., 2004; Partridge et al., 2009). Além disso, Collis & Hall (1995)

demonstraram que a posição do cassete gênico no integron em seus experimentos determinava os níveis de resistência. Os autores concluíram que as bactérias apresentaram maiores níveis de resistência quando o gene inserido no cassete gênico encontrava-se mais próximo ao promotor.

A região variável do integron pode apresentar diversos cassetes gênicos inseridos, estes são compostos por um único gene e por uma sequência curta, chamada de elemento base 59 (59 be) que funciona como sítio de recombinação específica. Os genes presentes nos cassetes gênicos normalmente não apresentam promotores, necessitando assim da região promotora presente no integron para a sua expressão (Bennett, 1999). A integrase permite a interação entre os sítios *attI* e o 59 be unindo ambos os sítios e facilitando a integração e excisão dos cassetes na região variável do integron (González et al., 2004). O número de cassetes gênicos associados aos integrons pode variar de nenhum a mais de 100 cassetes gênicos (Bennett, 1999; Yang et al., 2009).

Vários genes de resistência observados em bactérias Gram-negativas são parte de cassetes gênicos inseridos em um integron, estes codificam resistência a uma grande diversidade de compostos como antimicrobianos, que incluem β -lactâmicos, aminoglicosídeos, trimetoprima, sulfonamidas, fenicóis, tetraciclinas, rifampicina, eritromicina e quinolonas. Além disso, integrons de classe 1 contêm genes que poderiam ser remanescentes da estrutura do segmento conservado 3' no cassete gênico que codifica resistência a compostos quaternário de amônio e sulfonamidas (González et al., 2004; Antunes et al., 2006).

Os integrons são encontrados com mais frequência em isolados clínicos, porém estes tem sido isolados em ambientes aquáticos, animais de estimação e crianças, o que reflete a sua disseminação (Gonzáles et al., 2004). Antunes et al. (2006) detectaram a presença de integrons de classe 1 e 2 em *Salmonella enterica* de isolados clínicos, do ambiente e de carnes (frango, porco e gado). Henriques et al. (2006) encontraram 29,6% dos isolados de Enterobacteriaceae e 21% dos isolados de *Aeromonas* positivos para integrons de classe 1 provenientes de águas estuarinas. Yu et al. (2003) detectaram integrons de classe 1 em 54% dos isolados *E.coli* de amostras de urina. Kadlec & Schwarz (2008) analisaram a distribuição de integrons de classe 1 e 2 em isolados de *E.coli* obtidas de suínos, cavalos, cães e gatos e cerca de 18,6% dos isolados apresentaram integrons.

A resistência a múltiplas drogas em microrganismos entéricos como *E.coli*, está associada com a presença de integrons, sendo frequentemente relatado em isolados clínicos de *E. coli*. No entanto, existem poucos trabalhos relacionando a presença de integrons em indivíduos saudáveis (Infante et al., 2005; Skurnik et al., 2005; Cocchi et al., 2007; Vinué et al., 2008). Integrons de classe 1 foram encontrados em 11% - 42% isolados *E.coli* comensais de indivíduos adultos saudáveis. A alta prevalência do gene *intI1* nesses isolados sugere que os isolados comensais podem representar um importante reservatório de determinantes de resistência, onde cassetes gênicos podem se disseminar entre os isolados comensais e bactérias patogênicas (Sepp et al., 2009).

2.4 Bombas de efluxo

Bactérias resistentes aos antimicrobianos são freqüentemente isoladas em todo o mundo, possivelmente em decorrência do uso indiscriminado de antimicrobianos. Ao longo de sua evolução, os microrganismos desenvolveram versáteis mecanismos de resistência aos antimicrobianos bem como a outras drogas (Moreira et al., 2004). A resistência aos antimicrobianos ocorre normalmente como um resultado da inativação ou modificação de drogas, alteração do sítio alvo ou acúmulo reduzido associados à diminuição de permeabilidade da membrana e/ou sistema de efluxo (Poole, 2004).

Bactérias Gram-negativas caracterizam-se por serem intrinsecamente mais resistentes aos inibidores lipofílicos e anfifílicos do que as Gram-positivas. Estes inibidores incluem corantes, detergentes, ácidos graxos livres, antimicrobianos e outros agentes quimioterápicos. Esta resistência intrínseca é atribuída a menor permeabilidade devido à presença da membrana externa. A membrana externa atua como uma barreira, entretanto esta não é capaz de impedir a entrada dessas substâncias (Nikaido, 1996; Díaz, 2003).

No final da década de 1980, foram descobertos os primeiros sistemas de efluxo em procariotos. Estes poderiam explicar a resistência intrínseca dessas bactérias (Díaz, 2003). Esta propriedade é usada no enriquecimento seletivo de bactérias Gram-negativas, especialmente dos membros da família Enterobacteriaceae, por exemplo com Ágar MacConkey

(contém cristal violeta e sais biliares) e Ágar EMB (contendo corantes) (Nikaido, 1996).

Células bacterianas, bem como células eucarióticas, possuem sistemas de transporte localizados na membrana que estão envolvidos em funções vitais para a célula como a absorção de nutrientes, excreção de compostos tóxicos e manutenção da homeostase celular (Moreira et al., 2004). Rojas et al. (2001) isolaram *Pseudomonas putida* capazes de crescer na presença de solventes orgânicos como tolueno e xileno devido à presença de bombas de efluxo.

As bombas de efluxo são proteínas transportadoras envolvidas na extrusão de substâncias tóxicas do interior das células para o meio externo. As bombas de efluxo podem ser específicas para um substrato ou podem transportar uma gama de compostos estruturalmente diferentes e não relacionados, por estes motivos podem estar associadas com resistência a múltiplas drogas (Webber & Piddock, 2003). As primeiras evidências da presença de bombas de efluxo de múltiplas drogas foram mostradas por Tennent et al. (1989), Rouch et al. (1990) e Littlejohn et al. (1991, 1992) em isolados de *Staphylococcus* resistentes a compostos quaternário de amônio. Esses autores observaram que a proteína QACA, uma translocase de membrana, transporta brometo de etídeo, entre outras drogas para o exterior da célula.

Genes e proteínas das bombas de efluxo estão presentes tanto em bactérias resistentes aos antimicrobianos quanto em bactérias sensíveis.

Alguns sistemas podem ser induzidos por seus substratos específicos, fazendo com que um isolado aparentemente sensível hiper-produza uma bomba de efluxo, assim tornando-se resistente. Esta resistência aos antimicrobianos causada por um sistema de efluxo pode ocorrer devido a: hiper-expressão da bomba de efluxo ou pela produção de proteína que tenha substituições de aminoácidos, fazendo com que se torne mais eficiente na exportação do substrato. Em qualquer um dos casos, a concentração intracelular do antimicrobiano diminui, fazendo com que o microrganismo torne-se menos suscetível àquele agente antimicrobiano específico. Os genes que codificam bombas de efluxo podem estar presentes em plasmídeos, aqueles encontrados no cromossomo são freqüentemente relacionados com mecanismo intrínseco de resistência, permitindo a sobrevivência da bactéria em ambientes hostis, como por exemplo, na presença de antimicrobianos (Piddock, 2006b).

Transportadores de múltiplas drogas podem ser associados à resistência intrínseca e à resistência adquirida aos antimicrobianos. A resistência adquirida a múltiplas drogas pode ocorrer por três mecanismos: (a) mutação nos genes que codificam os transportadores de multi-drogas alterando nível de expressão, (b) mutação em genes específicos ou em genes regulatórios, resultando em um aumento da expressão de transportadores de múltiplas drogas e (c) a transferência de genes de resistência entre as células através de plasmídeos ou transposons (Moreira et al., 2004).

A ampla especificidade dos transportadores do sistema de efluxo confere um mecanismo de resistência que pode reforçar o efeito, e/ou favorecem a aquisição de outros mecanismos de resistência a antimicrobianos,

como as mutações nos alvos de ação dos antimicrobianos ou modificação das drogas (Mahamoud et al., 2007).

Os sistemas de efluxos bacterianos são agrupados em famílias de proteínas transportadoras com base na homologia de seqüências de aminoácidos, semelhanças na estrutura secundária e tamanho (Bolhuis et al., 1997). São divididas em cinco famílias: duas delas são superfamílias antigas, conhecidas como superfamília *ATP-binding cassette* (ABC) e *Major Facilitator Superfamily* (MFS). As outras três famílias são menores e evolutivamente mais recentes: *Resistance-Nodulation-cell Division* (RND), *Small Multidrug Resistance* (SMR) e *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (MATE) (Al-Karablieh et al., 2009). Todos estes sistemas utilizam a FPM como fonte de energia, com exceção da superfamília *ATP-Binding- Cassette* (ABC), que utiliza a hidrólise do ATP para a exportação dos substratos (Weber & Piddock, 2003; Moreira et al., 2004).

Antigamente, acreditava-se que os membros da família RND eram restritos às bactérias Gram-negativas, porém mais tarde foram identificados nos três domínios: Eukarya, Archaea e Bacteria. A família RND é o sistema de efluxo mais importante em Gram-negativos em termos de resistência aos agentes antimicrobianos, embora os membros das famílias MFS, MATE e SMR também mostrem uma capacidade limitada para promover a resistência a alguns biocidas e antimicrobianos. Esta família apresenta baixa especificidade de substrato, sendo capaz de transportar uma variedade de compostos como antimicrobianos, biocidas, corantes, detergentes, inibidores metabólicos,

hidrocarbonetos aromáticos, sais biliares e homoserina lactonas associados com “quorum-sensing” (Moreira et al., 2004; Poole, 2004).

O sistema de efluxo RND foi descrito em várias bactérias: *E. coli*, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria* spp., *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Burkholderia* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Klebsiella* spp., *A. baumannii*, *Serratia marcescens* e *Campylobacter jejuni* (Moreira et al., 2004; Poole, 2004).

O sistema RND (tais como AcrAB-TolC de *E. coli* e MexAB-OprM de *P. aeruginosa*) desempenham um papel importante na produção resistência a múltiplas drogas em bactérias gram-negativas. O sistema de efluxo RND possuem três componentes: proteína transportadora localizada na face internada membrana externa responsável pelo efluxo (por exemplo AcrB), uma proteína acessória (também conhecido como uma membrana-proteína de fusão, por exemplo, AcrA), que está localizado no espaço periplasmático e uma proteína na membrana externa (por exemplo, TolC). Através do sistema AcrAB-TolC, por exemplo, acredita-se que o transportador proteína AcrB, capta o substrato e depois o exporta para o meio extracelular através TolC que constitui um canal na membrana. A associação entre AcrB e Tolc é mediada por uma proteína acessória periplasmática AcrA (Piddock, 2006a; Nikaido, 2009).

O sistema AcrAB-TolC em *E.coli* é homólogo ao sistema MexAB-OprM em *P. aeruginosa*, AcrAB-TolC é responsável pela aquisição de resistência múltipla a antimicrobianos em *E.coli*. O perfil de substrato da bomba AcrAB-TolC inclui corantes catiônicos, como acriflavina, cristal violeta, brometo

de etideo e rodamina 6G; antimicrobianos, como as penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina, novobiocina, rifampicina, ácido fusídico, ácido nalidíxico; detergentes como Triton X-100 e SDS e sais biliares (Nikaido & Takatsuka, 2009).

Källman et al. (2009) demonstraram em isolados clínicos de *E.coli* que a interação de diferentes mecanismos de resistência como perda da permeabilidade da membrana, efluxo e produção de AmpC contribuem para a resistência a cefuroxima em isolados não produtores de ESBL. Thorrold et al. (2007) evidenciaram que atividade de bomba de efluxo em *E.coli* e *Salmonella* spp resistentes a fluoroquinolonas e tetraciclina implicam na redução da susceptibilidade a agentes utilizados na limpeza doméstica.

Os operons *acrD* e *acrE* também codificam bombas de efluxo, e foi demonstrado que AcrD é responsável pelo efluxo de aminoglicosídeos. Deleções no gene *acrD* resultaram na redução duas a oito vezes da CIMs para amicacina, gentamicina, neomicina, canamicina e tobramicina, e células com essas deleções acumularam elevados níveis de diidroestreptomicina e gentamicina. AcrE e AcrD apresentam 80 e 88% de similaridade com AcrA e AcrB, respectivamente (Moreira et al., 2004; Piddock, 2006a).

Em geral, as bombas de efluxo conferem baixos níveis de resistência a drogas, em contraste com altos níveis de resistência conferidos por mutações em genes que codificam alvos primários desses agentes. De fato, mesmo a super-expressão de uma bomba de efluxo com espectro ampliado para múltiplas drogas pode não conferir um alto nível de resistência. Entretanto, embora o significado clínico imediato desta resistência seja

pequeno, a diminuição da concentração intracelular do antimicrobiano permite à bactéria sobreviver até que sejam selecionados mutantes com alterações moleculares que podem determinar níveis de resistência clinicamente importantes (Webber & Piddock, 2003).

2.5 Seqüências ERIC e tipificação molecular através da técnica de ERIC-PCR

Famílias de elementos repetitivos foram descritos em bactérias, sendo conhecidos como *repetitive extragenic palindrome* (REP), *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC) e elementos BOX (Gillings & Holley, 1997). Oligonucleotídeos para cada um dos elementos têm sido usados na reação em cadeia da polimerase para amplificar regiões entre os elementos repetitivos. Os diferentes protocolos são referidos como REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR, coletivamente chamados de rep-PCR "*repetitive sequence element*" (Versalovic et al., 1991).

As seqüências conhecidas como *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC) são seqüências curtas e altamente conservadas (Versalovic et al., 1994; Meacham et al., 2003). Estas seqüências foram identificadas primeiramente em *E.coli* e *Salmonella enterica* sorovar Tiphymurium e posteriormente em outros membros da família Enterobacteriaceae, bem como em *Vibrio cholerae* (Wilson & Sharp, 2006). Esses elementos repetitivos, também descritos como unidades intergênicas repetitivas, são pequenas seqüências repetitivas compostas por 124-127pb contendo uma repetição conservada invertida de 40 pb (Niemann et al., 1999). As seqüências ERIC

localizam-se em regiões transcritas não codificantes e em ambas as orientações do cromossomo (Versalovic et al., 1994).

O número de cópias das seqüências ERIC varia entre as espécies. Estima-se que em *E.coli* K-12 existam cerca de 30 cópias, em *S. Typhimurium* cerca de 150 cópias, enquanto no genoma de *Photorhabdus luminescens* são encontrados mais de 700 cópias. A função das seqüências ERIC presentes no genoma dos procariotos é desconhecida, mas acredita-se que estas possam contribuir para a evolução da estrutura cromossomal através de rearranjos por deleção, duplicação e inversão, além disso, a presença das seqüências ERIC pode reforçar a expressão de um gene, fornecendo sítio de ligação de proteínas como a DNA polimerase e DNA girase ou aumentando a longevidade do mRNA (Wilson & Sharp, 2006). Newbury et al. (1987) demonstraram que seqüências repetitivas poderiam ser capazes de estabilizar o mRNA. Anisimov et al. (2005) sugeriram que uma inserção de seqüência ERIC em uma região promotora poderia aumentar a expressão do gene *ybtA* em *Yersinia enterocolitica*.

A metodologia ERIC-PCR foi desenvolvida por Versalovic et al. (1991). Neste trabalho foi apresentado um método de “DNA fingerprinting” para analisar o genoma bacteriano utilizando oligonucleotídeos iniciadores complementares às seqüências ERIC, com a base inosina ocupando as posições não conservadas para a amplificação das seqüências repetitivas presentes no genoma bacteriano (Versalovic et al., 1991; Olive & Bean, 1999). Os oligonucleotídeos iniciadores anelam-se nas seqüências presentes no genoma e, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), os produtos são

amplificados e separados em gel de agarose por eletroforese, resultando no polimorfismo de tamanhos de fragmentos (Meacham et al., 2003).

Essa técnica tem sido utilizada para a tipificação molecular de isolados bacterianos e tem demonstrado sucesso para diferenciar isolados de *Salmonella* (Saxena et al., 2002), *Helicobacter pylori* (Finger et al., 2006); *Streptococcus pyogenes* (Matsumoto et al., 2001), *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium abscessus* (Sampaio et al., 2006), *Escherichia coli* (Baldy-Chudzik et al., 2003; Borges et al., 2003), *Proteus mirabilis* (Michelini et al., 2008), *Pseudomonas aeruginosa* (Fuentefria et al., 2009) e várias outras bactérias.

A técnica é de fácil aplicação, podendo ser empregada para poucos ou muitos isolados, apresenta um melhor poder discriminatório se comparado à análise de restrição do gene 16S rRNA ou da região espaçadora 16S-23S amplificada (Olive & Bean, 1999). Wilson et al. (2009) avaliaram o poder discriminatório das técnicas de MLST, PFGE e rep-PCR para a tipificação de *Campylobacter jejuni*. O rep-PCR foi determinado por meio da presença das seqüências ERIC e BOX no genoma e os dados foram combinados. A comparação das três metodologias revelou que a combinação dos dados gerados com ERIC e BOX revelou um maior poder discriminatório que PFGE e MLST no estudo.

Por outro lado Olive & Bean (1999) evidenciaram uma correlação entre os resultados das técnicas de PFGE, padrão ouro para tipificação molecular, e ERIC-PCR. Neste estudo o ERIC-PCR apresentou poder

discriminatório inferior. Silbert et al. (2004) avaliaram três diferentes técnicas de tipificação molecular para bacilos Gram-negativos não-fermentadores. Todos os isolados utilizados no estudo foram submetidos às metodologias de ribotipificação automatizada, PFGE, e ERIC-PCR. Todos os isolados foram tipificados com a ribotipificação e ERIC-PCR, porém dois isolados não foram capazes de fornecer padrão eletroforético pelo PFGE. As três técnicas mostraram boa reprodutibilidade. As técnicas de ribotipificação e ERIC-PCR fornecem resultados em menos tempo. Da mesma forma, os custos para ERIC-PCR e PFGE foram inferiores aos da ribotipificação automatizada. PFGE apresentou o maior poder discriminatório para bacilos Gram-negativos não-fermentadores, entretanto, a ribotipificação automatizada e ERIC-PCR fornecem resultados em um menor tempo com poder discriminatório semelhante. Lim et al. (2009) caracterizaram isolados multiresistentes de *E.coli* através das técnicas moleculares PFGE, ERIC-PCR, REP-PCR e RAPD. As técnicas empregadas na tipificação molecular dos isolados resultaram na diferenciação dos isolados analisados. As técnicas de ERIC-PCR e REP-PCR foram capazes de diferenciar alguns isolados indistinguíveis pelo método de RAPD. Apesar da técnica apresentar um poder discriminatório inferior ao do PFGE, neste trabalho foi demonstrado que alguns isolados foram indistinguíveis através do PFGE, porém foram diferenciados através das técnicas que utilizam PCR. Estes resultados mostraram que os métodos de tipificação molecular de microrganismos devem ser complementares e as análises podem ser combinadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste estudo foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia 166 no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS).

3.1 Meios de cultura e soluções

Todos os meios de cultura e soluções utilizados na etapa experimental deste trabalho estão descritos nos Apêndices 8.1 a 8.3.

3.2 Caracterização dos pontos de coleta

As amostras de água superficial foram coletadas sazonalmente entre os períodos de outono/2007 e verão/2008 em oito pontos distintos da Lagoa dos Patos (FIGURA 1).

A Lagoa dos Patos e o seu estuário representam o segundo maior volume de águas interiores naturais no País. As águas da lagoa provém de

uma grande bacia de drenagem (201.600km²) que atravessa as mais industrializadas áreas do estado do Rio Grande do Sul. Principalmente na porção Norte, onde a influência marinha é inexistente, a lagoa serve como manancial a diversos municípios, incluindo-se a capital do estado do Rio Grande do Sul.

Nas suas margens, mais de 3 milhões de habitantes vivem em diversas cidades e vilarejos utilizando as suas águas para lazer, abastecimento público, indústrias, pesca comercial e de subsistência, agricultura (irrigação) e navegação (Yunes, 2009). As coletas foram realizadas nos seguintes pontos:

Enseada de Tapes (ponto A): Este município faz parte da região Centro-Sul, localiza-se a 30°,41 minutos de latitude e 51° e 25 minutos de longitude oeste e uma altitude de 5 metros, situando-se a 103 Km de Porto Alegre. A enseada da lagoa é utilizada para pesca, turismo, recreação, transporte. O local de coleta situa-se na Praia Municipal (lat. 30° 40' 18,4" S long. 51° 23' 30,9" W).

Trapiche de São Lourenço do Sul (ponto B): São Lourenço do Sul, localiza-se na parte Centro-Sul oriental do Estado do Rio Grande do Sul situada a uma distancia de 190 Km de Porto Alegre. A coleta neste município foi realizada nas coordenadas (lat. 31° 22' 06,6" S long. 51° 57' 36,3" W).

Saco da Mangueira (Rio Grande- ponto C): O Saco da Mangueira (SM) é uma enseada semifechada, possui uma área de 32Km² conectada ao estuário da Lagoa dos Patos. É uma área degradada por uma série de impactos antrópicos principalmente pelos lançamentos de esgotos domésticos

clandestinos e também lançamento de efluentes contendo resíduos ricos em compostos fosfatados e nitrogenados provenientes das indústrias de fertilizantes. As coordenadas do local de coleta são (lat. 32° 03' 35,13" S long. 52° 05' 20,54" W).

Museu Oceanográfico e Barra da Lagoa (Rio Grande- pontos D e E): Atividades humanas como dragagem, navegação, aterros e atividades agrícolas contribuem para a deterioração do estuário. Os locais de coletas foram: junto ao Museu Oceanográfico "Prof. Eliézer Rios" (M – ponto 03) (lat. 32° 01' 31,38" S long. 52° 05' 20,54" W) e na quarta secção da Barra (B – ponto 04) próximo a raiz do molhe oeste (lat. 32° 08' 56,46" S long. 52° 06' 04,09" W).

Praia do Cassino (Rio Grande- ponto F): Nos meses de veraneio este local recebe a vazão de vários córregos que desembocam ao longo da praia aumentando a quantidade de matéria orgânica de origem antrópica. Nos meses mais chuvosos recebe influência das descargas de água doce provenientes do sistema lagunar, recebendo grande volume de águas e matéria orgânica. As coletas foram realizadas nas coordenadas "lat. 32° 12' 18,09" S long. 52° 10' 23,09" W.

Parque Itapuã (Praia da Pedreira- ponto G e Praia de Fora- ponto H): O Parque Estadual de Itapuã localiza-se no município de Viamão, é uma unidade de conservação de proteção integral. O parque foi criado em 1973 e ficou fechado por mais de 10 anos para que pudesse haver a recuperação da área, por ser uma região onde ocorria extração de granito e ocupação urbana

desordenada (Rio Grande do Sul, 1997). As coletas foram realizadas nos seguintes locais na Praia de Fora (ponto 7) (Lat. $30^{\circ} 23' 14,7''$ S Long. $51^{\circ} 01' 12,4''$ W) e na Praia da Pedreira (ponto 8) (Lat. $30^{\circ} 21' 33,8''$ S Long. $51^{\circ} 02' 47,8''$ W) ambas liberadas para banho (Jornal da Universidade, 2007).

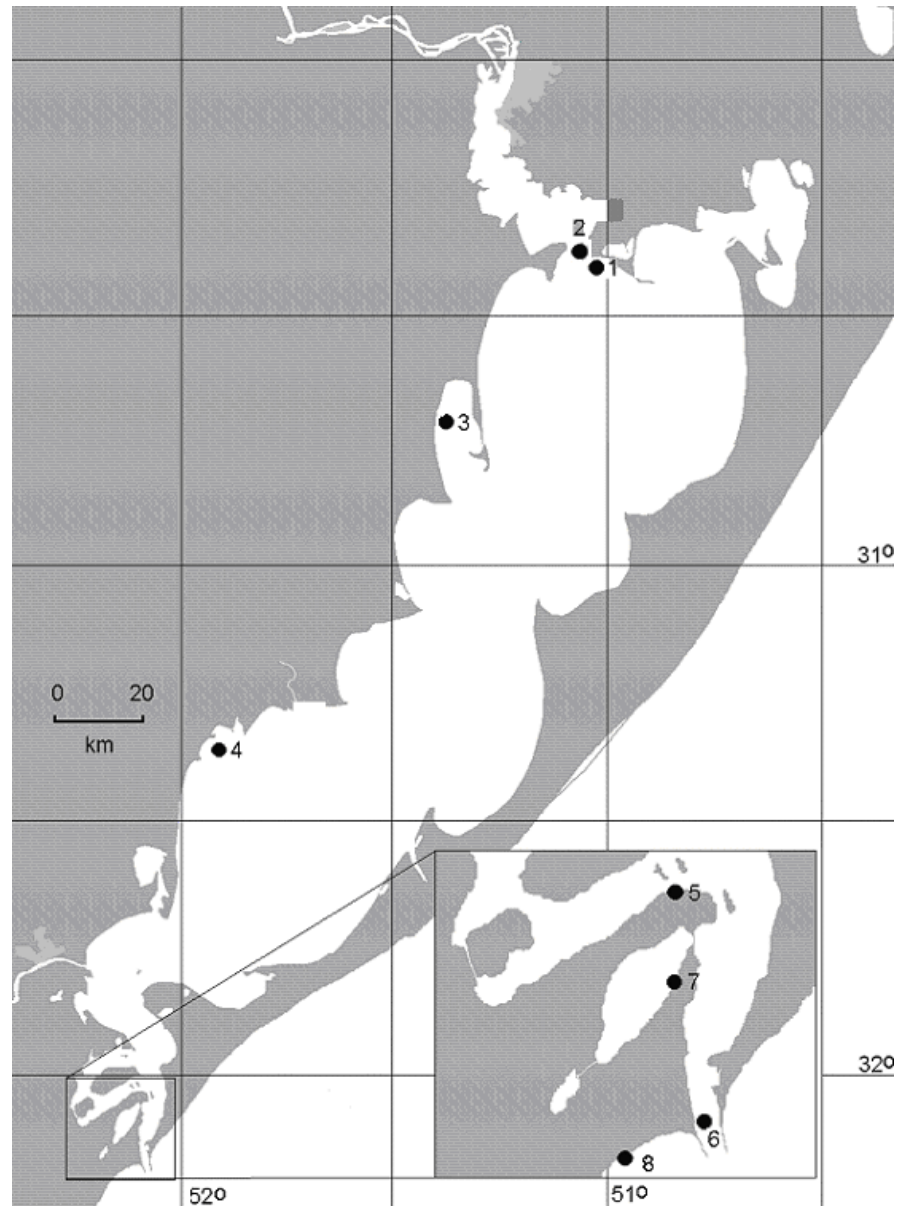


FIGURA 1: Localização dos pontos de coleta na Lagoa dos Patos. 1-2: Parque Itapuã, 1: H- Praia de Fora, 2: G- Praia de Pedreira Parque; 3: A- Enseada de Tapes; 4: B- Trapiche em São Lourenço do Sul; 5- 8: Rio Grande, 5: D- Museu Oceanográfico; 6: E- Barra da Lagoa; 7: C- Saco da Manguieira; 8: F- Praia do Cassino.

3.3 Amostras

3.3.1 Coleta e processamento das amostras

Em cada ponto de coleta, foram coletados de 3 a 4 litros de água, os quais foram acondicionados em frascos plásticos estéreis e transportados a baixa temperatura. A coleta das células foi realizada através da técnica membrana filtrante. As amostras foram diluídas até 10^{-4} em água peptonada 0,1%, homogeneizadas e filtradas na quantidade de 100mL em membranas filtrantes de estéreis com porosidade de 0,45 μ m. A filtração das amostras foi realizada em duplicata. Após a filtração, as membranas foram dispostas em placas contendo Ágar Les-Endo (8.1.1) e foram incubadas por 24h à 45°C. Após o período de incubação, foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), as colônias que apresentaram coloração verde metálica foram selecionadas e reisoladas em placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (8.1.2) e incubadas a 37°C por 18h. Após o período de incubação, foi verificada a pureza dos isolados e as colônias que apresentaram brilho verde metálica nas placas contendo EMB foram identificadas presumivelmente como *E. coli* e foram estocados em caldo BHI (8.1.3) com 15% glicerol a -20°C.

3.3.2 Recuperação e manutenção dos isolados

Os isolados foram recuperados em 2mL de caldo BHI (8.1.3) e incubados a 37°C por 24 h. Para verificar se as culturas estavam puras realizou-se isolamento em placas contendo TSA (8.1.4). A manutenção de

culturas puras foi realizada através da inoculação em tubos contendo TSA inclinado (8.1.4).

3.4 Identificação de *Escherichia coli*

A partir do TSA inclinado (8.1.4) foram realizadas as seguintes provas bioquímicas para a identificação de gênero e espécie: citrato, produção gás sulfídrico (H₂S), indol, motilidade, TSI, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e D-Sorbitol.

3.5 Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi avaliado através da técnica de difusão em Ágar Muller Hinton. Os isolados tiveram sua susceptibilidade testada frente a 15 antimicrobianos (TABELA 1).

Para a preparação da suspensão bacteriana de cada isolado, foram retiradas colônias isoladas de placas contendo TSA que foram suspensas em solução salina 0,9% até que atingissem a turbidez correspondente 0,5 da Escala de MacFarland. Após o preparo do inóculo, os isolados foram semeados com suabes estéreis em placas 150 mm contendo Ágar Muller Hinton. Foi empregada a metodologia de disco aproximação para testar a produção de β-lactamases de espectro estendido (ESBL). A metodologia consiste em posicionar os discos de ceftazidima, cefepime e cefotaxima a três centímetros de distância de um disco de amoxicilina- ácido clavulânico. A

deformação do halo de inibição ou o aparecimento de uma zona fantasma entre o substrato (ceftazidima, cefotaxima, cefepime) e o inibidor (amoxicilina-ácido clavulânico) caracteriza fenotipicamente o isolado como produtor de ESBL (PICÃO & GALES, 2007).

TABELA 1– Antimicrobianos utilizados para a avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados *E.coli*.

Antimicrobianos	Concentração do disco	Sigla	Marca
Ampicilina	10 µg	AMP	Sensifar
Amoxicilina-ácido clavulânico	20/10 µg	AMC	Sensifar
Aztreonam	30 µg	ATM	Sensifar
Imipenem	30 µg	IPM	Sensifar
Cefoxitina	30 µg	CFO	Sensifar
Ceftazidima	30 µg	CAZ	Sensifar
Cefotaxima	30 µg	CTX	Sensifar
Cefepima	30 µg	CPM	Sensifar
Piperacilina- tazobactam	100/10 µg	PPT	Sensifar
Amicacina	30 µg	AMI	Sensifar
Gentamicina	30 µg	GEN	Sensifar
Cloranfenicol	30 µg	CLO	Sensifar
Tetraciclina	30 µg	TET	Sensifar
Sulfametoxazol-trimetoprima	23,75/1,25 µg	SUT	Sensifar
Norfloxacin	10 µg	NOR	Sensifar

Os discos com os antimicrobianos foram dispostos com auxílio de uma pinça estéril nas placas já semeadas. As placas foram incubadas por 18h a 35°C. Após o período de incubação os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e os resultados reportados com base nos critérios estabelecidos pelo CLSI (2005) que permite classificar o perfil de cada isolado em sensível, intermediário e resistente. Todos os isolados que apresentaram perfil intermediário a antimicrobianos foram incluídos na categoria de

susceptibilidade reduzida. Os isolados foram considerados multiresistentes quando apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos.

3.6 Extração DNA

A extração de DNA seguiu o protocolo descrito por Misbah et al. (2005) com algumas modificações. Os isolados foram cultivados em placas contendo TSA a 37°C por 24h. Após a incubação, foram selecionadas de 2 a 3 colônias que foram semeadas em microtubos contendo 100µL de tampão TE (8.2.1) e fervidas por 10 minutos. Após a fervura foi adicionado igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (8.2.2) na proporção de 24:1, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 10 minutos, resultando num sobrenadante contendo DNA bacteriano.

3.7 Amplificação da região variável do integron de classe 1

Para a amplificação da região variável do integron através de PCR, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 5 CS' (5' GGCATCCAAGCAGCAAG 3') e 3 CS' (5' AAGCAGACTTGACCTGA 3') (Lévesque, 1995). As reações continham 1U *Taq polimerase* (pht), 2,5mM MgCl₂ (pht), 0,2mM dNTPs (Biolabs), 1µM de cada oligonucleotideo iniciador, 1x tampão de reação da *Taq polimerase* (pht) e água Milliq estéril para um volume final de 15µL. O programa de amplificação do DNA apresentava um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 min seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento 50°C por min, extensão 72°C por

1min, e uma extensão final de temperatura 72°C por 10min. Para todas as reações foi incluído como controle positivo *Pseudomonas aeruginosa* portadora do gene *bla*_{VIM-1}.

3.7.1 Análise dos fragmentos amplificados da região variável de integron de classe 1

Os produtos de PCR amplificados foram visualizados em gel de agarose a 0,7% (8.3.5) corado com brometo de etídeo, a uma corrente elétrica de 80v durante 1h em tampão TAE 1x (8.3.6). O gel foi analisado sob luz ultravioleta e fotografado com câmera digital Kodak 1D (versão 3.5.2).

3.7.2 Análise do tamanho de fragmentos da região variável do integron classe 1

A análise do tamanho dos fragmentos amplificados foi realizada através do programa Kodak 1D Image Analysis software. Para a análise dos fragmentos amplificados, foi utilizado como marcador de tamanho molecular o DNA fago lambda clivado com a enzima *Pst* I(Gibco).

3.8 Concentração Inibitória Mínima e sistema de efluxo dependente da força próton motiva

A determinação da Concentração Inibitória Mínima da ampicilina (CIM)

e a determinação do sistema de efluxo dependente da força próton motiva baseou-se em Moreira et al.(2005): 230µl de cada cultura, reativada em caldo BHI e diluída em caldo Muller Hinton para 10^5 UFC ml-1, foram adicionados à placa de microtitulação, juntamente com o antimicrobiano, nas diferentes concentrações, em um total de 300µl por orifício. A CIM foi estabelecida como a menor concentração do antimicrobiano que impedia o crescimento bacteriano. Para detecção do sistema de efluxo dependente de energia, foi utilizado um desacoplador da força próton motiva, o carbonil-cianeto-m-clorofenilhidrazona (CCCP) que diminui a energia disponível ao transporte. Previamente foram realizados testes com diversas concentrações de CCCP, para cada isolado. A concentração de CCCP escolhida para cada isolado foi a maior que mantinha o crescimento microbiano. O volume final, para cada orifício, foi de 300µl, sendo 230µl padronizados para a adição da cultura bacteriana 10^5 UFC ml-1, e os 70µl restantes formados por antimicrobiano, CCCP e caldo Muller Hinton. A redução da CIM, em presença do desacoplador, indica a necessidade da PMF para o mecanismo de resistência.

3.9 Amplificação das seqüências ERIC através de PCR

As reações de ERIC-PCR foram realizadas segundo Fuentefria (2009). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de ERIC-PCR foram ERIC1R (5' TGTAGGCTCCTGGGGATTAC 3') e ERIC2R (5' AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG 3') descritos por Versalovic et al. (1991). As reações foram realizadas em misturas contendo 6,5mM de $MgCl_2$ (pht), 1,25mM de dNTP's (Biolabs), 400ng/ µL de cada oligonucleotídeo, 1U *Taq*

polimerase (pht), 1x de tampão de reações da *Taq polimerase* (pht) e 5 μ L DNA bacteriano em um volume final de reação 25 μ L.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 7 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 51°C por 1min e extensão a 72°C por 1min e 30s, e um ciclo final de extensão a 72°C por 15min. Em todas as reações de ERIC-PCR, a cepa padrão *E.coli* ATCC 25922 foi incluída para a observação da reprodutibilidade da reação.

3.9.1 Análise dos fragmentos amplificados de ERIC-PCR

Aos 25 μ L do produto de PCR foi adicionado 5 μ L tampão de corrida 6x (8.3.1) e os fragmentos foram separados por migração eletroforética em gel de agarose com polímero de sinergel a 2% (8.3.2) com TBE 0,5x (8.3.3) corado com brometo de etídeo (concentração final 0,75 μ g/mL). Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 60v por 4h. Após a migração, o gel foi analisado sob luz ultravioleta e fotografado com câmera digital Kodak 1D.

3.9.2 Análise dos tamanhos dos fragmentos de ERIC-PCR

A análise do tamanho dos fragmentos amplificados foi realizada através do programa Kodak 1D "Image Analysis Software". Para a análise dos

fragmentos amplificados, foi utilizado como marcador de tamanho molecular o DNA de fago lambda clivado com a enzima *Pst* I(Gibco).

3.9.3 Análise estatística e construção de dendrograma

Após a análise do tamanho dos fragmentos, foi construída uma matriz binária com o objetivo de determinar a igualdade das bandas entre diferentes isolados, conforme o tamanho dos fragmentos comparado com marcador DNA fago lambda clivado com *Pst* I (Gibco). A matriz binária foi construída com base na presença representada por 1 ou ausência representada por 0 de um determinado fragmento. Os dados da matriz binária foram exportados para o programa SPSS (versão 11.0) para a construção da matriz de similaridade e dendrograma. A similaridade entre os isolados foi avaliada através do coeficiente de Jaccard. As análises de agrupamentos gerados foram realizadas através de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Averages*). A diversidade entre os isolados foi calculada pelo índice de Shannon-Weaver, H' . Os valores foram obtidos através da fórmula:

$$H' = C/N \cdot (N \cdot \log N - \sum n_i \cdot \log n_i),$$

Onde n_i corresponde ao número de isolados idênticos da espécie sob análise, N corresponde ao número total de isolados e C é uma constante de valor igual a 2,3 (Borges et al., 2003).

3.10 Análise estatística

Para comparar as contagens *E.coli* entre os pontos de coleta e estações do ano, a análise de variância foi aplicada. O teste Kruskal- Wallis foi utilizado para verificar se houve diferença entre o número de isolados resistentes aos antimicrobianos em cada ponto de coleta. A correlação de Spermán foi utilizada para avaliar se houve associação entre o número de isolados multiresistentes com UFC/100mL obtidos nos pontos de coleta. Para verificar se houve associação significativa entre a multiresistência aos antimicrobianos e a presença de integrons foi aplicado o coeficiente de Contingência C. O nível de significância adotado foi de 5%. As análises dos dados foram realizadas com auxílio do Programa BioEstat 3.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagens de *Escherichia coli*

A enumeração de *E.coli* com identificação presuntiva, nas amostras obtidas nos pontos de coleta variaram de 0 a $5,4 \times 10^3$ UFC/ 100mL. Não houve diferença estatística para as contagens entre os pontos de coleta e as estações do ano. Todavia, os pontos com frequência de *E.coli* mais elevadas foram A, B, e C, que correspondem, respectivamente, à Enseada de Tapes, Trapiche de São Lourenço do Sul e Saco da Mangueira. Essa maior contaminação foi verificada nas estações do outono e verão (TABELA 2). Estes três pontos estão situados em locais com aglomerados populacionais e o lançamento de esgotos advindos desses aglomerados pode estar contribuindo para os níveis elevados de *E.coli* nestes pontos.

Os pontos E, F, G, H correspondentes à Barra da Lagoa, Praia do Cassino, Praia da Pedreira e Praia de Fora, respectivamente, apresentaram as menores contagens de *E.coli*. Nos pontos G e H, localizados no Parque Itapuã, os maiores níveis de *E.coli* observados foram no verão. O Parque é aberto ao público sendo assim, nos meses mais quentes a população utiliza as águas da reserva para a recreação, isso poderia explicar as contagens mais elevadas na estação do verão nestes pontos.

TABELA 2- Contagens de *E.coli* em UFC/ 100 mL em amostras de água provenientes dos pontos de coleta A a H na Lagoa dos Patos e nas estações do outono ao verão.

Ponto de Coleta	Estação do ano/ Média UFC/100mL			
	Outono	Inverno	Primavera	Verão
A	5,4x10 ³	1,9x10 ³	1,1x10 ³	1,3x10 ³
B	2,6x10 ³	1,4x10 ²	1,9x10 ²	1,6x10 ³
C	1,8x10 ²	1,5x10 ²	6,0x10 ¹	1,1x10 ³
D	1,6x10 ²	1,3x10 ²	2,0x10 ¹	3,8x10 ²
E	3,0x10 ¹	1,7x10 ²	5,0x10 ¹	6,0x10 ²
F	1,3x10 ²	0	0	1,3x10 ²
G	8,0x10 ¹	4,0x10 ¹	7,0x10 ¹	4,4x10 ²
H	2,9x10 ²	8,0x10 ¹	4,0x10 ¹	1,0x10 ²

A: Enseada de Tapes; B: Trapiche de São Lourenço do Sul; C: Saco da Mangueira; D: Museu Oceanográfico; E: Barra da Lagoa; F: Praia do Cassino; G: Praia da Pedreira; H: Praia de Fora.

Diversos estudos comentam que vários fatores podem influenciar na sobrevivência de *E.coli* em sistemas aquáticos. Segundo Jamieson et al. (2004), a sobrevivência de *E.coli* poderia ser influenciada por temperatura, disponibilidade de nutrientes e presença de predadores. Noble et al. (2003) supuseram que *Enterococcus* sobreviveriam por mais tempo em ambientes marinhos do que *E.coli* e coliformes totais. Hanes & Fragala (1967) constataram que a sobrevivência *E.coli* em águas marinhas foi de 0,8 dias enquanto que *Enterococcus* sobreviveram por 2,4 dias. Sieracki (1980) demonstrou a influência da luz solar na sobrevivência de *E.coli*. Bordalo et al. (2002) concluíram que a sobrevivência coliformes foi maior em baixas salinidades e que a luz solar teve um efeito deletério, uma vez que acelerou a deterioração dos indicadores fecais, especialmente em altas salinidades. Todos estes fatores poderiam justificar a ausência de *E.coli* no ponto F nas estações do inverno e primavera.

As contagens de *E.coli* foram baixas quando comparadas com os limites estabelecidos pela legislação (CONAMA 274/2000). No Brasil, as águas doces, salobras e salinas destinadas à balneabilidade tem sua condição avaliada nas categorias própria e imprópria. As águas consideradas próprias são subdivididas em categorias: a) Excelente, com contagens ≤ 250 coliformes termotolerantes ou ≤ 200 *E.coli* ou ≤ 25 enterococos por 100mL de amostra, b) Muito boa, com contagens ≤ 500 coliformes termotolerantes ou ≤ 400 *E.coli* ou 50 enterococos por 100mL e c) Satisfatória, com contagens ≤ 1000 coliformes termotolerantes ou ≤ 800 *E.coli* ou 100 enterococos por 100mL (CONAMA 274/2000). Embora as coletas não tenham seguido as indicações da legislação vigente, todavia, adotando os parâmetros estabelecidos notou-se que os pontos analisados tiveram ocasiões que teriam sido classificados desde excelentes até impróprias, pelos parâmetros estabelecidos.

A degradação dos recursos naturais e a contaminação da Lagoa dos Patos, ao longo do tempo, tem sido resultante das indústrias petroquímicas, dos parques industriais de Porto Alegre e Rio Grande, da agropecuária, principalmente a rizicultura e das descargas orgânicas e clandestinas encontradas em grande número em toda a extensão as margens da Lagoa (Matthiensen et al.,1999). Oliveira et al. (2002), ao analisarem as águas da bacia do Rio Paraguai, constataram que 85,7% das amostras de três estações apresentavam NMP acima de 2.400 UFC/100 mL, mas em outros locais deste mesmo rio, encontraram teores menores de contaminação, enquadrando o rio na Classe 2 (1.000 NMP/100 mL de coliformes termotolerantes). Estes autores constataram que o NMP de coliformes totais e de termotolerantes aumenta à

medida que o rio recebe efluente. Vasconcellos et al. (2006) avaliaram a qualidade microbiológica do Rio São Lourenço e relataram que todos os pontos estavam impróprios para balneabilidade devido à alta contaminação por coliformes totais e termotolerantes, em 93% das amostras.

Koller (2002) constatou altos níveis de coliformes totais e termotolerantes em 4 pontos do Arroio Feijó, estes pontos apresentaram altos níveis por estarem localizados próximos à emissão de esgoto sem tratamento prévio. Em outro ponto, os níveis de coliformes totais e termotolerantes foram baixos, uma vez que este ponto estava localizado próximo à nascente do Arroio, onde a ocorrência de população é baixa. A comparação entre bactérias heterotróficas, coliformes totais e termotolerantes no Arroio Feijó revelaram uma tendência de locais que recebem um maior aporte de substâncias orgânicas (tais como esgoto), apresentarem uma maior quantidade de microrganismos.

Embora as contagens de *E.coli* tenham sido baixas no presente trabalho, não se pode descartar a possibilidade de ocorrência de patógenos. Gonzales et al. (2009) analisaram contagens de *E.coli* e *Enterococcus* e compararam com a presença de patógenos e relataram que apesar das contagens terem sido baixas, patógenos como *Salmonella*, *Vibrio* e *Giardia* ainda puderam ser encontrados.

Rios e lagos tradicionalmente usados como recursos hídricos são ecossistemas complexos que tem seu equilíbrio alterado pela atividade humana. Dejetos líquidos são produzidos diariamente pela atividade humana e

por várias operações industriais e agrícolas. Estas descargas de esgoto entram nos corpos aquíferos podendo percolar à água subterrânea, sendo assim é necessário manter a qualidade dos recursos hídricos naturais para um melhor aproveitamento, pois a água é um importante veículo de disseminação de agentes patogênicos, principalmente de origem entérica (Schmidt et al., 2003).

4.2 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Foram identificados um total de 477 isolados de *E.coli*: 113 do Ponto A, 77 do Ponto B, 64 do Ponto C, 103 do ponto D, 84 do ponto E, 19 do Ponto G e 17 do Ponto H. No ponto F (Praia do Cassino) as colônias identificadas presuntivamente como *E.coli* foram não-confirmadas. Todos os isolados foram sensíveis aos antimicrobianos aztreonam, cefepime, ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina, gentamicina e imipenem. Com exceção dos isolados provenientes dos pontos G e H (Praia da Pedreira e Praia de Fora), que foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, nos demais pontos foram encontrados isolados resistentes aos antimicrobianos amoxicilina-ácido clavulânico, ampicilina, piperacilina-tazobactam, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprima, cloranfenicol, amicacina e norfloxacina (TABELA 3). O maior número de isolados resistentes a antimicrobianos foram obtidos na estação verão. Através da análise do perfil de susceptibilidade aos β -lactâmicos dos isolados, segundo Livermore et al. (2001), é possível inferir sobre a presença de penicilinases em alguns isolados.

As maiores percentagens de resistência estiveram relacionados à

tetraciclina, a qual obteve 22,2% dos isolados resistentes. Os isolados resistentes a este antimicrobiano estiveram presentes em todos os pontos de coleta e os maiores percentuais de isolados resistentes foram encontrados nos pontos A (23%), C (23,4%), D (46,6%) e E (10,7%) correspondentes a Enseada de Tapes, Saco da Mangueira, Museu Oceanográfico e Barra da Lagoa, respectivamente. Nestes pontos de coleta, os isolados também apresentaram maiores percentagens de isolados resistentes à ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprima. No ponto B (Trapiche de São Lourenço do Sul), a principal resistência observada foi à ampicilina (16,8%), seguida de tetraciclina (10,3%) e sulfametoxazol-trimetoprima (7,7%) (TABELA 3). Os pontos de coleta apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o número de isolados resistentes a antimicrobianos ($p < 0,05$) (FIGURA 2). Os isolados do ponto D apresentaram os maiores índices de resistência a todos os antimicrobianos, além disso, observou-se um alto número de isolados resistentes ao cloranfenicol, quando comparados aos demais pontos de coleta. Os maiores índices de multiresistência foram encontrados no ponto D (38,8%) e os menores, no ponto E (4,7%).

A porcentagem de resistência à tetraciclina observada neste trabalho já haviam sido anteriormente relatada em bactérias do ambiente aquático (Parveen et al., 1997; Boon & Cattanach, 1999; Edge & Stephen, 2005; Watkinson et al., 2007a).

Resultados semelhantes ao presente trabalho para as taxas de resistência à tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim foram encontrados por Fars et al. (2005), em que 111 cepas de coliformes fecais isolados de sistema

de lodo ativado foram testadas contra 15 antimicrobianos e cerca de 21,62% e 13,51% dos isolados apresentaram resistência à tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima, respectivamente. Henriques et al. (2006) encontraram que a resistência à tetraciclina (52%) e ao sulfametoxazol-trimetoprim (24%) foi freqüente em isolados de enterobactérias provenientes de amostras de água estuárias.

TABELA 3- Porcentagem de isolados de *E.coli* resistentes e multiresistentes aos antimicrobianos em amostras de água da Lagoa dos Patos.

Antimicrobianos	Pontos de coleta				
	A= 113 [*] n(%)	B= 77 [*] n(%)	C= 64 [*] n(%)	D= 103 [*] n(%)	E= 84 [*] n(%)
AMC	0	1 (1,2)	2 (3,1)	7 (6,7)	0 (0)
AMP	18 (15,9)	13 (16,8)	7 (10,9)	40 (38,3)	8 (9,5)
PPT	1 (0,88)	0 (0)	1 (1,5)	1 (0,97)	0 (0)
AMI	4 (3,5)	0 (0)	3 (4,6)	3 (2,9)	1 (1,1)
SUT	18 (15,9)	6 (7,7)	6 (9,3)	39 (37,8)	5 (5,9)
CLO	1 (0,88)	1 (1,2)	0 (0)	38 (36,8)	0 (0)
TET	26 (23)	8 (10,3)	15(23,4)	48 (46,6)	9 (10,7)
NOR	2 (1,7)	0 (0)	0 (0)	3 (2,9)	1 (1,1)
MDR	20 (17,6)	9 (11,6)	5 (7,8)	40 (38,8)	4 (4,7)

^{*} Número total de isolados analisados. AMC, amoxicilina-ácido clavulânico; AMP, ampicilina; PPT, piperacilina-tazobactam; AMI, amicacina; SUT, sulfametoxazol-trimetoprim; CLO, cloranfenicol; TET, tetraciclina; NOR, norfloxacina; MDR, multiresistentes. A: Enseada de Tapes; B: Trapiche de São Lourenço do Sul; C: Saco da Mangueira; D: Museu Oceanográfico; E: Barra da Lagoa.

As taxas de resistência à tetraciclina e ampicilina neste trabalho foram menores do que as encontradas por Olaniran et al. (2009) em isolados de *E.coli* obtidos de amostras de água provenientes de rio. Porém as taxas de resistência à ampicilina e à tetraciclina encontradas no trabalho realizado por estes autores foram similares as encontradas no ponto D (Museu

Oceanográfico). Alam et al. (2006) também encontraram taxas de resistência à ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima superiores às encontradas neste trabalho em isolados *E.coli* obtidos a partir de ambientes aquáticos como lagoas, rios lagos e outros reservatórios aquáticos.

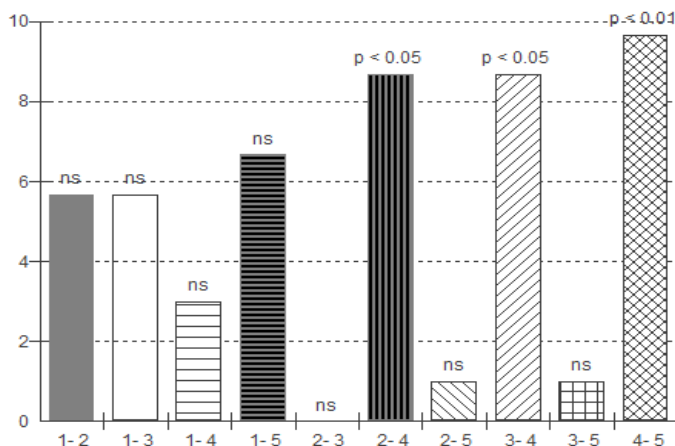


FIGURA 2: Diferenças entre as médias de isolados resistentes nos pontos de coleta pela análise de Kruskal-Wallis. Os pontos de coleta apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o número de isolados resistentes ($p < 0,05$) quando comparados entre si. ns: não significativo. 1: A- Enseada de Tapes; 2: B- Trapiche de São Lourenço do Sul; 3: C- Saco da Mangueira; 4: D- Museu Oceanográfico; 5: E- Barra da Lagoa.

A porcentagem geral de isolados multiresistentes de *E.coli* neste trabalho foi de 16,3%, sendo que os pontos A e D apresentaram os maiores valores e C e E, os menores. Porcentagens semelhantes de isolados multiresistentes foram encontradas por Lima-Bittencourt et al. (2007) em isolados de enterobactérias obtidas a partir de amostras de água. O gênero que apresentou as maiores taxas de multiresistência foi *Proteus* sp., enquanto que *E.coli* apresentou maior sensibilidade aos antimicrobianos, somente 12,5% dos isolados foram considerados multiresistentes.

A frequência de resistência aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli*, pode-se observar que a maior parte dos isolados analisados foram resistentes a somente um antimicrobiano (50%), com exceção do ponto D, no qual a frequência maior de resistência foi observada a quatro antimicrobianos (54,5%).

A resistência a um antimicrobiano em isolados de *E.coli* já foi relatada em outros trabalhos e parece ser uma observação freqüente. Schneider et al. (2009) analisando o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *E.coli* isoladas de amostras de água superficial, observou que a frequência de resistência variou entre um a sete antimicrobianos, porém o maior número de isolados resistentes foi obtido para um antimicrobiano. Outro estudo realizado por Garcia et al. (2007) com isolados de *E.coli* obtidas a partir de estação de tratamento de esgoto também relata que a resistência a um antimicrobiano foi mais freqüente. Vecchia (2002) observou em seu estudo que o perfil de resistência mais observado foi de simples resistência em isolados de *E.coli* obtidos a partir de amostras de água do Arroio Feijó.

Os isolados foram agrupados em 24 perfis de susceptibilidade a antimicrobianos. Observou-se que os perfis 2 (AMP), 8 (TET) e 20 (AMP+SUT+CLO+TET) apresentaram o maior número de isolados sendo que o perfil 20 foi restrito ao Ponto D (Museu Oceanográfico). Neste mesmo ponto foram encontrados isolados resistentes até cinco antimicrobianos (perfil 24) (TABELA 4). Os perfis de susceptibilidade 2 (AMP), 5 (SUT), 7 (AMI) e 8 (TET) estiveram presentes em todos os pontos de coleta. A resistência à ampicilina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetropima e a amicacina foram encontradas em

conjunto com a resistência a outros antimicrobianos. É possível que os isolados resistentes à tetraciclina possam ter adquirido, de forma independente, determinantes genéticos de resistência para outros antimicrobianos, presumivelmente, por transferência horizontal conforme Ram et al. (2008).

TABELA 4- Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de *E.coli* nos diferentes pontos de coleta.

Frequência de resistência	Perfil de susceptibilidade*	Número de isolados				
		A	B	C	D	E
Total de isolados resistentes		45	18	22	55	17
1 antimicrobiano	2 – AMP	9	5	2	3	5
	5 – SUT	2	2	1	2	2
	7 – AMI	2	1	3	2	1
	8 – TET	12	1	11	8	5
2 antimicrobianos	1 - AMI + TET	1	0	0	0	0
	3 - AMP + SUT	4	2	0	0	0
	9 – TET + SUT	8	1	0	1	1
	11 – AMP + TET	2	3	1	0	0
	12 – SUT + NOR	1	0	0	0	0
	14 – AMP + PPT	1	0	0	0	0
	23 – TET + NOR	0	0	0	1	0
3 antimicrobianos	6 – AMI + SUT + TET	1	0	0	0	0
	13 – AMP + SUT + TET	1	2	1	0	2
	16 – AMP + PPT + TET	0	0	1	0	0
	17 – AMC + AMP + TET	0	1	0	0	0
	18 – AMP + TET + NOR	0	0	0	0	1
4 antimicrobianos	21 – AMP + PPT+ CLO + TET	0	0	0	1	0
	15 – AMC + AMP + SUT + TET	0	0	2	0	0
	19 - AMP + AMI + CLO + TET	0	0	0	1	0
	20 - AMP + SUT + CLO + TET	0	0	0	28	0
5 antimicrobianos	22 – SUT + CLO + TET + NOR	0	0	0	1	0
	10 - AMP + SUT + CLO + TET + NOR	1	0	0	0	0
	24 - AMC + AMP + SUT + CLO + TET	0	0	0	7	0

*Perfil 4 não está representado, mas designa os isolados sensíveis todos os antimicrobianos. A: Enseada de Tapes; B: Trapiche de São Lourenço do Sul; C: Saco da Mangueira; D: Museu Oceanográfico; E: Barra da Lagoa. AMP, ampicilina; SUT, sulfametoxazol-trimetoprim; AMI, amicacina; TET, tetraciclina; NOR, norfloxacina; PPT, piperaciclina-tazobactam; AMC, amoxicilina-ácido clavulânico; CLO, cloranfenicol.

A resistência ao cloranfenicol esteve presente somente em conjunto com a resistência a outros antimicrobianos como ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina etc. Estes resultados podem sugerir a presença de integron, vários genes de resistência a antimicrobianos observados em bactérias Gram-negativas são parte de cassetes de gênicos inseridos em um integron. Estes cassetes gênicos contêm genes que conferem resistência à aminoglicosídeos, β -lactâmicos, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim entre outros, bem como genes que conferem resistência aos anti-sépticos e desinfetantes (Antunes et al., 2006). Além disso, Poole et al. (2004) também relata que a presença de bombas de efluxo que poderia conferir resistência aos antimicrobianos como cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina e penicilinas.

Em ambientes aquáticos, os perfis de resistência encontrados em isolados de *E.coli* apresentam grande variabilidade, segundo as características originais da água. Watkinson et al. (2007b) verificaram que a resistência a antimicrobianos estava fortemente associada às águas superficiais adjacentes a estações de tratamento de esgoto do que águas superficiais distante destas. Gallert et al. (2005) observaram altos índices de resistência à penicilina, ampicilina e vancomicina em *E.coli* isoladas a partir de poços localizados perto de canos de emissão de esgoto, já em um poço localizado distante deste ponto, observaram a ausência de coliformes. Os impactos ao estuário da Lagoa dos Patos têm se intensificado nas últimas décadas, pelas descargas orgânicas, *in natura* e clandestinas encontradas em grande número em toda a extensão às margens da Lagoa (Seeliger & Costa, 2002). Essas descargas

orgânicas além de contribuírem para a contaminação de águas do estuário, que servem de recursos ao abastecimento de comunidades bem como ao lazer, também poderiam contribuir para disseminação de bactérias resistentes, uma vez que essas bactérias resistentes sofreriam pressão de seleção através de efluentes domésticos e industriais.

A seleção de determinantes de resistência em ambientes aquáticos poderia ocorrer mesmo na ausência do antimicrobiano. Estudos demonstram que a seleção de determinantes de resistência aos antimicrobianos no ambiente poderia acontecer por meio da poluição por metais pesados e químicos. Muitos determinantes de múltipla resistência são capazes de conferir simultaneamente resistência a compostos pertencentes a várias classes como detergentes e anti-sépticos, sendo assim a seleção de bactérias resistentes poderia ocorrer através da seleção de compostos que não sejam antimicrobianos (Alonso et al. 2001). Por exemplo, triclosan e óleo de pinho podem selecionar *E.coli* resistentes a antimicrobianos, como consequência da produção dos sistemas de efluxo (Moken et al. 1997).

O município de Rio Grande vem sofrendo forte processo de urbanização, agravando as demandas de infra-estrutura e os problemas sócio-ambientais associados a ela. A urbanização desordenada nos últimos anos causou sérios distúrbios ambientais. A contaminação da área no município de Rio Grande por indústrias de fertilizantes e refinarias de petróleo, também é um grande problema ainda não solucionado, que afeta este estuário. Além disso, o lixo dos últimos 30 anos tem sido depositado as margens do estuário e também já foi evidenciada a contaminação orgânicas e por metais pesados na água e

sedimentos, causado por efluentes urbanos/pluvias, atividades ligadas aos terminais pesqueiros e a atividade portuária em geral (Touguinha & Oliveira, 2003). Todas essas fontes de contaminação observadas nos pontos de coletas localizados em Rio Grande poderiam exercer pressões seletivas capazes de selecionar microrganismos multi-resistentes a antimicrobianos.

4.3 Amplificação da região variável de integron de classe 1

A avaliação da região variável do integron de classe 1 foi realizada para os isolados resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Dos 157 isolados selecionados para a amplificação desta região, 62 isolados (39,4%) foram positivos, destes 42 isolados foram considerados multiresistentes. A porcentagem de isolados com integron de classe 1 observada neste estudo foi maior do que a observada por Rosser et al. (1999) em bactérias Gram-negativas isoladas de ambientes estuarinos. Entretanto, porcentagem similar foi observada em um estudo de Henriques et al. (2006), onde 25% dos isolados de Enterobacteriaceae resistentes à ampicilina obtidas de ambiente estuarino apresentaram integrons de classe 1.

Os produtos amplificados variaram de 386 pb a 1,9 Kb e os isolados positivos para integron classe 1 apresentaram perfis de susceptibilidade variados. Oito perfis de multiresistência foram negativos para a presença de integron de classe 1 (1,12,14,15,19,21,23,24).

O perfil susceptibilidade 20 (AMP+SUT+CLO+TET) apresentou o maior número de isolados positivos e foi restrito ao ponto D. Além disso, os

isolados deste perfil apresentaram o mesmo tamanho da região variável de integron de classe 1 em torno de 1,7 Kb. Todos os isolados dos perfis 2, 3 e 13 também apresentaram o mesmo tamanho da região variável. Os isolados com o perfil 8 apresentaram 4 isolados com tamanhos iguais para a região variável e 5 isolados apresentaram tamanhos diferentes (TABELA 5). Estes resultados indicam que os isolados apresentam um ou mais genes inseridos no cassete gênico, sugerindo que no caso de multiresistência, esta pode ser decorrente da presença dos mesmos (Lévesque et al., 1995).

TABELA 5: Distribuição de isolados *E.coli* positivos para região variável do integron de classe 1 entre os perfis de susceptibilidade e por ponto de coleta.

Frequência de resistência	Perfil de susceptibilidade	n° isolados com integron (n°total)/ Ponto de Coleta					Tamanhos dos fragmentos (pb)
		A	B	C	D	E	
1 antimicrobiano	2 - AMP	1(9)	1(5)	-	-	1(5)	380
	5 - SUT	1(2)	-	1(1)	-	1(2)	550; 400; 470
	7 - AMI	1(2)	1(1)	1(3)	1(2)	-	655; 550; 550; 600
	8 - TET	6(12)	-	-	3(8)	-	380; 470; 520; 570; 610
2 antimicrobianos	3 - AMP+ SUT	2(4)	-	-	-	-	1050
	9 - TET+SUT	4(8)	-	-	-	-	450; 450;380; 966
	11 - AMP+TET	1(2)	-	-	-	-	520
	23 - TET+NOR	-	-	-	1(1)	-	480
3 antimicrobianos	6 - AMI+SUT+TET	1(1)	-	-	-	-	988
	13 - AMP+SUT+TET	1(1)	1(2)	1(1)	-	-	1500
	16 - AMP+PPT+TET	-	-	1(1)	-	-	1893
	17 - AMC+AMP+TET	-	1(1)	-	-	-	455
	18 - AMP+TET+NOR	-	-	-	-	1(1)	466
4 antimicrobianos	20 - AMP+SUT+CLO+TET	-	-	-	25(28)	-	1700
	22 - SUT+CLO+TET+NOR	-	-	-	1(1)	-	1425
5 antimicrobianos	10 - AMP+SUT+CLO+TET+NOR	1(1)	-	-	-	-	1860

A: Enseada de Tapes; B: Trapiche de São Lourenço do Sul; C: Saco da Mangueira; D: Museu Oceanográfico; E: Barra da Lagoa. AMP, ampicilina; SUT, sulfametoxazol-trimetoprim; AMI, amicacina; TET, tetraciclina; NOR, norfloxacin; PPT, piperaciclina-tazobactam; AMC, amoxicilina-ácido clavulânico; CLO, cloranfenicol.

Foi observado neste trabalho uma associação significativa entre a multiresistência aos antimicrobianos e a presença de integrons de classe 1 ($p < 0,05$). Leverstein-van Hall et al. (2002b) também observaram a presença de associação entre integrons com a resistência a múltiplas drogas.

A diversidade dos cassetes gênicos de integron de classe 1 contribuem para a multiresistência. Diversos estudos já analisaram a região variável de integron de classe 1 provenientes de isolados de *E.coli* de diferentes origens (Leverstein-van Hall et al., 2003; Henriques et al., 2006; Chang et al., 2007; Moura et al., 2007; Sepp et al., 2009). Chang et al. (2007) analisaram região variável de integron classe 1 em isolados *E.coli* e observaram 15 cassetes gênicos diferentes, estes incluíam genes codificavam resistência aos aminoglicosídeos (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadB*, *aacA4*), cloranfenicol (*cmIA*, *catB8*), trimetoprim (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA17*), lincosamida (*linf*) e genes desconhecidos (*orfD*, *Orff*). Ho et al. (2009) analisaram a distribuição de integron associados a determinantes de resistência a sulfametoxazol-trimetoprim em *E.coli* de origem humana e animal. Foram encontrados genes que codificavam resistência trimetoprim (diidrofolato redutase, alelos *dfrA1*, *dfrA12* e *dfrA17*), aminoglicosídeos (aminoglicosídeo adeniltransferase [ANT (3')-I], *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadA23*; aminoglicosídeo acetiltransferase [AAC (6'')-Ib], *aacA4* e aminoglicosídeo adeniltransferase [ANT (2'')-I], *aadB*), rifampicina (*arr-3*) e cloranfenicol (*cmIA1*) em integron de classe 1. Ozgumus et al. (2009) caracterizaram cassetes gênicos de integron de classe 1 e 2 em coliformes isolados de água de rios no Norte da Turquia. A caracterização dos cassetes gênicos revelou uma associação significativa entre

a natureza dos cassetes de gênicos e correspondência ao fenótipo de resistência aos antimicrobianos dos isolados. Os integrons continham genes que conferiam resistência a trimetoprim (*dfrA1*, *dfr2d*, *dfrA7*, *dfrA16* e *dfrA17*), aminoglicosídeos (*aadA1* e *aadA5*), β -lactamase (*bla*_{OXA-30}). Resistência a outros antimicrobianos como ácido nalidíxico, cloranfenicol e tetraciclina não foram identificados nos cassetes gênicos. Embora no presente trabalho não tenha sido determinado os genes presentes na região variável, estudos apontam que a resistência a sulfametoxazol-trimetoprima, cloranfenicol e aminoglicosídeos poderia estar presente em integron de classe 1, justificando a resistência a estes antimicrobianos nos isolados do presente trabalho.

Foi observada presença de integrons de classe 1 em alguns isolados resistentes à tetraciclina. White et al. (2001) relatam que associação entre a resistência à ampicilina e à tetraciclina com a presença de integrons, pode ser provável devido à ligação genética entre integrons, transposons e plasmídeos conjugativos. Alguns estudos demonstram que os genes *tet* podem estar presentes em plasmídeos que carregam integrons de classe 1, assim podem ser transferidos para outras bactérias. Lapierre et al. (2008) detectaram alta percentagem de resistência à tetraciclina (77%) em isolados de *E.coli* obtidos a partir de aves e suínos, um grande número de isolados apresentaram os genes *tetB* e *tetA*. Nenhum destes genes foram encontrados nas regiões variáveis dos integrons, no entanto, sete isolados com *tetB* e *tetA* foram capazes de transferir esses genes, através da conjugação para uma cepa receptora (*E. coli* J53 AZ^r). Embora os genes *tetA* e *tetB* não tenham sido avaliados no presente trabalho, são amplamente disseminados em

Enterobacteriaceae e poderiam, assim, contribuir para a resistência observada à tetraciclina em isolados que não apresentaram integron de classe 1. Sunde & Norström (2006) encontraram associação entre genes *tetA* e genes como *sul1*, *dfrA1*, *aadA1* e *int1*, o que poderia indicar uma associação entre *tetA* e integron de classe 1. Experimentos de conjugação foram realizados e demonstraram que elementos de resistência eram encontrados em elementos que podem ser transferidos, provavelmente em plasmídeos conjugativos, sugerindo, assim, uma ampla disseminação de plasmídeos com *tetA* e integron de classe 1. Essa mesma associação foi observada em outros trabalhos (Maynard et al., 2004; Boerlin, 2005).

Foi observado somente a presença de integron classe 1 em três isolados resistentes somente à ampicilina. Segundo Livermore (1995), a resistência à ampicilina é devida à presença do gene *bla*_{-TEM} em 90% dos isolados *E.coli* e este gene é freqüentemente encontrado em plasmídeos. Alguns estudos demonstram a presença de integrons e gene *bla*_{-TEM} no mesmo plasmídeo (Villa et al., 2000; Guerra et al., 2001). Estudos envolvendo experimentos de conjugação investigaram a transferência de integrons e também mostraram que integrons e genes que codificam β -lactamases podem ser localizados no mesmo co-transferidos (Leverstein-van Hall et al., 2002a).

4.4 Indicação da presença de bomba de efluxo através da Concentração Inibitória Mínima na presença e ausência do CCCP

A determinação da concentração inibitória mínima, na presença e ausência do CCCP, foi realizada somente para os isolados multiresistentes que apresentaram resistência à ampicilina, foram avaliados um total de 62 isolados.

Para cada isolado foi determinada a maior a concentração de CCCP que mantinha o crescimento microbiano. Foi necessário conhecer a concentração do desacoplador que não modificasse o crescimento microbiano, mas influenciasse, em nível mínimo, o gradiente de prótons da membrana plasmática, as concentrações de CCCP variaram de 10 μ M a 20 μ M (TABELA 6). A Concentração Inibitória Mínima da ampicilina na ausência e presença do CCCP variaram de >512 μ g/mL a 32 μ g/mL. Observou-se a diminuição das CIM na presença do CCCP nos isolados B165, B182, B35, M85, M142, M146, M81, M83, M82, M138, M139, M140, SL133, SL157, SL192, SL212, SM106, SM29, T23, T29, T355, T362, T258, sugerindo que o mecanismo de resistência desse antimicrobiano possa ser dependente da energia oriunda da força próton motiva (TABELA 6). Embora não tenha sido determinada a CIM dos demais antimicrobianos aos quais os isolados apresentaram resistência, poderia se inferir, caso houvesse a diminuição da CIM na presença do CCCP, a possível presença de um sistema de efluxo de multidrogas nestes isolados.

Os genes que codificam os sistemas de bombas de efluxo são constituintes normais do genoma bacteriano e, portanto, fornecem para o microrganismo o potencial intrínseco de desenvolver um fenótipo de resistência

aos β -lactâmicos sem a aquisição de novos genes (Hasdemir et al., 2004). Os genes e proteínas das bombas de efluxo estão presentes tanto em bactérias resistentes a antimicrobianos quanto em bactérias sensíveis. Alguns sistemas podem ser induzidos por seus substratos específicos, fazendo com que um isolado aparentemente sensível hiper-produza uma bomba de efluxo, assim se tornando resistente (Piddock, 2006a). As proteínas que compõem os sistemas de efluxo são específicas e codificadas por genes cromossômicos ou plasmidiais. Esses sistemas contribuem para a resistência intrínseca ou adquirida através da extrusão de vários antimicrobianos, como tetraciclina, fluoroquinolonas, cloranfenicol e β -lactâmicos (Lee et al., 2000), fenótipos de resistência e multiresistência observados entre os isolados do presente estudo. As bombas de efluxo podem ter especificidade por um substrato ou podem transportar uma diversidade de compostos estruturalmente não relacionados, incluindo antimicrobianos de classes diferentes; normalmente este tipo de bomba de efluxo pode ser associado à multiresistência aos antimicrobianos (Terán et al., 2003).

Diversos estudos relatam que a resistência aos antimicrobianos pode ser devida a presença de sistemas de efluxo de multidrogas. Moreira et al. (2009) verificaram a presença de sistemas de efluxo de multidrogas dependente da força próton motiva em isolados de *E.coli* e *Enterobacter cloacae*. Foi observado a redução da CIM na presença do CCCP para os antimicrobianos furazolidona, nitrofurantoína, tetraciclina, espiramicina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprim. Em outro estudo, Moreira et al. (2005) detectaram sistema de efluxo ao cloranfenicol em isolados de *E.coli*. Piddock et al. (2000)

evidenciaram bombas de efluxo mediando a resistência a múltiplos antimicrobianos em isolados de *Salmonella* Typhimurium.

TABELA 6: Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ampicilina na ausência e presença do carbonil-cianeto-m-clorofenilhidrazona (CCCP) em isolados de *E. coli* multiresistentes e resistentes a Ampicilina

Isolado	CCCP (μm)	CIM de Ampicilina ($\mu\text{g/mL}$)		Isolado	CCCP (μm)	CIM de Ampicilina($\mu\text{g/mL}$)	
		sem CCCP	com CCCP			sem CCCP	com CCCP
B165	15	>512	256	M139	10	>512	128
B182	15	128	64	M140	10	>512	64
B35	15	>512	32	M141	10	>512	>512
M85	10	>512	64	M145	10	>512	>512
M142	10	>512	32	M149	10	>512	>512
M146	10	>512	128	M150	10	>512	>512
M166	10	>512	>512	M161	10	>512	>512
M182	10	>512	>512	M173	10	>512	>512
M186	10	>512	>512	M174	10	>512	>512
M187	10	>512	>512	M200	10	>512	>512
M190	10	>512	>512	SL79	15	512	512
M193	10	>512	>512	SL122	15	>512	>512
M196	10	>512	>512	SL133	20	512	32
M198	10	>512	>512	SL157	20	>512	256
M201	10	>512	>512	SL192	20	>512	64
M81	15	128	64	SL212	20	>512	256
M82	10	> 512	64	SL214	20	>512	>512
M83	15	128	64	SL220	20	>512	>512
M195	10	>512	>512	SM100	20	>512	>512
M179	10	>512	>512	SM106	15	>512	256
M176	10	>512	>512	SM29	20	>512	32
M170	10	>512	>512	SM30	20	>512	>512
M167	10	>512	>512	T258	15	>512	256
M153	10	>512	>512	T210	10	128	128
M195	10	>512	>512	T23	15	256	64
M163	10	>512	>512	T29	15	512	128
M177	10	>512	>512	T337	15	512	512
M155	10	>512	>512	T355	20	>512	32
M175	10	>512	>512	T362	15	512	128
M171	10	>512	>512	T131	15	512	512
M138	10	>512	64	T13	15	512	512

T: Enseada de Tapes (ponto A); SL: Trapiche de São Lourenço do Sul (ponto B), SM: Saco da Mangueira (ponto C), M: Museu Oceanográfico (ponto D), B: Barra da Lagoa (ponto E). Isolados em negrito apresentaram redução CIM na presença CCCP.

Pela metodologia utilizada, pode-se sugerir a presença de mecanismo de resistência dependente da força próton motiva em 23 isolados, porém não se pode afirmar que o sistema de efluxo esteja ausente nos demais isolados. O sistema de efluxo poderia funcionar em nível de detecção inferior ao da metodologia adotada. Em alguns isolados, que não apresentaram a redução da CIM na presença do CCCP, foi observado a presença da região variável de integron de classe 1, sugerindo que provavelmente o mecanismo de resistência a este antimicrobiano seja devido a presença do integron. Em bactérias, o sistema de efluxo poderia diminuir a susceptibilidade aos antimicrobianos, entretanto, essa diminuição nem sempre resulta em resistência em nível clínico (Piddock, 2006b). Embora bombas de efluxo confirmem um nível de resistência de baixo a moderado, seu impacto no tratamento clínico pode ser de suma importância, visto que pode levar à ineficiência de antimicrobianos em sítios de infecção onde as concentrações do agente são menores do que a desejável. Esse sistema de bombas de efluxo também causa resistência cruzada a antimicrobianos de classes não-relacionadas em bactérias Gram-negativas, além disso, podem ser difíceis de serem diagnosticados somente em testes de susceptibilidade padrão (Mesaros et al., 2007). O uso excessivo de uma droga exerceria a pressão necessária para selecionar mutações que resultam em um sistema de efluxo eficiente. Mecanismos múltiplos de resistência a determinados antimicrobianos podem coexistir em um mesmo isolado bacteriano (Lee et al., 2000).

4.5 Diversidade genética dos isolados *E.coli* resistentes a antimicrobianos através da técnica de ERIC-PCR

A diversidade genética através da técnica ERIC-PCR foi avaliada somente para os isolados que apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano, posteriormente também foram selecionados três isolados sensíveis a todos os antimicrobianos de cada ponto de coleta para esta análise. Foram avaliados um total de 172 isolados, 157 com resistência a um ou mais antimicrobianos e 15 isolados sensíveis a todos os antimicrobianos. O padrão de fragmentos demonstrou reprodutibilidade para a amplificação da *E.coli* ATCC 25922 repetida a cada reação realizada. Os padrões de bandas apresentaram grande diversidade, com 5 a 15 fragmentos variando de 150 a 1800 pb, sendo que foram utilizadas para análise de similaridade apenas os fragmentos acima de 200 pb e menores 1600 pb, que apresentaram melhor resolução. A distribuição dos fragmentos ocorreu de maneira uniforme, mas a maioria delas esteve concentrada na região inferior, abaixo dos 600 pb.

O dendrograma apresentou 18 grupos para uma similaridade de 70% (FIGURA 3). O maior dos grupos formados (grupo 9) reuniu 24 isolados, sendo que todos os isolados foram da mesma estação de coleta (verão) e apresentaram o mesmo perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, enquanto que os menores grupos (1, 3, 4, 5, 6, 7, 13, 14, 16 e 17) reuniram dois isolados e apresentaram perfis de susceptibilidade a antimicrobianos variados. O valor de similaridade dos agrupamentos mais distantes foi de 14%.

Os isolados dos cinco pontos de coleta analisados através da técnica tiveram uma distribuição homogênea. Alguns grupos apresentaram uma porcentagem de similaridade maior que 80% entre isolados de pontos de coleta diferentes (grupos 3, 8, 13). A maior similaridade encontrada entre isolados de pontos de coleta diferentes foi 100% (grupos 1 e 2). O maior número de agrupamentos formados com similaridade maior que 70% entre isolados de estações de coletas diferentes foi obtido entre as estações 3 e 4 (4 agrupamentos) correspondentes à estação da primavera e do verão. A presença de isolados geneticamente idênticos em estações de coletas diferentes sugere que, estes isolados resistentes de diferentes estações de coletas persistiram durante o intervalo entre as coletas. Foi observado que alguns isolados com perfil de susceptibilidade a todos os antimicrobianos agruparam com isolados resistentes aos antimicrobianos (grupos 2,10,15 e 18).

A tipificação por ERIC-PCR dos isolados *E.coli* revelou uma alta diversidade nos pontos de coletas estudados, indicando múltiplas origens de contaminação. Os achados de isolados idênticos ou intimamente relacionados no mesmo ponto de coleta foram na sua maioria no mesmo período de coleta (verão), o que pode indicar que estes isolados estão sendo lançados por um mesmo reservatório.

As seqüências ERIC tem sido utilizadas para a caracterização de varias cepas bacterianas por serem altamente conservadas entre as bactérias (Versalovic et al., 1991). Os perfis de ERIC dos isolados *E.coli* do presente estudo revelaram uma alta diversidade, mesmo entre isolados de um mesmo ponto de coleta, o que refletiu o baixo número de agrupamentos formados em

um nível de similaridade de 70%, a maioria dos agrupamentos formados estiveram localizados entre as similaridades de 70% a 50%. Esta alta diversidade sugere que populações geneticamente distintas estão estabelecidas nos ambientes estudados e que provavelmente diferentes fontes de contaminação possam estar contribuindo para esta grande diversidade.

Utilizando o índice de Shannon- Weaver os pontos de coleta foram ordenados conforme o grau de diversidade. O ponto D (Museu) apresentou o menor índice de diversidade entre os cinco pontos analisados, $H'=3,8$. Os pontos B e C, correspondentes à Trapiche em São Lourenço do Sul e Saco da Mangueira, apresentaram valores semelhantes para o índice de diversidade, $H'=4,1$ e $4,0$ respectivamente. O maior índice foi apresentado pelo ponto A (Enseada de Tapes) $H'=4,5$. Neste trabalho os maiores índices de diversidade genética foram encontrados nos pontos de coletas os quais apresentaram as maiores contagens de *E.coli* (Enseada de Tapes, Trapiche em São Lourenço do Sul e Saco da Mangueira). Estes dados contrastaram com o trabalho realizado por Borges et al. (2003) em que os maiores índices de diversidade genética foram encontrados em locais onde apresentaram as menores contagens *E.coli*. A heterogeneidade genética entre os isolados em ambientes naturais pode ser devido a diferenças entre os pontos de coletas, particularmente quando o local de amostragem está sujeito a elevada contaminação proveniente de fontes diversas.

O uso de técnicas de padrão únicos de bandas, que trabalham com DNA total, nos fornece resultados de similaridade genética mais detalhados e mais discriminatórios em relação aos que usam apenas algumas regiões do

DNA. No entanto, a dificuldade de interpretação dos dados é maior, assim como a necessidade de rigidez nos critérios de análise. Neste trabalho foi mostrada a diversidade existente entre os isolados resistentes a antimicrobianos de *E.coli* estudados, todavia não foi possível distinguir os pontos de coleta pela similaridade entre os isolados. A diversidade genética avaliada pela técnica de ERIC-PCR neste trabalho supõe que a liberação dessas bactérias neste ambiente é proveniente de diferentes fontes de contaminação.

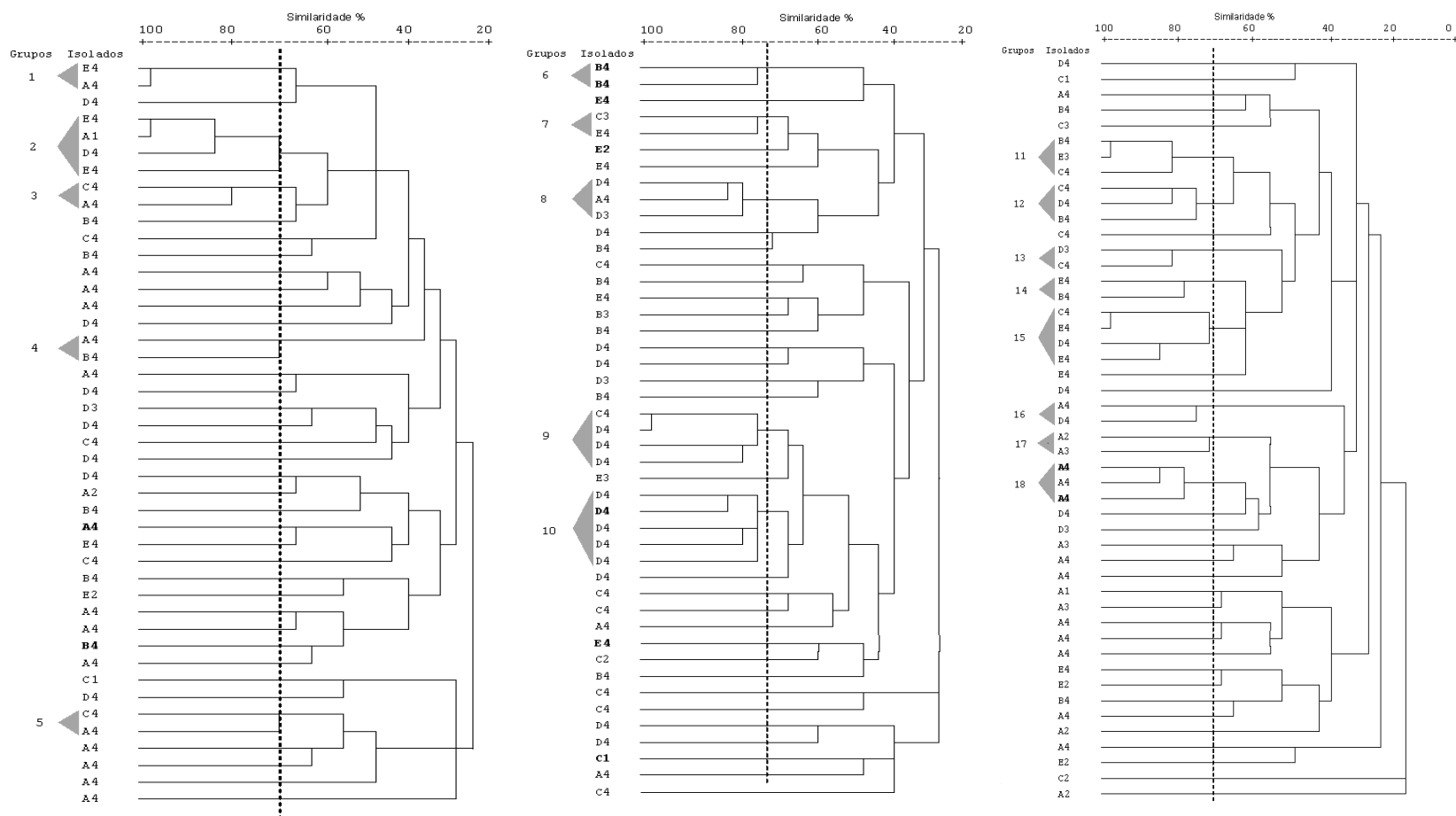


FIGURA 3: Dendrograma do percentual de similaridade entre os isolados *Escherichia coli* nos diferentes períodos de coleta através de ERIC-PCR. A linha vertical indica 70% similaridade. Os isolados em negrito apresentaram perfil de susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados. A: Enseada de Tapes; B: Trapiche em São Lourenço do Sul; C: Saco da Mangueira; D: Museu Oceanográfico; E: Barra da Lagoa. Períodos de coleta: 1- Outono; 2- Inverno; 3- Primavera; 4- Verão.

5. CONCLUSÕES

5.1 As maiores contagens de *E.coli* obtidas nos pontos de coleta próximos à maior concentração populacional.

5.2 Os pontos de coleta que apresentaram a maior quantidade de isolados resistentes são aqueles próximos aos centros urbanos.

5.3 Os isolados resistentes de *E.coli* apresentaram uma grande diversidade nos pontos de coletas estudados, o que refletiu no grande número de agrupamentos formados com um nível de similaridade de 70%, sugerindo que estes sejam provenientes de diferentes fontes.

5.4 Foi observado a presença de isolados resistentes de *E.coli* geneticamente idênticos nos diferentes períodos de coletas, o que sugere que estes isolados possam estar persistindo neste ambiente.

5.5 Os produtos amplificados para a região variável de integron de classe 1 apresentaram diferentes tamanhos o que pode indicar que apresentam um ou mais genes inseridos no cassete gênico. Foi observada uma associação significativa entre a multiresistência aos antimicrobianos e a presença de integrons de classe 1.

5.6 Em 23 isolados multiresistentes de *E.coli* foi observada a redução CIM da ampicilina na presença do CCCP o que indica que o mecanismo de resistência a este antimicrobiano seja dependente da força próton motiva.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Seria interessante através do seqüenciamento dos isolados que apresentaram região variável de integron de classe 1, identificar os genes presentes, determinando, assim, os mecanismos de resistência responsáveis pelos perfis de resistência aos antimicrobianos encontrados.

Também seria importante determinar a CIM dos outros antimicrobianos aos quais os isolados apresentaram resistência, a pesquisa de genes e expressão de bombas de efluxo através de técnicas moleculares, seria uma forma de confirmação da presença deste sistema nos isolados. Isso seria relevante, uma vez que, através da metodologia adotada, o sistema de efluxo poderia funcionar em níveis indetectáveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGERSØ, Y.; SANDVANG, D. Class 1 Integrons and Tetracycline Resistance Genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. Isolated from Pigsties and Manured Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p.7941–7947, 2005.

AHMED, N.; NELLER, R.; KATOULI, M. Host species-specific metabolic fingerprint database for enterococci and *Escherichia coli* and its application to identify sources of fecal contamination in surface waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n.8, p.4461–4468, 2005.

ALAM, M.; AHSAN, S.; PAZHANI, G.P.; TAMURA, K.; RAMAMURTHY, T.; GOMES, D.J.; RAHMAN, S.R.; ISLAM, A.; AKHTAR, F.; SHINODA, S.; WATANABE, H.; FARUQUE, S.M.; NAIR, G.B. Phenotypic and molecular characteristics of *Escherichia coli* isolated from aquatic environment of Bangladesch. **Microbiology and Immunology**, v.50, n.5, p.359-370, 2006.

AL-KARABLIEH, N.; WEINGART, H.; ULLRICH, M.S. Genetic Exchange of Multidrug Efflux Pumps among Two Enterobacterial Species with Distinctive Ecological Niches. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.2, p. 629-645, 2009.

ALONSO, A.; SÁNCHEZ, P.; MARTÍNEZ, J.L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, v.3, n.1, p.1-9, 2001.

ALTEWEGG, M.; BOCKMUHL, J. *Escherichia e Shigella*. In: Topley & Wilson Microbiology and microbial infections. **Microbiology and Microbial Infection.**, 9th ed., London: Arnold. 1998.

AMINOV, R.I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Environmental Microbiology**, v.11, n.12, p.2970-2988, 2009.

ANISIMOV, R.; BREM, D.; HEESEMANN, J.; RAKIN, A. Transcriptional regulation of high pathogenicity island iron uptake genes by Ybta. **International Journal of Medical Microbiology**, v.295, n.1, p.19-28, 2005.

ANTUNES, P.; MACHADO, J.; PEIXE, L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from

different sources in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p.297-304, 2006.

BALDY-CHUDZIK, K.; NIEDBACH, K.; STOSIK, M. rep-PCR fingerprinting as a tool for analysis of genomic diversity in *Escherichia coli* strains isolated from an aqueous/freshwater environment. **Cellular & Molecular Letters**, v.8, n.3, p.793– 798, 2003.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotics resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, n.3, p.260-265, 2008.

BENNETT, P.M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.43, p.1-4, 1999.

BILA, D.M.; DEZZOTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v.26, n.4, p.523-530, 2003.

BLANCH, A.R.; BELANCHE-MUÑOZ, L.; EDBON, J.; GANTZER, C.; LUCENA, F.; OTTOSON, J.; KOURTIS, C.; IVERSEN, A.; MOCÉ, L.; SCHWARTZBROD, J.; SKRABER, S.; PAPAGEORGIOU, G.T.; TAYLOR, H.; WALLIS, J.; JOFRE, J. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.9, p. 5915–5926, 2006.

BOERLIN, P.; TRAVIS, R.; GYLES, C.L.; REID-SMITH, R.; LIM, N.J.H.; NICHOLSON, V.; MCEWEN, S.A.; FRIENDSHIP, R.; ARCHAMBAULT, R. Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of *Escherichia coli* Isolates from Swine in Ontario. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.1, 6753–6761, 2005.

BOLHIUS, H.; VAN VEEN, H.W.; MOLENAAR, D.; POOLMAN, B.; DRIESSEN, A.J.M.; KONINGS, W.N. Mechanisms of multidrug transporters. **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, n.1, p.55-84, 1997.

BOON, P.I.; CATTANACH. Antibiotic resistance of native and faecal bacteria isolated from rivers, reservoirs and sewage treatment facilities in Victoria, southern-eastern Australia. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.164-168, 1999.

BORDALO, A.A.; ONRASSAMI, R.; DECHSAKULWATANA, C. Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong River, Thailand). **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 864-871, 2002.

BORGES, L.G.A.; VECCHIA, D.V.; CORÇÃO, G. Characterisation and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. **FEMS Microbiology Ecology**, v.45, p.173-180, 2003.

BRIANCESCO, R. Microbial indicators and fresh water quality assessment **Annali dell'Istituto superiore di sanità**, v.41, n.3, p.353-358, 2005.

CHANG, L.; CHANG, T.; CHANG, C. Variable gene cassette patterns of class 1 integron-associated drug-resistant *Escherichia coli* in Taiwan. **The Kaohsiung Journal of Medical Science**, v.23, n.6, p.273-280, 2007

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 15th Informational Supplement.**, Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

COCCHI, S.; GRASSELLI, E.; GUTACKER, M.; BENAGLI, C.; CONVERT, M.; PIFFARETTI, J.C. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.50, n.1, p.126–132, 2007.

COLLIS, C.M.; HALL, R.M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.155-162, 1995.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 274 de novembro de 2000.

CORREIA, J.E.; DE PAULIS, A.; PREDARI, S.; SORDELLI, D.O.; JERIC, P.E. First report of qacG, qacH and qacJ genes in *Staphylococcus haemolyticus* human clinical isolates. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. 956-960, 2008.

DÍAZ, S.P. Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. **Revista Española de Quimioterapia**, v.16, n.2, p.172-187, 2003.

EDGE, H.; STEPHEN, H. Occurrence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from surface waters and fecal pollution sources near Hamilton, Ontario. **Canadian Journal Microbiology**, v.51, n.6, p.501-505, 2005.

FARS, S.; OUFDOU, K.; NEJMEDDINE, A.; HASSANI, L.; MELLOUL, A.A. Antibiotic resistance and survival of faecal coliforms in activated sludge system in a semi-arid region (Beni Mellal, Morocco). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n.4, p.493–500, 2005.

FINGER, S.A.; VELAPATIÑO, B.; KOSEK, M.; DAILIDIENE, D.; QUINO, W.; BALQUI, J.; HERRERA, P.; BERG, D.E.; GILMAN, R.H. Effectiveness of Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR and random amplified polymorphic DNA fingerprinting for *Helicobacter pylori* strain differentiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.7, p.4713–4716, 2006.

FLUITZ, A.C.; SCHMITZ, F.J. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility and epidemiology. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.18, n.11, p.761-770, 1999.

FUENTEFRIA, D.B. **Detecção de metalo- β -lactamase e similaridade genética em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de efluente hospitalar e água superficial**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

GALLERT, C.; FUND, K.; WINTER, J. Antibiotic resistance bacteria in raw and biologically treated sewage and groundwater below leaking sewers. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.69, n.1, p.106-112, 2005.

GARCIA, S.; WADE, B.; BAUER, C.; CRAIG, C.; NAKAOKA, K.; LOROWITZ, W. The effect of wastewater treatment on antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. **Water environment research**, v.79, n.12, p. 2387-2395, 2007.

GILLINGS, M.; HOLLEY, M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, n.1, p.17-21, 1997.

GOÑI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C.; RAYMOND, N.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Impact of urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.1, p.125-132, 2000.

GONZÁLES, G.R.; MELLA, S.M.; ZEMELMAN, R.Z.; BELLO, H.T.; DOMÍNGUEZ, M. Y. Integrones y cassettes genéticos de Resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. **Revista Médica de Chile**, v.132, n.5, p.619-626, 2004.

GONZALEZ, A.M.; PARANHOS, R.; LUTTERBACH, M.S. Relationships between fecal indicators and pathogenic microorganisms in a tropical lagoon in Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.164, n.1-4, p.207-219, 2009.

GORDON, D.M. Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. **Microbiology**, Canberra, v.147, p.1079-1085, 2001.

GUERRA, B.; SOTO, S. M.; ARGÜELLES, J.M.; MENDOZA, M.C. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.45, n.4, p.1305-1308, 2001.

HALL, R.M.; COLLIS, C.M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. **Molecular Microbiology**, v.15, n.4, p.593-600, 1995.

HAMELIN, K.; BRUANT, G.; EL-SHAARAWI, A.; HILL, S.; EDGE, T.A.; FAIRBROTHER, J.; HAREL, J.; MAYNARD, C.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.2, p.477-484, 2007.

HANES, N.B.; FRAGALA, C. Effect of seawater concentration on the survival of indicator bacteria. **Journal - Water Pollution Control Federation**, v.39, n.1, p. 97-104, 1967.

HARWOOD, V.J.; WHITLOCK, J.; WITHINGTON, V. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.9, p.3698-3704, 2000.

HASDEMIR, U. O.; CHEVALIER, J.; NORDMANN, P.; PAGES, J. M. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 42, p. 2701-2706, 2004.

HENRIQUES, I.S.; FONSECA, F.; ALVES, A.; SAAVEDRA, M.J.; CORREIA, A. Occurrence and diversity of integrons and β -lactamases genes among ampicillin-resistant isolate from estuarine waters. **Research in Microbiology**, v.157, n.10, p.938-947, 2006.

HEUER, H.; KRÖGERRECKLENFORT, E.; WELLINGTON, E.M.; EGAN, S.; ELSAS, J.D.; OVERBEEK, L.; COLLARD, J.M.; GUILLAUME, G.; KARAGOUNI, A.D.; NIKOLAKOPOULOU, T.L.; SMALLA, K. Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. **FEMS Microbiology Ecology**, v.42, n.2, p.289-302, 2002.

HIRSH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K.L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **The Science of the Total Environment**, v.225, n.1, p.109-118, 1999.

HO, P.L.; WONG, R.C.; CHOW, K.H.; QUE, T.L. Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. **Letters in Applied Microbiology**, v.49, p.627-634, 2009.

INFANTE, B.; GRAPE, M.; LARSSON, M.; KRISTIANSSON, C.; PALLECCHI, L.; ROSSOLINI, G.M.; KRONVALL, G. Acquired sulphonamide resistance

genes in faecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.25, n.4, p.308–12, 2005.

JAMIESON, R.; GORDON, R.; JOY, D.; LEE, H. Assessing microbial pollution of rural surface wayers: A review of current watershed scale modeling approaches. **Agricultural Water Management**, v.70, p.1-17, 2004.

JORNAL DA UNIVERSIDADE. (2007). UFRGS, Porto Alegre/RS. Ano XI Número 103.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.469–473, 2008.

KÄLLMAN, O.; GISKE, C.G.; SAMUELSEN, Ø.; WRETLIND, B.; KALIN, M.; OLSSON-LILJEQUIST, B. Interplay of Efflux, Impermeability, and AmpC Activity Contributes to Cefuroxime Resistance in Clinical, Non-ESBL-Producing Isolates of *Escherichia coli*. **Microbial Drug Resistance**, v.15, n.2, p.91-95, 2009.

KANEENE, J.B.; MILLER, R.; SAYAH, R.; JOHNSON, Y.J.; GILLILAND, D.; GARDINER, J.C. Considerations when using discriminant function analysis of antimicrobial resistance profiles to identify sources of fecal contamination of surface water in Michigan. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.9, p.2878–2890, 2007.

KELSEY, R.H.; SCOTT, G.I.; PORTER, D.E.; THOMPSON, B.; WEBSTER, L. Using multiple antibiotic resistance and land use characteristics to determine sources of fecal coliform bacterial pollution. **Environmental monitoring and assessment**, v.81, p.337-348, 2003.

KOLLER, F.F.C. **Discriminação de ambientes aquáticos poluídos de não poluídos através da amplificação e clivagem rDNA16S**. Dissertação (Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; THURMAN, E.M.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.B.; BUXTON, H.T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, v.36, n.6, p.1202-1211, 2002.

KUMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, n.2, p.5-7, 2003.

KUMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, n.2, p.311-320, 2004.

LAPIERRE, L.; CORNEJO, J.; BORIE, C.; TORO, C.; SAN MARTÍN, B. Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and class 2 integrons in commensal strains of *Escherichia coli* isolated from poultry and swine. **Microbial Drug Resistance**, v.14, n.4, p.265-272, 2008.

LECLERC, H.; MOSSEL, D.A.A.; EDBERG, S.C.; STRUIJK, C.B. Advances in bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbiology water safety. **Annual Review of Microbiology**, v.55, p.201-234, 2001.

LEE, A.; MAO, W.; WARREN, M.S.; MISTRY, A.; HOSHINO, K.; OKUMURA, R.; ISHIDA, H.; LOMOVSKAYA, O. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.11, p.3142-3150, 2000.

LÉVESQUE, C.; PICHÉ, L.; LAROSE, C.; ROY, P. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.1, p.185-191, 1995.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M.A.; BOX, A.T.A.; BLOK, H.E.M.; PAAUW, A.; FLUIT, A.C.; VERHOEF, J. Evidence of extensive interspecies transfer of integron-mediated antimicrobial resistance genes among multidrug-resistant Enterobacteriaceae in a clinical setting. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, n.1, p.49–56, 2002a.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M.A.; PAAUW, A.; BOX, A.T.A.; BLOK, H.E.M.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C. Presence of Integron-Associated Resistance in the Community Is Widespread and Contributes to Multidrug Resistance in the Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.8, p.3038–3040, 2002b.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A.; BLOK, H.E.M.; DONDEERS, T. A.R.; PAAUW, A.; FLUIT, A. C.; VERHOEF, J. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. **The Journal of Infectious Diseases**, v.187, p.251–259, 2003.

LEVY, S.B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature medicine**, v.10, n.12, p.122-129, 2004.

LIM, K.T.; YASIN, R.; YEO, C.C.; PUTHUCHEARY, S.; THONG, K.L. Characterization of multidrug resistant ESBL- producing *Escherichia coli* isolates from Hospitals in Malaysia. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2009, p. 1-10, 2009.

LIMA-BITTENCOURT, C.I.; CURSINO, L.; GONÇALVES-DORNELAS, H.; PONTES, D.S.; NARDI, R.M.; CALLISTO, M.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A.M. Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater. **Genetics and Molecular Research**, v.6, n.3, p.510-521, 2007.

LITTLEJOHN, T.G.; DIBERARDINO, D.; MESSEROTTI, L.J.; SPIERS, S.J.; SKURRAY, R. A. Structure and evolution of family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. **Gene**, v.101, p.59-66, 1991.

LITTLEJOHN, T.G.; PAULSEN, I.T.; GILLESPIE, M.T.; TENNENT, J.M.; MIDGLEY, M.; JONES, I.G.; PUREWAL, A.S.; SKURRAY, R.A. Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.95, p.259-266, 1992.

LIVERMORE, D.M. "β-lactamases in laboratory and clinical resistance". **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.4, p.557-584, 1995.

LIVERMORE, D.M.; WINSTANLEY, T.G.; SHANNON, K.P. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p.87-102, 2001.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brooks**. 10th ed., Prentice Hall : Sao Paulo, 2004. p.608.

MAHAMOUD, A.; CHEVALIER, J.; ALIBERT-FRANCO, S.; KERN, W.V.; PAGÈS, J.M. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.1223-1229, 2007.

MARTÍNEZ, J.L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. **Proceedings, Biological Science**, v.276, n.1667, p.2521-2530, 2009.

MATSUMOTO, M.; SUZURI, Y.; MIYAZAKI, Y.; TANAKA, D.; YASUOKA, T.; MASHIKO, K.; ISHIKITA, R.I.; BABA, J.I. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-based PCR (ERIC-PCR): its ability to differentiate *Streptococcus pyogenes* strains and applicatly to thew study of outbreaks of streptococcal infection. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v.194, p.205-212, 2001.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J. S.; CODD, G. A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no Estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Revista Brasileira de Biologia**, v.59, n.3, p.361-376, 1999.

MAYNARD, C.; BEKAL, S.; SANSCHAGRIN, F.; LEVESQUE, R.C.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L.; LARIVIE`RE, S.; HAREL, J. Heterogeneity among Virulence and Antimicrobial Resistance Gene Profiles of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolates of Animal and Human Origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.12, p.5444-5452, 2004.

MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v.4, p.608-620, 2009.

MEACHAM, K. J.; ZHANG, L.; FOXMANN, B.; BAUER, R.J.; MARRS, C.F. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.11, p.5224–5226, 2003.

MEIRELLES- PEREIRA, F.; PEREIRA, A.M.S.; DA SILVA, M.C.G.; GONÇALVES, V.D.; BRUM, P.R.; DE CASTRO, E.A.R.; PEREIRA, A.A.; ESTEVES, F.A.; PEREIRA, J.A. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.287-293, 2002.

MESAROS,N.; GLUPCZYNSKI, Y.; AVRAN, L.; CACERES, N.E.; TULKENS, P.M.; VAN BAMBEKE, F. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, n.7, p.378-386, 2007.

MICHELIM, L.; MULLER, G.; ZACARIA, J.; DELAMARE, A.P.; COSTA, S.O.; ECHEVERRIGARAY, S. Comparison of PCR-based molecular markers for the characterization of *Proteus mirabilis* clinical isolates. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, n.5, p.423-429, 2008.

MISBAH, S.; HASSAN, H.; YUSOF, M.Y.; HANIFAH, Y.A. ABUBAKAR, S. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. **Singapore Medical Journal**, v.46, n.9, p.461-464, 2005.

MOKEN, M.C.; MCMURRY, L.M.; LEVY, S.B. Selection of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the mar and acrAB loci. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.41, p. 2770-2772, 1997.

MOREIRA, M.A.S.; SOUZA, E. C.; MORAES, C. A. Multidrug efflux system in gram-negative bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.19-28, 2004.

MOREIRA, M.A.S.; OLIVEIRA, J.A.; TEIXEIRA, L.M. MORAES, C.A. Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcasses. **Veterinary Microbiology**, v.109, p.75-81, 2005.

MOREIRA, M.A.; RODRIGUES, P.C.F.; TOMAZ, R.S.; MORAES, C.A. Multidrug efflux systems in *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* obtained from wholesome broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p. 241-247, 2009.

MOURA, A.; HENRIQUES, I.; RIBEIRO, R.; CORREIA, A. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse

wastewater treatment plant. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, n.6, p.1243-1250, 2007.

MÜLLER, R. L. **Análise de parâmetros microbiológicos e físico-químicos de amostras de água provenientes do Rio Maquine/RS-Brasil**. Dissertação (Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

NIEMANN, S.; DAMMANN-KALINOWSKI, T.; NAGEL, A.; PÜHLER, A.; SELBITSCHKA, W. Genetic basis of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR fingerprint pattern in *Sinorhizobium meliloti* and identification of *S. meliloti* employing PCR primers derived from an ERIC-PCR fragment. **Archives of Microbiology**, v.172, n.1, p.22–30, 1999.

NEWBURY, S.F.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E.C.; HILES, I.D.; HIGGINS, C.F. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. **Cell**, v.48, n.2, p.297-310, 1987.

NIKAIDO, H. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.20, p. 5853-5859, 1996.

NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v.78, p.119–46, 2009.

NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1794, n.4, p 769–781, 2009.

NOBLE, R.T.; MOORE, D.F.; LEECASTER, M.K.; MCGEE, C.D.; WEISBERG, S.B. Comparison of total coliform, faecal coliform, and enterococcus bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. **Water Research**, v.37, p.1637-1643, 2003.

OH, J.Y.; KIM, K.S.; JEONG, Y.W.; CHO, J. W.; PARK, J.C.; LEE, J.C. Epidemiological typing and prevalence of integrons in multiresistant *Acinetobacter* strains. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v.110, n.3, p.247-252, 2002.

OLANIRAN, A.O.; NAICKER, K.; PILLAY, B. Antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* isolates from river sources in Durban, South Africa. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.1743–1749, 2009.

OLAYEMI, A.B.; OPALEYE, F.I. Antibiotic resistance among coliform bacteria isolated from hospital and urban wastewaters. **World Journal of Microbiology and Biotechnonology**, v.6, p.285-288, 1990.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.1661–1669, 1999.

OLIVEIRA, M.D. DE; CALHEIROS, D.F.; SANTOS, M.B.F.; COSTA, M.S.; BARBOSA, D.S. **Qualidade da água em corpos d'água urbanos das cidades de Corumbá e Ladário e no Rio Paraguai**, MS. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, (Circular Técnica n. 36), 2002.

OZGUMUS, O.B.; SANDALLI, C.; SEVIM, A.; CELIK-SEVIM, E.; SIVRI, n. Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in Northern Turkey. **The Journal of Microbiology**, v.47, n.1, p.19-27, 2009.

PARVEEN, S.; MURPHREE, R.; EDMISTON, L.; KASPAR, C.; PORTIER, K.; TAMPLIN, M. Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.2607-2612, 1997.

PARTRIDGE, S.R.; TSAFNAT, G.; COIERA, E.; IREDELL, J. R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. **FEMS Microbiology Reviews**, v.33, n.4, p.757-784, 2009.

PICÃO, R.C.; GALES, A.C. β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação? **Prática Hospitalar**, n.49, p. 79-84, 2007.

PIDDOCK, L.J.V.; WHITE, D.G.; GENSBERG, K.; PUMBWE, L.; GRIGGS, D.J. Evidence for an Efflux Pump Mediating Multiple Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.11, p. 3118–3121, 2000.

PIDDOCK, L.J.V.. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. v.19, n.2, p.382–402, 2006a.

PIDDOCK, L.J.V. a Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.4, p.629-636, 2006b.

POOLE, K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology Infection**. v.10, n.1, p.12-26, 2004.

PRADO, T.; PEREIRA, W.C.; SILVA, D.M.; SEKI, L.M.; CARVALHO, A.P.; ASENSI, M.D. Detection of extended-spectrum β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of hospital sewage treatment plant. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, n.1, p.136-141, 2008.

RALOFF, J. Does it matter that pharmaceuticals are turning up in water supplies? **Science News**, v.153, n.12, p. 187-189, 1998.

RAM, S.; VAJPAYEE, P.; TRIPATHI, U.; SINGH, R.L.; SETH, P.K.; SHANKER, R. Determination of antimicrobial resistance and virulence gene signatures in

surface water isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, n.6, p. 1899–1908, 2008.

REINTHALER, F.F.; PSOCH, J.; FEIERL, G.; WÜST, G.; HAAS, D.; RUCKENBAUER, G.; MASCHER, F. MARTH, E. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. **Water Research**, v.37, n.8, p.1685–1690, 2003.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Agricultura e Abastecimento. **Plano de Manejo do Parque Estadual de Itapuã**. Porto Alegre. Departamento de Recursos Renováveis, 158p. 1997.

ROJAS, A.; DUQUE, E.; MOSQUEDA, G.; GOLDEN, G.; HURTADO, A.; RAMOS, J.L.; SEGURA, A. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.3967-3973, 2001.

ROSSER, S.J.; YOUNG, H.K. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.44, n.1, p.11-18, 1999.

ROUCH, D.A.; CRAM, D.S.; DIBERARDINO, D.; LITTLEJOHN, T.G.; SKURRAY, R.A. Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline-and sugar-transport proteins. **Molecular Microbiology**, v.12, n.12, p. 2051-2062, 1990.

SABATÉ, M.; PRATS, G. Estructura y función d los integrones. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.20, n.7, p.341-345, 2002.

SAMPAIO, J.L.; VIANA-NIERO, C.; DE FREITAS, D.; HÖFLING-LIMA, A.L.; LEÃO, S.C. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.55, n.2, p.107-118, 2006.

SAYAH, R.S.; KANEENE, J.B.; JOHNSON, Y.; MILLER, R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild animal fecal samples, human septage, and surface water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.3, p.1394-1404, 2005.

SAXENA, M.K.; SINGH, V.P.; LAKHCHARUA, B.D.; TAI, G.; SHARMA, B. Strain differentiation of Indian isolates of *Salmonella* by ERIC-PCR. **Research in Veterinary Science**, v.73, n.3, p.313-314, 2002.

SCHMIDT, V.; AVILA, L.F.; BENDATI, M.M.; CARDOSO, M.R.I. Caracterização bacteriológica de balneários do Lago Guaíba. **Biotemas**, v.16, n.2, p.27-44, 2003.

SCHNEIDER, R.N.; NADVORNY, A. SCHMIDT, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de água superficial e

subterrâneas em área de produção de suínos. **Biotemas**, v.22, n.3. p.11-17, 2009.

SEELIGER, U.; COSTA, C.S.B. The Patos-Mirim basins, lagoon and estuary. Natural and human forcing factors. **Loicz. Reports Studies**, v.21, p.105-112, 2002.

SEPP, E.; STSEPETOVA, J.; LÕIVUKENE, K.; TRUUSALU, K.; KÕLJALG, S.; NAABER, P.; MIKELSAAR, M. The occurrence of antimicrobial resistance and class 1 integrons among commensal *Escherichia coli* isolates from infants and elderly persons. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.8, p. 8-34, 2009.

SIERACKI, M. **The effects of short exposures of natural sunlight on the decay rates of bacteria enteric, coliphage in a simulated sewage outfall microcosm.** M.Sc. Thesis, Department of Biological Sciences, University of Rhode Island, Providence, RI. 1980.

SILBERT, S.; PFALLER, M.A.; HOLLIS, R.J.; BARTH, A.L.; SADER, H.S. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative gram-negative bacilli. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.25, n.10, p.847-851, 2004.

SKURNIK, D.; LE MENAC'H, A.; ZURAKOWSKI, D.; MAZEL, D.; COURVALIN, P.; DENAMUR, E.; ANDREMONT, A.; RUIMY, R. Integron-associated antimicrobial resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.49, n.7, p.3062–3065, 2005.

SUNDE, M.; NORSTRÖM, M. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, n.4, p.741-747, 2006.

TENNENT, J.M.; LYON, B.R.; MIDGLEY, M.; JONES, G.; PUREWAL, A.S.; SKURRAY, R.A. Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of General Microbiology**, v.135, p.1-10, 1989.

TERÁN, W.; FELIPE, A.; SEGURA, A.; ROJAS, A.; RAMOS, J.; GALLEGOS, M. Antibiotic dependent in induction of *Pseudomonas putida* DOT-T1E TtgABC efflux pump is mediated by the drug binding repressor TtgR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.10, p.3067-3072, 2003.

THORROLD, C.A.; LETSOALO, M.E.; DUSÉ, A.G.; MARAIS, E. Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E. coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, n.3, p.315–320, 2007.

TOUGUINHA, C.; OLIVEIRA, C. Valoração do Saco da Mangueira: uma inovação ao Método Contingente. In: Encontro Bienal da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica, 5, 2003, Caxias do Sul. Brasil e Cone Sul: desafios e possibilidades de um desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: ECOECO, 2003. p.1-24

VASCONCELLOS, F.C.S.; IGNANCI, J.R.V.; RIBEIRO, G.A. Qualidade microbiológica da água do rio São Lourenço, São Lourenço do Sul, Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)**, v.73, n.2, p.177-181, 2006.

VECCHIA, V.D. **Fatores de virulência, resistência a antimicrobianos e perfil de DNA plasmidial de isolados de *Escherichia coli* provenientes do Arroio Feijó**. Dissertação (Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.24, p.6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomics fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v.5, n.1, p.25-40, 1994.

VILLA, L.; PEZZELLA, C.; TOSINI, F. Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an extended-spectrum β -lactamase gene and a class 1 integron. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.44, p. 2911–2914, 2004.

VINUÉ, L.; SÁENZ, Y.; SOMALO, S.; ESCUDERO, E.; MORENO, M.A.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.934-937, 2008.

WATKINSON, A. J.; MICALIZZI, G.B.; BATES, J.B.; COSTANZO, S.D. Novel method for rapid assessment of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from environmental waters by use of a modified chromogenic agar. **Applied Environmental Microbiology**, v.73, p.2224-2229, 2007a.

WATKINSON, A.J.; MICALIZZI, G.B.; BATES, J.B.; COSTANZO, S.D. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewater, surface waters and oysters from an urban riverine system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.7, p.5667-5670, 2007b.

WEBBER, M.A.; PIDDOCK, L.J.V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p. 9-11. 2003.

WHITE, P.A.; MCIVER, C.J.; RAWLINSON, W.D. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.9, p.2658-2661, 2001.

WIGGINS, B.A.; ANDREWS, R.W.; CONWAY, R.A.; CORR, C.L.; DOBRATZ, E.J.; DOUGHERTY, D.P.; EPPARD, J.R.; KNUPP, S.R.; LIMJOCO, M.C.; METTENBRUG, J.M.; RINEHARDT, J.M.; SONSINO, J.; TORRIJOS, R.L.; ZIMMERMAN, M.E. Use of antibiotics resistance analysis to identify nonpoint sources of fecal pollution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.8, p.3483-3486, 1999.

WILSON, L.A.; SHARP, P.M. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. **Molecular Biology and Evolution**, v.23, n.6, p.1156–1168, 2006.

WILSON, M.K.; LANE, A.B.; LAW, B.F.; MILLER, W.G.; JOENS, L.A.; KONKEL, M.E.; WHITE, B.A. Analysis of the pan genome of *Campylobacter jejuni* isolates recovered from poultry by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Multilocus Sequence Typing (MLST), and Repetitive Sequence Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) reveals different discriminatory capabilities. **Microbial Ecology**, v.58, n.4, p.843–855, 2009.

YANG, C.M.; LIN, M.F.; LIN, C.H.; HUANG, Y.T.; HSU, C. T.; LIOU, M. L. Characterization of antimicrobial resistance patterns and integron in human fecal *Escherichia coli* in Taiwan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v.62, n.3, p.177-181, 2009.

YINGST, S.L.; SAAD, M.D.; FELT, S.A. Classifying *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.8, p.1297-1298, 2006.

YU, H. S.; LEE, J. C.; KANG, H. Y. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.5429–5433, 2003.

YUNES, J.S. Florações de *Microcystis* na Lagoa dos Patos e o seu estuário: 20 anos de estudos. *Oecol. Bras*, v.13, n.2, p.313-318, 2009.

8. APÊNDICES

8.1 Meios para isolamento, identificação e recuperação das bactérias

8.1.1 Ágar Les- Endo (Himedia)

Tecido animal digerido por enzimas peptídicas	10,0 g
Lactose	10,0 g
Fosfato dipotássio	3,5g
Sulfito de sódio	2,5 g
Fucsina básica	0,5g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

Suspender 41,5g em 1L água destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121°C, pH final 7,5±0,2.

8.1.2 Ágar Eosina Azul de Metileno (Himedia)

Tecido animal digerido por enzimas peptídicas	10,0 g
Fosfato dipotássio	2,0 g
Lactose	5,0 g
Sacarose	5,0 g
Eosina-Y	0,4 g
Azul de metileno	0,065 g
Ágar	13,5g

Suspender 36g em 1L água destilada. Ferver para dissolver o meio completamente. Esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C, pH final 7,2±0,2.

8.1.3 Caldo BHI (Brain Heart Infusion- Difco)

Infusão de cérebro de vitelo	200,0 g
Infusão de coração bovino	250,0 g
Peptona proteose	10,0 g
Dextrose	2,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato dissodico	2,5 g
Água destilada	1000 mL

Suspender 37g do pó em 1L de água destilada. Autoclavar a 121°C, 1atm, por 15 minutos, pH final 7,4±0,2.

8.1.4 Ágar Triptona de Soja (TSA)

Hidrolisado enzimático de caseína	15,0 g
Peptona de soja	5g
Cloreto de sódio	5,0g
Ágar	15g
Água destilada	1000 mL

8.2 Reagentes para extração de DNA

8.2.1 Tampão TE

Tris-HCl 1M pH8,0	1,0 mL[10mM]
-------------------	--------------

EDTA 0,5M pH 8,0	2,0 mL[1mM]
Água destilada q.s.p	100mL

8.2.2 Clorofórmio/Álcool isoamílico

A solução clorofórmio/álcool isoamílico deve ser preparada na proporção de 24:1; adicionando-se 24mL de clorofórmio e 1mL de álcool isoamílico. Armazenar a temperatura ambiente.

8.3 Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose

8.3. 1 Tampão de corrida 6x

Azul de bromofenol	0,005 g
Sacarose	0,8 g
Água destilada	2mL

8.3.2 Gel agarose 2% com sinergel

Agarose	0,7 g
Sinergel	0,65 g
TBE 0,5X	100 mL

8.3.3 Tampão TBE 0,5X

Tampão TBE 5X	100 mL
Água destilada	1000 mL

8.3.4 Tampão TBE 5X

Tris-base	54,0 g
Acido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5M pH 8,0	20 mL

Água destilada	1000 mL
----------------	---------

8.3.5 Gel agarose 0,7%

Agarose	0,7g
Tampão TAE1x	100mL

8.3.6 Tampão TAE 1X

Tampão TAE 50X	20 mL
Água destilada	1000mL

8.3.7 Tampão TAE 50X

Tris- HCl	242,0 g
Acido Acético Glacial	57,1mL
EDTA 0,5M pH8,0	100mL
Água destilada	1000mL