

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

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE  
BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS NAS ÁGUAS DO ARROIO  
DILÚVIO**

**DANIELE VARGAS DE OLIVEIRA  
Bióloga- PUCRS**

Porto Alegre, 2011

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

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE  
BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS NAS ÁGUAS DO ARROIO  
DILÚVIO**

DANIELE VARGAS DE OLIVEIRA  
Bióloga- PUCRS

Dissertação apresentada  
no Programa de Pós-  
Graduação em  
Microbiologia Agrícola e do  
Ambiente, como um dos  
requisitos para a obtenção  
do Grau de Mestre na Área  
de Microbiologia Ambiental

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Van Der Sand

Porto Alegre, RS, Brasil,  
Abril, 2011

### CIP - Catalogação na Publicação

Oliveira, Daniele V.

Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias gram-negativas isoladas nas águas do Arroio Dilúvio. / Daniele V. Oliveira. - 2011.

84 f.

Orientadora: Sueli Van Der Sand.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Arroio Dilúvio. 2. Qualidade da água. 3. Resistência a antimicrobianos. 4. Resistência a genes  $\beta$ -lactâmicos. I. Van Der Sand, Sueli, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos que recebo sem muitas vezes perceber, por me guiar e abençoar nos caminhos corretos.

Aos meus pais, que mesmo sem estarem presentes, fazem parte desta conquista e estão sempre comigo em tudo que eu faço.

Ao Manoel, pela força, amor e estímulos constantes. Você é parte dessa conquista, não teria conseguido sem você, Te Amo!!!

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Van Der Sand, por acreditar que eu seria capaz, por todas as respostas nos momentos mais difíceis, pelo carinho, paciência e extrema dedicação que sempre dispensou em nosso trabalho e pela constante amizade.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Guedes Frazzon, que sempre esteve presente neste trabalho, desde o primeiro dia, pelas explicações, ajudas, carinho e amizade.

As meninas do lab 164, pelas risadas, piadas, almoços e cafés que ajudavam a enfrentar o trabalho muitas vezes árduo, mas gratificante. As meninas do lab 209 pela força em todos os momentos.

Aos ICs que passaram por esse trabalho, a pequena Julie que começou junto a pesquisa, o Ramon o único estagiário que consegui ficar no nosso lab e a Tiele que foi e é uma grande companheira e amiga, sempre dedicada e competente.

As técnicas Sayonara e Leila pelos auxílios e amizade.

A Secretaria e a Coordenação do PPGMAA por todas as informações e esclarecimentos no decorrer do curso.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho em especial: Andressa Silveira, Margaroni Fialho de Oliveira, Sabrina Salamoni e Viviane Juliano.

E a CAPES, pelo apoio financeiro.

# **AValiação DO Perfil DE Resistência A Antimicrobianos DE Bactérias Gram-Negativas Isoladas Nas Águas DO Arroio Dilúvio.**

Autor: Daniele Vargas de Oliveira<sup>1</sup>

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Van Der Sand

## **RESUMO**

O Arroio Dilúvio faz parte de uma importante bacia do município de Porto Alegre, RS, possuindo 17.605m de extensão sendo a nascente no município de Viamão e deságue no Lago Guaíba, que recebe vários tipos de dejetos oriundos de esgoto pluvial, doméstico e hospitalar. Sendo assim, o Arroio recebe uma população microbiana diversificada, podendo alguns destes microrganismos apresentarem resistência a diferentes antimicrobianos e, portanto, atuar como possíveis disseminadores de genes de resistência. O objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade da população bacteriana Gram negativa das águas do Arroio Dilúvio, buscando identificar e caracterizar a população de acordo com o seu perfil de resistência a antimicrobianos e detectar a presença de genes de resistência a  $\beta$ -lactâmicos. As coletas ocorreram em cinco pontos nas diferentes estações do ano. As amostras coletadas passaram por isolamento e esgotamento da população bacteriana através da sementeira em placas contendo diferentes meios de cultura seletivos. Para a caracterização do perfil de resistência foi utilizado o método de difusão em disco utilizando antibióticos de diferentes classes. Após a identificação bacteriana foi observado a prevalência de bactérias da família Enterobacteriaceae. Aproximadamente 67% dos isolados das coletas 1 e 3, cerca de 52% dos isolados da coleta 2 e mais de 95% da coleta 4 foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos. Quanto à presença dos genes de resistência foi observado que 43,54% (27/62) dos isolados apresentaram amplificação para os genes, *bla*<sub>TEM</sub>, e/ou *bla*<sub>SHV</sub>. Dentre estes 33,87% (21/62) foram positivos para o gene *bla*<sub>TEM</sub>, 9,67% (6/62) para o gene *-bla*<sub>SHV</sub> e 3,22% (2/62) foram positivos para ambos os genes.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (84p.) Abril, 2011.

## EVALUATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE THE PROFILE OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA ISOLATED FROM DILÚVIO GULLY WATERS.

Author: Daniele Vargas de Oliveira<sup>1</sup>  
Adviser: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Van Der Sand

### ABSTRACT

The Dilúvio is part of an important watershed in the city of Porto Alegre, RS, having 17.605m of extension rising in the city of Viamão and flowing into Guaíba Lake receiving all kind of waste resulting from pluvial, domestic and hospital wastewater. Thus, the gully receives a diverse microbial population, some of these microorganisms may exhibit resistance to different antimicrobial agents and therefore act as potential disseminators of resistance genes. The aim of this study was to evaluate the diversity of the Gram negative population present in the Dilúvio gully waters; characterize and identify the population accordingly to the antimicrobial resistance profile and the presence of genes for the resistance to  $\beta$ -lactams antimicrobial. The water samples were collected at five sites in different seasons of the year. The samples passed through isolation of the bacterial population by plating them on plates containing different media. To characterization of the resistance profile was performed using disk diffusion on agar method using antibiotics of different classes. It was observed the prevalence of bacteria of the Enterobacteriaceae family. Approximately 67% of the isolates from collections 1 and 3, 52% of the isolates from collection 2 and more than 95% from collection 4 were resistant to two or more antimicrobial. As the presence of resistance genes it has been observed that 43.54% (27/62) of the isolates showed amplification of genes, *bla*<sub>TEM</sub>, and / or *bla*<sub>SHV</sub> among them 33.87% (21/62) were positive for the gene *bla*<sub>TEM</sub>, 9.67% (6 / 62) for gene *bla*<sub>SHV</sub> and 3.22% (2 / 62) were positive for both genes.

<sup>1</sup>. Master 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. (84 p.) April, 2011.

## SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS.....	IX
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	X
RELAÇÃO DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS.....	XI
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>03</b>
2.1. Água.....	03
2.2. Qualidade da água.....	04
2.3. O Arroio Dilúvio.....	08
2.4. Resistência a antimicrobianos.....	10
2.5. Resistência a classe dos $\beta$ -lactâmicos.....	15
2.5.1. TEM.....	18
2.5.2. SHV.....	19
2.5.3. Os surtos no mundo.....	19
2.5.3.1. Europa.....	20
2.5.3.2. Ásia.....	21
2.5.3.3. África.....	22
2.5.3.4. Oceania.....	22
2.5.3.5. Américas.....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1. Local e coleta das amostras.....	26
3.2. Isolamento bacteriano.....	28
3.3. Colimetria.....	29
3.4. Número de bactérias heterotróficas.....	29
3.5. Análise Físico-Química.....	29
3.6. Identificação bacteriana.....	30
3.7. Teste de resistência a antimicrobianos.....	30
3.8. Identificação Molecular dos genes de resistência a $\beta$ -lactâmicos.....	31
3.8.1. Extração de DNA dos isolados.....	31
3.8.2. Quantificação do DNA.....	32
3.8.3. Oligonucleotídeos iniciadores.....	32
3.8.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	33

3.8.5. Condições para amplificação.....	33
3.8.6. Eletroforese em gel de agarose.....	34
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
4.1. Colimetria.....	35
4.2. Determinação do número de bactérias heterotróficas.....	40
4.3. Parâmetros físico-químico.....	41
4.4. Identificação.....	44
4.5. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	48
4.6. Detecção de genes de resistência aos antimicrobianos da classe dos $\beta$ -lactâmicos.....	55
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>
<b>7. APÊNDICES.....</b>	<b>72</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 01- <i>Primers</i> para amplificação dos genes.....	33
Tabela 02- Número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes por 100mL, de amostras de água dos diferentes pontos de coleta no arroio Dilúvio.....	36
Tabela 03- Precipitação pluviométrica no ano de 2009.....	37
Tabela 04- Contagem de bactérias heterotróficas (UFC/100µL).....	41
Tabela 05- Análise físico-química das águas do arroio Dilúvio.....	42
Tabela 06- Número de espécies Gram-negativas e distribuição dos gêneros identificadas nas águas do arroio Dilúvio, ao longo das 4 coletas realizadas no período de janeiro a dezembro de 2009.....	46
Tabela 07- Perfil de resistência, relacionando os antimicrobianos com as coletas realizadas no arroio Dilúvio no período de janeiro a dezembro de 2009.....	51
Tabela 08- Número de isolados identificados positivos para a presença do gene <i>bla</i> <sub>TEM</sub> e <i>bla</i> <sub>SHV</sub> .....	60

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 01- Mapa dos cinco pontos de coleta ao longo do curso do Arroio Dilúvio em Porto Alegre/RS.....	27
Figura 02- Distribuição das espécies do gênero <i>Escherichia</i> , no período do estudo no arroio Dilúvio.....	47
Figura 03- Número de isolados resistentes para cada gênero identificado no decorrer do estudo dos pontos e das coletas no arroio Dilúvio.....	50
Figura 04- Fotografia de um gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para os genes <i>bla</i> <sub>TEM</sub> .....	57
Figura 05- Fotografia de um gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para os genes <i>bla</i> <sub>SHV</sub> .....	58

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**EMB:** Agar eosina azul de metileno  
**ESBL:**  $\beta$ -lactamases de espectro estendido  
 **$\mu\text{g}/\text{mL}$ :** microgramas por mililitro  
 **$\mu\text{g}$ :** microgramas  
 **$\mu\text{L}$ :** microlitro  
 **$\mu\text{M}$ :** micromolar  
**ATCC:** American Type Culture Collection  
**mg:** miligramas  
**mL:** mililitro  
**mM:** milimolar  
**NaCl:** cloreto de sódio  
**NMP:** Número Mais Provável  
 **$^{\circ}\text{C}$ :** graus Celsius  
**pb:** pares de base  
**PBP:** *Penicillin Binding Proteins*  
**PCR:** reação em cadeia da polimerase  
**pH:** logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio em uma solução  
**rpm:** rotações por minuto  
**SS:** ágar Salmonella-Shighella  
**TAE:** Tris-Ácido Acético-EDTA  
**TSA:** ágar triptona de soja  
**TSB:** caldo triptose de soja

## 1. INTRODUÇÃO

A água é um dos recursos naturais indispensáveis à existência de vida na terra, porém, apenas 3% de toda água é doce e dessa apenas uma pequena parte é utilizável para a maioria das atividades humanas, o restante permanece nos oceanos, geleiras e em águas subterrâneas de forma inacessível para a vida humana.

Os recursos hídricos foram considerados durante muito tempo como inesgotáveis, recebendo todo o tipo de despejos poluidores, o que acabou por favorecer o mau uso, o desperdício e a contaminação biológica das águas.

Mesmo uma água de aparência clara e limpa, pode estar contaminada por microrganismos que podem ser provenientes do ar, do solo e de despejos de resíduos contendo todos os tipos de contaminantes. Isto representa um sério risco à saúde, pois pode conter microrganismos patogênicos como os pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Legionella*, entre outros.

O Arroio Dilúvio atravessa o município de Porto Alegre, possui 17.605m de extensão, nasce no município de Viamão e recebe o aporte das águas dos Arroios Mariano, Moinho, São Vicente e Cascatinha e abastece a Barragem

Lomba do Sabão, indo desaguar entre os parques Marinha do Brasil e Maurício Sirotsky Sobrinho (Parque Harmonia) no Lago Guaíba que é o manancial de abastecimento de água de Porto Alegre. Ao longo de seu trajeto, recebe esgoto cloacal, pluvial e efluente de 37 instituições de saúde, agravando a qualidade da água e com isso a preocupação com a saúde pública.

A água de esgoto é caracterizada por conter despejos provenientes do uso doméstico, comercial, agrícola e industrial. As diferentes características biológicas, físicas e químicas fazem dos ambientes aquáticos nichos diversificados habitados por microrganismos distintos, o que acaba favorecendo a seleção destes.

O uso indiscriminado de antimicrobianos pela população coloca em risco o tratamento de doenças causadas por bactérias, pois essas podem carregar informação de resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos. No ambiente aquático, a maioria das investigações sobre resistência a antimicrobianos tem como foco bactérias de origem fecal por estas serem associadas a doenças infecciosas podendo vir a causar surtos de doenças de propagação hídrica.

Devido à importância do Arroio Dilúvio para a cidade de Porto Alegre, o presente trabalho teve como objetivos: i) identificar as bactérias Gram-negativas presentes na águas do Arroio; ii) caracterizar as bactérias de acordo com o perfil de resistência a diferentes classes de antimicrobianos; iii) detectar a presença de genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos utilizando PCR; e iv) avaliar a qualidade da água do Arroio Dilúvio no que se refere à concentração de coliformes e bactérias heterotróficas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Água**

A quantidade de água existente na terra é considerada constante e heterogênea, o que varia são as formas de armazenamento e o estado em que ela se encontra. O volume de água doce disponível na superfície dos continentes pode ser um importante controlador da distribuição das espécies na terra (Menegat, 2006).

Esse fato já foi ponderado em pesquisas que apontam que grandes aglomerados urbanos necessitam de água como recurso fundamental para a sua manutenção, portanto os problemas ambientais são um sinônimo de combate a superpopulação e desta forma o crescimento populacional estaria limitado à disponibilidade de água (Vieira, 2006). A quantidade e a qualidade da água disponível para os diferentes usos como o abastecimento público e industrial, a irrigação, o esporte e o lazer podem atuar como determinantes no desenvolvimento econômico e social das cidades (Bertoldo et al., 2004).

Dentro da distribuição mundial da água o Brasil é considerado um país rico em água doce de acordo com Rebouças (1999), pois ocupamos o primeiro

lugar na lista de quantidade de água doce, detendo 6.220Km<sup>3</sup>/ano, enquanto a Rússia que ocupa o segundo lugar detém 4.059Km<sup>3</sup>/ano, e possuímos 12% da água doce disponível no planeta, sendo o maior fluxo interno de recursos hídricos do mundo (Noronha et al., 2006).

A água é um dos recursos naturais indispensáveis para a existência dos seres vivos, porém as atividades antrópicas intensas produzem muitos poluentes quando lançados nos recursos hídricos, podendo vir a causar sérios problemas ambientais (Barbosa et al., 2007; Nascimento & Naime, 2009).

## **2.2 Qualidade da Água**

O desenvolvimento humano, a produção agrícola e industrial e a produção de resíduos aceleram a contaminação e conseqüente poluição das bacias hidrográficas, interferindo e alterando a qualidade da água de seus rios, lagos e arroios (Coiado, 2000). O crescimento rápido da população urbana e da industrialização submete os recursos hídricos a uma pressão pela constante renovação. Entretanto, isso nem sempre acontece e acaba por fim, comprometendo os recursos naturais, reduzindo a qualidade de vida das populações próximas a estas bacias, pois ficam expostas a doenças infecto-contagiosas, agentes carcinogênicos e teratogênicos, resultando em efeitos danosos à saúde (Moura et al., 2009; Nascimento & Naime, 2009).

A água utilizada pela população é originária de lagos, rios e lençóis subterrâneos o que corresponde a uma pequena parte da água doce disponível para o consumo humano. Esses locais sofrem com o contato direto e constante

do homem, conseqüentemente, acabam sendo poluídos com esgoto doméstico, industrial, agrícola e todo o tipo de resíduo (Albuquerque, 2001). À medida que a água avança nos mananciais a qualidade da mesma pode melhorar devido à capacidade de autodepuração dos próprios corpos hídricos e a diluição dos contaminantes pelo recebimento de água de melhor qualidade de seus afluentes (Bertoldo et al., 2004).

A água serve como veículo de transmissão de doenças causadas por parasitas e microrganismos, as chamadas doenças de veiculação hídrica, tornando-se um risco à saúde e ao bem estar da população (Moura et al., 2009). As doenças diarréicas são um exemplo dos problemas causados pela água contaminada e são responsáveis por um alto índice de mortalidade em crianças, nos países em desenvolvimento (Ram et al., 2008). No Brasil, as doenças de veiculação hídrica levam a um número de óbitos maior do que em países com PIB menor, como Cuba e Chile. Cerca de 80% dos leitos nos hospitais da rede pública são ocupados por pessoas com problemas de saúde ligados às doenças de veiculação hídrica. De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, a situação epidemiológica da doença diarréica aguda entre os anos de 2000 e 2007 foi de 39.757 óbitos por diarreia e gastroenterite no Brasil. No Rio Grande do Sul, no período de 1999 a 2008, ocorreram 1.626 óbitos notificados, num total de 684.487 casos da doença de 1999 a 2010. Outro dado preocupante é que quase 100.000 crianças com idade igual ou maior que 10 anos foram internadas por conseqüência desta doença, entre os anos 2000 e 2007, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde.

Os microrganismos presentes na água são componentes de biozoonoses particulares cuja composição e tamanho são dependentes de uma variedade de condições físicas e químicas (Avery et al., 2008). Os métodos utilizados para avaliar a qualidade microbiana da água, correspondem a procedimentos microbiológicos padronizados pela *American Public Health Association* – (APHA). Alguns indicadores microbiológicos têm sido utilizados mundialmente para a verificação da contaminação dos recursos hídricos por resíduos humanos, geralmente microrganismos presentes nas fezes humanas e de animais de sangue quente (Vasconcellos, 2006). A principal fonte de contaminação fecal de águas superficiais em países em desenvolvimento são fezes humanas e de animais, valas sépticas, drenagem de águas pluviais, resíduos urbanos e efluentes industriais (Ahmed et al., 2005).

Coliformes fecais e enterococos têm sido usados como indicadores de poluição fecal (Sinton et al., 1998; Morais et al., 2001; Shibata et al., 2004). Ambos os grupos microbianos podem ser determinados por enumeração, proporção de coliformes fecais/ enterococos ou por inativação através de diferentes agentes. Qualquer determinação da diversidade em diferentes ambientes deve considerar o fato de existirem um número grande de espécies nestes grupos e que os esgotos urbanos são um ambiente propício para várias outras espécies bacterianas. A determinação da origem da poluição fecal e das espécies bacterianas existentes nas águas é um fator importante no manejo e controle de qualidade das fontes de água, podendo indicar as fontes poluidoras das águas superficiais (Vilanova et al., 2002).

Dentro do grupo coliforme, a bactéria *Escherichia coli* se enquadra em todos os requisitos para ser utilizada como indicadora de contaminação fecal, já que ela está presente em excretas, efluentes residuais e é a única bactéria da família Enterobacteriaceae de origem exclusivamente fecal (Vasconcellos, 2006). Além do grupo coliforme existe também os coliformes termotolerantes que são capazes de fermentar lactose com produção de gás entre 44,5°C e 45,5°C. Dentre estes inclui-se três gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (Moura et al., 2009).

Segundo Etcheverria et al., (2004), os métodos físicos e químicos permitem apenas um conhecimento instantâneo e portanto limitado das condições da água, no momento em que são feitas as medições. Essas limitações tornam-se mais preocupantes se o objeto de estudo for um sistema lótico, onde existe uma correnteza que faz com que a água seja continuamente renovada em cada ponto. Porém, se medições periódicas forem realizadas aumenta significativamente o valor informativo e a confiabilidade dos métodos físicos e químicos. Mudanças nos fatores físicos, químicos, radiológicos e biológicos da água podem ser causadas pelas atividades do homem (Nascimento & Naime, 2009).

A preservação da qualidade da água necessita de uma atenção mais criteriosa por parte das autoridades de saúde e sanitárias, considerando os mananciais hídricos, principalmente aqueles que servem para o abastecimento de água para o consumo humano. Isto porque a contaminação destes pode servir como transmissora de infecções e doenças parasitárias para a população podendo ocasionar surtos e epidemias (Côrrea et al., 2006). A preservação da

qualidade da água superficial é importante não somente para a espécie humana, mas também para muitas outras formas de vida, podendo ser responsável pelo crescimento ou não de determinadas espécies (Nascimento & Naime, 2009).

De acordo com Naime & Nascimento (2009), a legislação estadual vigente determina o monitoramento das águas superficiais, o que não é prioridade, e que muitas vezes pode ser um controle deficiente. Portanto são poucos os arroios da região metropolitana de Porto Alegre que passam por um monitoramento físico-químico e microbiológico.

### **2.3. O Arroio Dilúvio**

Em Porto Alegre são delimitadas 27 sub-bacias hidrográficas, sendo a do Arroio Dilúvio a mais importante, pois escoam as águas de uma área de 83.74Km<sup>2</sup>, ou seja, onde reside um terço da população total de Porto Alegre. As sub-bacias, como a do Arroio Dilúvio, escoam as águas em escala local, portanto os pequenos cursos d'água são assim definidos. Já em escala regional, o conjunto de vários rios é definido como região hidrográfica e onde a água escoam, para um canal principal, é denominada de bacia hidrográfica (Menegat, 2006).

O curso principal do Arroio Dilúvio possui 17.605 m de extensão onde suas nascentes encontram-se no interior do Parque Saint' Hilaire, recebendo como afluentes os Arroios Mato Grosso, Moinho, Cascatinha, Águas Mortas entre outros afluentes que acabaram desaparecendo sob a cidade. Este Arroio abastece a Barragem Lomba do Sabão e deságua no Lago Guaíba, entre os

parques Marinha do Brasil e Maurício Sirotsky Sobrinho (Harmonia) (Menegat, 2006). Ele percorre 10 bairros altamente urbanizados.

O Dilúvio, ao longo da sua história já foi chamado de Arroio Jacareí (Pereira, 1995), devido à presença de jacarés na enseada da Rua Praia de Belas (antiga foz do arroio), a qual foi aterrada; e também de Riacho, pois havia uma ponte de pedra para ligar os bairros à zona sul, ponte esta que foi preservada através da história, encontrando-se no atual Largo dos Açorianos (Menegat, 2006; Devos et al., 2010).

O Arroio foi canalizado e seu curso original desviado, devido às constantes cheias, no período das chuvas. Recebe anualmente  $50.000\text{m}^3$  de detritos ao longo de seu curso na Avenida Ipiranga, produtos de erosão natural e do desmatamento das encostas dos morros, entulho e lixo (Menegat, 2006). Isso implica na necessidade de limpeza e dragagem permanentes do Arroio.

Tucci (1999), explica que o Arroio Dilúvio é um exemplo de curso d'água, pois devido a sua largura e pequena profundidade, durante os períodos de pouca chuva, ocorre a deposição no canal dos sedimentos de toda a bacia, reduzindo a capacidade de escoamento durante as enchentes, causando o seu assoreamento. Devido a esses fatores, quando ocorre uma grande precipitação o Arroio Dilúvio fica mais suscetível a alagamentos e inundações nas áreas do seu entorno, pois essas águas pluviais carregam além de sedimentos, outras substâncias oriundas da limpeza da cidade pela água.

A presença de sólidos no Arroio prejudica não apenas a estética e a biota local, mas exercem influência em uma vasta área. Dependendo das

condições hidráulicas do corpo aquático e acabam por influenciar a qualidade das águas e do meio ambiente em geral (Moreira, 2008).

#### **2.4. Resistência a antimicrobianos**

O primeiro relato que microrganismos poderiam ser inibidos por metabólitos de outros microrganismos foi feito por Louis Pasteur em 1877, que observou o *Bacillus anthracis* sendo inibido por um contaminante. Em 1929, Fleming constatou a lise de estafilococos por um fungo *Penicillium notatum* e 10 anos depois a substância produzida por este microrganismo foi purificada e identificada, denominada de penicilina (Kümerer, 2009a).

Os primeiros antibióticos eram de origem natural, ou seja, produzidos por microrganismos, depois vieram os obtidos através de síntese química (sintéticos) e ainda os por modificações químicas dos componentes naturais (semi-sintéticos). Os antibióticos são divididos em diferentes classes como os  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas, tetraciclinas, macrolídeos, sulfonamidas entre outros (Kümerer, 2009a). A partir do momento que as estruturas químicas dos antibióticos foram sendo identificadas, estas substâncias começaram a ser produzidas sinteticamente, e passaram a ser denominados de quimioterápicos. Hoje em dia, o termo antibiótico é usado também para os produtos com atividade contra fungos e parasitas, além de contra bactérias (Kümerer & Henninger, 2003).

Há três principais formas estratégicas que os microrganismos podem desenvolver resistência às drogas: 1) produzindo uma enzima que destrua o

antimicrobiano; 2) alterando o alvo molecular do antimicrobiano; 3) evitando a chegada do antimicrobiano ao alvo (através de bombas de efluxo ou permeabilidade de membrana). De forma geral, após o microrganismo encontrar a sua melhor estratégia, os novos genes que conferem resistência são disseminados entre aqueles de sua espécie e até mesmo para microrganismos de outras espécies tratados com o mesmo antimicrobiano (Sundsjord et al., 2004). Em bactérias Gram-negativas o mais comum é uma combinação das estratégias 1 e 3 (Rawat & Nair, 2011).

A resistência de bactérias a antibióticos e outras drogas antimicrobianas é um fenômeno natural e de pressão seletiva, mas que devido ao seu uso indiscriminado e recorrente, tornou-se um problema de saúde pública. Porque eles são eliminados e despejados no ambiente sem qualquer prevenção (Batista et al., 2007), provocando a seleção natural dos microrganismos mais aptos (Mota et al., 2005). Existe uma correlação entre a quantidade de antimicrobianos usados, o tempo de administração e o nível de resistência. Uma vez que quanto maior o número de antimicrobianos usados e/ou o tempo de tratamento, maiores serão as chances de favorecer uma seleção natural dos microrganismos mais resistentes (Rivera-Tapia, 2003).

A resistência das diversas espécies bacterianas, aos antimicrobianos, pode variar entre países, regiões e de acordo com a origem do microrganismo, que pode ser hospitalar ou comunitária. A resistência aos antimicrobianos pode ser um fenômeno genético ou não. Os genéticos estão relacionados com a existência de genes ou elementos móveis (plasmídios, transposons e integrons) presentes no microrganismo que codificam diferentes mecanismos

bioquímicos que impedem a ação das drogas, chamada resistência adquirida (Chroma & Kolar, 2010). Os elementos móveis propiciam a troca de material genético inclusive entre bactérias Gram-negativas e positivas (Levy, 2002). Dessa forma a resistência pode ser levada a diversos ambientes e de diversas formas, afetando os organismos aquáticos e terrestres (Kümerer, 2009b). O fenômeno não genético é aquela resistência que ocorre de forma natural dentro de uma espécie ou gênero bacteriano é a chamada resistência intrínseca (Chroma & Kolar, 2010). A expressão de genes de resistência pode ou não depender de estímulo externo: 1) na indutiva é necessário um estímulo, como por exemplo, a produção de  $\beta$ -lactamase por microrganismos, quando expostos aos antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos; 2) na constitutiva não é necessário nenhum estímulo; e 3) constitutiva-indutiva a expressão aumenta quando um estímulo é recebido (Koneman et al., 2001).

Algumas espécies bacterianas possuem capacidades de adaptação para mudanças ambientais e conseguem sobreviver em condições desfavoráveis, resultando em mutações que favoreçam as espécies que sobrevivem em condições externas diferentes. Além disso, muitas bactérias estão em constante contato com genes itinerantes que se movem de uma célula bacteriana para outra, realizando troca de material genético (Kümerer, 2009b).

Os alvos dos antimicrobianos nos microrganismos, freqüentemente são as proteínas (enzimas), que são muito importantes para o metabolismo da célula bacteriana. O principal mecanismo utilizado por uma bactéria sensível para se tornar resistente é a mutação cromossômica espontânea e a recombinação de genes (Mota et al., 2005). Um dos mecanismos pelo qual a

bactéria pode se proteger da ação dos antimicrobianos é alterando o seu alvo de ação tornando-o resistente e continuando a produzir o alvo original sensível (Rivera-Tapia, 2003). De acordo com Levy (2002), precisamos de novas drogas que consigam bloquear os mecanismos de resistência, mas também é preciso mudar a mentalidade do ser humano e sua forma de agir perante o uso indiscriminado e excessivo desses medicamentos.

A resistência a duas classes de antimicrobianos têm sido observada com frequência, tanto na medicina humana quanto veterinária, o que acaba por dificultar as opções de tratamento para certas enfermidades e facilitar que microrganismos oportunistas invadam um organismo já debilitado (Von Baum & Marre, 2005). O uso de antimicrobianos na medicina veterinária pode acabar aumentando o índice de microrganismos resistentes, pois estes podem ser carregados para o solo, alimentos e água (superficial e/ou subterrânea), selecionando os microrganismos mais adaptados (Schneider et al., 2009).

Dessa forma, a resistência também está presente em muitas comunidades em ambientes naturais, onde muitos microrganismos não podem ser cultivados em laboratório, mas que podem possuir uma diversidade molecular muito grande e, portanto, deveriam ser investigados (Henriques et al., 2006).

No grupo das bactérias Gram-negativas, as espécies que mais se destacam com elevado perfil de resistência aos antimicrobianos são as da família Enterobacteriaceae e do gênero *Pseudomonas* (Batista et al., 2007).

Bactérias resistentes ou multirresistentes como as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e outras das famílias Acinetobacter,

*Pseudomonaceae* e *Enterobacteriaceae*, estão presentes nos esgotos municipais e em tanques de digestão (aeróbicos e anaeróbicos) de estações de tratamento de esgoto (Kümerer, 2009b).

Os antimicrobianos podem ser mais ou menos metabolizados pelos seres humanos e animais, após são eliminados no ambiente e a parte que não foi metabolizada segue ativa, podendo causar sérios impactos nos diferentes ecossistemas e nos microrganismos em diferentes níveis tróficos presentes nestes locais (Kümerer, 2009a; Nagulapally et al., 2009). Somente alguns antimicrobianos podem ser biodegradados no ambiente aquático, a grande maioria é persistente, o que resulta em uma alta concentração em águas residuais urbanas podendo vir a interferir nas bactérias que vivem em ambientes aquáticos. Por esse fato muitos tipos de bactérias patogênicas resistentes e até mesmo multirresistentes tem sido identificadas em esgoto, solo, mananciais e estações de tratamentos de efluentes (Kümerer, 2003). Kümerer (2009b) sugere que a entrada de bactérias resistentes no ambiente, pelo uso dos antimicrobianos, é muito mais importante e causa maior impacto ambiental do que a entrada direta dos antimicrobianos.

O fenômeno da resistência a antimicrobianos em bactérias presente em águas superficiais também é observado em rios, nas nascentes de águas urbanas, sistemas de abastecimento de água potável, estuários, águas costeiras poluídas e no mar. Pode estar associada a genes de resistência mostrando que estes podem estar presentes onde existe pouca ou nenhuma pressão de seleção (Kümerer, 2009b). Os mais diversos ambientes, os quais são mais impactados pelas atividades humanas ou agrícolas, mostram uma

maior concentração de bactérias e de genes resistentes a antimicrobianos, também detectados em águas residuais (Pruden et al., 2006).

### **2.5. Resistência a classe dos $\beta$ -lactâmicos**

Os antimicrobianos desta classe são o maior grupo de antimicrobianos disponíveis para o consumo e possuem um anel  $\beta$ -lactâmico central na sua estrutura, que é o sítio de ação na parede celular bacteriana, pois é por onde se ligam nas enzimas que vão sintetizá-la (Dropa, 2009). Os compostos  $\beta$ -lactâmicos são transportados para o interior da célula pelas porinas, que são proteínas que formam um canal entre o meio externo e a parede celular, facilitando a ação destes compostos (Koneman et al., 2001). Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos são altamente específicos e atóxicos para as células hospedeiras e compreendem os seguintes compostos: as penicilinas (naturais ou semi-sintéticas) que atuam se ligando irreversivelmente a diversas enzimas transpeptidases conhecidas como *Penicillin Binding Proteins* (proteínas ligadoras de penicilinas) –PBPs, resultando em uma parede celular mais fraca; as cefalosporinas (naturais ou semi-sintéticas) atuam de mesma forma que as penicilinas, porém em alguns casos de maneira mais eficiente; os monobactâmicos agem se ligando a PBP3, impedindo a divisão celular e com isso a síntese da parede celular e podem induzir a filamentação; e as carbapenemas ligam-se a PBP1 causando a inibição da elongação celular e a posterior lise da célula e PBP2 alternado a forma celular (Kohanski et al., 2010; Rawat & Nair, 2011).

A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos pode ocorrer por três diferentes formas: inativação enzimática, alteração nos receptores do alvo ou transporte alterado da droga; sendo a primeira a mais usada pelas enzimas  $\beta$ -lactamases (Dropa, 2009). A síntese das enzimas  $\beta$ -lactamases pode ser constitutiva (cromossômica) ou indutiva (mediada por plasmídeos) e especula-se que a verdadeira função fisiológica desta enzima seja re-estruturar o peptidoglicano durante o crescimento da célula bacteriana (Koneman et al., 2001).

As enzimas  $\beta$ -lactamases são classificadas de duas formas: 1) classificação molecular de Ambler que as divide em quatro classes (A, B, C e D), de acordo com a similaridade dos aminoácidos; e 2) classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros que separa as  $\beta$ -lactamases em quatro grupos e vários subgrupos, relacionando a similaridade funcional entre elas (Gniadkowski, 2001; Paterson & Bonomo, 2005; Rawat & Nair, 2011).

As  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) são um grupo de enzimas capazes de hidrolisar as penicilinas, a primeira, segunda e terceira geração das cefalosporinas e o aztreonam. Representam o primeiro grupo na qual a resistência mediada pela  $\beta$ -lactamase, aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, é resultado de mudanças no substrato da enzima e é o mecanismo mais comum e preferencial de resistência em bactérias Gram-negativas (Paterson & Bonomo, 2005; Bush & Jacoby, 2010; Rawat & Nair, 2011) também presente em algumas bactérias Gram-positivas (Henriques et al., 2006), tanto de origem animal como humana (Li et al., 2007).

Nos anos 60 foi descrita a primeira  $\beta$ -lactamase mediada por plasmídeos, denominada de TEM, em Gram-negativas. Até o momento já foram descobertas mais de 400  $\beta$ -lactamases e mais de 300 tipos de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), que já foram caracterizadas e estão presentes em bactérias em mais de 30 países (Braford, 2001; Bush & Jacoby, 2006 apud DROPA, 2009). As enzimas ESBL estão freqüentemente localizadas em plasmídeos e também podem carregar resistência a outros antimicrobianos como aminoglicosídeos, trimetoprim, sulfonamidas, tetraciclina e cloranfenicol. Desde 1980, vem sendo estudado a presença de ESBL em Enterobacteriaceae, e de todos os tipos existentes, os tipos TEM e SHV, aparecem como sendo uma importante causa de infecções adquiridas em hospital e um único microrganismo pode produzir diferentes tipos de  $\beta$ -lactamases (Rawat & Nair, 2011).

Das enzimas, TEM-1 é a  $\beta$ -lactamase mais freqüente mediada por plasmídeo em bacilos entéricos Gram-negativos, como, por exemplo, em *Escherichia coli*. A SHV-1 é mais comum em *Klebsiella pneumoniae* e as ESBLs que derivam das enzimas TEM-1, SHV-1, ou seja a grande maioria, se diferenciam em alguns poucos aminoácidos, responsáveis por uma grande mudança na atividade enzimática das ESBLs (Braford, 2001; Paterson & Bonomo, 2005).

Em 1989, no primeiro artigo de revisão sobre ESBL, essas enzimas foram identificadas como o primeiro exemplo no qual as  $\beta$ -lactamases conferiam resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos devido a mudanças no substrato das enzimas (Paterson & Bonomo, 2005). Existe uma grande

diversidade de  $\beta$ -lactamases e estas são encontradas em bactérias que habitam os mais variados ambientes e expostas a diferentes pressões de seleções (Bush & Jacoby, 2010).

O tratamento com antimicrobianos pode ser um risco para selecionar um microrganismo produtor de ESBL, até porque está sendo encontrada uma relação entre o uso da terceira geração de cefalosporina e a produção de ESBL em algumas amostras (Lautenbach et al., 2001).

A maioria das ESBLs identificadas na família das Enterobacteriaceae pertencem a classe A de Ambler, e grande parte são derivadas de TEM e SHV. Estas enzimas são produzidas principalmente pela *E. coli*, *K. pneumoniae* ou *Proteus mirabilis* e são responsáveis por surtos de infecções nosocomiais em todo o mundo (Cao et al., 2002). Essas derivações ocorrem devido a pequenas mutações pontuais nos genes que mudam o perfil do substrato (Braford, 2001).

### **2.5.1 TEM**

Seu nome é devido ao primeiro relato de ESBL mediada por plasmídeo, que foi identificada em *E. coli* isolada de uma paciente grega chamada Temoneira em 1965. Todas as enzimas TEM são derivadas de TEM-1 e TEM-2 (Paterson & Bonomo, 2005), sendo que mais de 160  $\beta$ -lactamases já foram descritas e a maioria delas são ESBLs (Jones et al., 2009). Estão presentes em vários integrantes da família das Enterobacteriaceae e acabaram se disseminando para outros patógenos Gram-negativos. Alterações nos

aminoácidos glutamato por lisina na posição 104 ou 240; arginina por serina ou histidina na posição 164; e glicina por serina na posição 238 (Braford, 2001), na enzima TEM, favorecem o aparecimento de diversos fenótipos ESBL.

### **2.5.2 SHV**

Esse tipo de ESBL é mais freqüente em isolados clínicos e seu nome está relacionado com "variações na sulfidril". A alteração que ocorre no gene *bla<sub>SHV</sub>* originando fenótipos ESBL é a substituição de uma serina por uma glicina na posição 238 (Braford, 2001). Desde sua descoberta, microrganismos contendo SHV-2 foram encontrados em todos os continentes (Paterson et al., 2003). SHVs tem sido identificada em Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp* (Paterson & Bonomo, 2005). Até o momento, 112 SHVs já foram identificadas, mas nem todas são ESBLs, e podem ser encontradas no cromossomo (*K. pneumoniae*) ou em plasmídeo (*E. coli*) (Braford, 2001; Jones et al., 2009).

### **2.5.3 Os surtos no mundo**

A distribuição de Enterobacteriaceae que produzem ESBL é muito ampla, e está presente em vários países e cada vez mais estes microrganismos são responsáveis por causarem surtos de resistência aos antimicrobianos em pacientes hospitalizados. Curiosamente, alguns tipos de

ESBLs são exclusivos de determinados países e regiões (Braford, 2001; Gniadkowski, 2001; Freitas et al., 2003; Khroma & Kolar, 2010).

### **2.5.3.1 Europa**

O primeiro relato, no mundo, sobre ESBL é datado 1983, na Alemanha, de onde teria ocorrido um aumento dessas infecções e a disseminação para todo o mundo (Khroma & Kolar, 2010), sendo, portanto este, o primeiro relato no mundo (Paterson & Bonomo, 2005).

O problema das ESBLs iniciou no oeste da Europa devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos de espectro expandido. A prevalência das ESBL em Enterobacteriaceae varia de país para país e até entre hospitais (Braford, 2001). Há uma grande variedade de ESBL amplamente distribuída nos países da Europa (Paterson & Bonomo, 2005).

Um exemplo disso foi observado na Holanda em uma pesquisa em 11 hospitais, menos de 1 % de amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* eram ESBL (Stobberingh et al., 1999).

O primeiro surto identificado causado por ESBLs na França ocorreu em 1986 e a proliferação nesse país foi muito grave, sendo que nos anos 90, 25 a 35% das amostras de *K. pneumoniae* eram positivas para esse espectro (Marty & Jarlier, 1998). Em 1998, uma pesquisa com 14 hospitais na França, detectou ESBLs em 9,5% das amostras de *K. pneumoniae* e 3,2% de todas as

Enterobacteriaceae (Gniadkowski, 2001). Também foi observado uma alta incidência de ESBL em *Enterobacter aerogenes*.

### 2.5.3.2 Ásia

A presença de ESBL na Ásia tem sido detectada em amostras clínicas, mas também com variações de acordo com os países e hospitais. Como observado na Coreia, que 4,8% das bactérias *E.coli* e *K. pneumoniae* produzem ESBL (Pai et al., 1999), sendo as mais comuns SHV-12 e SHV-2a (Kim et al., 1998). Em Hong Kong, mais de 12% dessas bactérias produzem ESBL (Ho et al., 2000). Já no Japão essa porcentagem é muito mais baixa, menos de 1% tanto para *E. coli* quanto para *K. pneumoniae* (Braford, 2001; Cao et al., 2002).

Cao et al., (2002) investigaram a presença de ESBL no Vietnã e este estudo revelou uma alta incidência desse perfil em Enterobacteriaceae. O gene *bla*<sub>TEM</sub> foi encontrado em 100% das amostras de *P. mirabilis*, 84,3% de amostras de *E. coli* e 38,4% das amostras de *K. pneumoniae*. O gene *bla*<sub>SHV</sub> não foi detectado em *P. mirabilis*, no entanto em *E. coli* e *K. pneumoniae* foi detectado em 44 e 54% das amostras, respectivamente.

De acordo com Paterson & Bonomo (2005) as ESBLs estão presentes de 5 a 8% de amostras de *E. coli* da Coreia, Japão, Malásia e Singapura. No entanto este índice fica entre 12 e 24% na Tailândia, Taiwan, Filipinas e Indonésia.

### **2.5.3.3 África**

Na África do Sul, vários surtos de infecções por *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs foram relatados entre 1998 e 1999, 36,1% das amostras de *Klebsiella* de um único hospital eram ESBLs positivas (Bell et al., 2002). Os tipos prevalentes de ESBL na África do Sul são o TEM e o SHV (Hanson et al., 2001).

### **2.5.3.4 Oceania**

Na Austrália, o primeiro relato de *Klebsiella* produtora de ESBL ocorreu entre 1986 e 1988 e foi identificado com sendo do tipo SHV e na última década as ESBLs foram encontradas em todos os estados desse país (Bell et al., 2002).

### **2.5.3.5 Américas**

O primeiro relato de microrganismos produtores de ESBL nos Estados Unidos da América (EUA) foi em 1988 (Jacoby et al., 1988). Um estudo relatou que 75% de 24 centros médicos norte americanos estudados, possuíam amostras produtoras de ESBL (Moland et al., 1998). Nos EUA, as ESBL foram identificadas com grande variação de 0 a 25% em Enterobacteriaceae, dependendo das instituições de saúde, predominando a TEM-10 (Braford, 2001).

Na América Latina e em outros países vem sendo relatada uma crescente ocorrência de  $\beta$ -lactamases CTX-M, comparando com  $\beta$ -lactamases TEM e SHV, produzidas por microrganismos Gram-negativos como *K. pneumoniae* e *E. coli* (Bonnet, 2004).

Na América do Sul de acordo Paterson & Bonomo (2005), poucos são os relatos sobre ESBL do tipo TEM, predominando os outros tipos.

Na Argentina, mais precisamente em Buenos Aires, no ano de 1982 foi identificado uma *K. pneumoniae* produtora de ESBL, SHV-5, sendo o primeiro relato na América Latina (Bonnet et al., 2000a; Paterson & Bonomo, 2005). A partir deste período muitas outras foram sendo identificadas e em 1989 ocorreu um grande surto com *Salmonella enterica* serovar Typhimurium produtora de ESBL em 12 das 14 províncias argentinas (Bauernfeind et al., 1996).

No Brasil uma nova ESBL foi identificada, a CTX-M-8 (Bonnet et al., 2000a). De 30 a 60% das klebsiellas que têm sido encontradas em Unidades de Terapias Intensivas do Brasil, Colômbia e Venezuela são produtoras de ESBL (Paterson & Bonomo, 2005). Um novo tipo de ESBL foi detectado em um hospital do Rio de Janeiro em uma amostra de *Serratia marcescens*, o tipo BES-1 (Bonnet et al., 2000b).

Em Curitiba (PR), numa pesquisa avaliando a presença de ESBL em 498 amostras de Enterobacteriaceae, 121(24%) foram positivas para esse espectro. Destas, 67(55%) eram *K. pneumoniae*, 20(16,5%) de *Enterobacter cloacae*, 14(14,6%) de *E. coli* e 3(2%) de *Klebsiella oxytoca*. Neste estudo, também foram avaliados os melhores antimicrobianos para confirmação de

ESBL e constataram que cefotaxime é o mais efetivo para todas as espécies de Enterobacteriaceae (Nogueira et al., 2006). Em Goiânia houve uma avaliação de dois hospitais e o índice de ESBL em *Klebsiella sp.* foi de 25% para o hospital A e 67% para o hospital B, com perfil de resistência a antimicrobianos elevados (Santos et al., 2008). Em uma pesquisa, durante um ano, em um hospital público de São Paulo foi detectado 127 amostras positivas para ESBL em Enterobacteriaceae. Destas, a grande maioria 96(75,6%) eram *K. pneumoniae* seguido por outras espécies. Ainda foi investigado a presença dos genes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>* nestas amostras e o índice de detecção para os genes foi de 63%, 17,3%, e 33,9% respectivamente (Dropa, 2009).

Já em um hospital de Porto Alegre (RS) foram testados diversos métodos para identificação de ESBLs em *E. coli* e *K. pneumoniae* e foi confirmada a produção de ESBLs em *E. coli* entre 8 a 13%, em *K. pneumoniae* entre 33 a 40%. Foram utilizados testes confirmatórios como dupla-difusão de disco (DD), e a relação da Concentração mínima inibitória de ceftazidime (MIC CAZ) e a Concentração mínima inibitória de ceftazidime adicionado de ácido clavulânico (MIC CAZ/CAC)) (Freitas et al., 2003).

Estudos demonstram um aumento de isolados produtores de ESBL em todo o mundo, sendo que no Brasil este índice já é mais elevado que em outras partes do mundo (Freitas et al., 2003; Nogueira et al., 2006; Santos et al., 2008; Dropa, 2009). De acordo com Freitas et al., (2003), dados sobre microrganismos Gram-negativos produtores de ESBL no Brasil ainda são muito poucos.

Toda a variedade de tipos de ESBLs e sua ampla distribuição mundial podem estar relacionadas com a diversidade parental e evolução das ESBLs devido à mobilidade de seus genes, a pressão seletiva através do uso de antimicrobianos como as cefalosporinas, o tempo prolongado de tratamento em UTIs e o uso de cateteres. Esses fatores podem colaborar com a propagação de surtos, dificultando as possibilidades de tratamento, pois alguns microrganismos podem ainda apresentar vários genes de resistência a outras classes de antimicrobianos (Gniadkowski, 2001; Freitas et al., 2003).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### **3.1. Local e coleta das amostras:**

As amostras de água foram coletadas no período de janeiro a dezembro de 2009 (coleta 1- verão; coleta 2- outono; coleta 3- inverno; coleta 4- primavera), ao longo do curso do Arroio Dilúvio, desde sua nascente no Parque Saint' Hilaire, no município de Viamão, até seu deságüe no Lago Guaíba, no município de Porto Alegre. Quatro coletas foram realizadas, uma a cada estação do ano, em cinco pontos distintos ao longo de seu curso (Figura 01):

- A. Na nascente dentro do Parque Saint' Hilaire;
- B. Início da Av. Ipiranga, cruzamento com a Av. Antônio de Carvalho;
- C. Av. Ipiranga, esquina da rua Guilherme Alves;
- D. Cruzamento da Av. Ipiranga com a Av. Ramiro Barcelos

E. Próximo ao deságüe, na Av. Ipiranga, esquina Av. Borges de Medeiros.

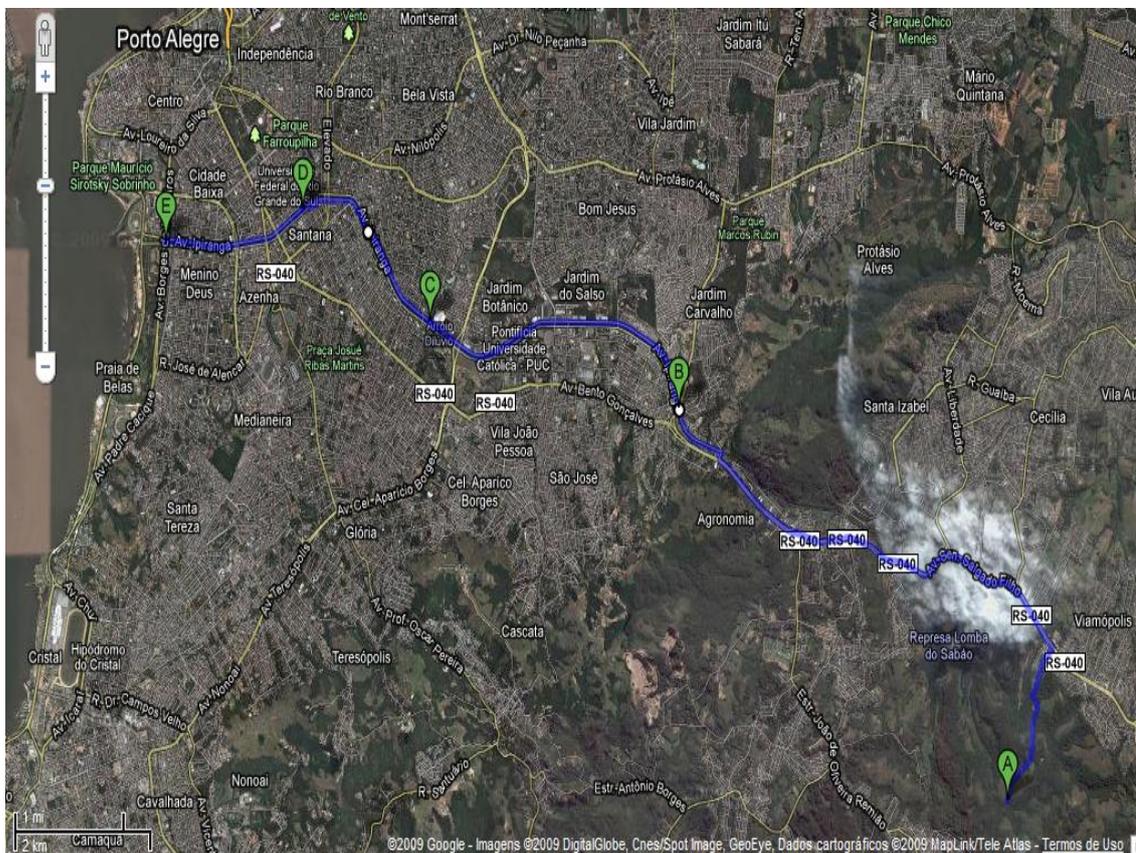


Figura 01- Mapa dos cinco pontos de coleta ao longo do curso do Arroio Dilúvio em Porto Alegre/RS. Fonte: Google Maps.

Foram coletados dois litros de água de cada ponto. Após as coletas, as amostras foram armazenadas sob refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do ICBS- UFRGS para as análises microbiológicas e para o Laboratório de Análises de Solo na Faculdade de Agronomia para avaliação dos parâmetros físico- químicos.

### 3.2 Isolamento bacteriano

Após a coleta as amostras passaram por diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) e 100 $\mu$ l das diferentes diluições, foram semeados em duplicata, através da técnica de espalhamento em superfície com o auxílio de alça de Drigalski (Antunes, 1995). As amostras foram semeadas em meios de cultura não seletivos como, ágar triptona de soja (TSA) e seletivos como o ágar Salmonella-Shighella (SS), ágar cetrimide, ágar eosina azul de metileno (EMB). As placas foram incubadas a temperatura de 37°C por 24-48h.

Uma vez crescidas as colônias nas placas a seleção destas foi realizada utilizando o método dos quadrantes onde é realizado um mapa da placa de Petri com quatro quadrados vazados de 1cm<sup>2</sup> (Oliveira et al., 2006). De cada quadrado foi retirada uma colônia e estas foram isoladas novamente em placas contendo os mesmos meios de cultura de origem. Após crescimento, as colônias foram inoculadas em caldo triptona de soja (TSB) e incubadas como descrito anteriormente. A partir desse crescimento foi realizada a coloração de Gram, para verificar a pureza da cultura, a morfologia e arranjo das células e classificá-las em bactérias Gram positivas ou Gram negativas. Uma vez confirmada a pureza da cultura uma alíquota foi armazenada em glicerol 20% e mantida em freezer a -20°C. Outra alíquota foi semeada em tubos de ensaio contendo TSA inclinado e armazenado em geladeira para posterior manipulação.

### **3.3 Teste colimétrico- Método da fermentação em tubos múltiplos**

A colimetria foi determinada através do Número Mais Provável (NMP) de bactérias do grupo coliformes totais e fecais, utilizando-se da técnica de tubos múltiplos com séries de 5 tubos (FUNASA, 2006). Para a realização deste teste foi utilizada as amostras na diluição  $10^{-1}$  na coletas 1 e 2, e a diluição  $10^{-3}$  nas coletas 3 e 4.

### **3.4 Determinação do número de bactéria heterotróficas**

O número de bactérias heterotróficas presente nas amostras foi determinado semeando-se as amostras em placas contendo o meio de cultura ágar padrão para contagem (PCA). Para tanto foi utilizando 100µl das amostras das diluições. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24/48h. Foram contadas as colônias nas placas que apresentavam entre 30 e 300 unidades formadoras de colônia (UFC). Placas fora desse padrão foram descartadas.

### **3.5 Análise Físico-Química**

Para análise físico-química das amostras coletadas, somente foi utilizada a água do ponto A e do ponto E. Estas amostras foram encaminhadas até o Laboratório de Análises de Solo da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde foram realizadas as análises físico-químicas. Foram determinados os seguintes parâmetros: Demanda Biológica ou Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO), os metais pesados selênio, cobalto, cádmio, níquel, chumbo, zinco, cromo, mercúrio.

### 3.6 Identificação bacteriana

A identificação da população bacteriana foi baseada nas provas bioquímicas clássicas para bactérias Gram negativas de acordo com Holt et al, (1984). Alguns testes realizados foram: catalase, oxidação/fermentação, fenilalanina desaminase, vermelho de metila (VM)/ Voges Proskauer (VP), motilidade, indol, H<sub>2</sub>S, citrato, urease, oxidase, ferro tríplice açúcar.

### 3.7 Teste de resistência a antimicrobianos

O teste de resistência aos antimicrobianos foi realizado seguindo as normas preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009) utilizando o método de difusão em disco de Kirby- Bauer. Cada isolado foi inoculado em TSB e incubado em estufa a 37°C até alcançar uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de Mac Farland (aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL). Uma vez obtida à concentração desejada a amostra foi semeada com o auxílio de um suabe estéril em placas contendo meio agar Müller Hinton. Os discos contendo os antimicrobianos foram distribuídos sobre a placa de forma equidistante e posteriormente as placas foram incubadas a 37°C por 16/18h. Após esse período foi realizada a medida dos halos de inibição. Para a validação do teste foi utilizada a linhagem padrão *Escherichia coli* ATCC 25922. Os antimicrobianos utilizados foram: amoxicilina/ ácido clavulânico (AMC 10µg), ampicilina (AMP 30µg), cefalotina (CFL 30µg), cefoxitina (CFO 30µg), ceftriaxona (CRO 30µg), ciprofloxacina (CIP 5µg), clorafenicol (CLO 30µg), estreptomicina (EST 10µg), gentamicina (GEN 10µg), imipenem (IMP

10µg), nitrofurantoína (NIT 300µg), norfloxacin (NOR 10µg), sulfametoxazol/trimetoprim (SUT 25µg) e tetraciclina (TET 30µg).

### **3.8 Identificação molecular dos genes de resistência aos β-lactâmicos**

Após a determinação do perfil de resistência, os isolados que apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos foram submetidos à identificação dos genes de resistência aos β-lactâmicos, utilizando os genes *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>*, pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

O controle positivo para os dois genes foi gentilmente cedido pelo Professor Dr. Afonso L. Barth do Programa de Pós Graduação em Medicina-Ciências Médicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### **3.8.1 Extração de DNA dos isolados**

Para a extração de DNA cromossomal das amostras foi utilizado o protocolo de acordo com Sambrook et al., (2001), com adaptações. As amostras foram cultivadas em 4mL de TSB a 37°C por 18h. A cultura foi então centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspenso em 1mL da solução tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM – pH7,8) e novamente centrifugado. As células foram então ressuspendidas em 200µL da solução tampão ao qual foi adicionado 200µl de TE<sup>5</sup>N (TE-5X + NaCl), 10% do volume de SDS e 5µL de Proteinase K (20mg/ml). A amostra foi incubada em banho de água por 1h a 37°C. Posteriormente adicionou-se 30µL NaCl 5M e 400µL de fenol-clorofórmio (1:1) e a mistura homogeneizada e

posteriormente submetida a centrifugação por 15min a 13.000rpm. A solução aquosa foi transferida para um novo tubo e a ele adicionada 400µL de clorofórmio-alcool isoamílico (9:1). A mistura foi novamente homogeneizada e centrifugada durante 15min a 13.000rpm. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo, sendo adicionado 1mL de etanol 100%. Após incubação a -20°C por 1h, a amostra foi centrifugada por 15min a 13.000 rpm e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspenso em 100µL de TE e o DNA foi estocado e armazenado em freezer.

### **3.8.2 Quantificação do DNA por comparação de intensidade de banda**

A quantificação das amostras de DNA foi determinada por comparação de intensidade das bandas, em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, usando como controle o DNA lambda (Invitrogen) de concentração conhecida.

### **3.8.3 Oligonucleotídeos iniciadores**

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de cada gene *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> de resistência a classe de antimicrobianos β- lactâmicos foram descritos por Jones et al., (2009). As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes, bem como a temperatura de anelamento de cada par de oligonucleotídeo e o tamanho do amplicon, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 01- Oligonucleotídeos iniciadores para amplificar os genes:

Genes	Oligonucleotídeos iniciadores	Temperatura de anelamento	Amplicon (pb)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	F: 5'-GTGCGCGGAACCCCTATT R: 5'-TTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC	52°C	968
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	F: 5'-CTTTACTCGCCTTTATCGGC R: 5'-TTACCGACCGGCATCTTTCC	50°C	982

Fonte: JONES, et al., 2009.

### 3.8.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL. A mistura de reação continha: DNA (30ng); 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> para o *bla*<sub>TEM</sub> e 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> para o *bla*<sub>SHV</sub>; tampão de reação 1X; oligonucleotídeos iniciadores (60 µM de cada primer para o *bla*<sub>TEM</sub> e para o *bla*<sub>SHV</sub>); 0,2mM de deoxinucleotídeos (Promega); 200ng de soro albumina bovino (BSA); 0,2U unidade de Taq polimerase e água MiliQ estéril para completar um volume final. As reações foram realizadas em Termociclador (Mastercycler Personal Eppendorf).

### 3.8.5 Condições para amplificação

As condições de amplificação utilizadas para os genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> foram: 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C; 35 ciclos, 1minuto a 94°C, 1

minuto a 52°C para o *bla*<sub>TEM</sub> e 50°C para o *bla*<sub>SHV</sub> e 1 minuto a 72°C; 5 minutos de extensão final a 72°C.

### **3.8.6 Eletroforese em gel de agarose**

Os fragmentos obtidos através da técnica da PCR foram resolvidos em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio. O gel foi submetido à eletroforese a uma voltagem de 80 Volts em tampão TAE1X, por 30 minutos, após foi visualizado em transluminador com luz ultra violeta e fotografado com uma câmera Kodak DC 120 1 (Zoom Digital Picture Transfer Application, versão 3.5.2.).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Teste colimétrico- Método de fermentação de tubos múltiplos**

As amostras de água do Arroio foram coletadas em quatro períodos distintos do ano e em cada coleta destas, cinco pontos distintos foram coletados e submetidos à análise. No teste de colimetria foi observado um aumento do número de coliformes totais e coliformes termotolerantes, à medida que os pontos se distanciavam da nascente do Arroio (Tabela 02). Este resultado caracteriza a poluição do local devido ao despejo de esgoto doméstico e decomposição de matéria orgânica. Coliformes totais e os coliformes termotolerantes (fecais) são as bactérias indicadoras de contaminação com a presença de fezes e, portanto indicam a qualidade da água (Naime & Nascimento, 2009).

O número mais provável de coliformes totais foi variando no decorrer dos pontos de coleta estabelecido. Quanto mais próximo da foz do arroio, maiores os valores de coliformes totais (Tabela 02). Somente um ponto divergiu deste comportamento, no período da coleta 3, o índice no ponto E sofreu uma redução ( $6 \times 10^4$  NMP/100mL) quando comparado com o ponto D ( $1,6 \times 10^6$  NMP/100mL) (Tabela 02). Isto pode ter ocorrido devido ao fato que durante o período da coleta, houveram longos dias de precipitação,

aumentado muito o nível do Lago Guaíba e portanto extravasado para dentro do arroio, levando a uma diluição das águas do dilúvio (Tabela 03).

Tabela 02- Número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes por 100mL, de amostras de água dos diferentes pontos de coleta, arroio Dilúvio.

Coleta	Pontos*	Coliformes Totais	Coliformes Termotolerantes
1	A	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
	B	$1,6 \times 10^4$	$4,9 \times 10^2$
	C	$\geq 1,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^3$
	D	$\geq 1,6 \times 10^4$	$3,5 \times 10^2$
	E	$\geq 1,6 \times 10^4$	$2,8 \times 10^3$
2	A	$1,4 \times 10^3$	$1,4 \times 10^2$
	B	$\geq 1,6 \times 10^4$	$2,7 \times 10^2$
	C	$1,6 \times 10^4$	$5,1 \times 10^2$
	D	$\geq 1,6 \times 10^4$	$2,7 \times 10^2$
	E	$\geq 1,6 \times 10^4$	$5,5 \times 10^2$
3	A	$1,1 \times 10^3$	$4 \times 10^1$
	B	$5 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$
	C	$9 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$
	D	$1,6 \times 10^6$	$4,3 \times 10^4$
	E	$6 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$
4	A	$3 \times 10^3$	$9,5 \times 10^2$
	B	$9 \times 10^5$	$3 \times 10^5$
	C	$3,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$
	D	$\geq 1,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^3$
	E	$\geq 1,6 \times 10^6$	$7,8 \times 10^2$

Pontos de coleta\*: A– Parque Saint’Hilaire (nascente); B– rua Antônio de Carvalho; C– rua Guilherme Alves; D– rua Ramiro Barcelos; E– av. Borges de Medeiros (foz).

Em relação aos índices de coliformes termotolerantes, houveram algumas variações no número de bactérias no decorrer das coletas e dos pontos, como pode ser observado nas coletas 3 e 4 (Tabela 02). Na coleta 4 ocorreu uma diminuição no número de bactérias a partir do ponto B ( $3 \times 10^5$  NMP/100mL) até o ponto E ( $7,8 \times 10^2$  NMP/100mL). Uma explicação para esta variação pode ser que no período da coleta 4, ocorreram muitas variações no clima e no índice pluviométrico o que também acabou atrasando o cronograma da coleta. Na Tabela 03 é possível observar os níveis de chuva durante as coletas.

Tabela 03 – Precipitação pluviométrica no ano de 2009.

Mês	Janeiro <sup>1</sup>	Fevereiro	Março	Abril <sup>2</sup>	Maio	Junho
I.P.	169,6	95,9	139,4	27,4	103,1	55,7
Mês	Julho	Agosto	Setembro <sup>3</sup>	Outubro	Novembro	Dezembro <sup>4</sup>
I.P.	57,4	226,3	284,1	125,1	280,3	144,5

I.P.: Índice Pluviométrico (mm); <sup>1</sup> coleta 1; <sup>2</sup> coleta 2; <sup>3</sup> coleta 3; <sup>4</sup> coleta 4.

Fonte: 8º Distrito de Meteorologia – Instituto Nacional de Meteorologia (Inmet).

Era esperado um aumento no valor dos coliformes do decorrer dos pontos, pois à medida que o arroio avança sobre a cidade ele vai sofrendo com a poluição antrópica e o descaso da população. As diferenças de valores que foram observados, em algumas coletas e pontos, podem ser devido às variações do clima, pois antes de algumas coletas ocorreram chuvas intensas, em Porto Alegre e nas cabeceiras dos afluentes que deságuam no arroio dificultando dessa forma as coletas. Fato este aconteceu na coletas 1, 3 e 4,

enquanto que na coleta 2 houve um período de estiagem prolongado (Tabela 03), caracterizado pela diminuição de água na nascente onde foi possível observar somente um filete de água e ao longo do arroio nos pontos de coleta o nível de água estava muito baixo.

Oliveira et al., (2006) avaliaram a qualidade da água superficial do balneário Belém Novo no município de Porto Alegre/RS e detectaram uma contagem de coliformes muito acima do que é permitido para a balneabilidade, com altas concentrações de coliformes totais e termotolerantes, pois recebia, na época, o esgoto da zona sul da cidade sem qualquer tratamento. Naime & Nascimento (2009) avaliaram os níveis de coliformes para o arroio Pampa no município de Novo Hamburgo/RS e os resultados em alguns pontos de coleta foram semelhantes aos encontrados em esgoto doméstico. Os autores salientam que a perda da qualidade dessas águas é devido à urbanização acelerada e sem planejamento. O arroio Pampa possui 9Km de extensão, onde passa por seis bairros de Novo Hamburgo e ainda abrange os municípios de Campo Bom e Dois Irmãos.

Oliveira et al., (2006) relataram em sua pesquisa que os maiores valores para coliformes foram detectados no outono e inverno, pela interferência das temperaturas mais baixas e períodos de chuva o que não foi observado na pesquisa com o arroio Dilúvio, pois os valores mais elevados foram nas coletas 3 e 4 (Tabela 02). Vasconcellos et al., (2006) avaliaram a qualidade das águas do Rio São Lourenço em São Lourenço do Sul/RS e detectaram no período do verão os maiores valores para coliformes o que também foi evidenciado por Moura et al., (2009) nas águas do Rio Cascavel/PR, isso devido ao aumento do

índice pluviométrico que acaba aumentando o número de microrganismos, pois segundo eles com o aumento da chuva ocorre um carreamento de contaminantes das margens para o interior dos corpos d'água.

Em alguns pontos (C, D e E da coleta 1; B, D e E na coleta 2; D e E na coleta 4) de algumas coletas não foi possível determinar o número exato do NMP de coliformes totais, quando estes apresentaram o valor de  $\geq 1600$  NMP/100mL. Este fato é resultado de ter-se trabalhado com uma diluição muito alta. Pelo fato de terem acontecido pesadas precipitações, o cálculo de diluição foi subestimado e, portanto induzindo a um resultado menos acurado.

De acordo com Naime & Nascimento (2009), embora os parâmetros da qualidade da água possam variar de forma natural em um recurso hídrico, a quantidade elevada de coliformes fecais ou termotolerantes é um indicativo da contaminação antrópica que estas águas sofrem.

O arroio Dilúvio é um dos córregos mais poluídos de Porto Alegre e o mais demandado em termos de responsabilidade pública, no que diz respeito a sua despoluição (DMAE, 2009). Foi observado no presente estudo um elevado nível de poluição em muitos pontos, demonstrando que muito ainda precisa ser feito para que essas águas se tornem despoluídas ou em condições sanitárias adequadas, para que as mesmas sejam desaguadas no Lago Guaíba sem aumentar o nível de poluição deste. A água do Guaíba é captada e abastece Porto Alegre e menos investimentos seriam gastos com o tratamento da água, se cuidados forem tomados para reduzir a contaminação do arroio Dilúvio.

#### **4.2 Determinação do número de bactérias heterotróficas**

Na contagem das bactérias heterotróficas, foi observado uma pequena variação no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Como esperado essa maior variação do número de bactérias heterotróficas foi observado da nascente para o segundo ponto de coleta, a partir dali não houve grande variação do número de UFCs (Tabela 04).

A contagem de heterotróficos é muito importante para se conhecer a densidade bacteriana no local de amostragem, pois uma concentração muito elevada pode mascarar a detecção dos coliformes de acordo com a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 2006.

Os maiores valores para contagem foram observados na coleta 1 nos pontos B, C, D e E (Tabela 04), enquanto que para os coliformes totais os valores mais elevados ocorreram na coleta 3 no ponto D e na coleta 4 nos pontos D e E (Tabela 02).

A contagem de bactérias heterotróficas é muito usada como indicadora da qualidade da água, já que elas utilizam matéria orgânica com fonte de energia. No laboratório o ensaio é realizado em placas contendo meios não seletivos e ricos em nutrientes, para que possa crescer os mais variados tipos de microrganismos como bactérias de origem fecal e não fecal, da água, do solo e formadoras de biofilmes.

Tabela 04- Contagem de bactérias heterotróficas (UFC/100µL), nos diferentes pontos, no Arroio Dilúvio.

Pontos	Coletas			
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
A	$10^0$	$1,6 \times 10^1$	$3,33 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$
B	$1,2 \times 10^5$	$1,21 \times 10^5$	$0,58 \times 10^4$	$7,93 \times 10^3$
C	$1,42 \times 10^5$	$5,47 \times 10^4$	$2,65 \times 10^4$	$2,77 \times 10^4$
D	$1,00 \times 10^5$	$8,96 \times 10^4$	$8,4 \times 10^4$	$5,04 \times 10^3$
E	$6,03 \times 10^5$	$7,78 \times 10^4$	$1,98 \times 10^5$	$>3 \times 10^4$

Pontos de coleta: A– Parque Saint’Hilaire (nascente); B– rua Antônio de Carvalho; C– rua Guilherme Alves; D– rua Ramiro Barcelos; E– av. Borges de Medeiros (foz).

Portanto no estudo com o Arroio Dilúvio, foi verificada uma água de baixa qualidade, de acordo com a contagem de bactérias heterotróficas, já que a Portaria MS nº 518/2004 classifica como água potável aquela que apresenta até 500 UFC/mL (50 UFC/100µL), exceto para o ponto A em todas as coletas, no arroio, onde o valor ficou bem abaixo desses da portaria do MS.

### 4.3 Parâmetros físico-químico

Os parâmetros físico-químicos determinados das águas do arroio Dilúvio estão dispostos na Tabela 05 onde verificamos que em todas as coletas e em todos os pontos, os níveis de metais pesados analisados praticamente não variaram, apresentando valores bastante baixos entre  $<0,2$  e  $<0,003$ . Para os metais pesados, os valores baixos são justificados pelo fato de que o arroio é um sistema lótico, ou seja, a água está em movimento e talvez esse movimento não deixe ocorrer o acúmulo de metais na superfície da água ou estes se acumulam no solo devido à precipitação.

Tabela 05- Análises físico-químico das águas do Arroio Dilúvio referente às quatro coletas realizadas

	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Coleta 4	
	P. A	P. E						
DBO mg O <sub>2</sub> /L	<2	6,7	<2	4,7	8,8	35	3,8	9,8
DQO mg O <sub>2</sub> /L	14	61	7,5	9,7	15	60	15,7	43,2
Selênio mg/L	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
Cobalto mg/L	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Cádmio mg/L	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
Níquel mg/L	<0,002	<0,002	0,003	0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
Chumbo mg/L	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,01	<0,02	<0,01	<0,01
Zinco mg/L	<0,02	0,02	0,02	0,04	0,05	0,07	<0,02	<0,02
Cromo mg/L	<0,004	<0,004	<0,004	0,004	<0,004	<0,004	<0,004	<0,004
Mercúrio µg/L	<0,2	<0,02	<0,2	0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2

Pontos de coleta: P. A– Parque Saint' Hilaire (nascente); P. E– av. Borges de Medeiros (foz).

Os resultados obtidos para a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) no presente trabalho mostraram valores mais elevados na coleta 3 tanto no ponto A (8,8 mg/L) como no E (35 mg/L), quando comparado com as demais coletas. Nas coletas 1 e 2, no ponto A foi observado os menores valores de todas as amostras analisadas (<2 mg/L). Bertoldo et al., (2004) analisando um efluente do Arroio Cadena em Santa Maria/RS, observaram um aumento de 30,5% na medida tomada no verão (11,8mg/L) quando comparado com a do inverno (8,2mg/L). Os valores obtidos pelos autores no arroio Cadena no período do inverno são semelhantes aos observados no presente estudo (coleta 3, ponto A), já os valores na primavera para o Arroio Cadena (10,6mg/L) ficaram próximos aos do ponto E da coleta 4 (9,8mg/L) no Arroio Dilúvio e os valores para o verão do Cadena, ficaram acima dos do arroio Dilúvio (coleta 1, valores entre <2 e 6,7mg/L). Os valores nas amostras da coleta do inverno

detectados no Arroio Dilúvio foram menores do que as do Arroio Cadena no mesmo período e na coleta relativa ao outono no arroio Dilúvio (<2mg/L no ponto A e 4,7mg/L no ponto E). Quanto maior a DBO, mais rapidamente é consumido o oxigênio o que pode ocasionar a decomposição anaeróbica da matéria orgânica provocando uma degradação da qualidade da água. Esta decomposição gera produtos que causam maus odores e a morte de espécies aquáticas, o que foi possível observar no ponto E, principalmente na coleta 3 no estudo do arroio Dilúvio, onde a água estava com cor escura e espuma.

De acordo com Bertoldo et al., (2004) as estações do ano podem interferir na qualidade da água, devido a mudanças no clima e variações na vazão dos poluentes nos corpos de água.

Naime & Nascimento (2009), avaliaram o arroio Pampa, quanto ao parâmetro DBO e no decorrer dos pontos de amostragem, verificaram uma variação de valores permanecendo uma média de 50,3mg/L. Os autores constataram que alguns dos valores obtidos eram comparáveis com esgoto doméstico, o que é uma questão preocupante, pois sua foz localiza-se no Rio dos Sinos de onde é captada a água para abastecer aquela região. Os dados obtidos neste trabalho no Arroio Dilúvio ficaram muito abaixo dos encontrados no Arroio Pampa por Naime & Nascimento (2009). Os dois arroios sofrem com constantes poluições já que cortam suas cidades passando por bairros muito densos, mas as variações dependem da capacidade de autodepuração e de quanta matéria orgânica é dispensada em cada recurso hídrico.

A Demanda Química de Oxigênio (DQO) determina a quantidade de matéria orgânica suscetível à oxidação por meios químicos em uma amostra

líquida. No Arroio Dilúvio o menor valor para DQO foi obtido na coleta 2 nos pontos A (7,5 mg/L) e E (9,7 mg/L) e os maiores valores foram observados nas coletas 1 (61 mg/L) e 3 (60 mg/L) ambas no ponto E (Tabela 05) . No Rio Grande do Sul os limites máximos estabelecidos para DQO, de acordo com a Portaria N° 05/89 da Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente (SSMA), estão entre  $\leq 450$  a  $\leq 160$ mg/L, dependendo do volume de vazão do efluente poluidor. Dessa forma, as águas do Dilúvio estão dentro dos valores estabelecidos pela SSMA.

Quanto mais próximos estiverem os valores de DBO aos valores de DQO mais fácil será a biodegradação. Esse fato pôde ser observado na coleta 2 em ambos os pontos (A e E), onde a diferença foi de apenas 5 mg O<sub>2</sub>/L.

#### **4.4 Identificação**

Neste estudo, diferentes meios de cultura foram utilizados para o isolamento da população microbiana. Após o isolamento e coloração de Gram para a verificação da pureza e a morfologia das colônias, foram selecionados somente os microrganismos Gram-negativos para a identificação através de provas bioquímicas. Foram isoladas 87 bactérias Gram-negativas dos diferentes meios de cultura, e destes 66 foram identificadas através de provas bioquímicas (Holt et al., 1984). Os 66 isolados (84,61%) do total foram identificados como pertencentes a diferentes gêneros da família Enterobacteriaceae. A espécie predominante foi a *Escherichia coli* (23-26,43%), seguida pela *Klebsiella pneumoniae* (6- 6,89%). Na Tabela 06 é possível observar as diferentes espécies identificadas.

O gênero *Escherichia* foi o mais abundante e encontra-se distribuído em todas as coletas, representado por três diferentes espécies. Na coleta 3, somente foi observado *E. coli* e a espécie *E. blattae* somente na coleta 2, como pode ser observado na Figura 02. Oliveira et al., (2006) verificaram a prevalência do gênero *Escherichia*, seguido pelo gênero *Enterobacter* e *Hafnia* quando avaliaram a diversidade das águas do balneário de Belém Novo. Os autores ainda observaram um aumento no número dos gêneros *Escherichia* e *Enterobacter* durante os períodos chuvosos, como outono e inverno. No presente estudo, foi observado um aumento de *Escherichia* nas coletas 4 (primavera) e 2 (outono) e para o gênero *Enterobacter* foi mais evidente nas coletas 1 (verão) e 3 (inverno).

Tabela 06- Número de espécies e distribuição dos gêneros das bactérias Gram-negativas identificados nas águas do Arroio Dilúvio, ao longo das 4 coletas realizadas no período de janeiro a dezembro de 2009.

Gêneros	Espécies	Coletas				Total
		1	2	3	4	
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	4	7	6	7	23
	<i>E. blattae</i>	-	1	-	-	1
	<i>E. adercaboxilata</i>	1	-	-	4	5
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	2	3	1	-	6
	<i>K. oxytoca</i>	-	1	-	-	1
<i>Citrobacter</i>	<i>C. diversus</i>	-	-	5	-	5
	<i>C. freundii</i>	1	-	-	-	1
	<i>C. amalomaticus</i>	-	1	-	-	1
<i>Shigella</i>	<i>S. sonnei</i>	1	2	1	-	4
	<i>S. desiynteriae</i>	1	-	-	-	1
<i>Enterobacter</i>	<i>Ent. intermedium</i>	3	-	-	-	3
	<i>Ent. agglomerans</i>	1	-	2	-	3
	<i>Ent. aerogenes</i>	-	1	-	-	1
	<i>Ent. gergoviae</i>	-	1	-	-	1
	<i>Ent. sakazakii</i>	-	-	1	-	1
<i>Yersinia</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	-	2	-	-	2
<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>	-	2	-	-	2
<i>Serratia</i>	<i>S. liquefaciens</i>	-	-	1	-	1
	<i>S. plymuthica</i>	-	-	1	-	1
<i>Providencia</i>	<i>P. rettgeri</i>	-	-	1	-	1
<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis</i>	-	-	1	-	1
Total de gêneros por coleta		5	6	8	1	

Coletas 1, 2, 3 e 4; (-) espécie ausente.

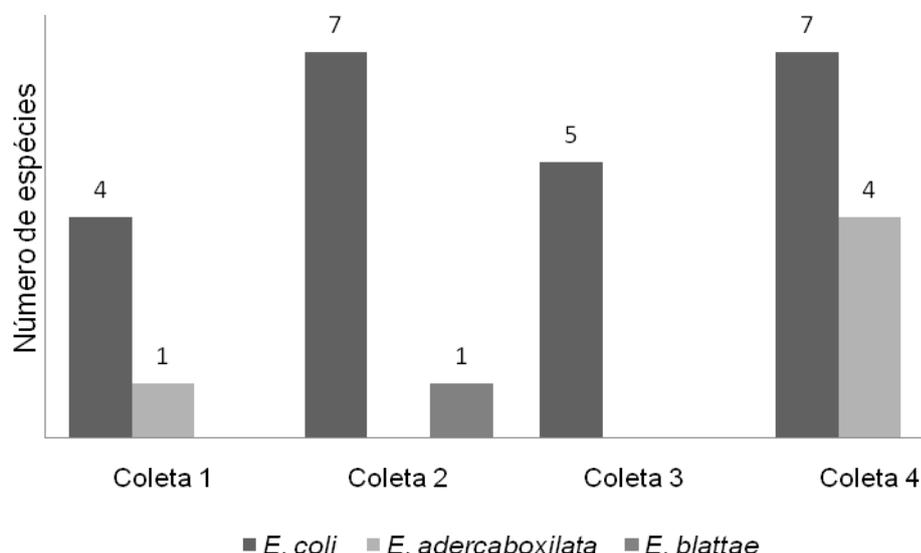


Figura 02- Distribuição das espécies do gênero *Escherichia*, no decorrer das coletas no Arroio Dilúvio ( n=29).

No decorrer do trabalho foi possível observar uma diversidade de gêneros e espécies da família Enterobacteriaceae distribuídos em todas as coletas. Na coleta 3, um maior número de gêneros foi encontrado, seguido da coleta 2. Na coleta 4, houve um predomínio do gênero *Escherichia*, como observado na Tabela 06. De acordo com Vilanova et al., (2002) é normal e comum encontrarmos muitas espécies bacterianas com vários exemplares em água residual rural ou urbana.

Diariamente são liberados no arroio Dilúvio 600Kg de resíduo provenientes de diversas fontes (Departamento de Esgoto Pluvial- DEP). A presença de bactérias da família das Enterobacteriaceae condiz com o fato que o arroio Dilúvio recebe uma descarga grande de esgoto doméstico *in natura*.

É importante identificarmos as espécies microbianas presentes nesse ambiente, pois a determinação dessas produz informações valiosas a respeito das fontes poluidoras das águas superficiais (Vilanova et al., 2002).

A população microbiana no meio ambiente está exposta a condições de sobrevivência estressantes, isto deve determinar a prevalência de algumas espécies mais adaptadas naquelas condições ambientais, como é o caso da *E. coli*. Portanto, no presente estudo, as características das águas podem inevitavelmente ter influenciado na sobrevivência da população de *E. coli* nesse ambiente, visto que houve uma prevalência desta bactéria. Esta espécie faz parte do grupo dos coliformes, e tem sido extensivamente utilizado como um indicador da qualidade da água. Entre os coliformes, a *E. coli* é a bactéria mais utilizada para estimar o grau de poluição fecal (Yáñez et al., 2006), já que ela é um dos microrganismos tido como habitante natural da microbiota do trato intestinal de humanos e da maioria dos animais de sangue quente, sendo portanto, normalmente encontrado nas fezes destes animais. A presença da *E.coli* na água ou alimentos é indicativa de contaminação com fezes humanas ou mais raramente de outros animais, e o Arroio Dilúvio recebe esses dejetos.

#### **4.5 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos**

As bactérias identificadas foram submetidas à análise do perfil de resistência aos antimicrobianos. Foram utilizados 14 antimicrobianos, divididos em dez classes diferentes. Os resultados mostraram que para todas as classes sempre foi detectado pelo menos um isolado resistente. Os antimicrobianos para os quais os isolados apresentaram maior suscetibilidade foram o

imipenem com um (1,14%) isolado resistente, ciprofloxacina e norfloxacina três (3,44%) isolados resistentes para cada um e a cefalotina apresentou menor eficiência com 53 (60,91%) isolados resistentes (Tabela 07).

No presente estudo observou-se um elevado número de isolados resistentes, 71,26% (62/87), a pelo menos dois antimicrobianos, o que caracteriza um perfil de multirresistência. Foi observada uma maior prevalência de isolados multirresistentes na coleta 4, com 21/22 (95,45%) dos isolados com este perfil, seguido pelas coletas 1 com 12/18 (66,66%) e 3 com 16/24 (66,66%) e na coleta 2 com 13/22 (59,09%). Seis (6,89%) isolados foram resistentes a apenas um antimicrobiano.

Dentro dos gêneros identificados, os isolados que se mostraram resistentes aos antimicrobianos houve uma prevalência do gênero *Escherichia* (30,64%), seguido por *Enterobacter* (12,9%), *Citrobacter* (9,67%), *Klebsiella* (6,45%), *Shigella* (4,83%), *Hafnia* (1,61%), *Proteus* (1,61%), *Providência* (1,61%) e *Serratia* (1,61%), havendo, portanto uma grande diversidade de bactérias resistentes nas águas do arroio (Figura 03).

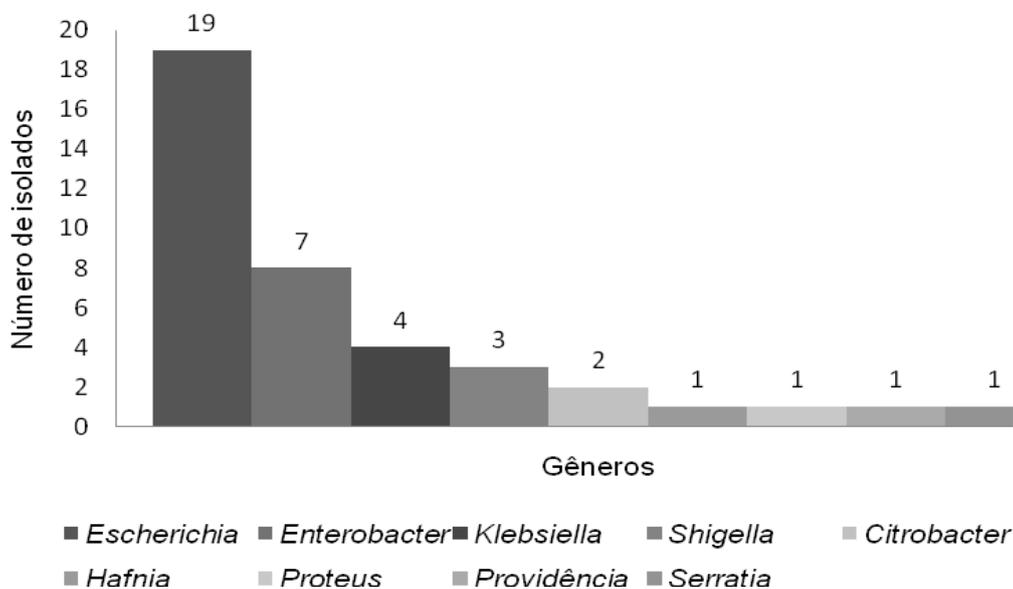


Figura 03- Número de isolados resistentes para cada gênero identificado no decorrer do estudo dos pontos e das coletas no Arroio Dilúvio. Com 19 isolados *Escherichia*, 7- *Enterobacter*, 4- *Klebsiella*, 3- *Shighella*, 2- *Citrobacter* e 1 – *Hafnia*, *Proteus*, *Providência* e *Serratia*.

Na coleta 1 (verão), houve uma maior prevalência de isolados resistentes a amoxicilina/ ácido clavulânico e ampicilina, ambos com 83,33% dos isolados, e cefoxitina em 66,66% dos isolados (Tabela 07), sendo que os gêneros resistentes predominantes nesta coleta foram *Escherichia* e *Enterobacter*. Na coleta 1, todos os isolados foram sensíveis a estreptomicina, gentamicina e imipenem. Schneider et al., (2009) observaram que todos os isolados apresentaram sensibilidade a gentamicina ao avaliarem amostras de águas superficiais.

Tabela 07- Perfil de resistência, relacionando os antimicrobianos com as coletas realizadas no Arroio Dilúvio no período de janeiro a dezembro de 2009.

Classe	Antibiótico	Número de isolados resistentes				
		1*	2*	3*	4*	
β- lactâmicos	Ampicilina	11	6	9	15	
	Penicilinas	Amoxicilina+Ác. clavulânico	11	9	10	19
		Cefalotina	8	12	14	19
	Cefalosporinas	Cefoxitina	9	6	6	15
		Ceftriaxona	4	0	1	2
	Carbapenem	Imipenem	0	0	1	0
Tetraciclina	Tetraciclina	3	4	4	14	
Aminoglicosídeos	Gentamicina	0	0	2	12	
	Estreptomicina	0	2	1	9	
Sulfonamida	Sulfametoxazol+ Trimetoprim	6	4	3	14	
Quinolona	Ciprofloxacina	2	0	1	0	
Anfenicol	Cloranfenicol	3	4	1	15	
Fluoroquinolona	Norfloxacina	2	0	1	0	
Nitrofurano	Nitrofurantoína	7	7	7	1	

\* coleta 1, coleta 2, coleta 3, coleta 4.

Na coleta 2 (outono), cefalotina e amoxicilina/ ác. clavulânico (ambos com 45,45%) e nitrofurantoína (27,27%) foram os antimicrobianos aos quais os isolados apresentaram o maior perfil de resistência. A gentamicina, ceftriaxona, norfloxacina, ciprofloxacina e o imipenem foram os antimicrobianos para os quais os isolados apresentaram maior sensibilidade (Tabela 07). O gênero resistente que predominou nesta coleta foi a *Klebsiella*, seguido por *Escherichia* e *Shigella*. Portanto, foi observado além de coliformes fecais, bactérias de origem hospitalar com perfil de resistência, o que havia sido

abordado por Kümerer et al., (2004). Dentre todas as coletas, na 2 obteve-se o menor índice de isolados resistentes quando comparada com as coletas 1, 3 e 4. Uma hipótese para essa diferença seria que no período da coleta, abril de 2009, o volume de chuvas foi muito reduzido e, portanto, haveria uma redução nos níveis de resistência. Alguns autores relacionam um alto índice de resistência com períodos de chuva (Peak et al. 2007), uma vez que esta propicia o arraste de contaminantes da margem dos recursos hídricos para o seu interior, como comentado anteriormente.

Na coleta 3 (inverno), os antimicrobianos com o maior número dos isolados resistentes foram a cefalotina (58,33%), a ampicilina (41,66%) e a amoxicilina/ ácido clavulânico (37,5%). *Citrobacter* foi o gênero que prevaleceu nesta coleta, apresentando um perfil de multirresistência (de 2 a 6 classes). Este gênero também é encontrado na microbiota intestinal natural de humanos e animais e pode estar relacionado a infecções oportunistas, podendo também ser isolados da água, solo, esgoto e alimentos (Holt et al., 1994).

Na coleta 4 (primavera), o maior número de isolados resistentes foi observado para amoxicilina/ ácido clavulânico e cefalotina (86,36%), ampicilina, cefoxitina e cloranfenicol (68,18%). Nesta coleta, também foram detectados o maior número de isolados resistentes (95,45%) de todo o estudo. Diferente dos dados encontrados neste trabalho, Canal et al., (2009), que analisaram as águas da Lagoa dos Patos, detectaram a maior concentração de isolados resistentes no verão. Dos isolados resistentes que foram isolados na coleta 4, nas águas do arroio Dilúvio, todos são do gênero *Escherichia*, compreendendo as espécies *E. coli* e *E. adecarboxilata*. Ainda nesta coleta foi observado o

maior índice de resistência a tetraciclina e a sulfametoxazol/ trimetoprim, ambos com 63,63% dos isolados resistentes.

Nas águas do Arroio Dilúvio, 29,06% dos isolados apresentaram resistência a tetraciclina e desses, 56% foram detectados na 4ª coleta.

A tetraciclina é um composto que inibe a síntese de proteínas e foi por muito tempo utilizado como promotor de crescimento na ração animal, no entanto hoje esse tipo de uso é proibido em diversos países pela Organização Mundial da Saúde. Segundo Peak et al. (2007) existe uma relação quanto ao uso desse antimicrobiano e a frequência dos genes de resistência em água superficial, devido que a sua liberação ou seu destino final ser no ambiente. Canal (2009) relata que, essa resistência pode ser encontrada junto à resistência a outros antimicrobianos, devido à aquisição de determinantes genéticos.

A ampicilina em todas as coletas apresentou uma elevada frequência de isolados resistentes (52%). Resultado similar foi encontrado por Schneider et al., (2009) em um estudo realizado com águas subterrâneas e superficial, onde 36% das amostras eram resistentes a este antimicrobiano. O alto índice de resistência a ampicilina, também foi observado por Batista et al., (2007) em pesquisa realizada com enterobactérias de efluentes urbanos.

A resistência a múltiplos antibióticos de diferentes classes como ampicilina, cefalosporina, aminoglicosídeo e fluoroquinolona tem aumentado em bactérias Gram-negativas de origem hospitalar como *K. pneumoniae* e *Enterobacter spp* (Rivera-Tapia, 2003). No estudo com as águas do arroio

Dilúvio foi observado com grande número de espécies de bactérias Gram-negativas resistentes.

No estudo com as águas do arroio Dilúvio foi possível observar uma elevada prevalência de resistência as penicilinas e cefalosporinas que pertencem a uma grande classe denominada de  $\beta$ -lactâmicos, que atuam interagindo com as Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBP- Penicillin binding proteins) impedindo a formação da parede celular. A resistência pode estar relacionada com o fato desses antibióticos serem os mais utilizados na medicina e por estarem disponíveis a mais tempo no mercado, tendo o seu uso banalizado pela população, o que acaba por selecionar fatores disseminadores de resistência, uma vez que os antibióticos são eliminados no ambiente.

O aumento e o uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária, aquicultura e na agricultura pode levar à contaminação da água e do solo, alterando os ecossistemas microbianos e disseminando organismos resistentes aos antimicrobianos no meio ambiente (Henriques et al., 2006). Isso demonstra a importância de estudos não só na área clínica, mas também em ambientes naturais, onde pode estar escondido uma diversidade molecular ligada à resistência. Além disso, alguns fatores de resistência (plasmídeos ou transposons) podem estar no ambiente sem a presença do antimicrobiano propriamente dito. Mesmo que os efluentes hospitalares ou domésticos sejam diluídos pelos esgotos municipais e águas pluviais, neste ambiente ainda haverá uma concentração de substâncias antibióticas, pois essas águas podem conter desinfetantes domésticos e outros

produtos farmacêuticos e veterinários, onde a maioria dos componentes são persistentes no ambiente (Kümerer, 2003).

No presente trabalho, o perfil de resistência ao maior número de antimicrobianos foi observado na 4<sup>a</sup> coleta, onde 95,45% dos isolados resistentes a dois ou mais antimicrobianos. A porcentagem mais elevada pode estar relacionada às diferentes estações do ano, onde o período chuvoso pode causar o aumento da incidência de resistência a antimicrobianos (Peak et al., 2007). Devido à variedade de espécies identificadas, constatou-se a coexistência de um elevado número de microrganismos nesse ambiente o que poderia selecionar as linhagens mais resistentes e propiciar a troca de determinantes de resistência aos antimicrobianos entre o grupo das enterobactérias.

Quando os antimicrobianos são liberados no ambiente, eles podem acabar interferindo nas populações que vivem ali e, se em altas concentrações, podem causar grandes impactos (Kümmerer, 2009a, 2003), podendo atingir os seres humanos que utilizam direta ou indiretamente esse ambiente. No caso o arroio que deságua na principal fonte de abastecimento de água da cidade de Porto Alegre, esses fatos deveriam ser levados em consideração pelos órgãos de saúde e saneamento do município.

#### **4.6 Detecção de genes de resistência aos antimicrobianos da classe dos $\beta$ -lactâmicos:**

A partir dos resultados de susceptibilidade obtidos com os antibiogramas foram selecionadas as bactérias que apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos, com o intuito de verificar a presença ou não dos genes de

resistência a  $\beta$ -lactâmicos, e assim evidenciar a incidência dos genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>.

A resistência aos antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, mais especificamente as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), vem sendo estudada há muitos anos e em diferentes ambientes, incluindo os aquáticos (Hassani et al., 1992; Henriques et al., 2006; Schneider et al., 2009; Vasconcelos et al., 2010). Várias ESBLs já foram descritas na literatura, muitas delas foram encontradas em bactérias Gram-negativas (Sundsford et al., 2004).

No presente estudo foi detectado, a presença do gene *bla*<sub>TEM</sub> em 33,87% (21/62) dos isolados (Figura 04). Este índice foi maior do que a encontrado por Dropa et al., (2009) onde 17,30% das amostras clínicas de um hospital de São Paulo apresentaram o *bla*<sub>TEM</sub>. Cabe salientar que os valores obtidos no presente estudo, analisando amostras ambientais, é praticamente o dobro daquele obtido no estudo de amostras clínicas por Dropa et al., (2009).

Um estudo realizado por Jones et al., (2009) com 272 amostras clínicas detectaram que 88% das amostras analisadas foram produtoras de ESBL, mas somente seis amostras eram ESBL do tipo TEM, nesse caso a grande maioria apresentava o tipo CTX-M.

Para o gene *bla*<sub>SHV</sub>, o índice de presença de microrganismos positivos foi de 9,67% (6/62) (Figura 05). Este índice é baixo quando comparado com o índice encontrado para o gene *bla*<sub>TEM</sub> 37% (21/62). Dropa et al., (2009) detectou a presença do gene *bla*<sub>SHV</sub> em 63% dos isolados de amostras clínicas em São Paulo em seis espécies diferentes.

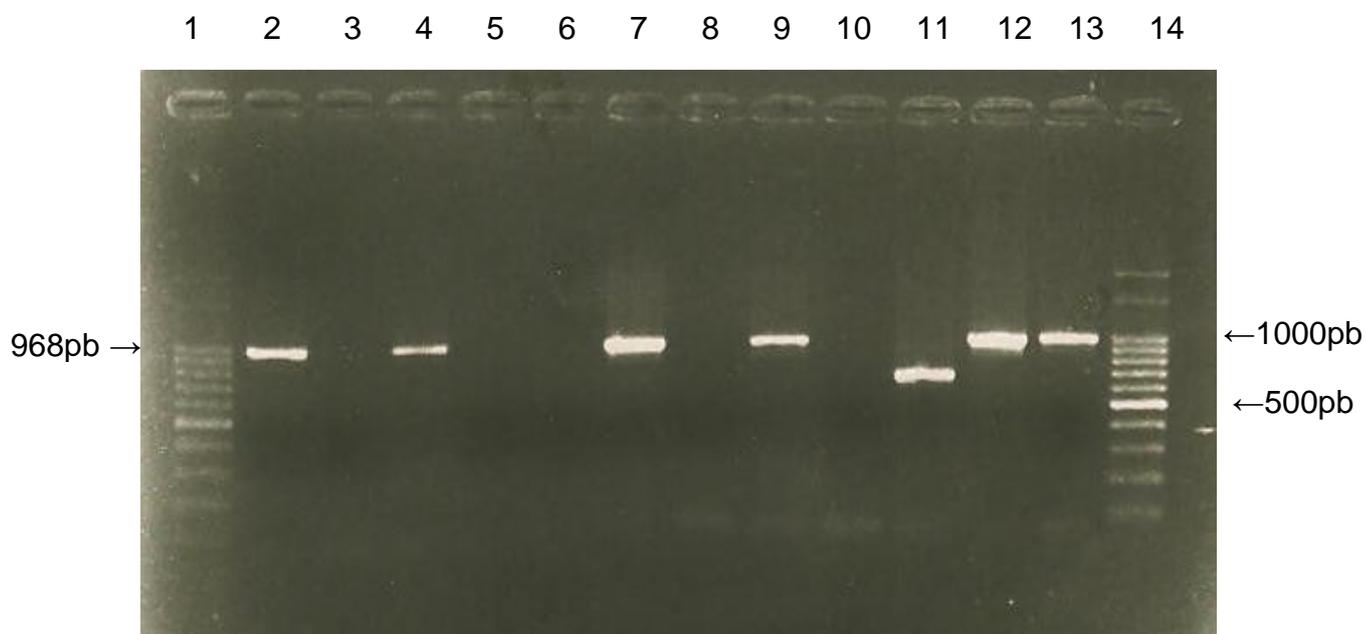


Figura 04- Fotografia de um gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para os genes *bla*<sub>TEM</sub>. Canaleta 1 e 14- Marcador Ladder de 100pb; 2- Controle positivo (*Klebsiella pneumoniae*); 3- Controle negativo; canaletas 4, 7, 9, 11, 12, 13- amostras do arroio positivas para o genes *bla*<sub>TEM</sub>.

Nogueira et al., (2006) avaliaram amostras de pacientes hospitalizados em Curitiba e detectaram um índice muito elevado de Enterobacteriaceae produtoras de ESBL, 78% de todas as amostras foram positivas. Santos et al., (2008) encontraram 25 e 67,7% de amostras positivas para ESBL em dois hospitais de Goiânia. Esses autores relataram ainda que a incidência de microrganismos produtores de ESBL está aumentando em hospitais de todo o mundo, mas que no Brasil este índice é mais alto que em outros países. Além disso, esses microrganismos estão emergindo para a comunidade. No presente

estudo, 43,54% (27/62) de isolados foram positivos para os dois genes analisados nas águas do arroio. Dentre os positivos, dois isolados apresentaram ambos *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> (3,22%). Oliveira, et al., (2009) relataram, em um estudo realizado com amostras de pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria/ RS, que 39 (43,3%) amostras apresentavam os dois genes TEM e SHV. Já o gene TEM foi identificado em 82,2% (n= 74) e o SHV em 67,8% (n= 61) das amostras selecionadas. De acordo com Luzzaro et al., (2006), a presença de ambos os genes TEM e SHV são as associações mais comumente encontradas em bactérias.

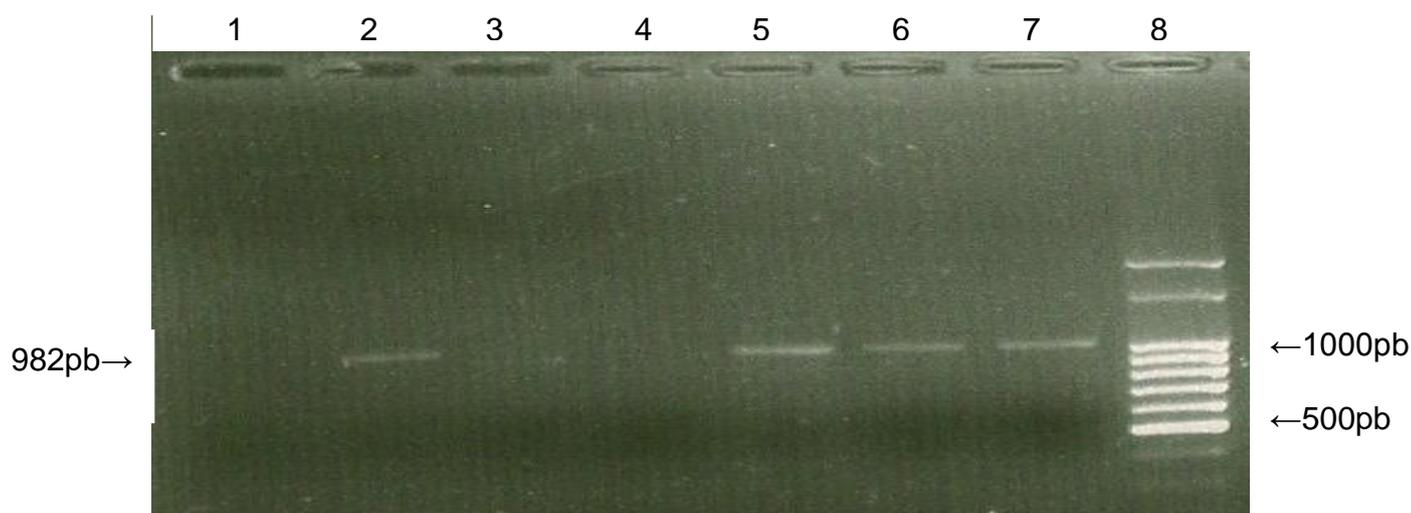


Figura 05- Fotografia de um gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para os genes *bla*<sub>SHV</sub>. Canaletas 1- Controle negativo; 2- Controle positivo (*Klebsiella pneumoniae*); 3 e 4- isolado negativo para o gene *bla*<sub>SHV</sub>; 5, 6 e 7- isolados do arroio positivos para o gene *bla*<sub>SHV</sub>; 8- Marcador Ladder de 100pb.

A maioria dos estudos que buscam identificar microrganismos produtores de ESBL relatam que na família Enterobacteriaceae a espécie predominante é a *K. pneumoniae*, seguida pela *E. coli* (Braford, 2001; Gniadkowski, 2001; Freitas et al., 2003; Sundsfjord et al., 2004; Rawat & Nair, 2010). Porém, no presente estudo foi detectado uma prevalência para a presença do gene *bla*<sub>TEM</sub> em *E. coli* (33,33%) e *C. diversus* (9,52%) e ainda *Ent. intermedium*, *P. mirabilis* e *E. adecarboxilata* (com 4,76% cada) (Tabela 08). Já para o gene *bla*<sub>SHV</sub>, não foi possível detectar uma prevalência e sim uma diversidade, pois cada um dos seis isolados positivos foi de uma espécie diferente (Tabela 08).

A enzima TEM foi a primeira ESBL descrita na família das Enterobacteriaceae (Gniadkowski, 2001), e os genes *bla*, através da transferência horizontal de genes, passaram a ser os potenciais disseminadores de resistências entre essas bactérias (Bush & Jacoby, 2010).

Na América do Sul, relatos de ESBLs vêm sendo publicados, sobretudo em *K. pneumoniae*, sendo que no Brasil, Colômbia e Venezuela, 30 a 60% das infecções nosocomiais são causadas por essa bactéria (Paterson & Bonomo, 2005). Os resultados obtidos com as amostras do arroio Dilúvio mostraram uma elevada dos genes na espécie *E. coli*, como foi observado na Tabela 08. Uma maior prevalência do gene *bla*<sub>TEM</sub> foi observada nos isolados do presente trabalho. Para Braford (2001), mais de 90% da resistência a ampicilina em *E. coli* é pela produção de enzimas derivadas da enzima TEM. Este alto índice foi confirmado na pesquisa no arroio, pois 85,71% das *E. coli* que apresentaram o gene *bla*<sub>TEM</sub> foram resistentes a ampicilina. Minarini et al., (2007) também

detectaram uma elevada frequência do gene *bla*<sub>TEM</sub>, estudo realizado com amostras de pacientes com infecções no trato urinário em Juiz de Fora/ MG.

Tabela 08- Número de isolados identificados como positivos para a presença dos genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>, em bactérias isoladas das águas do Arroio Dilúvio.

Espécie	Gene <i>bla</i> <sub>TEM</sub> (%)	Gene <i>bla</i> <sub>SHV</sub> %	espécie %
<i>Escherichia coli</i>	7 (33,33%)	1 (1,61%)	8/23 (34%)
<i>Citrobacter diversus</i> *	2 (9,52%)	1 (1,61%)	2/5 (40%)
<i>Enterobacter intermedium</i>	1 (4,76%)	-	1/3 (33,33%)
<i>Escherichia adecarboxilata</i>	1 (4,76%)	-	1/5 (20%)
<i>Proteus mirabilis</i> *	1 (4,76%)	1 (1,61%)	1/1 (100%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	1 (1,61%)	1/6 (16,66%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	1 (1,61%)	1/1 (100%)
<i>Hafnia alvei</i>	-	1 (1,61%)	1/2 (50%)
Isolados não identificados	8 (12,90%)	-	8/18 (44,44%)

(-) ausente para o gene; (\*) apresenta os dois genes.

A presença do gene *bla*<sub>SHV</sub> é mais comum em *K. pneumoniae* de acordo com Braford (2001), mas também encontrado em outras espécies da família

das Enterobacteriaceae (Dropa, 2009), como encontrado com o estudo nas águas do arroio dilúvio.

É tão grande a variedade de enzimas ESBLs atuando em diferentes substratos que explica o fato de que elas constituem o principal mecanismo de resistência em bacterias Gram negativas.

## 5. CONCLUSÕES

As bactérias do gênero *Escherichia* predominaram nas amostras de água do arroio Dilúvio.

Também foram observados os efeitos dos antimicrobianos mais utilizados na medicina clínica nas bactérias isoladas, onde foi detectado o maior nível de resistência a cefalotina, amoxicilina/ ácido clavulânico e a ampicilina e o antimicrobiano mais eficiente foi o norfloxacin.

A técnica da PCR permitiu a identificação dos genes de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos em amostras de água do arroio, mostrando assim, que genes de resistência estão se disseminando cada vez mais e alcançando o meio ambiente.

A presença dos dois genes de resistência *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>, foi detectada em todas as coletas, sendo o primeiro o mais prevalente nos isolados da família Enterobacteriaceae e também foi detectado dois isolados que apresentavam os dois genes de resistência das águas do arroio.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, W.; 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. **Apple Environment Microbiology** 71, 4461–4468pg, 2005.

ALBUQUERQUE, S. A. **Cartilha ecológica**: educação ambiental. Curitiba: Educarte, 2001.

ANTUNES, G. S. **Manual de diagnóstico bacteriológico**. 2ed. Porto Alegre: UFRGS. 278, 1995.

AVERY, L.M., WILLIAWS, A.P., KILLHAM, K., JONES, D.L. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in waters from lakes, rivers, puddles and animal-drinking troughs. **Science of the Total Environment**, 389. 378 – 38pg, 2008.

BARBOSA, S. P. P.; CAMINHA, M. C. C.; PAZ, C. F. Identificação da microbiota bacteriana autóctone de efluentes petroquímicos no município de Fortaleza. II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica João Pessoa - PB – 2007.

BATISTA, M. V. A.; SANTOS, M. I. S.; MENEZES, L. C. S.; CARNEIRO, M. R. P.; CÂNDIDO, A. L. Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* sp. Multiresistentes isoladas de efluentes urbanos em Aracaju, Sergipe. **Biologia Geral e Experimental**, São Cristóvão, SE 7(1):15-18, 2007.

BAUERNFEIND, A., I.; STEMLINGER, R.; JUNGWIRTH, S.; ERNST, and J. M. Casellas. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 40:509–513, 1996.

BELL, J. M.; TURNIDGE, J. D.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–99). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 42:193–198, 2002.

BERTOLDO, F.; RIGHES, A. A.; MORTARI, S. R. Qualidade da água em um afluente do Arroio Cadena em Santa Maria – RS. **Disc. Scientia**. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas, S. Maria, v. 5 , n. 1, p. 51-65, 2004.

BONNET, R.; SAMPAIO, J. L.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 44:1936–1942, 2000. a

BONNET, R., J.; SAMPAIO, L.; CHANAL, C.; SIROT, D.; DE CHAMPS, C.; VIALARD, J. L.; LABIA, R.; SIROT, J. A novel class extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 44:3061–3068, 2000. b

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 48:1–14, 2004.

BRAFORD, Patrícia. Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**. p. 933–95, Oct. 2001.

BRASIL. Portaria MS n.º 518/2004. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde em [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1549](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1549)

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Manual prático de análise de água**. 2ª Ed. rev. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 146pg, 2006.

BUSH, K. & JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p. 969–976, Mar. 2010.

CANAL, N. Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isolada de amostras de água da Lagoa dos Patos, RS. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente/ UFRGS. Porto Alegre, 2010.

CAO, V.; LAMBERT, T.; NHU, D. Q.; LOAN, H. K.; HOANG, N. K.; ARLET, G.; COURVALIN, P. Distribution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p. 3739–3743, Dec. 2002.

CHROMA, M. & KOLAR, M. Genetic methods for detection of antibiotic resistance: Focus on extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic**. 154(4):289–296, Decd, 2010.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. M100-19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2009.

COIADO, E. M. Gestão ambiental de sistemas hídricos. In: 21° Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. pg. 2-9, 1999.

CORRÊA, T. A. F.; RALL, V. L. M.; SILVA, M. G.; LOPES, C. A. M.; Microbiological evaluation of hydric resources provided by the Tietê river, district of Vitoriana, Botucatu, SP, Brazil. **Arquivos do Instituto Biol.**, São Paulo, v.73, n.3, p.283-286, jul./set., 2006.

DEVOS, R. V.; SOARES, A. P. M.; ROCHA, A. L. C. Habitantes do Arroio: memória das águas urbanas. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, n. 22, p. 51-64. Editora UFPR, jul/dez. 2010.

DROPA, M.; BALSALOBRE, L. C.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; MURAKAMI, T.; CASSETTARI, V. C.; FRANCO, F.; GUIDA, S. M.; BALABAKIS, A. J.; PASSADORE, L. E.; SANTOS, S. R.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Extended-Spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical**. 51 (4):203-209, July-August, 2009.

DROPA, M. Caracterização genotípica de cepas da família Enterobacteriaceae produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública/ USP, 2006.

ETCHEVERRIA, L.; FRECERO, L. S.; PARRA, M. Avaliação da qualidade da água do rio Uruguai na localidade de São Marcos- Cantão a partir de análises físico-química e biológicas. **Revista Hífen**, Uruguiana, v. 28, n. 53, p. 111-114, jan/jun. 2004.

FREITAS, A. L. P.; MACHADO, D. P.; SOARES, F. S. C.; BARTH, A. L. Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella spp* and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching hospital: Detection, prevalence and molecular typing. **Brazilian Journal of Microbiology** 92, 34: 344-248, 2003.

GNIADKOWSKI, M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. **Clinical Microbiology and Infection**. Volume 7 Number 11, November 2001.

HANSON, N. D.; SMITH MOLAND, E.; PITOUT. J. D. Enzymatic characterization of TEM-63, a TEM-type extended spectrum beta-lactamase expressed in three different genera of *Enterobacteriaceae* from South Africa. **Diagnostic Microbiology of Infectious Disease**. 40:199–201, 2001.

HASSANI, L.; IMZILN, B.; GAUTHIER, M. J. 1992. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from wastewater before and after treatment in stabilization ponds in the arid region of Marakech, Morocco. **Letters in Applied Microbiology**, 15: 228-231.

HENRIQUES, I.; MOURA, A.; ALVES, A.; SAAVEDRA, M. J.; CORREIA, A. Analysing diversity among  $\beta$ -lactamase encoding genes in aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, 56: 418–429, 2006.

HO, P. L.; TSANG, D. N. C.; QUE, T. L.; HO, M.; YUEN, K. Y. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum  $\beta$ - lactamases and their prevalence among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Hong Kong. **APMIS**, 108:237-240, 2000.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; MURRAY, R. G. E.; BRENNER, D. J.; BRYANT, M. P.; MOULDER, J. W.; PFENNIG, N.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T. **Bergey's manual of Sistematic Bacteriology**. Vol. 1. Williams & Wilkins, 1984.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). 8° Distrito de Meteorologia em <http://www.inmet.gov.br>

JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A.; O'BRIEN, T. F.; PINTO, M. E.; JIANG. H. Broad-spectrum, transmissible beta-lactamases. **New England Journal of Medicine**, 319: 723–724, 1988.

JACOBY, G. A.  $\beta$ -Lactamase Nomenclature. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. p. 1123–1129, Apr. 2006.

JONES, C. H.; TUCKMAN, M.; KEENEY, D.; RUZIN, A.; BRAFORD, P. A. Characterization and sequence analysis o extended -spectrum-  $\beta$ -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. 465-475pg, Feb, 2009.

KIM, J.; KWON, Y.; PAI, H.; KIM, J. W.; CHO. D. T. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum-lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**. 36:1446–1449, 1998.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico Microbiológico** – Texto e Atlas colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature reviews: Microbiology**. Vol 8. 423-435, June, 2010.

KÜMMERER, Klaus. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 52: 5–7, 2003.

KÜMMERER, Klaus. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 54: 311–320, 2004.

KÜMMERER, Klaus. Antibiotics in the aquatic environment- A review- Part I. **Chemosphere** 75: 417–434, 2009. a

KÜMMERER, Klaus. Antibiotics in the aquatic environment- A review- Part II. **Chemosphere** 75: 435-441, 2009. b

KÜMMERER, K. & HENNINGER, A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. **Clinical Microbiology and Infection**, 2003.

Laudo N°14/2009. A melhoria da qualidade da água do arroyo Dilúvio (sub-bacia D-11, Porto Alegre/RS e sua relação com as ligações de esgoto no sistema separador absoluto do DMAE. **DMAE**, Porto Alegre, 2009.

LAUTENBACH, E.; PATEL, J. B.; BILKER, W. B.; EDELSTEIN, P. H.; FISHMAN, N. O. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. **Clinical Infectious Disease**, 32:1162–1171, 2001.

LEVY, S. B. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 49: 25-30, 2002.

LI, X. Z.; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE, L.  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology**, 121: 197-214, 2007.

LUZZARO, F.; MEZZATESTA, M.; MUGNAIOLO, C.; PERILLI, M.; STEFANI, S.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G. M.; TONIOLO, A. Trends in production of extended- spectrum  $\beta$ -lactamase among enterobacteria of medical interest: Report of the second Italian nationwide survey. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.5, 1659-1664, 2006.

MARTY, L. & JARLIER. V. Surveillance of multiresistant bacteria: justification, role of the laboratory, indicators, and recent French data. **Pathology Biology** (Paris) 46:217–226, 1998.

Menegat, Rualdo (coordenador). **Atlas ambiental de Porto Alegre**. 3 ed. rev. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS. 256, 2006 .

Mezrioui, N.; Baleux, B. Resistance patterns of *E. coli* strains isolated from domestic sewage before and after treatment in both aerobic lagoon and activated sludge. **Water Research**, 28 (11): 2399-2406, 1994.

MINARINI, L. A. R.; GALES, A. C.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. C. Prevalence of Community-Occurring Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Current Microbiology**, Vol. 54, 335–341, 2007.

MOLAND, E. S.; SANDERS, C. C.; THOMSON, K. S. Can. Results obtained with commercially available MicroScan microdilution panels serve as an indicator of beta-lactamase production among *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with hidden resistance to expanded-spectrum cephalosporins and aztreonam. **Journal Clinical Microbiology**, 36: 2575–2579, 1998.

MORAIS, M. R.; CEBALLOS, B. S. O.; CATÃO, R. R. M.; FEIJÓ, V. S. G.; PASCOAL, S. A. Comportamento de *Salmonella spp*, Coliformes e Estreptococos fecais num rio poluído com esgotos domésticos (Campina Grande, Paraíba, Brasil). 21º Congresso de Engenharia Sanitária e Ambiental, **ABES- Trabalhos Técnicos**, 1-10, 2001.

MOREIRA, L. G. R. A influência da precipitação no transporte de sólidos em cursos d'água urbanos: o caso do arroio Dilúvio, Porto Alegre (RS), Brasil. Instituto de Geociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B, G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, 465-470, 2005.

MOURA, A. C.; ASSUMPÇÃO, R. A. B.; BISCHOFF, J. Monitoramento físico-químico e microbiológico da água do Rio Cascavel durante o período de 2003 a 2006. **Arquivos do Instituto Biol.**, São Paulo, v.76, n.1, 17-22, jan./mar., 2009.

NAGULAPALLY, S. R.; AHMAD, A.; HENRY, A.; MARCHIN, G. L.; ZUREK, L.; BHANDARI, A. Occurrence of ciprofloxacin, trimethoprim–sulfamethoxazole, and vancomycin resistant bacteria in a municipal wastewater treatment plant. **Water Environment Research**, 81(1):82–90, 2009.

NAIME, R. & NASCIMENTO, C. A. Monitoramento de pH, temperatura, OD, DBO e condições microbiológicas das águas do Arroio Pampa em Novo Hamburgo- RS. **UNI Ciências**, v.13, 2009.

NASCIMENTO, C. A. & NAIME, R. Panorama do uso, distribuição e contaminação das águas superficiais no Arroio Pampa na bacia do Rio dos Sinos. **Estudos Tecnológicos** - Vol. 5, nº 1:101-120, jan/abr 2009.

NOGUEIRA, K. S.; HIGUTI, I. H.; NASCIMENTO, A. J.; TERASAWA, L. B.; OLIVEIRA, S.; MATOS, A. P.; SOUZA, H. A.; COGO, L. L.; COSTA, L. M. D. Occurrence of Extended-Spectrum Beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*

isolated from hospitalized in Curitiba, southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 10(60): 390-395, 2006.

NORONHA, L.C.; GRASSI, L.A.T.; CALLEGARO, V.L.; FILHO, O.L.B.; FISCHER, L.A. Tempo das águas. Porto Alegre, Laser Press Comunicação, 120 p, 2006.

OLIVEIRA, C. F.; DAL FORNO, N. L. F.; ALVES, I. A.; HORTA, J. A.; RIEGER, A.; ALVES, S. H. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 42(5):556-560, set-out, 2009.

OLIVEIRA, M. F.; CORÇÃO, G.; VAN DER SAND, S. T. An evaluation of transient bacterial population in a polluted bathing site in Porto Alegre – Brazil. **Biociências**, Porto Alegre, v. 14, n. 2, p. 136-143, dez. 2006.

PAI, H.; LYU, S.; LEE, J.H.; KIM, H.; KWON, Y.; KIM, J. W.; CHOE, K. W. Survey of extended-spectrum-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. **Journal Clinical Microbiology** 37:1758–1763, 1999.

PATERSON, D. L. & BONOMO, R. A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**. October. 657-686, 2005.

PATERSON, D. L.; HUJER, K. M.; HUJER, A. M.; YEISER, B.; BONOMO, M. D.; RICE, L. B.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 47:3554–3560, 2003.

PEAK, N.; KNAPP, C. W.; YANG, R. K.; HANFELT, M. M.; SMITH, M. S.; AGA, D. S.; GRAHAM, D. W. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. **Environmental Microbiology**, 9(1), 143–151, 2007.

PEREIRA, A. A grande luta pelo resgate de um arroio In: **Pesquisa Ecos Revista**, Departamento municipal de Água e Esgotos. Porto Alegre. Ano 2, n. 3, p. 20-25 ,janeiro/1995.

PRUDEN, A.; PEI, R.; STORTEBOOM, H.; CARLSON, K. H .Antibiotic Resistance Genes as Emerging Contaminants: Studies in Northern Colorado. **Environmental Science & Technology**, 40:7445-7450, 2006 .

RAWAT, D. & NAIR, D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram negative bacteria. **Journal of Global Infectious Diseases**, vol 2. 263-273, Sep-Dec 2010.

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**, 105: 1899–1908, 2008.

REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J.G. Águas doces no Brasil. Instituto de estudos avançados. Ed. Escrituras, São Paulo, 717pg, 1999.

RIO GRANDE DO SUL. Portaria N° 01/89- SSMA. Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente, 1986.

RIVERA-TAPIA, José Antonio. Antibiotic resistance, public health problem. **Anales Medicos**: Asociación Médica del American British Cowdray Hospital. 48 (1): 42-47, 2003.

SANTOS, D. F.; PIMENTA, F. C.; ALVES, R.; MONTALVÃO, E. R.; SANTOS, D. B.; FILHO, J. R. C. Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in two hospitals in Goiânia/ Brazil: detection, prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39:608-612, 2008.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning**: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHNEIDER, R. N.; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. **Biotemas**, 22 (3): 11-17, setembro de 2009.

SHIBATA, T.; SOLO GABRIELE, H. M.; FLEMING, L. E.; ELMIR, S. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. **Water Research** 38, 3119-3131, 2004.

SINTON, L. W.; FINLAY, R. K.; HANNAH, D.J. Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review. New Zealand. **Journal of Marine Freshwater Research**, 32: 323–348, 1998.

STOBBERINGH, E. E.; ARENDS, J.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A.; GOESSENS, W. H. F.; VISSER, M. R.; BUITING, A. G. M.; DEBETS-OSSENKOPP, Y. J.; KETEL, R. J. V.; OGTROP, M. L. V.; SABBE, L. J. M.; VOORN, G. P.; WINTER, H. L. J; VAN ZEIJL, J. H. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Dutch hospitals. **Infection**, 27:348–5–354, 1999.

SUNDSJORD, A.; SIMONSEN, G. S.; HALDORSEN, B. C.; HAAHEIM, H.; HJELMEVOLL, S.; LITTAUER, P.; DAHL, K. H. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. **APMIS**, 112: 815-37, 2004.

TUCCI, C. E. M.; PORTO, R. L. L.; BARROS, M. T. Drenagem Urbana. Porto Alegre. Editora da UFRGS. 1995.

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

VIEIRA, M. S.; MOURA, M. A. M.; GIL, F. G. Qualidade da água de lagos e nascentes do Parque Dr. "Fernando Costa" (Água Branca), São Paulo, SP. **Arquivo Instituto Biol.**, São Paulo, v.73, n.4, p.475-483, out./dez., 2006.

VILANOVA, X.; MANERO, A.; CERDÀ-CUÉLLAR, M.; BLANCH, A. R. The effect of a sewage treatment plant effluent on the faecal coliforms and enterococci populations of the reception river waters. **Journal of Applied Microbiology**, 92, 210–214, 2002.

VON BAUM, H.; MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **International Journal of Medical Microbiology**, 295: 503-511, 2005.

YÁÑEZ, M. A.; VALOR, C.; CATALÁN, V. A simple cost-effective method for the quantification of total coliforms and *Eschecherichia coli* in potable water. **Journal of Microbiological Methods**, 65 (3): 608-611, 2006.

## 7. APÊNDICES

SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)

50g de SDS

500 mL de água destilada

Tampão TAE 50x

242g de Tris

57,1 ml de ácido acético glacial

100ml de EDTA 0,5m pH8,0

1000ml de água destilada

Tampão TE 10X

10 mL de Tris base 1M

2 mL de EDTA 0,5M

88 mL de água destilada

Tampão TE 1X

1mL de TE 10X

90 mL de água destilada

NaCl 5M

292,2g de NaCl  
1000mL de água destilada

Gel de agarose 1,2%  
Agrose 1,2g  
TAE 100mL  
Brometo de Etídeo 6 $\mu$ L

Fenol tamponado  
50ml de água destilada  
6ml de Tris pH 8 1M  
12,5ml de Cresol  
0,5 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol  
7,5g de NaOH 1N

Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores foram diluídos em água miliQ (100ng/ $\mu$ l) e estocados a -20°C.

dNTPs

Os dNTPs foram diluídos a uma concentração de 2,5mM, cada, em água MiliQ e estocados a -20°C.

Tampão de amostra  
0,25% (p/v) azul de bromofenol  
40% (p/v) sacarose em água