

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

**Avaliação da diversidade e do perfil de susceptibilidade
a antimicrobianos de *Enterococcus sp.* isolados
nas águas do arroio Dilúvio – Porto Alegre, RS**

GISELE NACHTIGALL
Bióloga – UFRGS

Porto Alegre, RS, Brasil
Junho, 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 da diversidade e do perfil de susceptibilidade
a antimicrobianos de *Enterococcus sp.* isolados
nas águas do arroio Dilúvio – Porto Alegre, RS**

GISELE NACHTIGALL
Bióloga – UFRGS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente
como um dos requisitos para
obtenção do Grau de Mestre
na Área de Microbiologia
Molecular de Procariotos

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Sueli T. Van Der Sand

Porto Alegre, RS, Brasil

Junho, 2011

CIP - Catalogação na Publicação

Nachtigall, Gisele

Avaliação da diversidade e do perfil de susceptibilidade de *Enterococcus* sp. isolados nas águas do Arroio Dilúvio - Porto Alegre, RS / Gisele Nachtigall. -- 2011.

99 f.

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Coorientadora: Sueli T. 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. *Enterococcus* sp. 2. Resistência bacteriana. 3. Antimicrobianos. 4. Águas residuais. I. Frazzon, Ana Paula Guedes, orient. II. Van Der Sand, Sueli T., coorient. III. Título.

*Se depender de mim,
nunca ficarei plenamente maduro
nem nas idéias nem no estilo,
mas sempre verde, incompleto,
experimental.*

Gilberto Freyre

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, que a cada dia se faz mais presente na minha vida e que me faz ser mais do que razão.

À minha pequena grande família que é tudo pra mim. Vocês são o meu chão e o meu céu, me apontando milhões de horizontes.

À minha mãe, que foi mãe, pai e muito mais, que me ensinou a encarar as dificuldades como coisas normais da vida. Agradeço pelo exemplo de luta, pelo amor, dedicação, apoio e estímulo, tão fundamentais nas minhas conquistas.

À minha avó Yolanda (in memoriam), pelo cuidado, companhia e carinho. Pelas muitas histórias, poesias, aulas de dança e música. Por todo o seu amor.

Aos meus filhos Renata e Rafael, sou tão feliz por tê-los. Agradeço pelas artes, brincadeiras, pela alegria, pelas encrencas, pela paciência e impaciência, que tanto me faz crescer.

Ao José Francisco, meu namorado, amigo e companheiro, que tanto tem me ajudado. Obrigada pelo amor, carinho e força em todas as horas, e por me fazer olhar as coisas de um outro jeito, também.

À minha orientadora Ana Paula Guedes Frazzon, pelos ensinamentos, pelo apoio incondicional, pela paciência, brincadeiras, amizade e carinho.

À minha co-orientadora, que tanto me orientou, Sueli Van Der Sand, agradeço pela atenção, pelas sugestões, carinho e dedicação.

Às professoras Ana Cláudia Franco e Marisa da Costa, pela carta de recomendação. Vocês confiaram em mim, espero ter correspondido.

À minha estagiária Alyne, pela força, boa vontade e disposição.

Às funcionárias do Departamento de Microbiologia, Sayonara e Leila, pelas muitas “pequenas e grandes ajudas”, pela disponibilidade e carinho.

À turma maravilhosa do laboratório 164, pela troca, pela amizade, pelas brincadeiras e experiências vividas. Foram muitos bons momentos. Em especial à Karina, pelas muitas noites e finais de semana trabalhados em boa companhia.

Um especial agradecimento ao Rafael (meu filho) e ao José Francisco (meu namorado), pelo apoio técnico.

Avaliação da diversidade e do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *Enterococcus sp.* isolados nas águas do arroio Dilúvio – Porto Alegre, RS

Autor: Gisele Nachtigall¹

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Sueli Teresinha Van Der Sand

RESUMO

A contaminação das águas naturais representa um dos principais riscos à saúde pública, sendo conhecida a estreita relação entre a qualidade da água e inúmeras enfermidades. *Enterococcus* são habitantes da microbiota intestinal humana, podendo ser encontrados em praticamente todos os animais e ambientes. A importância crescente dos enterococos como patógenos oportunistas e a emergência e disseminação de cepas multiresistentes contribuiu para um maior interesse na epidemiologia desses micro-organismos. Os objetivos desse trabalho são caracterizar fenotipicamente e determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *Enterococcus* isolados das águas do arroio Dilúvio, em Porto Alegre. Foram coletadas amostras de água em cinco diferentes pontos do arroio, em quatro períodos do ano. Dos 348 isolados, 62,07% foram identificados como *E. faecium*, 13,50% como *E. faecalis*, 12,07% como *E. casseliflavus* e 12,36% como *Enterococcus sp.* Noventa e quatro por cento dos isolados demonstraram resistência a pelo menos uma classe de antimicrobianos e 44,25% a duas classes. *E. faecium* foi a espécie com maior frequência de cepas resistentes (74,07%) a pelo menos duas classes de antimicrobianos, seguida de *E. casseliflavus* (66,67%) e *E. faecalis* (36,17%). No ponto 1, que corresponde a nascente do arroio, foi observado a menor incidência de cepas de *Enterococcus* e de cepas resistentes, quando comparados com os demais pontos de coleta. Os resultados demonstram a presença de cepas de *Enterococcus* resistentes isoladas em todos os pontos do arroio Dilúvio. Estes resultados mostram a necessidade de medidas sanitárias urgentes que busquem a melhoria da qualidade de suas águas a fim de evitar a contaminação e a disseminação de micro-organismos resistentes à antimicrobianos.

¹Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Molecular de Procariotos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (91 p.) Junho, 2011.

Evaluation of diversity and antimicrobial susceptibility profile of *Enterococcus* sp. isolated from Dilúvio stream waters – Porto Alegre, RS

Author: Gisele Nachtigall¹

Advisor: Prof^a. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-advisor: Prof^a. Dra. Sueli Teresinha Van Der Sand

ABSTRACT

The contamination of natural resources of water is a major risk to public health, due to the tight relation between water quality and countless diseases. *Enterococcus* is a inhabit of human intestinal microbiota, and can be isolated from animals and environments. The increasing importance of enterococci as opportunistic pathogens, as well as the emergence and dissemination of multi-resistant strains, contribute for a greater interest in epidemiology study of these microorganisms. The aim of this study was to characterize phenotypic and to determine the antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* isolated from Dilúvio stream, in Porto Alegre. Water samples were collected in five different locations of the stream, throughout four periods of the year. Among the 348 isolates obtained 62.07% were identified as *E. faecium*, 13.50% as *E. faecalis*, 12.07% as *E. casseliflavus*, and 12.36% as *Enterococcus* sp. Ninety-four percent of the isolates were resistant to at least one antimicrobial class, and 44.25% to two classes. *E. faecium* was the most frequently species resistant to at least two antimicrobial classes (74,07%), followed by *E. casseliflavus* (66.67%) and *E. faecalis* (36.17%). In all locations was isolated *Enterococcus* resistant the results indicate the urgent sanitary initiative, in order to improve the water quality of Dilúvio's to avoid the contamination and of antimicrobial-resistant microorganisms.

¹Masters Dissertation in Agriculture and Environmental Microbiology - Prokaryotes Molecular Microbiology, Institute of Basic Sciences and Health, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil. (91 p.) Junho, 2011.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	ix
RELAÇÃO DE FIGURAS	x
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivo Geral	2
1.2. Objetivos Específicos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Águas superficiais	4
2.1.1. O Arroio Dilúvio	4
2.1.2. Tratamento de esgoto	6
2.1.3. Efluente hospitalar	7
2.1.4. Doenças de veiculação hídrica	9
2.1.5. Água contaminada por esgoto	11
2.2. O gênero <i>Enterococcus</i>	12
2.2.1. Histórico	13
2.2.2. Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> sp.	16
2.2.3. Epidemiologia	18
2.2.4. Resistência a antimicrobianos	20
2.2.4.1. Resistência intrínseca de <i>Enterococcus</i> sp.	21
2.2.4.1.1. Resistência à β -lactâmicos	21
2.2.4.1.2. Resistência a aminoglicosídeos	21
2.2.4.1.3. Resistência a glicopeptídeos	22
2.2.4.2. Resistência adquirida de <i>Enterococcus</i> sp.	22
2.2.4.2.1. Resistência à β -lactâmicos	23
2.2.4.2.2. Resistência a aminoglicosídeos	24
2.2.4.2.3. Resistência à tetraciclina	26
2.2.4.2.4. Resistência ao cloranfenicol	27
2.2.4.2.5. Resistência a macrolídeos	27
2.2.4.2.6. Resistência à quinolonas	28
2.2.4.2.7. Resistência a glicopeptídeos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Amostras	33
3.2. Semeadura e Isolamento	35
3.3. Identificação fenotípica para confirmação do gênero	35
3.3.1. Coloração de Gram	35

3.3.2. Teste da catalase	36
3.3.3. Hidrólise da esculina em presença de sais biliares	36
3.4. Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> sp.	36
3.4.1. Fermentação de carboidratos	37
3.4.2. Hidrólise da arginina	37
3.4.3. Utilização do piruvato a 1%	38
3.4.4. Produção de pigmento	39
3.5. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Isolamento e identificação fenotípica das espécies de <i>Enterococcus</i> sp.	41
4.2. Diversidade de <i>Enterococcus</i> sp., por ponto de coleta	43
4.3. Diversidade de <i>Enterococcus</i> sp., por período do ano	47
4.4. Resistência de <i>Enterococcus</i> sp.	52
4.5. Resistência de <i>Enterococcus</i> sp., por ponto de coleta	59
4.6. Resistência de <i>Enterococcus</i> sp., por período do ano	61
5. CONCLUSÕES	63
6. PERSPECTIVAS	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8. APÊNDICE	83

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Características fenotípicas utilizadas para a identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> e gêneros relacionados.	17
Tabela 2. Distribuição e freqüência de isolados de <i>Enterococcus</i> sp., por ponto de coleta.	43
Tabela 3. Distribuição e freqüência de isolados de <i>Enterococcus</i> sp. por período do ano.	48
Tabela 4. Distribuição de isolados de <i>Enterococcus</i> sp. por ponto de coleta e período do ano.	50
Tabela 5. Resistência de isolados de <i>Enterococcus</i> sp. por ponto de coleta e período do ano.	59

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Imagem do Arroio Dilúvio.	5
Figura 2. Mapa do Arroio Dilúvio.	34
Figura 3. Percentuais de resistência de <i>Enterococcus</i> sp.	53
Figura 4. Percentual de espécies de <i>Enterococcus</i> sp. resistentes aos antimicrobianos testados.	54
Figura 5. Perfil de resistência de <i>Enterococcus</i> sp. frente às diferentes classes de antimicrobianos testadas.	57
Figura 6. Percentual de <i>Enterococcus</i> sp. multirresistentes.	58

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC – *American Type Culture Collection*
BHI – Infusão de cérebro-coração
CyIA – enzima citolisina
CLSI – *Clinical and Laboratorial Standards Institute*
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
°C – graus centígrados
DEP – Departamento de Esgotos Pluviais
DNA – Ácido desoxirribonucléico
g – grama
Glaas – *Global Annual Assesment of Sanitation and Drinking-water*
h – hora
HIV – vírus da imunodeficiência humana
IRAS – Infecções Relacionadas a Assistência em Saúde
ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Kg - quilograma
L - litro
mg – miligrama
MG – Minas Gerais
MGP – metil- α -D-glico-piranosideo
mL – mililitro
mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina
NaCl – Cloreto de sódio
OMS – Organização Mundial da Saúde
 μ L – microlitro
PBP – Proteína Ligadora de Penicilina
PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*
pH – potencial hidrogeniônico
PISA – Programa Integrado Socioambiental
PNSB – Pesquisa Nacional de Saneamento Básico
rDNA – Ácido desoxirribonucléico ribossômico
RJ – Rio de Janeiro
RNA – Ácido ribonucléico
rRNA – Ácido ribonucléico ribossômico
RS – Rio Grande do Sul
SP – São Paulo
TGI – Trato gastrointestinal
TGU – Trato geniturinário
tRNA – Ácido ribonucéico transportador
VRE – *Enterococcus* resistente à vancomicina
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
WMO – *World Meteorological Organization*

1. INTRODUÇÃO

A água é um bem natural e o principal elemento para os seres vivos, podendo ser também um potencial meio de transmissão de inúmeras doenças, como as causadas por vírus e bactérias, por exemplo.

A contaminação das águas naturais representa um dos principais riscos à saúde pública, sendo amplamente conhecida a estreita relação entre a qualidade da água e as inúmeras enfermidades que acometem as populações, especialmente aquelas não atendidas por serviços de saneamento.

A má qualidade da água consumida e o contato direto ou indireto com água contaminada têm sido responsáveis pela maior parte das doenças endêmicas nos países em desenvolvimento.

Os cocos Gram-positivos são a principal causa de infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS), sendo o gênero *Enterococcus* um dos principais responsáveis. Enterococos fazem parte da microbiota do trato intestinal, cavidade oral e do trato geniturinário de humanos e de outros animais. Embora sejam considerados micro-organismos comensais, em seres humanos, eles podem atuar como patógenos oportunistas causando uma série de infecções, tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade. A presença de *Enterococcus* sp. no solo, nos alimentos e nas águas superficiais

pode ser atribuída à contaminação por fezes humanas e de outros animais, ou por esgoto não tratado. Por essa razão, os *Enterococcus* sp. são utilizados como indicadores de contaminação fecal em água e alimentos. Uma das características marcantes deste gênero é a resistência a várias classes de agentes antimicrobianos. Isolados resistentes já foram obtidos de amostras de alimentos, ambiente, clínicas e de animais.

O Arroio Dilúvio, localizado na cidade de Porto Alegre, é um dos muitos mananciais contaminados por resíduos domésticos, industriais e de serviços de atendimento à saúde. O Arroio Dilúvio recebe anualmente cerca de 50 mil metros cúbicos de lixo e terra, além do esgoto cloacal de vários bairros da cidade. Sendo o esgoto um potencial agente de contaminação fecal, é provável que se encontre nele grande quantidade de micro-organismos potencialmente patogênicos.

Assim, este trabalho se justifica pela importância sócio-ambiental do Arroio Dilúvio, sendo necessária a identificação dos micro-organismos indicadores de contaminação fecal e resistentes encontrados nele, e das relações estabelecidas por eles, condições essenciais ao monitoramento da qualidade de suas águas.

1.1. OBJETIVO GERAL

Isolar, caracterizar, identificar e traçar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *Enterococcus* sp. presentes nas amostras de água coletadas no Arroio Dilúvio.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Isolar, caracterizar e identificar bioquimicamente *Enterococcus* sp. presentes em amostras de água coletadas em diferentes pontos do Arroio Dilúvio, em quatro períodos do ano.

b) Determinar os padrões de resistência a antimicrobianos nas diferentes espécies isoladas.

c) Estabelecer relação entre a ocorrência de determinadas espécies com o local de coleta e a sazonalidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Águas superficiais

Segundo *World Meteorological Organization* (WMO, 1997), três quartos da superfície da Terra é coberta por água, porém 97% de toda essa água está contida nos mares e oceanos restando apenas 3% de água doce. Desses, 2,7% estão congelados nas calotas polares, restando menos de 1% de toda a água do planeta, que são as águas superficiais de fácil captação (lagos e rios ou como umidade presente no solo, na atmosfera e como componente dos mais diversos organismos). É desse 1% que mais de seis bilhões de seres humanos devem obter a água que precisam para sobreviver. No entanto, parte dessa água já está poluída por esgotos e resíduos industriais, tornando-se imprópria para o consumo

2.1.1. O Arroio Dilúvio

O Arroio Dilúvio, situado na cidade de Porto Alegre, nasce no limite dos municípios de Porto Alegre e Viamão, na represa Lomba do Sabão e recebe água de afluentes como os Arroios dos Marianos, Beco do Salso, São Vicente, Mato Grosso, Moinho, Cascata e Águas Mortas, para finalmente desaguar,

entre os parques, Marinha do Brasil e Maurício Sirotski Sobrinho (Faria & Morandi, 2002).

A microbacia do Arroio Dilúvio tem cerca de 80 quilômetros quadrados com uma extensão canalizada de aproximadamente 12 quilômetros em áreas urbanas, com grande trânsito de pessoas e veículos (Figura 1).

O Arroio Dilúvio recebe anualmente cerca de 50 mil metros cúbicos de lixo e terra, além do esgoto doméstico, esgoto laboratorial e hospitalar de vários bairros da cidade (Faria & Morandi, 2002). Um terço da população de Porto Alegre é contribuinte à sub-bacia do arroio Dilúvio (Menegat, R. et al., 1998).



Figura 1. Imagem do Arroio Dilúvio na cidade de Porto Alegre, RS <http://www.skyscrapercity.com/showthread.php?t=349064&page=2>. Foto de Henrique Amaral.

Apesar do expressivo percentual de redes coletoras de esgotamento sanitário implantadas na bacia do Arroio Dilúvio, isto não tem garantido a melhoria da qualidade de suas águas. Especialmente em trechos de urbanização mais recente onde a coleta e a canalização dos esgotos não acompanharam a expansão populacional, a carga afluyente ao arroio é

significativa. Além disso, muitas economias desta sub-bacia, por problemas técnicos e/ou culturais, não efetuaram as ligações do esgoto à rede cloacal, mantendo seus efluentes ligados à rede pluvial, que os conduz, junto com as águas da chuva, diretamente para o arroio (Morandi & Faria, 2002). Esse panorama pouco se alterou de 2002 até 2011, devendo passar por significativa melhora com a implantação do PISA, até dezembro de 2012.

2.1.2. Tratamento de esgoto

A qualidade de vida das populações depende do acesso aos bens necessários à sua sobrevivência, sendo o saneamento básico um dos principais meios para se atingir esse fim. A água potável, assim como a coleta de lixo e a captação e tratamento de esgoto, tem fundamental importância para a diminuição dos índices de mortalidade e morbidade nessas populações, pois evitam a disseminação de doenças. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o impacto das doenças diarreicas nas crianças é superior ao impacto combinado do vírus da imunodeficiência humana (HIV), tuberculose e malária. As estimativas mais recentes indicam que a melhoria do saneamento e do abastecimento de água potável poderia reduzir em 2,2 milhões o número de crianças que morrem todos os anos (Glaas, 2010).

No Brasil, as péssimas condições sanitárias verificadas em muitas das bacias hidrográficas densamente e desordenadamente ocupadas, resultam na degradação generalizada dos elementos naturais e, obviamente, dos recursos hídricos. É realidade comum o lançamento de esgotos sanitários não tratados, a disposição inadequada de resíduos sólidos nas mediações de cursos d'água

ou em locais sem infra-estrutura adequada, loteamentos clandestinos e outras. A baixa cobertura dos serviços de esgotamento sanitário, na grande maioria dos estados brasileiros, é ainda, uma realidade (Libânio et al., 2005).

Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico – PNSB 2008, o contingente populacional sem a cobertura de rede de esgoto sanitário, considerando-se apenas os municípios sem rede coletora, era de aproximadamente 34,8 milhões de pessoas, ou seja, em 2008, cerca de 18% da população brasileira estava exposta ao risco de contrair doenças em decorrência da inexistência de rede coletora de esgoto.

Em Porto Alegre, segundo pesquisa de campo desenvolvida pelo Instituto Trata Brasil, entre os meses de julho e agosto de 2008, 62,7% das doenças em comunidades carentes eram de veiculação hídrica, relacionadas diretamente à falta de coleta e de tratamento de esgoto. Conforme a pesquisa, diarreias representavam 25,3% do total das doenças registradas, seguidas de leptospirose (21%) e verminoses (16,4%), sendo as crianças com idades entre 0 e 7 anos as mais atingidas. Dos serviços de saneamento, a coleta de lixo é o único serviço efetivamente oferecido pelo poder público.

Em termos gerais, Porto Alegre trata 27% de seu esgoto, devendo passar, com o Programa Integrado Socioambiental (PISA), para 77% até dezembro de 2012, essa é a meta da Prefeitura Municipal de Porto Alegre.

2.1.3. Efluente hospitalar

Grande parte da contaminação dos mananciais que abastecem as populações é proveniente de efluentes hospitalares não tratados. Machado-

Homem (1986) sugere que os efluentes hospitalares seriam possíveis disseminadores de micro-organismos patogênicos, além de veicularem grandes concentrações de antibióticos e outros medicamentos, via excreta de pacientes.

O efluente hospitalar atua como fonte de contaminação, uma vez que nele são concentrados os dejetos dos indivíduos doentes que expressam morbidade variável (Fayer et al., 2004).

Os riscos à saúde pública concernentes à eliminação de esgoto hospitalar sem tratamento no ambiente abrangem desde o simples lançamento de bactérias e vírus patogênicos até a disseminação de fatores de resistência a antimicrobianos selecionados nos ambientes hospitalares, além de produtos químicos e medicamentos em geral. Embora, no Brasil o tema sobre os resíduos sólidos tenha entrado no cenário legal e normativo por meio da Resolução nº 05/93 do Conama – que estabelece critérios para o gerenciamento de resíduos sólidos oriundos de serviços de saúde, portos, aeroportos, terminais rodoviários e ferroviários – ainda não há um claro esforço no intuito de gerar normativas para a questão do esgoto hospitalar. Faltam políticas, definições, fiscalizações e principalmente ações que sinalizem a preocupação governamental que o tema exige, por sua complexidade, dimensão e impacto direto na vida das populações (Vecchia et al., 2009).

Em virtude da inexistência de dados sobre o tema e da falta de saneamento de fato, é necessária uma discussão mais ampla que possibilite a implantação de normas e de um conjunto de práticas que se apliquem especificamente ao caso do esgoto hospitalar no Brasil, tema até hoje mantido

à margem das políticas públicas e de regulamentação específica (Vecchia et al., 2009).

2.1.4. Doenças de veiculação hídrica

As doenças de veiculação hídrica aumentam à medida que crescem as áreas urbanas. De acordo com o Banco Mundial 50% da população mundial em 2010, vivem em cidades. A tendência do crescimento das áreas urbanas deve continuar até 2050, restando apenas 30% da população morando em áreas rurais.

Conforme Motta & Silva (2002), a diarreia aguda prevalece como uma das mais importantes causas de morte na infância, principalmente em lactentes e crianças em idade pré-escolar de muitos países em desenvolvimento. Além disso, em grande parte dos casos a diarreia tem como agentes etiológicos os vírus, as bactérias e alguns parasitas intestinais como os protozoários, geralmente transmitidos pelo contato direto fecal-oral ou por contaminação de alimentos e água em ambientes sem condições sanitárias adequadas.

Em áreas densamente povoadas ocorre uma grande geração de resíduos que são dispostos no meio, causando a contaminação do solo e das águas superficiais e subterrâneas.

Nas “doenças de veiculação hídrica”, o agente patogênico está presente na água, isto é, a água é a principal forma de exposição ao agente. Para as “doenças baseadas na água”, o agente patogênico desenvolve parte do seu ciclo vital na água através de reservatórios aquáticos e a água pode ser uma forma de contato do agente com as pessoas. Assim, são consideradas

“doenças de veiculação hídrica” a cólera (*Vibrio cholerae*), febre tifóide (*Salmonella typhi*), salmonelose (*Salmonella* spp.), amebíase (*Entamoeba histolytica*), giardíase (*Giardia intestinalis*), hepatite A (vírus da hepatite A) e leptospirose (*Leptospira* sp.). Enquanto que as helmintoses e a esquistossomose são consideradas “doenças baseadas na água” (Instituto Trata Brasil).

Diversos estudos têm procurado avaliar o impacto das ações de saneamento sobre a saúde. Os principais indicadores epidemiológicos utilizados nesses estudos têm sido: 1) a incidência de diarreias, 2) a prevalência de helmintoses, giardíase e amebíase e 3) a mortalidade infantil (Heller, 1997). A maior parte desses estudos foi realizada em regiões da Ásia e África, com precárias condições de saneamento. Poucos estudos foram feitos no Brasil e com populações urbanas. Uma análise preliminar dos registros destas doenças no Brasil aponta baixos índices endêmicos de febre tifóide, com surtos localizados, nem sempre ligados à contaminação da água. A leptospirose possui baixos níveis endêmicos, sendo verificados surtos desta doença durante enchentes, ligados ao contato com água contaminada pela bactéria presente na urina de ratos. A hepatite infecciosa tem registrado altas taxas de morbidade, entretanto, os registros da doença integram o vírus de hepatite A, de transmissão fecal-oral, e outros vírus de hepatite, que podem ser transmitidos pelo sangue (Benenson, 1997). As gastroenterites possuem taxas de mortalidade e morbidade elevadas, mesmo que admitido um alto grau de subnotificação. Seu registro é proporcionalmente mais alto para grupos etários mais jovens, indicando uma melhor qualidade de dados para crianças (0 a 1

ano e 1 a 5 anos). Em relação às demais doenças de veiculação hídrica, as gastroenterites podem estar relacionadas a diversos agentes infecciosos de características biológicas e epidemiológicas diferentes e que expressam condições da contaminação da água (Torres et al., 1989).

2.1.5. Água contaminada por esgoto

Indicadores microbiológicos são utilizados mundialmente para verificar a contaminação de corpos d'água por resíduos humanos. Os micro-organismos geralmente utilizados incluem coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e enterococos (Shibata et al., 2004). Tipicamente são utilizadas bactérias que são encontradas em elevadas concentrações em fezes humanas (*E. coli*, em média, 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g de fezes; enterococos, 10^5 UFC/g a 10^8 UFC/g de fezes). No entanto, nenhuma delas apresenta todos os critérios de um indicador fecal ideal.

Segundo a Fundação Nacional de Saúde – FUNASA (2006), para uma bactéria ser considerada ideal indicadora de contaminação fecal, ela deve apresentar um conjunto de características, quais sejam:

- Estar presente nas fezes de animais homeotérmicos, inclusive seres humanos;
- Sua presença na água deve possuir uma relação direta com o grau de contaminação fecal;
- Ser facilmente detectável e quantificável por técnicas simples e economicamente viáveis, em qualquer tipo de água;

- Sua persistência na água deve ser igual ou superior à dos microorganismos patogênicos mais persistentes;
- Ser mais resistente à ação dos agentes desinfetantes do que as bactérias patogênicas.

A quantificação dos organismos indicadores é fundamental para monitorar a qualidade ambiental fornecendo a evidência da presença ou ausência de um patógeno, o qual sobrevive sob semelhantes características e condições. Embora a maioria dessas bactérias não seja patogênica, podem representar riscos à saúde, como também, deteriorar a qualidade da água, provocando odores e sabores desagradáveis (FUNASA, 2006).

2.2. O gênero *Enterococcus*

Os enterococos são cocos Gram-positivos, não formadores de esporos, catalase e oxidase negativa que podem ser encontrados isolados, aos pares ou em cadeias curtas, podendo apresentar formas ovóides ou cocobacilares, dependendo do meio em que crescem. Algumas espécies podem ser móveis, apresentando poucos flagelos e ausência de cápsula. São anaeróbios facultativos e capazes de fermentar diversos carboidratos com produção de ácidos. Distinguem-se de outros cocos Gram-positivos por crescerem em temperaturas entre 10° C e 45° C, podendo sobreviver por cerca de 30 min a 60° C (com temperatura ótima de crescimento de 35° C), bem como suportando variações de pH entre 4,0 e 9,6. Também se observa multiplicação de *Enterococcus* em meio contendo 6,5% de NaCl e em presença de sais biliares

a 40% (Koneman et al., 2001; Facklam et al., 2002; Moreno et al., 2006; Hew et al., 2007; Ogier et al., 2007).

Devido a essa capacidade de crescer e sobreviver em condições tão adversas, *Enterococcus* sp. encontram-se amplamente dispersos na natureza, podendo ser encontrado na água, solo, alimentos, plantas e animais (Facklam et al., 2002). Em seres humanos podem ser encontrados na microbiota do trato gastrointestinal (TGI) e geniturinário (TGU), bem como, com menos freqüência, em cavidade oral, vesícula biliar e uretra masculina (Koneman et al., 2001). Embora sejam considerados micro-organismos comensais, podem atuar como patógenos oportunistas causando surtos de infecções hospitalares de difícil controle e disseminar clones epidêmicos (Titze-de-Almeida et al., 2006).

2.2.1. Histórico

O nome enterococo tem sua origem na palavra francesa “entérocoque” a qual foi utilizada pela primeira vez por Thiercelin em 1899 com a finalidade de indicar a origem entérica, desse coco Gram-positivo.

Em 1906, Andrewes e Horder propuseram o nome *Streptococcus faecalis*, a uma bactéria isolada de um caso de endocardite. Orla-Jensen descreveu um segundo micro-organismo desse grupo em 1919, o qual denominou *Streptococcus faecium*, que diferia de *Streptococcus faecalis* quanto aos padrões de fermentação (Murray, 1990).

Rebecca Lancefield, em 1933, desenvolveu uma classificação para os estreptococos baseada nas características antigênicas de um carboidrato de

parede celular. Em 1937, Sherman classificou os estreptococos em quatro grupos: piogênicos, viridans, láctico e enterococo (Facklam, 2002).

Baseando-se no arranjo celular e nas características fenotípicas, Kalina propôs em 1970 a criação de um novo gênero para os estreptococos do grupo enterococo. Kalina sugeriu que *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* e subespécies fossem classificadas no gênero *Enterococcus*. A proposta não foi aceita e a denominação *Streptococcus* continuou sendo utilizada (Facklam, et al., 2002).

Em 1984, Schleifer e Kilpper-Bälz, usando hibridização DNA-DNA e DNA-rDNA, mostraram que o *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* eram fracamente relacionados aos estreptococos, incluindo o *Streptococcus bovis*, de maneira que deveriam ser classificados em outro gênero: o gênero *Enterococcus* anteriormente sugerido por Kalina.

Atualmente, são conhecidas mais de 41 espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* sp.: *E. aquimarinus*, *E. asini*, *E. avium*, *E. caccae*, *E. camelliae*, *E. canintestini*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. devriesei*, *E. díspar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hermannienseis*, *E. hiraie*, *E. italicus*, *E. malodoratus*, *E. moravienseis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. porcínus*, *E. pseudoavium*, *E. raffínus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharominimus*, *E. seriolicida*, *E. silesiacus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus*, *E. termitis*, *E. thailandicus*, *E. viikkienseis* e *E. villorum* (Manero & Blanch, 1999; Euzéby, 2011).

Devido à capacidade desses micro-organismos crescerem e sobreviverem por longos períodos em condições adversas (pH, salinidade, temperatura), existe uma grande variedade de nichos dos quais já foram isoladas espécies de enterococos. Além de fazerem parte da microbiota do TGI e TGU humano, também são encontrados em mamíferos, aves, insetos, peixes, plantas, bem como disseminados no solo e água, provavelmente como resultado de contaminação fecal. (Murray, 1990; Facklam et al., 2002; Giraffa et al., 2002). Abaixo, seguem alguns exemplos de nichos ecológicos dos quais já foram isoladas diferentes espécies do gênero *Enterococcus* (Schleifer et al., 1984; Collins et al., 1984; Farrow et al., 1985; Collins et al., 1986; Ruoff et al., 1990; Kusuda et al., 1991; Moellering, 1992; Mordehai et al., 1997; De vaux et al., 1998; Svec et al., 2001; Teixeira et al., 2001; Reid et al., 2001; Sandoe et al., 2001; Poyart et al., 2002; Tyrrell et al., 2002; Law-Brown et al., 2003; De Graef et al., 2003; Koort et al., 2004; Vancanneyt et al., 2004; Fortina et al., 2004; Svec et al., 2005; Iaria et al., 2005; Higashide et al., 2005; Svec et al., 2006; Carvalho et al., 2006; Pehlivan et al., 2007; Tanasupawat et al., 2008):

- Água: *E. aquimarinus* (mar), *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. silesiacus*, *E. casseliflavus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. durans*, entre outros.
- Plantas: *E. casseliflavus*
- Leite e derivados: *E. sacharominimus*, *E. italicus*, *E. malodoratus*, *E. durans*.
- Solo: *E. casseliflavus*

- Animais: *E. termitis*, da microbiota intestinal de cupins; *E. asini*, da microbiota intestinal de burros; *E. devriesei*, da carne de bovinos; *E. porcinus*, de porcos com sintomas de diarreia; *E. rattii*, de ratos com sintomas de diarreia; *E. columbae*, do intestino de pombos; *E. avium*, de fezes de frangos; *E. viikkiensis*, da carne de frango e derivados; *E. seriolicida*, de peixes de água doce e do mar (patógenos); *E. gallinarum*, do intestino de aves domésticas; *E. hirae*, de pintos e intestino de porcos; *E. phoeniculicola*, das glândulas do uropígio de aves; *E. canis*, de cães com otite crônica e “swab” anal de cães saudáveis; *E. canintestini*, de fezes de cães saudáveis; *E. hermanniensis*, amígdalas de cães e derivados de frango; *E. thailandicus*, de salsicha;
- Ser humano: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. caccae*, *E. avium*, *E. pallens*, *E. gilvus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. mundtii* e *E. raffinosus*.

2.2.2. Identificação das espécies de *Enterococcus*

A identificação das espécies do gênero *Enterococcus*, através dos testes bioquímicos convencionais foi inicialmente proposta por Facklam & Collins (1989), modificada por Facklam & Sham (1995) e recentemente atualizada por Teixeira & Facklam (2003). As espécies do gênero *Enterococcus* foram divididas em cinco grupos (I - V), com base em três provas bioquímicas: fermentação do manitol e da sorbose, e dehidrolação da arginina (Tabela 1). Outras características fenotípicas tais como motilidade e produção de pigmento também são avaliadas para caracterizar as diferentes espécies de enterococos e gêneros relacionados.

Entretanto, identificar espécies de *Enterococcus* é bastante complexo. Muitos isolados, especialmente de amostras ambientais, não são prontamente identificados, quando consideradas somente características fenotípicas. A dificuldade de se identificar as espécies usando apenas testes fisiológicos é devido à heterogeneidade observada no gênero (Devriese, 1993).

A diferenciação de espécies, como *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, por exemplo, que apresentam grande similaridade metabólica, pode ser difícil através de métodos bioquímicos, sendo assim o PCR-RFLP do 16S DNA ribossomal pode ser útil para a confirmação das espécies (Medeiros, et al., 2010).

Tabela 1. Características fenotípicas utilizadas para a identificação das espécies de *Enterococcus* e gêneros relacionados.

ESPÉCIES	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP
Grupo I												
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. pallens</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
Grupo II												
<i>E. faecalis</i>	+*	-	+*	-	+	-	+	-	-	+*	+	-
<i>Lactococcus ssp.</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-
<i>E. faecium</i>	+*	-	+	+	V	V	-	-	-	+*	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+*	+	V	+	-*	+*	+*	+	V	+
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	V	+	-	-	+	+	-	-
<i>E. gallinarum</i>	+*	-	+*	+	-	+	-	+*	-	+	-	+
Grupo III												
<i>E. dispar</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. porcinus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. ratti</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo IV												
<i>E. asini</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. cecorum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Grupo V												
<i>E. columbae</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>Vagococcus sp.</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+

MAN: manitol; SOR: sorbose; ARG: arginina; ARA: arabinose; SBL: sorbitol; RAF: rafinose; TEL: telurito à 0:04%; MOT: motilidade; PIG: pigmento; SUC: sucrose; PYU: piruvato; MGP: metil- α -glicopiranoside; +: >90% positivo; -: < 10% positivo; v: variável;

*: exceções ocasionais (<3% das cepas apresentam reações discordantes).

Fonte: Teixeira & Facklam, 2003.

2.2.3. Epidemiologia

Enterococcus são habitantes da microbiota do TGI e TGU de humanos, podendo ser encontrados em praticamente todos os animais, desde insetos a humanos. Podem ser isolados de plantas, do solo e de águas superficiais, que provavelmente foram contaminadas por excrementos de animais ou por água de esgoto não tratado. Por essa razão, ainda hoje os enterococos são utilizados como indicadores de contaminação fecal em água e alimentos (Moellering Jr., 1992; Jett et al., 1994; Aarestrup et al., 2002).

Embora sejam habitualmente encontrados no TGI e TGU humano, também podem colonizar a cavidade oral, com menos frequência (Rice et al., 1995; Stobberingh et al., 1999). Por pertencerem à microbiota humana, há alguns anos as infecções enterocócicas eram tradicionalmente consideradas endógenas, por esta razão a epidemiologia dessas infecções não despertava muita atenção. Mas recentemente, maior interesse tem sido dado a esse assunto devido às evidências que apontam a aquisição exógena de infecções enterocócicas. Além disso, a importância crescente dos enterococos como patógenos hospitalares e a emergência e disseminação de isolados multirresistentes contribuiu de forma relevante para o maior interesse na epidemiologia desses micro-organismos (Facklam et al., 2002).

A habilidade dos enterococos em colonizar indivíduos na maioria das vezes sem provocar infecções, e de sobreviver em objetos inanimados por longos períodos, associado à sua resistência intrínseca e adquirida a vários antimicrobianos torna-os potentes patógenos de infecções relacionadas a assistência a saúde (IRAS) (Murray, 1998).

E. faecalis representa cerca de 80 a 90% das causas de infecções clínicas em humanos e *E. faecium* 5 a 15%. No entanto, outras espécies como *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. avium*, e *E. raffinosus* também são isoladas de amostras clínicas, mas com uma frequência inferior a 5% (Huycke et al., 1998; Centinkaya et al., 2000; Pérez, 2002)

Enterococos estão relacionados a uma grande variedade de infecções humanas, tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade, tais como endocardite, bacteremia, síndromes diarréicas em recém nascidos, infecções intra-abdominais, urinárias e colonizando ou causando infecções em feridas superficiais de pacientes hospitalizados (Murray, 1990; Murray, 1998; Koneman et al., 2001; Hörner et al., 2005). Com menos frequência podem ocorrer infecções do sistema nervoso central, infecções pulmonares, do tecido periodontal e outras (Jett et al., 1994; Paradella et al., 2007).

A infecção do trato urinário é a mais comum em humanos. A maioria dessas infecções tem origem hospitalar e estão associadas, principalmente a instrumentalização/cateterização prévia, a anormalidades do trato urinário, ao uso indiscriminado de antimicrobianos e a debilidade do paciente. Além de infecções do trato urinário inferior e pielonefrites, também já foram descritos casos de prostatite e abscesso periférico atribuídos a enterococos. Os enterococos raramente causam infecções não complicadas do trato urinário em mulheres (Gould et al., 2004; Sandri et al., 2004). De um modo geral enterococos causam mais infecções em pacientes internados e principalmente naqueles que estão sob antibioticoterapia há muito tempo (Bender et al., 2010).

2.2.4. Resistência a antimicrobianos

No último século, a disponibilidade dos antimicrobianos trouxe importante impacto na redução de morbidade e mortalidade causadas por doenças infecciosas. Entretanto, associado ao uso de antimicrobianos, tem-se observado um aumento na frequência de bactérias resistentes aos agentes de uso corrente (Saraiva et al., 1997).

Atualmente, a resistência entre as bactérias Gram-positivas vêm se tornando um problema na terapêutica anti-infecciosa e motivo de grande preocupação entre os cientistas, microbiologistas e médicos clínicos (Tavares, 2000). Além disso, o desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos tem sido lento, se comparado ao crescente surgimento da resistência bacteriana (Zarrili et al., 2005; Chang et al., 2007; Deshpande et al., 2007). A resistência a várias classes de agentes antimicrobianos é uma característica marcante dos *Enterococcus* sp. (D'azevedo et al., 2004).

A pressão seletiva provocada pela utilização de antimicrobianos aos quais enterococos são naturalmente resistentes favorece a sua disseminação e o aparecimento de surtos epidêmicos (Suppola et al., 1996; Edlund et al., 1997; Donskey et al., 2000; Harbarth et al., 2002; Chavers et al., 2003).

Enterococos apresentam uma grande variedade de mecanismos que os tornam resistentes a muitas classes de antimicrobianos. A variabilidade genética e a rápida multiplicação permitem a adaptação das bactérias aos mais diversos ambientes (Centinkaya et al., 2000).

A resistência bacteriana a antimicrobianos pode ser classificada como intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca ou natural se encontra no

cromossomo bacteriano e é própria da espécie. A resistência adquirida pode ser resultado de uma mutação no DNA cromossomal ou pela aquisição de material genético externo como plasmídeos ou transposons (Aslangul et al., 2005; Zarrili et al., 2005).

2.2.4.1. Resistência intrínseca de *Enterococcus* sp.

A resistência natural de *Enterococcus* sp. a muitos antimicrobianos pode ser resultado da sua necessidade de sobreviver e persistir em ambientes altamente competitivos, como o TGI. Enterococos apresentam resistência intrínseca a vários agentes antimicrobianos utilizados na clínica (Shepard & Gilmore, 2002).

2.2.4.1.1. Resistência à β -lactâmicos

As bactérias intrinsecamente resistentes aos β -lactâmicos são capazes de modificar as proteínas ligadoras de penicilina (PBP), localizadas na membrana, responsáveis pela união do peptidoglicano, diminuindo assim sua afinidade à penicilina. A PBP mais frequentemente associada à resistência aos β -lactâmicos é a PBP5, codificada pelo gene *pbp5* que determina uma baixa resistência e encontra-se no DNA cromossômico (Moreillon, 2000; Rice et al., 2001; Aslangul et al., 2005; Poeta et al, 2006; Top et al., 2008)

2.2.4.1.2. Resistência à aminoglicosídeos

A resistência a baixos níveis de aminoglicosídeos (MIC 8-256 $\mu\text{g/mL}$) é devido a dificuldades no transporte do antimicrobiano pela baixa

permeabilidade da parede celular a esse tipo de molécula. Aminoglicosídeos não são efetivos como monoterapia contra enterococos, porém a sua associação à β -lactâmicos ou glicopeptídeos, que facilitam a entrada do aminoglicosídeo na célula bacteriana, permite a ação bactericida da droga. Esse sinergismo entre as duas classes de antimicrobianos tem sido utilizado com frequência no tratamento de infecções graves (Tannock & Cook, 2002; Hermann, 2007; Top et al., 2008).

2.2.4.1.3. Resistência à glicopeptídeos

A resistência a baixas concentrações de vancomicina (MIC 2-32 $\mu\text{g/mL}$) e susceptibilidade à teicoplanina (MIC 0.5-1 $\mu\text{g/mL}$) é uma propriedade intrínseca de *E. gallinarum* (*vanC1*) e *E. casseliflavus* (*vanC2*). O baixo nível de resistência determinado pelo fenótipo VanC ocorre devido a alterações na síntese da parede celular, a alanina é substituída pela serina (Toye et al., 1997; Centinkaya et al., 2000; Sandri, 2004; Bazet et al., 2005; Top et al., 2008).

2.2.4.2. Resistência adquirida de *Enterococcus* sp.

A resistência adquirida deve-se a modificações genéticas por mutação, aquisição de DNA (transformação, transdução ou conjugação), transposons, integrons ou plasmídeos, que podem ser conjugativos ou não-conjugativos (Auto, et al., 1980).

A transferência de genes, que codificam uma enzima, que confere resistência a antimicrobianos, pode ocorrer dentro da mesma espécie ou entre diferentes espécies e gêneros, sendo neste caso, designada “transferência

horizontal” (Woo et al., 2003). A transferência horizontal é uma importante ferramenta na adaptação de procariotos, pois à aquisição de genes funcionais e melhorados, aumentam a adaptabilidade destes organismos (Lawrence, 2002).

Muitos genes específicos de cocos Gram-positivos, que conferem resistência à canamicina, eritromicina e à tetraciclina já foram detectados em patógenos Gram-negativos humanos como *Campylobacter coli*, *Neisseria gonorrhoeae* e vários representantes da família *Enterobacteriaceae* (Trieu-cout et al., 1988). A transferência do gene *VanA*, mediado por plasmídeos, dos enterococos para *Staphylococcus aureus* (VRSA) foi observada pela primeira vez em 2002. Os VRSA's são, atualmente, motivo de grande preocupação entre pesquisadores e profissionais da área da saúde (Chang et al., 2003).

Os enterococos podem adquirir resistência ao cloranfenicol, à tetraciclina, macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas, alto nível de resistência aos aminoglicosídeos, aos β -lactâmicos, aos glicopeptídeos e mais recentemente às quinolonas (Moellering Jr., 1991; Huyche et al., 1998; Centinkaya et al., 2000; Teixeira & Facklam, 2003).

2.2.4.2.1. Resistência à β -lactâmicos

Todos os β -lactâmicos atuam inibindo a biossíntese do peptideoglicano. Este mecanismo se explica devido à analogia estrutural existente entre as moléculas de β -lactâmicos e a porção terminal D-alanil-D-alanina, da cadeia peptídica do peptideoglicano. Os β -lactâmicos ocupam o lugar do substrato natural da transpeptidase, bloqueando o crescimento da cadeia do

peptideoglicano. Devido à grande afinidade dessas enzimas (transpeptidases e carboxipeptidases) com a penicilina, elas são denominadas de Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBP's – do inglês Penicillin Binding Proteins) (Poeta, 2006; Top et al., 2008).

A resistência adquirida à β -lactâmicos pode ser devida à alteração ou superprodução das PBP's, atribuindo um nível de resistência, mais elevado do que aquele referente à resistência intrínseca, este é o caso dos *E. faecium* resistentes à ampicilina, por exemplo. Um segundo mecanismo de resistência adquirida pode ser resultante da síntese da enzima β -lactamase que hidrolisa o antimicrobiano no espaço periplasmático. A produção de β -lactamase é rara e tem sido descrita em *E. faecalis*, sendo atribuída, na maioria dos casos, a aquisição do operon da β -lactamase de *S. aureus* (Moreillon, 2000; Comenge et al., 2003; Rice et al., 2004; Aslangul et al., 2005; Hsieh et al., 2006; Top et al., 2008).

2.2.4.2.2. Resistência à aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos que agem inibindo a síntese protéica, são muito utilizados no tratamento de infecções graves provocadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, normalmente em associação com antimicrobianos antiparietais. No citoplasma bacteriano ligam-se à subunidade 30S ribossomal, induzindo uma alteração na síntese protéica e a criação de proteínas anômalas *non sense* associadas a uma alteração da permeabilidade celular, o que explica o seu efeito bactericida (Osswald et al., 2001; Hermann, 2007).

Enterococos podem adquirir alto nível de resistência aos aminoglicosídeos por três mecanismos distintos: 1) alteração do sítio-alvo no ribossomo; 2) interferência no transporte de membrana e 3) inativação enzimática do antimicrobiano. Os dois primeiros mecanismos ocorrem por mutações no DNA cromossomal, enquanto o terceiro é geralmente mediado por plasmídeo (Courvalin, et al., 1980; Lecrercq et al., 1992).

Em amostras clínicas, o alto nível de resistência geralmente ocorre por inativação enzimática, devido à presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que podem ser fosfotransferases (fosforilam a molécula de aminoglicosídeo a partir de ATP), acetiltransferases (acetilam a molécula a partir de acetil-CoA) ou nucleotidiltransferases (adicionam molécula de adenina, proveniente de ATP). A resistência à estreptomicina, no entanto, ocorre através de alterações do sítio-alvo, por mudanças na subunidade ribossomal 30S, que diminui a capacidade de ligação do antimicrobiano, ou ainda por inativação enzimática pela ação da nucleotidiltransferases (Hernández, 1998; Mingeot-Lecrercq et al., 1999; Chow, 2000; Hermann, 2007).

A resistência à estreptomicina e à gentamicina é motivo de grande preocupação em saúde pública, visto que o sinergismo de um aminoglicosídeo com um inibidor de síntese de parede celular constitui-se a única estratégia terapêutica confiável para o tratamento de endocardite enterocócica (Fines et al., 1999; Pootoolal et al., 2002; Lazo et al., 2006).

2.2.4.2.3. Resistência à tetraciclina

As tetraciclinas são drogas muito utilizadas no tratamento de infecções provocadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As suas propriedades antimicrobianas, reduzida toxicidade, baixo custo e fácil aplicação fazem com que as tetraciclinas sejam largamente consumidas tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (Chopra et al., 2001).

A tetraciclina penetra na célula bacteriana por difusão passiva e age na subunidade ribossômica 30S, impedindo a ligação do RNA transportador (tRNA), bloqueando o aporte de aminoácidos, inibindo assim a síntese protéica. Diversos estudos têm relatado uma crescente freqüência de isolados resistentes à tetraciclina (Fluit et al., 2001; Chopra et al., 2001). Diferentes genes conferindo resistência à tetraciclina têm sido encontrados, incluindo os genes *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS* e *tetX* (Burdett et al., 1982; Brunton, 1984; LeBlanc et al., 1988; Charpentier et al., 1993; Chopra et al., 2001).

Até o momento são conhecidos três mecanismos, que conferem resistência a esse agente: os genes *tetK* e *tetL* (plasmidiais ou cromossomais) que codificam proteínas transmembrana responsáveis pelo efluxo da droga através da membrana externa, proteção ribossomal por proteínas, conferida pelos genes *tetM* (mais comum, cromossomal, presente em *Tn916* e plasmídeos conjugativos), *tetO* e *tetS* pela ligação de proteínas ao ribossomo e alteração de sua conformação, impedindo a ligação da tetraciclina ao ribossomo e inativação enzimática da tetraciclina (*tetX*), sendo esse último pouco freqüente (Chopra et al., 2001; Gilbert, 2002; Zhanel et al., 2004; Top et al., 2008). Mais recentemente, a presença de genes transferíveis *tetM* e *tetL*

foram identificados em amostras de *Enterococcus* sp. isoladas de carcaças de frangos (Frazzon et al., 2009).

2.2.4.2.4. Resistência ao cloranfenicol

O cloranfenicol é um antibiótico de amplo espectro, ativo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com atividade bacteriostática.

O principal mecanismo de resistência ao cloranfenicol consiste na sua inativação enzimática, pela expressão da enzima cloranfenicol-acetiltransferase, produzida pelo gene *catA* que acetilam a molécula do antimicrobiano impedindo a união deste com os ribossomos bacterianos (Fluit et al., 2001; Gilbert, 2002; Top et al., 2008). O gene *catA*, codificante para essa enzima, pode ser encontrado no cromossomo, bem como em plasmídeos, e a presença dos mesmos genes em cepas de enterococos, estreptococos e estafilococos sugerem que possa estar ocorrendo uma transferência horizontal desta resistência entre diferentes gêneros. O outro mecanismo importante de resistência ao cloranfenicol baseia-se na impermeabilidade da bactéria à droga. O cloranfenicol também pode atuar nas mitocôndrias dos mamíferos, o que dificulta a sua utilização pela elevada toxicidade, representada pelo alto índice de discrasias sanguíneas (Murray, 1990; Marothi et al., 2005).

2.2.4.2.5. Resistência a macrolídeos

Os antimicrobianos da classe dos macrolídeos são bacteriostáticos, podendo ter ação bactericida em concentrações elevadas ou em contato com micro-organismos muito sensíveis (Fluit et al., 2001).

Atuam inibindo a síntese de proteínas através de sua ligação reversível às subunidades ribossômicas 50S, inibindo a fase de alongação na síntese de proteínas (Rice, 2001). O principal mecanismo de resistência aos macrolídeos é conferido por uma enzima que metila um resíduo de adenina na porção 23S da subunidade 50S do RNA ribossomal, alterando o sítio de ligação antimicrobiano-ribossomo. Este fenótipo é usualmente mediado pelo gene *ermB*, que apresenta uma maior resistência, e raramente pelo gene *ermA*. O gene *mefA* codifica uma proteína de efluxo que bombeia a molécula do antibiótico para fora da célula. Esse gene parece estar localizado num elemento conjugativo e determina níveis de resistência à eritromicina mais reduzidos do que aqueles mediados pelo gene *ermB* (Piñera et al., 1998, Roberts et al., 1999; Gilbert, 2002; Lazo et al., 2006; Top et al., 2008).

2.2.4.2.6. Resistência a quinolonas

As quinolonas atuam inibindo a replicação do DNA bacteriano. Através dos canais de porinas ou da camada fosfolipídica as quinolonas penetram no citoplasma da bactéria e atuam sobre a replicação dos ácidos nucléicos através de mecanismos complexos que impedem o enrolamento do DNA. Possuem como alvo a DNA-girase e topoisomerase IV, sítio ativo mais comum em Gram-positivas (Gilbert, 2002; Walsh, 2003; Lazo et al., 2006; Top et al., 2008).

A atividade do ciprofloxacino contra *Enterococcus* é moderada e a resistência às quinolonas é comum em isolados clínicos destes microorganismos. Algumas fluorquinolonas como moxifloxacino e gatifloxacino se mostram bastante efetivas "in vitro" contra enterococos, entretanto isolados

resistentes ao ciprofloxacino são geralmente resistentes à moxifloxacino e gatifloxacino. O mecanismo de resistência ocorre basicamente por mutações nas regiões *parC* e *gyrA* do DNA bacteriano (Moreillon, 2000; Sefton, 2002; Walsh, 2003; Kolar et al., 2006; Lazo et al., 2006).

2.2.4.2.7. Resistência a glicopeptídeos

O uso de glicopeptídeos como a vancomicina e teicoplanina é uma alternativa em casos de infecções mais graves, causadas por enterococos resistentes às principais drogas antimicrobianas (Kirst et al., 1998; Courvalin, 2006).

O mecanismo de ação dos glicopeptídeos é bloquear a incorporação, no peptideoglicano, das subunidades N-ácido acetimuramico e N-acetilglucosamina, ao se ligar reversivelmente a estas moléculas. Como consequência alteram a formação da parede celular (Reynolds, 1989; Walsh et al., 2000). Enterococos resistentes à vancomicina (VRE) apresentam alteração no sítio alvo de ligação do antimicrobiano. Essa alteração ocorre pela substituição dos precursores de peptideoglicano D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Lac ou D-Ala-D-Ser. A resistência à vancomicina em enterococos pode ser associada a sete fenótipos distintos VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG e VanL, sendo o fenótipo VanL, o último a ser descrito e o fenótipo VanC, o único de resistência intrínseca (Top et al., 2008; Boyd et al., 2008).

Os mecanismos de resistência à glicopeptídeos são genotipicamente e fenotipicamente distintos e envolvem uma maquinaria complexa de enzimas responsável por perceber a presença de glicopeptídeos no local, modificar a

produção do peptídeoglicano para o fenótipo resistente e eliminar precursores de peptídeoglicano normais, de maneira que a célula passe a sintetizar, quase que exclusivamente, precursores de peptídeoglicano de fenótipo resistente (Kak & Chow, 2002; Teixeira & Facklam, 2003; Khan et al., 2005).

O fenótipo VanA codifica uma resistência de alto nível a vancomicina (MIC 64-1000 µg/mL) e a teicoplanina (MIC 16-512 µg/mL). A resistência é codificada pelo transposon *Tn1546*. O *Tn1546* tem cerca de 11Kb e pode ser encontrado no DNA cromossômico ou em plasmídeos, podendo ser transferível por conjugação (Arthur et al., 1993; Arthur et al., 1996; Centinkaya et al., 2000; Pootolal et al., 2002; Moreno et al., 2006; Courvalin, 2006; Ogier et al., 2007; Top et al., 2008).

O fenótipo VanB é menos prevalente, confere resistência à vancomicina (MIC 4-1000 µg/mL) e susceptibilidade à teicoplanina. Está associado ao gene *vanB* que por sua vez também pode estar presente em plasmídeos e no DNA cromossômico. O gene *vanB* foi encontrado nos transposons *Tn1547*, *Tn1549* e *Tn5382*, estando esse último também associado ao transporte de *pbp5*. Assim, o cluster *vanB* está associado a resistência à vancomicina e à ampicilina (Carias et al., 1998; Gold, 2001; Bazet et al., 2005; Courvalin, 2006; Top et al., 2008).

O fenótipo VanD induz a um moderado nível de resistência à vancomicina (MIC 64-128 µg/mL) e teicoplanina (MIC 4-64 µg/mL) e apresenta-se localizado no DNA cromossômico (Casadewall & Courvalin, 1999; Centinkaya et al., 2000; Sandri, 2004; Bazet et al., 2005; Poeta, 2006; Top et al., 2008).

Os fenótipos VanE e VanG codificam uma resistência reduzida à vancomicina (MIC < 16 µg/mL) e susceptibilidade à teicoplanina. Seus determinantes encontram-se no DNA cromossômico e seus fenótipos são adquiridos e induzíveis (Fines et al., 1999; McKessar et al., 2000; Centinkaya et al., 2000; Sandri, 2004; Bazet et al., 2005; Top et al., 2008).

O fenótipo VanL foi mais recentemente descoberto, codifica uma resistência adquirida de baixo nível à vancomicina (MIC 8 µg/mL) e susceptibilidade à teicoplanina, seus determinantes também se encontram no cromossomo bacteriano (Boyd et al., 2008).

Embora a dinâmica da transmissão de micro-organismos resistentes a antimicrobianos não esteja ainda bem compreendida há estudos que indicam que nichos ecológicos extrahospitalares como animais para consumo humano, ambiente de produção animal, alimentos, humanos saudáveis e ambiente aquático podem servir de reservatórios de isolados e genes envolvidos na resistência à antimicrobianos (Poeta et al., 2007, Caplin et al., 2008; Damborg et al., 2009). Bates et al. (1994) ao detectar pela primeira vez isolados VRE's em alimentos sugeriram que os VRE's poderiam contaminar humanos através da cadeia alimentar. Bertrand et al. (2000) demonstraram, através da técnica de PFGE, que isolados alimentares apresentavam perfis comuns aos isolados de humanos, reforçando a hipótese de que isolados alimentares possam servir de reservatórios ou via de transmissão da resistência à vancomicina. Recentemente Biavasco et al. (2007) estudaram a relação entre isolados de *E. faecium vanA* de diversos ambientes, e os resultados que obtiveram sugerem

que isolados de alimentos, no caso carne, podem contribuir para a disseminação deste tipo de resistência.

A água é outro meio que gera muitas preocupações e dúvidas quanto ao seu papel na transmissão e disseminação de resistência a antimicrobianos. Vários estudos têm demonstrado que um elevado número de VRE's encontram-se presentes em águas de esgotos hospitalares e de matadouros, que posteriormente são misturados aos esgotos municipais em estações de tratamento. Os tratamentos a que os esgotos são submetidos reduzem a carga bacteriana, mas não a eliminam totalmente, o que pode resultar na disseminação de isolados multirresistentes através de córregos, rios e oceanos (Novais et al., 2005; Martins da Costa et al., 2006; Martins da Costa et al., 2006; Abriouel et al., 2008; Moore et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

Foram realizadas quatro coletas de dois litros de amostras de água superficial (profundidade de cerca de um metro), em cinco diferentes pontos do Arroio Dilúvio, sendo a primeira coleta no verão, a segunda no outono, a terceira no inverno e a quarta na primavera de 2009. As amostras foram mantidas refrigeradas até a chegada ao Departamento de Microbiologia da UFRGS. Os pontos coletados são apresentados na Figura 2.

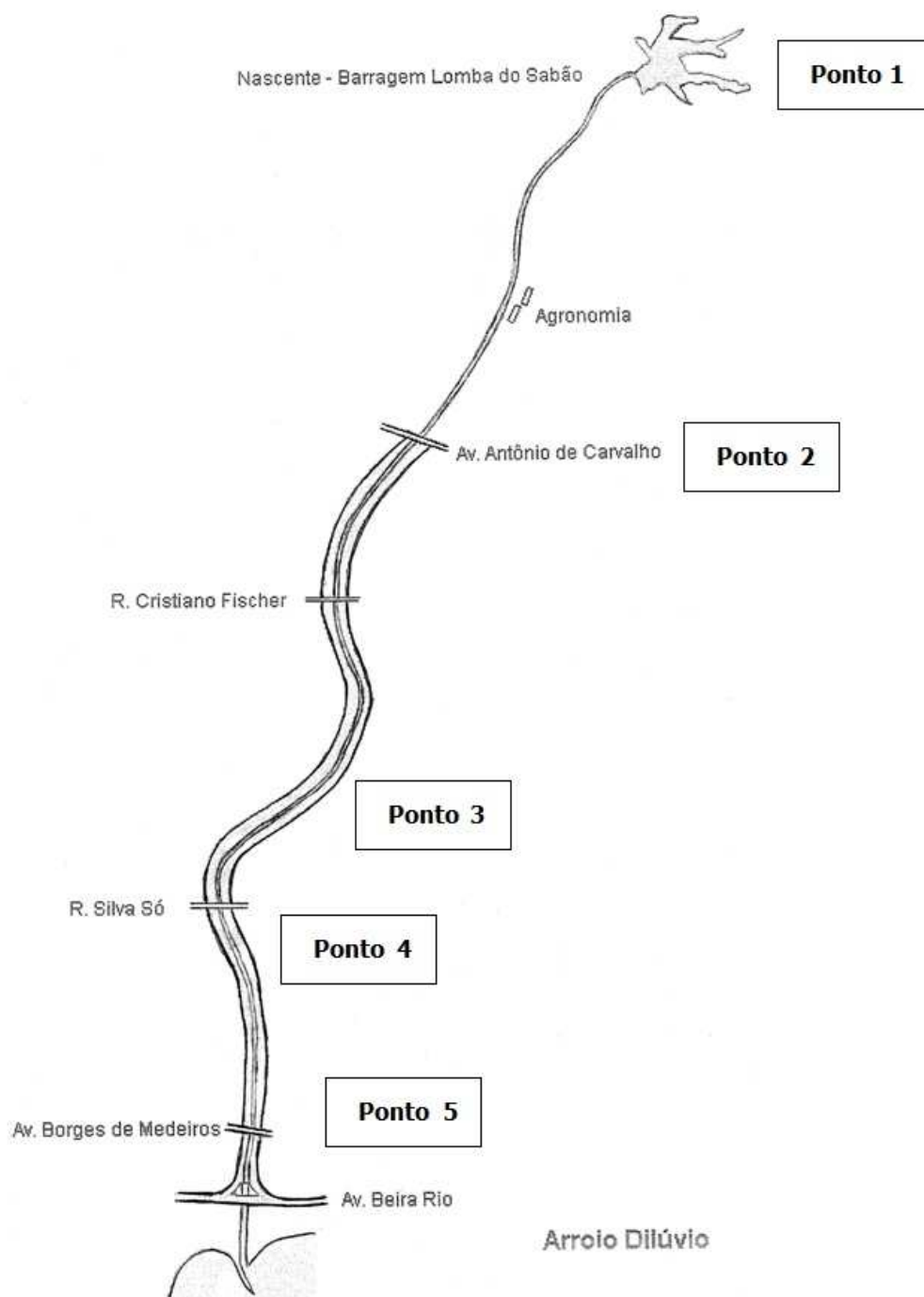


Figura 2. Mapa mostrando o percurso do Arroio Dilúvio na cidade de Porto Alegre e os pontos de coleta das amostras durante o período o ano de 2009. **Ponto 1:** nascente do arroio, na represa Lomba do Sabão; **Ponto 2:** esquina das Avenidas Ipiranga com Antônio de Carvalho; **Ponto 3:** esquina da Avenida Ipiranga com a Rua Guilherme Alves; **Ponto 4:** esquina da Avenida Ipiranga com a Rua Ramiro Barcelos; **Ponto 5:** esquina das Avenidas Ipiranga com Borges de Medeiros. Fonte: Faria, C. M.; Morandi, I. C. Pesquisa Ecos, Ano 3 – Nº 6: p. 12, 2002.

3.2. Semeadura e isolamento

No Laboratório de Microbiologia da UFRGS, cada uma das cinco amostras coletadas foi semeada, inicialmente, em meio seletivo para enterococos, Caldo Azida Dextrose (Himedia, Mumbai, Índia), sendo inoculado 1 mL de cada amostra de água em 9 mL de caldo . Em seguida foram realizadas diluições seriadas até 10^{-5} e incubadas por 24 horas à 35° C. Após a incubação, 100µL de caldo de cada diluição foram semeados em placas contendo meio Agar Infusão de Cérebro e Coração - BHI (Himedia, Mumbai, Índia), acrescidos de 6,5% de NaCl e incubadas, por 24 horas à 35° C. Das placas em que houve crescimento foram selecionadas aleatoriamente (método dos quatro quadrantes em placa) 20 colônias de cada ponto de coleta e re-isoladas por esgotamento em Agar BHI.

3.3. Identificação fenotípica para confirmação do gênero

Para confirmação do gênero os isolados crescidos em meio BHI, foram caracterizados com base em sua morfologia e comportamento tintorial pelo método de coloração de Gram, ausência de produção de catalase e hidrólise da esculina em presença de 40% de sais biliares.

3.3.1. Coloração de Gram

As colônias isoladas foram submetidas à coloração de Gram e observadas ao microscópio. Cocos Gram-positivos dispostos aos pares ou em cadeias curtas foram testados quanto à produção de catalase.

3.3.2. Teste da Catalase

Para verificação da produção de catalase as colônias isoladas foram repicadas em ágar BHI e após incubação à 35° C por 24 horas, foi adicionado peróxido de hidrogênio a 3% (Lifar, Porto Alegre, RS, Brasil) sobre as colônias e observado a formação (positivo), ou não (negativo), de bolhas de ar. Os isolados catalase negativos, que não produziram bolhas, foram submetidos aos demais testes.

3.3.3. Hidrólise da esculina em presença de sais biliares

Os isolados identificados como catalase negativos foram inoculados no meio ágar Bile Esculina (Himedia, Mumbai, Índia) e incubados à 35° C por 24 horas. A presença de coloração escura, em torno do crescimento da colônia, indica resultado positivo, ou seja, o isolado apresenta, neste caso, a capacidade de hidrolisar a esculina em presença de bile, glicose e esculina.

3.4. Identificação das espécies de *Enterococcus* sp.

A identificação dos *Enterococcus* em espécies foi realizada por meio dos seguintes testes bioquímicos: fermentação dos carboidratos arabinose, manitol, rafinose, sacarose, metil-alfa-D-piranosídeo (MGP) e sorbitol, hidrólise da arginina, utilização do piruvato a 1% e produção de pigmento amarelo. Os resultados obtidos foram analisados segundo Teixeira & Facklam, 2003, como mostra a Tabela 1.

3.4.1. Fermentação de carboidratos

A fermentação dos carboidratos foi realizada em água peptonada, sendo 1 g de peptona caseína, 0,1 g de cloreto de sódio e 100 mL de água destilada. A esse meio base foi acrescido, 1 g de açúcar (1%) e 4 gotas do indicador de pH púrpura de bromocresol. O pH foi ajustado para 6,8 e os meios contendo os diversos carboidratos foram autoclavados por 10 min a 120°C. Os isolados crescidos em ágar BHI por 18-24 horas à 35°C foram diluídos em tubos estéreis contendo 3 mL de solução salina 0,9%, até atingir o padrão 0,5 da escala de McFarland, desses inóculos foram retirados 100 µL que foram pipetados em tubos de ensaio contendo 2 mL de meio base com o carboidrato a ser testado.

O resultado foi considerado positivo quando a cor do meio alterava de roxo (cor original) para amarelo, após incubação à 35°C, por um período de até sete dias a contar da data da inoculação, sendo a leitura realizada a cada 24 horas.

3.4.2. Hidrólise da arginina

A descarboxilação da arginina foi verificada em um meio base contendo 1 g de peptona de carne, 0,6 g de extrato de levedura, 0,2 g de glicose, 200 mL de água destilada e 8 gotas do indicador de pH púrpura de bromocresol. Em uma porção correspondente a 50% do meio base foi acrescido 1 g de arginina (1%). Os dois meios foram autoclavados por 10 min à 120°C e o pH ajustado para 6,8.

Culturas crescidas por 18-24 horas em meio ágar BHI à 35°C foram diluídas em tubos estéreis contendo 3 mL de solução salina 0,9% até atingir o padrão 0,5 da escala de McFarland. Desses inóculos foram retirados 100 µL, que foram pipetados em tubos de ensaio contendo 2 mL de meio base com a arginina e contendo apenas o meio base sem o aminoácido (controle negativo). Em todos os tubos, de teste e controle, foram adicionadas 3 ou 4 gotas de óleo mineral estéril, para criar um ambiente de anaerobiose.

A prova foi considerada positiva quando após 24-48 horas, a 35°C de incubação, a coloração original roxa, permaneceu roxa, indicando a alcalinização do meio, e negativa quando a coloração passou a ser amarela, indicando a acidificação do meio.

3.4.3. Utilização do piruvato a 1%

A utilização do piruvato a 1%, por parte do isolado, foi testada em meio contendo 1 g de peptona caseína, 0,5 g de extrato de levedura, 0,5 de K₂HPO₄, 0,5 g de NaCl, 1 g de piruvato de sódio, 100 mL de água destilada e 10 gotas do indicador de pH azul de bromotimol. Os isolados crescidos por 18-24 horas em ágar BHI à 35°C foram diluídos em tubos estéreis contendo 3 mL de solução salina 0,9% até atingir o padrão 0,5 da escala de McFarland. Desses inóculos foram retirados 100 µL que foram pipetados em tubos de ensaio contendo 2 mL de meio base com o piruvato a 1%.

O teste foi considerado positivo quando após incubação à 35°C por sete dias consecutivos, o meio passou da cor original verde para amarelo,

indicando a utilização do piruvato pelo isolado e a consequente acidificação do meio. As leituras foram feitas a cada 24 horas a partir da data de inoculação.

3.4.4. Produção de pigmento

A prova da produção de pigmento foi realizada em meio ágar BHI. Isolados crescidos por 24 horas à 35°C foram removidos com “swab” e observados. As colônias que apareceram com coloração amarela no “swab” foram consideradas positivas e a ausência de coloração ou presença de coloração creme, acinzentada ou amarelo pálido, foram consideradas negativas.

3.5. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

Todos os isolados foram submetidos ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos pelo método de Kirby e Bauer (método de difusão de disco antimicrobiano em Agar Mueller Hinton). Como controles, positivo e negativo, foram utilizadas cepas de *E. faecalis* ATCC 51299 e *E. faecium* ATCC 53519, respectivamente.

Os isolados a serem testados foram semeados em Agar BHI (35°C/ 24 horas) e colônias provenientes desta cultura foram diluídas em solução salina 0,9%, na escala 0,5 de McFarland. Com o auxílio de “swab” a suspensão obtida foi inoculada sobre a superfície de uma placa de Agar Mueller Hinton (semeadura em cinco direções) e dispostos os discos de papel impregnados com concentrações padronizadas de diferentes antimicrobianos: ampicilina (10µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg),

gentamicina (120µg), nitrofurantoína (300µg), norfloxacin (10µg), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30µg).

A leitura e medição dos halos de inibição em torno do disco foram realizadas após 18-24 horas de incubação à 35°C. Os isolados foram classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes, conforme tabela elaborada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e identificação fenotípica das espécies de *Enterococcus* sp.

Foram isolados 348 *Enterococcus* sp. de amostras de água coletadas de cinco pontos distintos do arroio Dilúvio, em quatro períodos do ano de 2009. Todos foram submetidos a provas fisiológicas para identificação de suas espécies. Desses isolados, 216 (62,07%) foram identificados como *E. faecium*, 47 (13,50%) como *E. faecalis* e 42 (12,07%) como *E. casseliflavus*. Neste estudo, 43 (12,36%) isolados não puderam ser identificados em nível de espécie.

Devido à grande similaridade metabólica encontrada entre representantes do gênero *Enterococcus*, raramente a identificação fenotípica das espécies contempla os 100% dos isolados. Percentuais semelhantes de enterococos, identificados em nível de espécie, foram encontrados por Hayes et al. (2003), Dias (2009), Cassenego et al. (2010) e Furukawa et al. (2011), com isolados obtidos a partir de amostras de carne, ambientes de suinocultura, cloaca de frango e águas residuais, respectivamente. Devriese et al. (1993) descreveram que *E. faecium* isolados de humanos e frangos diferem na fermentação de carboidratos, condição que pode dificultar a sua identificação.

Neste estudo foi observada uma elevada prevalência de *E. faecium* entre os isolados. Embora a espécie predominante nas fezes de humanos seja *E. faecalis*, diversos estudos realizados em diferentes regiões do mundo relatam resultados semelhantes a este. Svec & Sedláček (1999), na República Checa, detectaram 21,42% de *E. faecium* e 18,25% de *E. faecalis*, entre bactérias isoladas de diferentes fontes de águas superficiais. Manero et al. (2002), na Espanha, isolaram enterococos de três diferentes locais com contaminação fecal, em dois deles (esgoto urbano e esgoto hospitalar), observaram a prevalência de *E. faecium* com 41% e 44%, respectivamente. Em outro estudo realizado na Eslováquia, Pangallo et al. (2004), relataram a prevalência de *E. faecium* (39,34%), sendo *E. faecalis* (11,47%) a segunda espécie mais prevalente, entre os enterococos isolados de amostras de água de diferentes ambientes, tais como, rio Danúbio, estações de tratamento de esgoto, efluentes de indústrias de derivados lácteos e excrementos de ovelhas. No Irã, Saifi et al. (2008), encontraram 64% de *E. faecium* e 29% de *E. faecalis*, entre enterococos isolados de três estações de tratamento de esgoto. Em Portugal, Dias (2009), também observou a prevalência de *E. faecium* (56%), entre enterococos isolados de amostras oriundas de ambientes de suinocultura. Mais recentemente, Furukawa et al. (2011), no Japão, ao analisarem genotipicamente isolados de enterococos de amostras de água de uma estação de tratamento de esgoto e de um rio com contaminação fecal, encontraram 73,75% de *E. faecium* e apenas 5% de *E. faecalis*.

No Brasil, a prevalência de *E. faecium*, também foi detectada entre isolados de origem aviária analisados em estudos realizados em São Paulo e

em Viçosa (MG), com 52,9% e 90%, respectivamente (Leme, 1998; Oliveira, 2006). O conhecimento sobre a composição de espécies de enterococos na microbiota intestinal humana e de outros animais, bem como de águas residuais é duvidoso, pois são muitas as variáveis possíveis. A dieta, a localização geográfica, o clima e o tipo de efluente descartado são fatores que podem influenciar muito a distribuição das espécies.

Em geral, as espécies mais prevalentes na microbiota intestinal humana são *E. faecium* e *E. faecalis*, também considerados os principais agentes de infecções enterocócicas, com predominância para *E. faecalis* (Teixeira & Facklam, 2003).

4.2. Diversidade de *Enterococcus* sp., por ponto de coleta

A distribuição e frequência das espécies de enterococos isoladas, por ponto de coleta, encontram-se demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição e frequência das espécies de *Enterococcus* sp., por ponto de coleta (n=348).

Ponto de coleta – n (%)	Nº de isolados (%)			
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>Enterococcus</i> sp.
Ponto 1 – 44 (12,64)	0	17 (38,64)	27 (61,36)	0
Ponto 2 – 67 (19,25)	48 (71,64)	1 (1,49)	13 (19,41)	5 (7,46)
Ponto 3 – 76 (21,84)	44 (57,89)	17 (22,37)	2 (2,63)	13 (17,11)
Ponto 4 – 77 (22,13)	56 (72,73)	9 (11,69)	0	12 (15,58)
Ponto 5 – 84 (24,14)	68 (80,95)	3 (3,57)	0	13 (15,48)

Na nascente do arroio (Ponto 1), houve predomínio da espécie *E. casseliflavus* (61,36%), seguida de *E. faecalis* (38,64%). A elevada prevalência de *E. casseliflavus* neste ponto é facilmente explicada uma vez que plantas, solo e regiões com mata, como é o caso do Parque Saint Hilaire, onde se localiza a nascente do arroio, são o seu nicho natural. Em águas de nascente de rios e córregos, que são depositários de folhas e resíduos de origem vegetal, também são frequentemente encontrados *E. casseliflavus* (Collins et al., 1984). A outra espécie isolada neste ponto foi *E. faecalis*, espécie típica do TGI de animais de sangue quente. Neste ponto, vivem muitos animais silvestres, cães e cavalos utilizados pelos guardas florestais. A ação antrópica restringe-se a circulação de poucos visitantes e dos funcionários do próprio parque. Com isso, a água que nasce no arroio é isenta de esgoto de qualquer natureza, os detritos encontrados são basicamente a matéria orgânica produzida pela própria mata e animais que nela vivem. Essa população, residente e visitante, pode explicar a presença de *E. faecalis* nas águas da nascente do arroio.

O ponto 2, localizado entre as Avenidas Ipiranga e Antônio de Carvalho, é um ponto bem urbanizado, mas que apresenta o predomínio de casas e não de edifícios, sendo que muitas delas não se encontram ligadas ao sistema de esgotamento sanitário, liberando seus efluentes diretamente no solo ou no sistema de esgoto pluvial, que é lançado no arroio. Neste ponto, foi detectada a prevalência de *E. faecium* com 71,64% dos isolados. Esta espécie é uma das mais freqüentes no TGI humano e de outros animais. A prevalência de *E. faecium*, neste ponto, pode ser justificada pelo fato de diversos domicílios

liberarem seus efluentes sanitários nas redes pluviais. Além disso, muitos moradores de vilas como Vila Pinto, Divinéia e Mato Sampaio, que ficam próximas ao arroio, criam animais como galinhas e cavalos, sendo esses últimos utilizados na coleta e transporte de lixo, sem instalações adequadas, contaminando o solo com lixo e excrementos. O esgoto cloacal, quando não coletado na rede pluvial, é disposto diretamente no solo. As condições higiênicosanitárias dessas comunidades são precárias. Todos esses contaminantes acabam sendo liberados, direta ou indiretamente, no arroio e interferem na qualidade de suas águas e diversidade dos micro-organismos que nele vivem. Este ponto também apresentou um significativo percentual de *E. casseliflavus* (19,40%) que pode ser explicado pela grande quantidade de vegetação que ainda tem às margens do arroio e por esse ponto de coleta receber micro-organismos que são carregados da nascente do arroio. Ou seja, parte dos *E. casseliflavus* encontrados na nascente, são transportadas para o ponto seguinte, que é o ponto 2.

Os demais pontos de coleta, pontos 3 a 5, correspondem à parte do arroio já canalizada e encontram-se em áreas densamente urbanizadas sendo, portanto, bastante impactadas. O ponto 3, localizado na esquina da Avenida Ipiranga com a Rua Guilherme Alves, caracteriza-se por ser uma área comercial e residencial, nesta área encontram-se diversas vilas, tais como Morro da Cruz, Morro da Tuca e João Pessoa, além do Hospital São Lucas (PUC-RS), do campus da Pontifícia Universidade Católica, do Shopping Bourbon e da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) – LACEN, todos produtores de grande quantidade de efluentes e com uma

elevada circulação de pessoas. Neste ponto houve um predomínio de *E. faecium* (57,89%), seguido de *E. faecalis* (22,37%), embora a prevalência de *E. faecium* tenha sido mais discreta, quando comparada com os pontos 2, 4 e 5. A razão desta distribuição de espécies mais homogênea, no ponto 3, pode ser devido a melhorias no saneamento desta região. Segundo estudo de Faria & Morandi (2002), foram realizadas diversas obras pelo DEP, visando à melhoria das condições da água do arroio, entre as ruas Cristiano Fischer e Santa Cecília, que, apesar de não ter resolvido o problema na sua totalidade, surtiram algum efeito, ainda que pontual. Neste trajeto, foram executadas obras de esgotamento sanitário, sendo que a contribuição mais significativa foi à desvinculação dos efluentes do Complexo da PUC (universidade e hospital) que eram lançados diretamente no arroio. No ponto 4, localizado na esquina da Avenida Ipiranga com a Rua Ramiro Barcelos, encontram-se o Hospital de Clínicas e o Campus Saúde, ambos da UFRGS, neste ponto houve mais uma vez a prevalência de *E. faecium* (72,73%), seguido de *E. faecalis* (11,69%). No ponto 5, último ponto de coleta, localizado na esquina das Avenidas Ipiranga e Borges de Medeiros, foi observada a mais alta prevalência de *E. faecium* (80,95%) entre os isolados. Esta área, local onde o arroio Dilúvio deságua no lago Guaíba, caracteriza-se por apresentar muitos prédios residenciais e comerciais, além de um grande centro de compras, o Shopping Praia de Belas. Como em outros pontos, o sistema de esgotamento sanitário de muitos domicílios mantém-se ligado à rede pluvial, contribuindo de forma significativa para a contaminação do arroio.

Esses esgotamentos sanitários que são liberados na rede puvial que deságua no arroio e os efluentes e resíduos de diferentes animais que vão se acumulando ao longo de todo o trajeto do arroio, acrescidos de contaminantes provenientes do lixo, que são descartados diretamente no solo e carreados com a água da chuva, possivelmente expliquem a prevalência de *E. faecium*, encontrada nestes pontos (4 e 5).

Por essas e provavelmente por outras razões a prevalência de uma ou de outra espécie de enterococos em águas residuais varia muito. Assim como neste estudo, a predominância de *E. faecium* em águas residuais, também foi observado na Polônia e no Reino Unido (Blanch et al., 2003; Lukzkiewicz et al., 2010), enquanto que estudos realizados em Portugal e nos Estados Unidos apontaram *E. hirae* como a espécie mais abundante (Bonilla et al., 2006; Ferreira da Silva et al., 2006).

4.3. Diversidade de *Enterococcus* sp., por período do ano

As coletas das amostras foram realizadas em quatro períodos do ano de 2009, sendo a primeira no verão, a segunda no outono, a terceira no inverno e a quarta na primavera. A Tabela 3 mostra a distribuição e a freqüência das espécies de enterococos isoladas nos quatro períodos do ano.

Tabela 3. Distribuição e frequência das espécies de *Enterococcus* sp., por período do ano (n=348).

Período do ano – n (%)	Nº de isolados (%)			
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>Enterococcus</i> sp.
Janeiro – 89 (25,58)	50 (56,18)	25 (28,09)	8 (8,99)	6 (6,74)
Abril – 97 (27,87)	37 (38,14)	8 (8,25)	27 (27,84)	25 (25,77)
Setembro – 79 (22,70)	73 (92,41)	5 (6,33)	0	1 (1,26)
Dezembro – 83 (23,85)	56 (67,47)	9 (10,84)	7 (8,44)	11 (13,25)

A análise dos resultados demonstra uma prevalência de *E. faecium* nas quatro estações do ano, sendo que, no período correspondente ao inverno, *E. faecium* representou 92,41% dos isolados.

No inverno, nenhuma espécie de enterococos foi isolada no ponto 1, e na primavera, foi detectada uma baixa prevalência de enterococos, com apenas sete isolados. Isto pode ser devido à grande precipitação de chuva que ocorreu em Porto Alegre nos períodos que antecederam a essas coletas. Conforme dados fornecidos pelo Instituto de Meteorologia (Inmet) – 8º Distrito, no mês agosto de 2009 ocorreu uma precipitação de 264,5 mm, enquanto que o esperado para o período era 134,3 mm e no mês de novembro de 2009, a precipitação foi de 287,6 mm, enquanto que o esperado era de 101,7 mm. Esse excesso de chuva inundou o arroio, sendo a sua nascente o ponto de coleta mais prejudicado. Por ser uma área mais natural, não conta com mecanismos artificiais de escoamento e o seu solo ficou encharcado por um longo período,

sem condições de absorver tanta água. Desse modo, as amostras ficaram naturalmente diluídas prejudicando o isolamento das espécies. Esses dados, aliados ao fato de que, na nascente, não ocorre descarte de esgoto cloacal, provavelmente justifiquem a ausência de enterococos neste ponto, no inverno e, o isolamento de apenas sete enterococos na primavera.

A Tabela 4 mostra a distribuição das espécies, por ponto de coleta e por período do ano.

Tabela 4. Distribuição das espécies de *Enterococcus* sp. isoladas nas águas do arroio Dilúvio, por ponto de coleta e por período do ano (n=348).

Pontos de Coleta (n)	Verão (n=89)				Outono (n=97)				Inverno (n=79)				Primavera (n=83)			
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>Enterococcus</i> sp.
Ponto 1 (44)	0	17	2	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	7	0
Ponto 2 (67)	7	0	5	1	8	0	8	3	19	0	0	0	14	1	0	1
Ponto 3 (76)	12	2	1	1	5	7	1	7	20	2	0	0	7	6	0	5
Ponto 4 (77)	11	5	0	2	11	1	0	8	14	3	0	1	20	0	0	1
Ponto 5 (84)	20	1	0	2	13	0	0	7	20	0	0	0	15	2	0	4

No mês de abril, segundo o Inmet – 8º Distrito, a precipitação pluvial foi de 31,0 mm, enquanto que o esperado era de 95,2 mm. Neste mês foi realizada a coleta correspondente ao outono, coleta em que houve a mais homogênea distribuição das espécies, onde *E. faecium* correspondeu a 38,14%, *E. casseliflavus* a 27,83%, *E. faecalis* a 8,25% e *Enterococcus* sp. a 25,77% dos isolados. A baixa precipitação ocorrida nesse período provavelmente justifique esta distribuição mais homogênea.

Em estudo realizado no litoral sul da Califórnia (EUA) por Ferguson et al. (2005), com amostras de água e sedimentos marinhos de regiões entre-marés, foi observada a prevalência de *E. faecium* em todas as amostras sedimentares. Esses resultados sugerem que a ressuspensão de sedimentos de um manancial, pode aumentar a concentração, na água, de espécies que nele se encontrem. Se nos sedimentos do Arroio Dilúvio, assim como nos sedimentos do litoral sul da Califórnia, também ocorre à prevalência de *E. faecium*, esta pode ser uma das razões da elevada prevalência desta espécie encontrada neste estudo e da distribuição mais homogênea das espécies verificada no outono, período em que houve uma precipitação pluvial abaixo do esperado. Em duas das quatro coletas realizadas (inverno e primavera) houve precipitação muito acima do esperado, nos períodos que antecederam as mesmas, e estas foram às coletas em que houve a maior prevalência de *E. faecium* (92,41% e 67,47%), respectivamente. É provável que a intensa precipitação ocorrida tenha provocado a ressuspensão dos sedimentos e de *E. faecium*, que nele se encontravam, elevando a prevalência desta espécie, nestes períodos do ano.

As chuvas interferem diretamente nas concentrações de microorganismos de um manancial. No momento que a chuva incide diretamente sobre a superfície da água, ocorre uma melhora nas condições sanitárias, devido ao processo de diluição. Entretanto, se a intensidade e duração da precipitação for muito grande, poderá ocorrer o carreamento de contaminantes existentes nas superfícies urbanas e/ou agrícolas, provocando assim a contaminação dos corpos aquáticos. Além disso, a força da chuva pode provocar o revolvimento de sedimentos, ocasionando ressuspensão dos microorganismos que se encontram no leito do manancial, e o aumento de sobrevivência dos mesmos. Em função da influência das chuvas na balneabilidade, na Califórnia (EUA), são emitidos boletins informativos para a população, quando a concentração das bactérias indicadoras de contaminação fecal ultrapassa os padrões sanitários para as águas recreativas ou quando ocorre precipitação com intensidade e duração acima do limite pré-estabelecido para a segurança sanitária em corpos aquáticos.

4.4. Resistência de *Enterococcus* sp.

Todos os 348 isolados submetidos aos testes de susceptibilidade foram sensíveis à ampicilina e a gentamicina, 87,93% foram resistentes a eritromicina, 41,95% a nitrofurantoína, 37,93% a norfloxacin, 33,62% a ciprofloxacina, 6,03 ao cloranfenicol, 3,73% a tetraciclina e 0,6% a vancomicina (Figura 3).

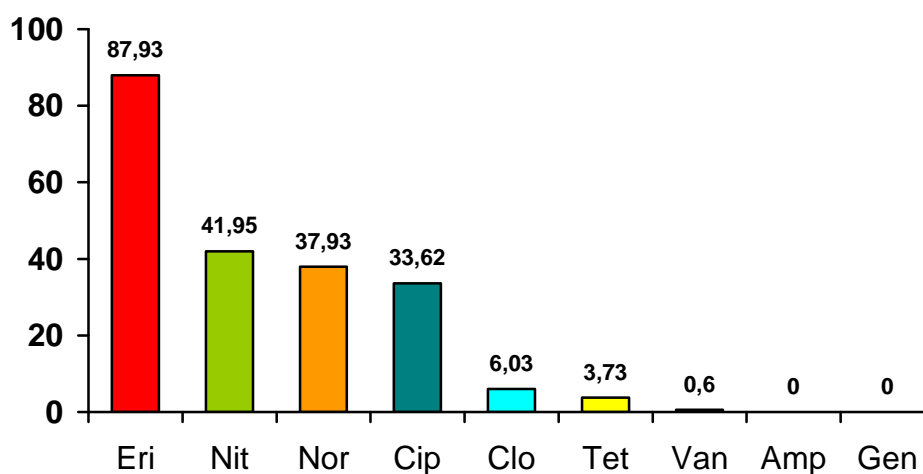


Figura 3. Percentual de resistência de isolados de enterococos frente aos antimicrobianos: eritromicina (Eri), nitrofurantoína (Nit), norfloxacina (Nor), ciprofloxacina (Cip), cloranfenicol (Clo), tetraciclina (Tet), vancomicina (Van), ampicilina (Amp) e gentamicina (Gen).

E. faecium apresentou elevada resistência à eritromicina e à nitrofurantoína e moderada resistência às quinolonas (Cip e Nor). *E. casseliflavus* foi muito resistente à eritromicina e à norfloxacina e moderadamente resistente à ciprofloxacina. Já *E. faecalis*, o principal agente das infecções enterocócicas, apresentou alta resistência apenas à eritromicina, sendo moderadamente resistente às quinolonas (Cip e Nor). A figura 4 apresenta o perfil de resistência das espécies isoladas frente aos antimicrobianos testados.

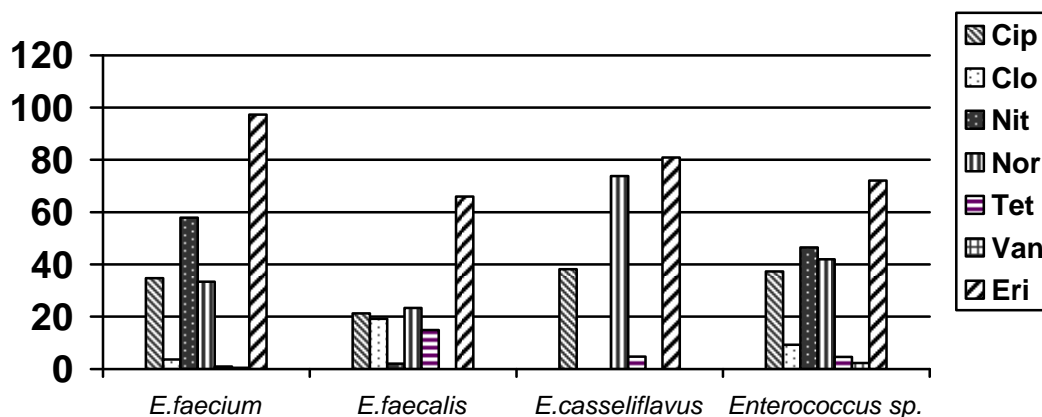


Figura 4. Percentual de espécies de *Enterococcus* sp., resistentes aos antimicrobianos testados: ciprofloxacina (Cip), cloranfenicol (Clo), nitrofurantoína (Nit), norfloxacina (Nor), tetraciclina (Tet), vancomicina (Van) e eritromicina (Eri).

A ampicilina é o antibiótico de primeira escolha para infecções enterocócicas de menor gravidade. A resistência a este antimicrobiano na espécie *E. faecalis* é pouco frequente ao contrário do que ocorre com as amostras de *E. faecium*, que são geralmente resistentes a maioria dos antimicrobianos, especialmente a ampicilina (Murray, 2000). Entretanto, vários estudos relatam alta sensibilidade à ampicilina entre isolados de *E. faecium*.

No Irã, Saifi et al. (2008) detectaram apenas 18% de resistência à ampicilina, entre isolados de *E. faecium*, obtidos a partir de amostras de água de estações de tratamento de esgoto. Em recente estudo realizado em Portugal, Macedo et al. (2011), observaram 100% de sensibilidade à ampicilina entre os isolados de *E. faecium* oriundos de amostras de água não-tratada para consumo humano. Estudos realizados no Brasil também relatam resultados semelhantes, com alta sensibilidade à ampicilina, Hörner et al. (2005),

observaram um padrão de resistência à ampicilina de 21%, entre seus isolados clínicos de *E. faecium* e Cassenego et al. (2010), observaram 100% de sensibilidade entre *E. faecium* isolados de cloaca de frango. Há, no entanto, estudos realizados em Portugal, Suécia e China, que relatam alta resistência à ampicilina, com taxas de 70%, 21,5% e 45,3%, respectivamente (Cristino-Melo, 1998; Torell et al., 1999; Ting-Ting et al., 2006).

Da mesma forma, há divergências quanto aos resultados apresentados por estudos que testaram a resistência de isolados à gentamicina. Neste estudo, a sensibilidade a esse agente foi de 100%, e em outro, realizado por Martins da Costa et al. (2006), com águas residuais e amostras de matadouros de aves, foi observado 0,4% de resistência à gentamicina. Entretanto, em outro estudo, realizado na Polônia, também com amostras ambientais, os isolados de enterococos apresentaram uma resistência de aproximadamente 35% (Luczkiewicz et al., 2010). Com amostras clínicas, os resultados também foram conflitantes, enquanto Teixeira (2007) encontrou um padrão de 31,3% de resistência e Bender et al. (2010) encontrou um padrão de 23,2%, Bedendo et al. (2003) encontrou 10,3% e Batistão (2010) 3,3%.

O padrão de resistência à eritromicina encontrado foi muito elevado e, em se tratando de amostras ambientais, o dado é preocupante. A prevalência de enterococos resistentes a eritromicina em águas residuais e outras amostras ambientais tem sido amplamente divulgado na literatura, com taxas de resistência de até 82% (Blanch et al., 2003; Ferreira da Silva et al., 2006; Martins da Costa et al., 2006; Teixeira, 2007; Bender et al., 2010; Luczkiewicz et al., 2010).

A resistência apresentada pelos isolados à nitrofurantoína foi surpreendente, embora já tenham sido descritos padrões semelhantes em estudos realizados com amostras clínicas e ambientais. Hörner et al. (2005) em pesquisa realizada com isolados de amostras colhidas de pacientes ambulatoriais e internados em hospital de Santa Maria (RS) observaram resistência de 50% à nitrofurantoína entre *E. faecium*. Em Portugal, Martins da Costa et al. (2006) detectaram 34% de resistência, entre enterococos isolados de amostras ambientais e, na Polônia, Luczkiewicz et al. (2010) constataram uma frequência de 53% de resistência, entre enterococos isolados de águas residuais de uma estação de tratamento de esgoto. A resistência a esse fármaco é alarmante, uma vez que ele é amplamente utilizado no tratamento de infecções urinárias, principal infecção causada por enterococos.

Com relação às quinolonas testadas neste estudo, foram observadas taxas semelhantes de resistência à ciprofloxacina e norfloxacina, 33,62% e 37,93%, respectivamente. Pesquisas realizadas com amostras clínicas têm apresentado resultados similares (Hörner et al., 2005; Teixeira, 2007; Bender et al., 2008).

Embora seja crescente o surgimento de enterococos resistentes à vancomicina, neste estudo, apenas dois isolados apresentaram padrão de resistência. Revisando a literatura observa-se que diversos trabalhos publicados, apresentam resultados semelhantes a este (Bedendo et al., 2003; Hörner et al., 2005; Martins da Costa et al., 2006; Bender et al., 2010; Luczkiewicz et al., 2010).

Com relação aos demais antimicrobianos testados, cloranfenicol e tetraciclina, ambos apresentaram taxas relativamente baixas de resistência, 6,03% e 3,73%, respectivamente. O pequeno número de isolados resistentes ao cloranfenicol está de acordo com outros estudos realizados, o mesmo não ocorre com a tetraciclina. Amostras clínicas e ambientais têm apresentado taxas de resistência, de moderadas a elevadas, a esse agente. No entanto, Martins da Costa et al. (2006) também observaram resultados semelhantes a este, com 4,6% dos enterococos isolados, resistentes ao cloranfenicol (Dias, 2009; Cassenego et al., 2010; Batistão, 2010).

A figura 5 apresenta o perfil de multirresistência dos isolados frente às diferentes classes de antimicrobianos testadas. Os resultados demonstram que 93,96% dos isolados foram resistentes a pelo menos uma classe de antimicrobianos, 44,25% a duas classes, 19,83% a três classes e 2,01% a quatro classes.

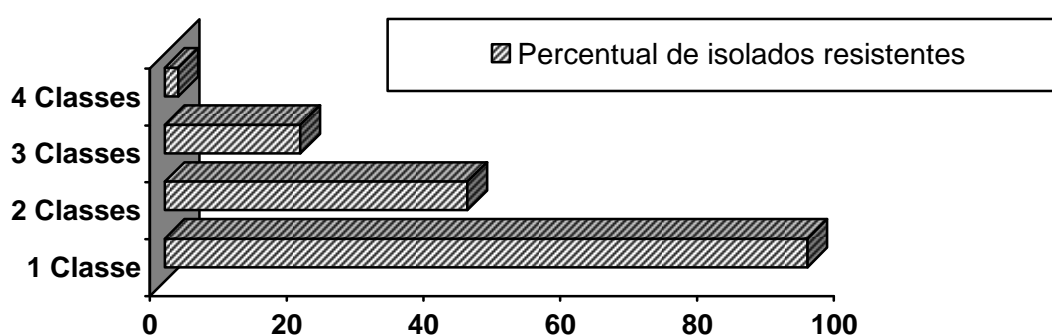


Figura 5. Perfil de resistência de *Enterococcus* sp. frente às diferentes classes de antimicrobianos testadas.

Analisando o desempenho dos isolados frente à utilização dos antimicrobianos testados constata-se que a espécie que apresentou percentual de resistência mais elevado foi *E. faecium* com 74,07% dos isolados resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos. Em seguida vieram *E. casseliflavus* com 66,67% e *E. faecalis* com 36,17%. A figura 6 mostra os percentuais de resistência das espécies de *Enterococcus* sp. isoladas.

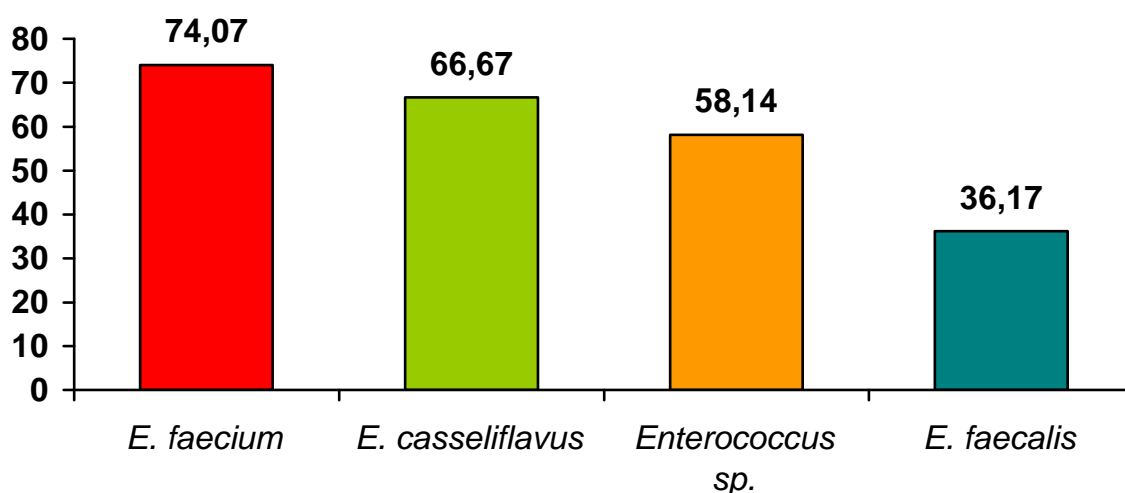


Figura 6. Percentual de *Enterococcus* sp. multirresistentes (duas ou mais classes), frente às diferentes classes de antimicrobianos testadas: aminoglicosídeos, β -lactâmicos, cloranfenicol, glicopeptídeos, macrolídeos, quinolonas e tetraciclina.

A multirresistência apresentada por *E. faecium*, neste estudo encontra amplo respaldo na literatura. *E. faecium* são intrinsicamente resistentes à β -lactâmicos e aminoglicosídeos e podem adquirir resistência à ampicilina, aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina, quinolonas e glicopeptídeos e oxazolidinonas (Top et al., 2008).

Em estudo realizado por Martins da Costa et al. (2006) foi observada uma taxa de 37,1% de enterococos isolados de amostras ambientais,

resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos. Saifi et al. (2008) relataram multirresistência entre *E. faecium* e *E. faecalis* isolados de água de estações de tratamento de esgoto e, mais recentemente, Macedo, et al. (2011) observaram elevada taxa de multirresistência, com 57% de enterococos isolados de água não tratada para consumo humano, resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos.

A capacidade de micro-organismos adquirirem resistência a várias classes de antimicrobianos pode estar relacionada à exposição sequencial a diferentes drogas ou a aquisição de elementos genéticos móveis (Poole, 2005).

4.5. Resistência de *Enterococcus* sp., por ponto de coleta

Os resultados obtidos com os testes de susceptibilidade à antimicrobianos encontram-se representados na tabela 5.

Tabela 5. Resistência de *Enterococcus* sp. isolados do arroio Dilúvio, por ponto de coleta e por período do ano. (n=348) (resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos)

Pto de Coleta (n)	Nº Isolados Resistentes (%)	Período do Ano (n)	Nº Isolados Resistentes (%)
Ponto 1 (44)	18 (40,90)	Janeiro (89)	41 (46,07)
Ponto 2 (67)	52 (77,61)	Abril (97)	74 (76,29)
Ponto 3 (76)	32 (42,10)	Setembro (79)	60 (75,95)
Ponto 4 (77)	59 (76,62)	Dezembro (83)	55 (66,26)
Ponto 5 (84)	69 (82,14)		

Os resultados indicam que o ponto 1 (40,90%) apresentou o menor percentual de isolados resistentes, e por sua vez o ponto 5 (82,14%), o maior percentual. O perfil de resistência detectado nestes pontos corresponde ao esperado, uma vez que o ponto 1 (nascente do arroio) fica em uma área bastante preservada, onde não ocorre liberação de esgoto, enquanto que o ponto 5 (foz do arroio) localiza-se numa área muito urbanizada que acumula esgoto residencial e efluentes de diversas origens que vão sendo descartados ao longo de todo o percurso do arroio. O ponto 2, localizado em uma área urbanizada, fica próximo à diversas vilas e loteamentos irregulares, cujo descarte de lixo, esgoto e todo o tipo de material tóxico, ou não, no arroio, é uma prática comum. O percentual de resistência de 77,61%, apesar de elevado, encontrado neste ponto pode refletir a realidade. Os pontos 4 (76,62%) e 5 (82,14%), também apresentaram altas taxas de resistência que, da mesma forma, são justificáveis, por encontrarem-se localizados em áreas ainda mais urbanizadas e sujeitas a descarte de esgoto não tratado. Além disso, esses pontos correspondem à porção terminal do arroio, sendo próximo à sua foz, no lago Guaíba. Isto significa que nas suas águas encontram-se materiais, diferentes substâncias e moléculas, oriundas de medicamentos descartados ao acaso e, esgoto que vem se acumulando ao longo de todo o trajeto do arroio.

Vários estudos evidenciam o impacto de antimicrobianos presentes no meio ambiente, registrando-se a presença de várias moléculas (tetraciclina, macrólidos, glicopeptídeos e aminoglicosídeos), em amostras de água, solo e

vegetais (Chee-Sanford et al., 2001). A pressão seletiva exercida por esses elementos presentes no meio contribuem para o desenvolvimento e disseminação de micro-organismos cada vez mais resistentes aos agentes antimicrobianos de uso comum.

O percentual de resistência observado no ponto 3 (42,10%), foi consideravelmente mais baixo que os percentuais observados nos pontos 2, 4 e 5, que apresentam área com semelhante nível de urbanização e sujeitas, portanto, a equivalente impacto ambiental. Este percentual de resistência mais baixo, provavelmente esteja relacionado com a prevalência mais discreta de *E. faecium*, encontrada neste ponto (57,89%), quando comparado com os demais pontos, pois *E. faecium* foi a espécie que apresentou o maior percentual de resistência, com 74,07% dos isolados resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos. Segundo Konemann et al. (2001), é conhecida a estreita relação de *E. faecium* com a resistência bacteriana. Sendo assim, é de se esperar que diminuindo a prevalência de *E. faecium*, no ponto 3, a resistência neste ponto, também diminua.

4.6. Resistência de *Enterococcus* sp., por período do ano

Um dos objetivos deste estudo foi verificar a influência da sazonalidade na incidência, maior ou menor, de isolados resistentes a antimicrobianos. Até que ponto as alterações climáticas poderiam influenciar no desenvolvimento e disseminação da resistência.

Os resultados indicam que, apenas na coleta referente ao verão (46,07%), ocorreu um percentual menor de resistência. Nas demais estações

do ano, outono (76,29%), inverno (75,95%) e primavera (66,26%), os percentuais de resistência obtidos foram muito semelhantes, sugerindo que às temperaturas verificadas nos períodos, não tenham interferido de modo significativo nos índices de resistências. Por outro lado, analisando os dados fornecidos pelo Inmet, observa-se que nos meses de janeiro, abril, setembro e dezembro, as temperaturas mínimas variaram entre 18°C e 21,6°C e as temperaturas máximas, entre 22,8°C e 32,5°C, variações muito pequenas, insuficientes para interferir no desenvolvimento de bactérias reconhecidamente resistentes, como enterococos.

5. CONCLUSÕES

Foram isoladas bactérias do gênero *Enterococcus* presentes em amostras de água coletadas em diferentes pontos do Arroio Dilúvio em quatro períodos do ano. A espécie mais prevalente foi *Enterococcus faecium*.

O ponto 1, que corresponde a nascente do arroio Dilúvio, foi o que apresentou o menor número de enterococos isolados e o percentual mais baixo de enterococos resistentes, quando comparado com os demais pontos.

O ponto 5, que fica localizado próximo à foz do arroio, apresentou o maior número de enterococos isolados e as mais elevadas taxas de resistência.

Foram identificados enterococos resistentes em todos os pontos de coleta.

Todos os isolados foram sensíveis à ampiciliana e gentamicina.

Não houve influência das estações do ano na distribuição das espécies e nas taxas de resistência dos isolados.

6. PERSPECTIVAS

- Avaliação do perfil de proteínas dos isolados identificados como *Enterococcus* sp.
- Avaliação do perfil genotípico para os antimicrobianos.
- Avaliação do perfil dos fatores de virulência dos isolados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; BUTAYE, P.; WITTE, W. Nonhuman reservoirs of enterococci. In: GILMORE, M.S.; CLEWEKK, D.B.; COURVALIN, P.; DUNNY, G.M.; MURRAY, B.E.; RICE, L.B. **The Enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. p. 55-100, 2002.

ABRIOUEL, H.; OMAR, N.B.; MOLINOS, A.C.; LOPEZ, R.L.; GRANDE, M.A.; MARTINEZ-VIDEIRA, E. ; ORTEGA, E.; CANAMERO, M.M.; GAVEZ, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **Int. J. Food Microbiol**, v. 123, p. 38-49, 2008.

ANDREWES, F.W. & HORDER, T. J. A study of the streptococci pathogenic for man. **Lancet**, ii, p. 708-713, 1906.

ARTHUR, M.; DEPARDIEU, F.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptides-resistant enterococci. **Mol. Microbiol**, v. 21, p. 33-44, 1996.

ARTHUR, M.; MOLINAS, C.; DEPARDIEU, F.; COURVALIN, P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursor in *Enterococcus faecium* BM4147. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 1, p. 117-127, 1993.

ASLANGUL, E.; RUIJMY, R.; CHAU, F.; GARRY, L.; ANDREMONT, A.; FANTIN, B.; Relationship between the level of acquired resistance to gentamicin and synergism with amoxicillin in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4144-4148, 2005.

AUTO, H.; CONSTANT, A.; CONSTANT, J. **Antibióticos e Quimioterápicos**. **Edufal**, ed. 5, p. 131-166, 1980.

BATES, J.; JORDENS, J.Z.; GRIFFITHS, D.T. Farms animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. **J. Antimicrobiol Chemother**, v. 34, p. 507-514, 1994.

BATISTÃO, D.W.F. Epidemiologia e fatores de risco associados à colonização por VRE e MRSA em uma unidade de terapia intensiva de adultos. **Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia**, 2010.

BAZET, C.; BLANCO, J.; SEIJA, V.; PALACIO, R. Enterococos resistentes a vancomicina. Un problema emergente en Uruguay. **Revista Médica del Uruguay**, v. 21, p. 151-158, 2005.

BEDENDO, J.; SIQUEIRA, V.L.D.; CARDOSO, C.L.; BORELLI, S.D. Estudo do perfil de susceptibilidade antimicrobiana e avaliação molecular de amostras de *Enterococcus* spp. isoladas de pacientes hospitalizados. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 25, n. 1, p. 35-40, 2003.

BENDER, E.A.; FREITAS, A.L.P.; BARTH, L.A. Avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* spp. isolados em dois hospitais de Porto Alegre-RS, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas**, v.42, n.1, p.15-19,2010.

BENENSON, A.S. Manual de Control de las enfermedades transmisibles. **Washington: APHA/OPAS**, 1997.

BERTRAND, X.; MULIN, B.; VIEL, J.F.; THOUVEREZ, M.; TALON, D. Common PFGE patterns in antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* from humans and cheeses. **Food Microbiology**, v. 17, p. 543-551, 2000.

BIAVASCO, F.; FOGLIA, G.; PAOLETTI, C.; ZANDRI, G.; MAGI, G.; GUAGLIANONE, E.; SUNDSFJORD, A.; PRUZZO, C.; DONELLI, G.; FACINELLI, B. VanA-type enterococci from humans, animals and food: species distribution, population structure, Tn1546-typing and location, and virulence determinants. **Appl Environ Microbiol**, 2007.

BLANCH, A.R.; CAPLIN, J.L.; IVERSEN, A.; KÜHN, L.; MANERO, A.; TAYLOR, H.D.; VILANOVA, X. Comparison of enterococcal populations related urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. **Journal of Applied Microbiology**. v. 94 (6), p. 994-1002, 2003.

BONILLA, T.D.; NOWOSIELSKI, K.; ESIÖBU, N.; MCCORQUODALE, D.S.; ROGERSON, A. Species assemblages of *Enterococcus* indicate potential sources of fecal bacteria at a south Florida recreational beach. **Mar Pollut Bull**. v. 52 (7), p. 807-810, 2006.

BOYD, D.A.; WILLEY, B.M.; FAWCETT, D.; GILLANI, N.; MULVEY, M.R. Molecular characterization of low level vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* N06-0364 harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52 (7), p. 2667-2672, 2008.

BRUNTON, J. Antibiotic resistance in streptococci. In: BRAYAN, L.T. **Antimicrobial Drug Resistance**, p. 530-565, 1984.

BURDETT, V.; INAMINE, J. RAJAGOPALAN, S. Heterogeneity of tetracycline resistance determinants in *Streptococcus*. **Journal of Bacteriology**, v. 149 (3), p. 995-1004, 1982.

CAPLIN, J.L.; HANLON, G.W.; TAYLOR, H.D. Presence of vancomycin and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 885-892, 2008.

CARIAS, L.L.; RUDIN, S.D.; DONSKEY, C.J.; RICE, L.B. Genetic linkage and cotransfer of a novel, VanB-containing transposon (Tn5382) and low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p. 4426-4434, 1998.

CARVALHO, M.G.S.; SHEWMAKER, P.L.; STEIGERWALT, A.G.; MOREY, R.E.; SAMPSON, A.J.; JOYCE, K.; BARRETT, T.J.; TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R.R. *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1505-1508, 2006.

CASADEWALL, B.; COURVALIN, P. Characterization of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 12, p. 3644-3648, 1999.

CASSENEGO, A.P.V. Avaliação da colonização e resistência antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados de "swabs" cloacais de frangos de corte. **Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. UFRGS**, 2010.

CENTINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 686-707, 2000.

CHANG, P.C.; LI, H.Y.; TANG, H.J.; LIU, J.W.; WANG, J.J.; CHUANG, Y.C. In vitro synergy of baicalein and gentamicin against vancomycin-resistant *Enterococcus*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 40, p. 56-61, 2007.

CHANG, S.; SIEVERT, D.M.; HAGEMAN, J.C.; BOULTON, M.L.; TENOVER, F.C.; DOWNES, F.P.; SHAH, S.; RUDRIK, J.T.; PUPP, G.R.; BROWN, W.J.; CARDO, D.; FRIDKIN, S.K. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *VanA* resistance gene. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1342-1347, 2003.

CHARPENTIER, E.; GERBAUD, G.; COURVALIN, P. Characterization of a new class of tetracycline-resistance gene *tetS* in *Listeria monocytogenes* BM4210. **Gene**, v. 131, p. 27-34, 1993.

CHIVERS, L.S.; MOSER, S.A.; BENJAMIN JR., W.H.; BANKS, S.E.; STEINHAUER, J.R.; SMITH, A.M.; JOHNSON, C.N.; FUNKHOUSER, E.; CHIVERS L.,P.; STAMM, A.M.; WATES, K.B. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. **Journal Hospital Infection**, v. 53 (3), p. 159-171, 2003.

CHEE-SANFORD, J.C.; AMINOV, R.I.; KRAPAC, I.J.; GARRIGUES-JEANJEAN, N.; MACKIE, R.I. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1494-1502, 2001.

CHOPRA, J. & ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.

CHOW, J.W. Aminoglycoside resistance in Enterococci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. 586-589, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing, Tables M100 – S18 2008 e MS 100 – 15, v. 25, p. 1, 2008.

COLLINS, M.D.; JONES, D.; FARROW, J.A.E.; KILPPER-BALZ, R. SCHLEIFER, K.H. *Enterococcus avium* nom. rev., com. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; *E. malodoratus* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, n. 2, p. 220-223, 1984.

COLLINS, M.D.; FARROW, J.A.E.; JONES, D. *Enterococcus mundtii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 8-12, 1986.

COMENGE, Y.; QUINTILIANI JR., R.; LING, L.; DUBOST, L.; BROUARD, J.P.; HUGONNET, J.E.; ARTHUR, M. The CroRS two-component regulatory system in required for intrinsic β -Lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7184-7192, 2003.

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clinical Infection Disease**, v. 42, p. 25-34, 2006.

COURVALIN, P.; CARLIER, C.; COLLATZ, E. Plasmid-mediated resistance to amino-cyclitol antibiotics in group D streptococci. **Journal of Bacteriology**, v. 143, p. 541-551, 1980.

CRISTINO-MELO, J.; Antimicrobial resistance in staphylococci and enterococci in 10 portuguese hospitals in 1996 and 1997. **Microbiology Drug Resistance**, v. 4, p. 319-324, 1998.

DAMBORG, P.; TOP, J.; HENDRICKX, A.P.A.; DAWSON, S.; WILLEMS, R.J.L.; GUARDABASSI, L. Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n. 8, p. 2360-2365, 2009.

D'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.G.; LEMOS, S.K.; BITTENCOURT, J.A.F.; TEIXEIRA, L.M. Antimicrobial susceptibility among *Enterococcus* isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.199-204, 2004.

DE GRAEF, E.M.; DEVRIESE, L.A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; COLLINS, M.D.; LEFEBVRE, K.; SWINGS, J.; HAESEBROUCK, F. Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et AL. 2001. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1069-1-074, 2003.

DESHPANDE, L.M.; FRITSCH, T.R.; MOET, G. J.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 163-170, 2007.

DE VAUX, A.; LAGUERRE, G.; DIVIÉS, C.; PRÉVOST, H. *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p. 383-387,1998.

DEVRIESE, L.A.; POT, B.; COLLINS, M.D. Phenotypic Identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.399-408, 1993.

DIAS, A.I.G.S.F. Estudo da susceptibilidade a antibióticos em *Enterococcus* spp. oriundos do ambiente de suiniculturas portuguesas. **Monografia de graduação para Ciências Farmacêuticas. Faculdade Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2009**

DONSKEY, C.J.; CHOWDHRY, T.K.; HECKER, M.T.; HOYEN, C.K., HANRAHAN, J.A.; HUJER, A.M.; HUTTON-THOMAS, R.A.; CHRISTOPHER, C.W.; BONOMO, R.A.; RICE, L.B. Effect of antibiotic therapy on density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. **New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 1925-1932, 2000.

EDLUND, C.; BARKHOLT, L. OLSSON-LIJEQUIST, B.; NORD, C.E. Effect of vancomycin on intestinal flora of patients who previously received antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Disease**, v. 25, p. 729-732, 1997.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Enterococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>. Acesso: 15 Maio 2011.

FACKLAM, R.R.; CARVALHO, M.G.; TEIXEIRA, L. History, taxonomy, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: GILMORE, M.S. **The enterococci pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2002.

FACKLAM, R.R.; COLLINS, M.D. Identification of *Enterococcus* Species Isolated from Human Infections by Conventional Test Scheme. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 731-734, 1989.

FARIA, C.M. & MORANDI, I.C. **Pesquisa Ecos**, Ano 3, n. 6, p. 7-22, 2002.

FARROW, J.A.E. & COLLINS, M.D. *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, n. 1, p. 73-75, 1985.

FAYER, R.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, V. 20, i.11, p. 531-536, 2004.

FERGUSON, D.M.; MOORE, D.F.; GETRICH, M.A.; ZHOWANDAI, M.H. Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p. 598-608, 2005.

FERREIRA DA SILVA, M.; TIAGO, L.; VERÍSSIMO, A.; BOAVENTURA, R.A.; NUNES, O.C.; MANAIA, C.M. . Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 55, p. 322-329, 2006.

FINES, M.; PERICHON, B. REYNOLDS, P.; SAHM, D.F.; COURVALIN, P. VanE, a new type of acquired glycopeptides resistance in *Enterococcus faecalis* BM 4405. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 9, p. 2161-2164, 1999.

FLUIT, A.C.; VISSER, M.R.; SCHMITZ, F.J. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 836-871, 2001.

FORTINA, M.G.; RICCI, G.; MORA, D.; MANACHINI, P.L. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p. 1717-1721, 2004.

FRANZ, C.M.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K.H.; HOLZAPFEL, W.H. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. **International journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 105-122, 2003.

FRAZZON, A.P.G.; GAMA, B.A.; HERMES, V.; BIERHALS, C.G.; PEREIRA, R.I.; GUEDES, A.G.; D'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, J. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tetM* and *tetL* genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **World Journal Microbiology and Biotechnology** (On line). doi: 10.1007/a11274-009-0160-x, 2009.

FUNASA. Manual Prático de Análise de Água. Ministério da Saúde. **Fundação Nacional de Saúde**. Brasília, 2006.

FURUKAWA, T.; TAKAHASHI, H.; YOSHIDA, T.; SUZUKI, Y. Genotypic analysis of enterococci isolated from fecal-polluted water from different sources by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for application to microbial source tracking. **Microbes Environ**, v. 26, n.2, p. 181-183, 2011.

GILBERT, P.; ALISSON, D.; LAMBERT, P. Antibiotics that act on nucleic acids and protein biosynthesis. **Molecular Medical microbiology. Academic press: San Diego, California**, 2002.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiol**, v. 26, p. 163-171, 2002.

GLOBAL ANNUAL ASSESMENT OF SANITATION AND DRINKING-WATER. Targeting resources of better results. World Health Organization. GLAAS, 2010. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/glaas/en/

GOLD, H.S. Vancomycin-resistant enterococci: mechanisms and clinical observations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 210-219, 2001.

GOULD, C.V.; FISHMAN, N.O.; NACHAMKIN, I.; LAUTENBACH, E. Chloramphenicol resistance in vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: impact of prior fluoroquinolona use? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, p. 138-145, 2004.

HARBARTH, S.; COSGROVE, S.; CARMELI, Y. Effects of antibiotics on nosocomial epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1619-1628, 2002.

HAYES, J.R.; ENGLISH, L.L.; CARTER, P.J.; PROESCHOLDT, T.; LEE, K.Y.; WAGNER, D.D.; WHITE, D.G. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7153-7160, 2003.

HERMANN T. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.64,p. 1841-1852, 2007.

HERNÁNDEZ, E.B. Aminoglucósidos. **Acta Medica**. v. 8, n. 1, p. 48-53, 1998.

HEW, C.M.; MAHER, K.; VOGEL, R.F. Expression of virulence-related gene by *Enterococcus faecalis* in response to different environments. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, p. 257-267, 2007.

HIGASHIDE, T.; TAKAHASHI, M.; KOBAYASHI, A.; OHKUBO, S.; SAKURAI, M.; SHIRAO, Y.; TAMURA, T.; SUGYIAMA, K. Endophthalmitis caused by *Enterococcus mundtii*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1475-1476, 2005.

HÖRNER, R.; LISCANO, M.G.H.; MARASCHIN, M.M.; SALLA, A.; MENEGHETTI, B.; FRASSON, N.L.; RIGHI, R.A. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.41, n.6, p.391-395, 2005.

HSIEH, S.E.; HSU, L.L.; HSU, W.H.; CHEN, C.Y.; CHEN, H.J.; LIAO, C.T. Importance of amino acid alterations and expression of penicillin-binding protein 5 amplicin resistance of *Enterococcus faecium* in Taiwan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, p. 514-519, 2006.

HUYCKE, M.H.; SAHM, D.F.; GILMORE, M.S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, 1998.

IARIA, C.; STASSI, G.; COSTA, G.B.; DI LEO, R.; TOSCANO, A.; CASCIO, A. Enterococcal meningitis caused by *Enterococcus casseliflavus*. First case report. **BMC Infect Dis**, v.5, p.3, 2005.

IBGE. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Ministério das Cidades. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, 2008.

INSTITUTO TRATA BRASIL. Disponível em: http://www.tratabrasil.org.br/novo_site/?id=334. Acesso em: 22 março 2011.

JETT, B.D.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 462-478, 1994.

KAK, V.; CHOW, J.W. Acquired antibiotic resistances in enterococci. In: Gilmore, M.S. **The enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance**, p.355-376, 2002.

KHAN, S.A.; NAWAZ, M.S.; KHAN, A.A.; HOPPER, S.L.; JONES, R.A.; CERNIGLIA, C.E. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 27-34, 2005.

KIRST, H.A.; THOMPSON, D.G.; NICAS, T.I. Historical yearly usage of vancomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1303-1304, 1998.

KOLAR, M.; URBANEK, K.; VAGNEROVA, I.; KOUKALOVA, D. The influence of antibiotic use on the occurrence of vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 31, p. 67-72, 2006.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D. **Diagnóstico microbiológico**, ed. 5, p. 589-659. MEDSI, Rio de Janeiro, 2001.

KOORT, J.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; SUKURA, A.; BJORKROTH, J. *Enterococcus hermanniensis* sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1823-1827, 2004.

KUSUDA, R.; KAWAL, K.; SALATI, F.; BANNER, C.R.; FRYER, J.L. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 406-409, 1991.

LANCEFIELD, R.C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. **Journal of Experimental Medici**, v. 57 (4), p. 571-595, 1933.

LAW-BROWN, J.; MEYERS, P.R. *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 683-685, 2003.

LAWRENCE, J.G. Gene transfer in bacteria: speciation without species? **Theoretical Population Biology**, v.61, p. 449-460, 2002.

LAZO, J.S.; BRUNTON, L.L.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw Hill, p. 999-1055, 2006.

LEBLANC, D.J.; LEE, L.N.; TITMAS, B.M.; SMITH, C.J.; TENOVER, F.C. Nucleotide sequence analysis of tetracycline resistance gene *tetO* from *Streptococcus mutans* DL5. **Journal of Bacteriology**, v. 170 (8), p. 3618,3626, 1988.

LECRERCQ, R. Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. **Clinical Microbiology and Infections**, v.15, n.3, 2009.

LECRERCQ, R.; DUTKA, M.S.; BRISSON, N.A. Resistance of enterococci aminoglycosides and glycopeptides. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 495-501, 1992.

LEME, I.L. Avaliação do perfil de susceptibilidade a antibióticos em amostras de enterococos de origem aviária de São Paulo. **Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo**, 1998.

LIBÂNIO, P.A.C.; CHERNICHARO, C.A.L.; NASCIMENTO, N.O. A dimensão da qualidade de água: avaliação da relação entre indicadores sociais, de disponibilidade hídrica, de saneamento e de saúde pública. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 10, n. 3. p. 219-228, 2005.

LUCZKIEWICZ, A.; JANKOWSKA, K.; FUDALA-KSIAZEK, S.; OLANCZUK-NEYMAN, K. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. **Water Research**, v. 44, p. 5089-5097, 2010.

MACEDO, A.S.; FREITAS, A.R.; ABREU, C.; MACHADO, E.; PEIXE, L.; SOUSA, J.C.; NOVAIS, C. Characterization of antibiotic resistant enterococci isolated from untreated Waters for human consumption in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 315-319, 2011.

MACHADO-HOMEM, J.C.M. Les Effluents Hospitaliers. Paris: Université Louis Pasteur. **Institut Mécanique des Fluides**, 1986.

MANERO, A.; BLANCH, A.R. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 4425-4430, 1999.

MANERO, A.; VILANOVA, X.; CERDÀ-CUÉLLAR, M.; BLANCH, A.R. Characterization of sewage waters by biochemical fingerprinting of Enterococci. **Water Research**, v. 36 (11), p. 2831-2835, 2002.

MAROTHI, Y.A.; AGNIHOTRI, H.; DUBEY, D. Enterococcal resistance – An overview. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 23 (4), p. 214-219, 2005.

MARTINS DA COSTA, P.M.; VAZ-PIRES, P.; BERNARDO, F. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. Isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. **Water Research**, v. 40, p. 1735-1740, 2006.

MARTINS DA COSTA, P.M.; VAZ-PIRES, P.M.; BERNARDO, F.M. Antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and sludge of poultry slaughterhouses. **J. Environ Sci Health B**, v, 41, p. 1393-13403, 2006.

MCKESSAR, S.J.; BERRY, A.M.; BELL, J.M.; TURNIDGE, J.D.; PATON, J.C. Genetic characterization of *vanG*, a novel resistance locus of *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 11, p. 3224-3228, 2000.

MEDEIROS, A.W.; D'AZEVEDO, P.; PEREIRA, R.I.; CASSENEGO, A.P.; VAN DER SAND, S.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A.P.G. PCR-RFLP of 16S ribosomal DNA to confirm the identification of *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* isolated from clinical and food samples. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43 (1), p. 100-101, 2010.

MENEGAT, R.; PORTO, M.L.; CARRARO, C.C.; FERNANDES, L.A.A. **Atlas Ambiental de Porto Alegre**. UFRGS, PMPA, INPE. Porto Alegre: Ed. Unniversidade/UFRGS, 1998.

MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P.M. Aminoglycosides phosphotransferases type III from *Enterococcus*: over expression, purification and substrate specificity. **Biochemistry**, v. 33, p. 6936-6944, 1999.

MOELLERING JR., R.C. The *Enterococcus*: a classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic potions. **Journal Antimicrobiology Chemotherapy**, v. 28, p. 1-12, 1991.

MOELLERING, R.C.J. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. **Clinical Infectious Disease**, v. 14, p. 1173-1178, 1992.

MOORE, D.F.; GUZMAN, J.A.; MCGEE, C. Species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from surface and ocean water. **Journal Appl Microbiology**, 2008.

MORANDI, I.C. & FARIA, C.M. A difícil recuperação de arroios em áreas urbanas – Arroio Dilúvio – Porto Alegre – RS. **XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**. ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2002.

MORDEHAI, J.; KURZBART, E.; COHEN, Z.; MARES, A.J. Necrotizing fasciitis and myonecrosis in early childhood: a report of three patients. **Pediatr Surg Int**, v. 12, p. 538-540, 1997.

MOREILLON, P. Moyens de defense des bactéries. **Revue Médicale de La Suisse Romande**, v. 120, p. 641-650, 2000.

MORENO, M.R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 1-24, 2006.

MOTTA, M.E.F.A.; SILVA, G.A.P. Diarréia por parasitas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**. v. 2 (2), p. 117-127, 2002.

MURRAY, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**. v.3, n.1, p.46-65, 1990.

MURRAY, B.E. Diversity among multidrug-resistant enterococci. **Emerging Infectious Diseases** v.4 (1), p. 37-47, 1998.

MURRAY, B.E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **N Engl J Med**, 342(10), p. 710-721, 2000.

NOVAIS, C.; COQUE, T.M.; FERREIRA, H.; SOUSA, J.C.; PEIXE, L. Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal. **Appl. Environ Microbiol**. v. 71, p. 3364-3368, 2005.

OGIER, J.C.; SERROR, P. The *Enterococcus* genus. **Int. J. Food Microbiol**, 2007.

OLIVEIRA, K.A.M. Prevalência de *Campylobacter* spp. e *Enterococcus* spp. no ambiente de criação de frango de corte. **Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2006.

ORLA-JENSEN, S. The lactic acid bacteria. **Mem AcadR Soc Danemark Sec SciSer**, v. 8, p. 81-197, 1919.

OSSWALD, W.; GUIMARÃES, S. Terapêutica medicamentosa e as suas bases farmacológicas. Porto, **Porto Editora**, ed. 4, p. 853-947, 2001.

PANGALLO, D.; HARICHOVÁ, J.; KARELOVÁ, E.; DRAHOVSKÁ, H.; CHOVANOVÁ, K.; FERIANC, P.; TURNA, J.; TIMKO, J. Molecular investigation of enterococci isolated from different environmental sources. **Biologia, Bratislava**, v. 59, n. 6, p. 829-837, 2004.

PARADELLA, T.C.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.C.; *Enterococcus faecalis*: Considerações clínicas e microbiológicas. **Revista de Odontologia da UNESP**. V. 36, n. 4, p. 163-168, 2007.

PEHLIVAN, Y.; TOY, M.A.; KARAOGLAN, I.; NAMIDURU, M.; BUYUKHATIPOGLU, H. *Enterococcus avium* cerebral abcess. **Intern Med**, v. 46, p. 1280, 2007.

PÉREZ, C. Caracterización molecular de los genotipos de Resistencia a glucopéptidos en enterococos de los hospitales de Canarias. Disponível em: <ftp://tesis.bbt.ull.es/ccppytec/cp177.pdf>. Acesso: 16 de maio de 2011.

PIÑERA, J.G.G.; PENIÉ, J.B.; RODRÍGUES, M.Á.; REYES, A.M.; MORA, E.; LESCAY, M. Glicopéptidos. **Acta Medica**. v. 8,n.1, p. 54-57, 1998.

POLLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemother**. V. 56, p. 20-51, 2005.

POETA, P.; COSTA, D.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. **Int. J. Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 131-137, 2006.

POETA, P.; COSTA, D.; IGREJAS, G.; ROJO-BEZARES, B.; SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-LARREA, F.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Characterization of VanA containing *Enterococcus faecium* isolates carrying Tn5397-like and Tn916/Tn1545-like transposons in wild boars (*Sus Scrofa*). **Journal of Medical Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 151-156, 2007.

POOTOOLAL, J.; NEU, J.; WRIGHT, G. D. Glycopeptide antibiotic resistance. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 42, p. 381-408, 2002.

POYART, C.; LAMBERT, T.; MORAND, P.; ABASSADE, P.; QUESNE, G.; BAUDOY, Y.; TRIEU-CUOT, P. Native valve endocarditis due to *Enterococcus hirae*. **J. Clin. Microbiol**. v. 40, p. 2689-2690, 2002.

REID, K.C.; COCKERILL, I. F.; PATEL, R. Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: a report of 20 cases. **Clinical Infect Diseases**, v. 32, p. 1540-1546, 2001.

REINOLDS, P.E. Structure, biochemistry and mechanisms of action of glycopeptide antibiotics. **Europ. Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**. v. 8, n. 11, p. 943-950, 1989.

RIBOLDI, G.P.; FRAZZON, J.; D'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, A.P.G. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.40, p.125-128, 2009.

RICE, E.W.; MESSER, J.W.; JOHNSON, C.H.; REASONER, D.J. Occurrence of high-level aminoglycoside resistance in environmental isolates. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61 (1), p. 374-376, 1995.

RICE, L.B. Emergence of vancomycin-resistant enterococci. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 183-187, 2001.

RICE, L.B.; BELLAIS, S.; CARIAS, L.L.; HUTTON-THOMAS, R.; BONOMO, R.A.; CASPERS, P.; PAGE, M.G.P.; GUTMANN, L. Impact of specific *pbp5* mutations on expression of β -Lactam resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3028-3032, 2004.

ROBERTS, M.C.; SUTCLIFFE, J.; BOGO JENSEN, L.; ROOD, J.; SEPPALA, H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 12, p. 2823-2830, 1999.

RUOFF, K.L.; DE LA MAZA, L.; MURTAGH, M.J.; SPARGO, J.D.; FERRARO, M.J. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. **Journal Clinical Microbiology**, v. 28, p. 435-437, 1990.

SAIFI, M.; DALLAL, M.M.S.; POURSHAFIE, M.R.; ESHRAGHIAN, M.R.; POURMAND, M.R.; SALARI, M.H.; SHIRAZI, M.H. High level resistance of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* isolates from municipal sewage treatment plants to gentamicin. **Iranian J. Publ. Health**, v. 37, n. 1, p. 103-107, 2008.

SANDOE, J.A.; WITHERDEN, I.R.; SETTLE, C. Vertebral osteomyelitis caused by *Enterococcus raffinosus*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1678-1679, 2001.

SANDRI, A.M. Enterococcus spp. resistente à vancomicina: tipagem molecular, caracterização clínica e associação com mortalidade. **Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Medicina**. UFRGS, Porto Alegre, 2004.

SARAIVA, I.H.; JONES, R.N.; ERWIN, M.; SADER, H.S. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de 87 amostras clínicas de enterococos resistentes à vancomicina. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43 (3), p. 217-222, 1997.

SCHLEIFER, K.H.; KILPPER-BALZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *E. faecium* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, n.1, p. 31-34, 1984.

SCHLEIFER, K.H.; KLIPPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus*

faecalis comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 31-34, 1984.

SEFTON, A.M. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millenium. **Drugs**, v. 62, p. 557-566, 2002.

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

SHERMAN, J.M. The Streptococci. **Bacteriology Rev**, v. 1 (1), p. 3-97, 1937.

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

STOBBERINGH, E.; BOGAARD, A.V.D.; LONDON, N.; DRIESSEN, C.; TOP, J.; WILLEMS, R. Enterococci with glycopeptide resistance in Turkeys, Turkey farmers, Turkey *slaughterers* and (sub) urban residents in the south of the Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 9, p. 2215-2221, 1999.

SUPPOLA, J.P.; VOLIN, L.; VALTONEN, V.V.; VAARA, M. Overgrowth of *Enterococcus faecium* in the faces of patients with hematologic malignancies. **Clinical Infectious Disease**. v. 23, p. 694-697, 1996.

SVEC, P. & SEDLÁČEK. Occurrence of *Enterococcus* spp. in Waters. **Folia Microbiol**. V. 44, n. 1, p. 3-10, 1999.

SVEC, P.; DEVRIESE, L.A.; SEDLÁČEK, I.; BAELE, M.; VANCANNEYT, M.; HAESBROUCK, F.; SWINGS, J.; DOSKAT, J. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1567-1574, 2001.

SVEC, P.; VANCANNEYT, M.; DEVRIESE, L.A.; NASER, S.M.; SNAUWAERT, C.; LEFEBVRE, K.; HOSTE, B.; SWINGS, J. *Enterococcus aquamarinus* sp. nov., isolated from sea water. **International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 2183-2187, 2005.

SVEC, P.; VANCANNEYT, M.; KOORT, J.; NASER, S.M.; HOSTE, B.; VIHAVAINEN, E.; VANDAMME, P.; SWINGS, J.; BJÖRKROTH, J. *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p. 2479-2484, 2005.

SVEC, P.; VANCANNEYT, M.; SEDLACEK, I.; NASER, S.M.; SNAUWAERT, C.; LEFEBVRE, K.; HOSTE, B.; SWINGS, J. *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 577-581, 2006.

TANASUPAWAT, S.; SUKONTASING, S.; JUNG-SOOK, L. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ("mum") in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1630-1634, 2008.

TANNOCK, G.W. & COOK, G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In: GILMORE, M.S.; CLEWELL, D.B.; COURVALIN, P.; DUNNY, G.M.; MURRAY, B.E.; RICE, L.B. (ed), **The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance**. ASM Press, Washington, D.C. p. 101-132, 2002.

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

TEIXEIRA, C.D. Estudo de amostras de *Enterococcus* isoladas de pacientes atendidos em quatro hospitais do município de Niterói: caracterização fenotípica e genotípica. **Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal Fluminense**, 2007.

TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R.R. *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 8^a ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. P. 422-433, 2003.

TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.S.; ESPINOLA, M.M.B.; STELGERWALT, A.G.; DOUGLAS, M.P.; BRENNER, D.J.; FACKLAM, R.R. *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus rattii* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1737-1743, 2001.

THIERCELIN, M.E. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogen. **CR Soc Biol**, v. 5, p. 269-271, 1899.

TING-TING, Q.; YA-GANG, C.; YUN-SONG, Y.; ZE-QING, W.; ZHI-HUI, Z.; LAN-JUAN, L. Genotypic diversity and epidemiology of high-level gentamicin resistant *Enterococcus* in a Chinese hospital. **Journal of Infection**. v. 52 (2), p. 124-130, 2006.

TITZE-DE-ALMEIDA, R.; FELIPE, M.S.; ZANELLA, R.C.; TOP, J.; WILLEMS, R.J. Multilocus sequence typing of hospital-associated *Enterococcus faecium*

from Brazil reveals their unique evolutionary history. **Microbiology Drug Resist**, v. 12, n. 2, p. 121, 2006.

TOP, J.; WILLEMS, R.; BONTEN, M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.52, p. 297-308, 2008.

TORELL, E. CARS, O.; OLSSON-LIJEQUIST, B.; HOFFMANN, B.M.; LINDBACK, J.; BURMAN, L.G. The Enterococcal Study Group. Near absence of vancomycin-resistant enterococci but high carriage rates of quinolone-resistant ampicillin-resistant enterococci among hospitalized patients and non-hospitalized individuals in Sweden. **Journal Clinical Microbiology**. v. 37, p. 3509-3513, 1999.

TORRES, J. Água e saneamento: relação com a mortalidade por enfermidades diarreicas agudas. **BIO**, v. 1, p. 46-51, 1989.

TOYE, B.; SHYMANSKI, J.; BOBROWSKA M.; WOODS, W.; RAMOTAR, K. Clinical and epidemiologic significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the *vanC* genotype). **Journal Clinical Microbiology**. v.3, p. 3166-3170, 1997.

TRIEU-COUT, P.; CARLIER, C.; COURVALIN, P. Conjugative plasmid-transfer from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 4388-4391, 1988.

TYRRELL, G.J.; TURNBULL, L.; TEIXEIRA, L.M.; LEFEBVRE, J.; CARVALHO, M.G.S.; FACKLAM, R.R.; LOVGREN, M. *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1140-1145, 2002.

VANCANNEYT, M.; ZAMFIR, M.; DEVRIESE, L.A.; LEFEBVRE, K.; ENGELBEEN, K.; VANDEMEULEBROECKE, K.; AMAR, M.; DE VUYST, L.; HAESBROUCK, F.; SWINGS, J. *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2175-2179, 2004.

VECCHIA, A.D.; THEWES, W.R.; HARB, R.N. Diagnóstico sobre a situação do tratamento do esgoto hospitalar do Brasil. **Revista Saúde e ambiente**. v. 10, n. 2, 2009.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**. v. 406, p. 775-781, 2000.

WALSH, C. Antibiotics that block DNA replication and repair: the quinolones. In: Walsh, C.; Editor: Antibiotics, origins, resistance. **American Society for Microbiology**, Washington DC, 2003.

WOO, P.C.Y.; TO, A.P.C.; LAU, S.K.P.; YUEN, K.Y. Facilitation of horizontal transfer of antimicrobial resistance by transformation of antibiotic-induced cell-wall-deficient bacteria. **Medical Hypotheses**, v. 61 (4), p. 503-508, 2003.

ZARRILI, R.; TRIPODI, M.F.; PODOLO, A.D.; FORTUNATO, R.; BAGATTINI, M.; CRISPINO, M.; FLORIO, A.; TRIASSI, M.; UTILI, R. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, p. 827-835, 2005.

ZHANEL, G.G.; HOMENUIK, K.; NICHOL, K.; NOREDDIN, A.; VERCAIGNE, L.; EMBIL, J.; GIN, A.; KARLOWSKY, J.A.; HOBAN, D.J. The glycylicyclines: a comparative review with the tetracyclines. **Drugs**. v. 64, n. 1, p. 63-88, 2004.

8. APÊNDICE

8.1. Meios de cultura e soluções utilizadas

8.1.1. Meios de cultura arginina e controle

8.1.1.1. Arginina	g.L⁻¹
arginina	10
peptona de carne	5
3extrato de levedura	3
glicose	1
água destilada	1000mL
púrpura de bromocresol (pH 6,8)	40 gotas

8.1.1.2. Controle	g.L⁻¹
peptona de carne	5
extrato de levedura	3
glicose	1

água destilada	1000mL
púrpura de bromocresol (pH 6,8)	40 gotas

8.1.2. Meio de cultura caldo azida

caldo azida	34,7g.L ⁻¹
água destilada	1000mL

8.1.3. Meio de cultura agar Brain Heart Infusion (BHI)

agar BHI	37g.L ⁻¹
água destilada (pH 6,8)	1000mL

8.1.4. Meio de cultura agar BHI + NaCl 6,5%

agar BHI	37g.L ⁻¹
cloreto de sódio	65g.L ⁻¹
água destilada (pH 6,8)	1000mL

8.1.5. Meio de cultura agar Bile Esculina

agar Bile Esculina	43,5g.L ⁻¹
água destilada (pH 6,8)	1000mL

8.1.6. Meio de cultura agar Mueller Hinton

agar Mueller Hinton	38g.L ⁻¹
água destilada	1000mL
(pH 6,8)	

8.1.7. Meio de cultura arabinose

	g.L ⁻¹
arabinose	10
peptona caseína	10
cloreto de sódio	1
água destilada	1000mL
púrpura de bromocresol	40 gotas
(pH 6,8)	

8.1.8. Meio de cultura manitol

	g.L ⁻¹
manitol	10
1peptona caseína	10
cloreto de sódio	1
água destilada	1000mL
púrpura de bromocresol	40 gotas
(pH 6,8)	

8.1.9. Meio de cultura Metyl- β -D-glucopyranoside (MGP)

	g.L ⁻¹
MGP	10
peptona caseína	10
cloreto de sódio	1
água destilada	1000mL
púrpura de bromocresol	40 gotas
(pH 6,8)	

8.1.10. Meio de cultura piruvato

	g.L ⁻¹
piruvato de sódio	10
peptona caseína	10
extrato de levedura	5
K ₂ HPO ₄ (potássio fosfato dibásico)	5
cloreto de sódio	5
água destilada	1000mL
gotas de azul de bromotimol	100 gotas
(pH 7,6)	

8.1.11. Meio de cultura rafinose

	g.L ⁻¹
rafinose	10
peptona caseína	10
cloreto de sódio	1

água destilada 1000mL

púrpura de bromocresol 40 gotas

(pH 6,8)

8.1.12. Meio de cultura sacarose g.L⁻¹

sacarose 10

peptona caseína 10

cloreto de sódio 1

água destilada 1000mL

púrpura de bromocresol 40 gotas

(pH 6,8)

8.1.13. Meio de cultura sorbitol g.L⁻¹

sorbitol 10

peptona caseína 10

cloreto de sódio 1

água destilada 1000mL

púrpura de bromocresol 40 gotas

(pH 6,8)

8.1.14. Solução salina 0,9%

cloreto de sódio 90g.L⁻¹

água destilada 1000

