

**Departamento de Química**

**PREVALÊNCIA DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS, METAIS E  
DESINFECTANTES EM ISOLADOS DE *STAPHYLOCOCCUS*  
PROVENIENTES DE UMA ETAR MUNICIPAL**

Eduarda Sofia Arrepiá Costa Serapicos

Licenciada em Biologia pela Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Dissertação submetida para satisfação parcial dos requisitos do grau de mestre em Engenharia  
do Ambiente

ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Olga Nunes

CO-ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Célia Manaia

**Porto, Janeiro de 2008**

## RESUMO:

O principal objectivo deste trabalho consistiu em caracterizar os perfis de resistência a antibióticos, desinfectantes e metais pesados em estafilococos isolados de águas residuais de uma estação de tratamento de águas residuais, que recebe principalmente efluentes domésticos.

O estudo incluiu trinta e nove isolados de estafilococos provenientes das águas residuais brutas e tratadas. A identificação dos isolados ao nível de espécie recorreu a genotipagem e análise da sequência do gene para o rRNA 16S. Os perfis de resistência a antibióticos (amoxicilina, tetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina, gentamicina, eritromicina, vancomicina, meticilina, oxacilina, clindamicina, lincomicina e penicilina), desinfectantes (peróxido de hidrogénio e hipoclorito de sódio) e metais pesados (níquel, cádmio, mercúrio e zinco) foram determinados através do método de difusão em agar. Para os isolados com fenótipo de resistência a eritromicina, testou-se a indução de resistência a clindamicina, através do teste D. Para avaliar a possível associação entre fenótipos de resistência ou susceptibilidade aos diferentes agentes antimicrobianos testados recorreu-se a uma análise de correlação. Os determinantes genéticos responsáveis pela resistência à eritromicina (*ermA*, *ermC* e *msrA/B*) e meticilina (*mecA*) foram pesquisados por PCR.

A identificação dos isolados revelou a presença de dez espécies distintas no conjunto de estirpes em estudo -*Staphylococcus pettenkoferi*, *S. succinus*, *S. aureus*, *S.pasteuri*, *S.cohnii*, *S.arlettae*, *S. haemolyticus*, *S.equorum* e *S. saprophyticus/S. xylosus*. Estas duas últimas espécies, que não puderam ser distinguidas através da análise da sequência do gene rRNA 16S, representaram o grupo mais abundante (77%). No que se refere à prevalência de resistência a antibióticos no grupo de estirpes analisadas, os valores mais altos foram registados para lincomicina (66,7%), eritromicina (23,1%), clindamicina (17,9%), gentamicina (17,9%) e tetraciclina (7,7%). Pelo contrário, não se observou resistência a amoxicilina, ciprofloxacina, vancomicina e sulfametoxazol/trimetoprim. Comparando os halos de inibição produzidos pelos diferentes agentes antimicrobianos, detectaram-se possíveis associações de

fenótipos de resistência ou de susceptibilidade, indicadas pela ocorrência de correlações positivas significativas ( $\alpha < 0,0001$ ) - por exemplo entre tetraciclina e ciprofloxacina, tetraciclina e gentamicina, clindamicina e lincomicina, metilicina e oxacilina, e penicilina e amoxicilina. A avaliar pela análise de correlação efectuada, não ocorreram nestes isolados associações de fenótipo de resistência entre antibióticos e desinfectantes ou metais pesados. Todos os isolados que apresentaram resistência à eritromicina detinham, pelo menos, um dos dois genes *msrA* e *msrB*, que codificam o mecanismo de resistência mediado por bombas de efluxo. O gene *ermC* foi detectado em dois isolados, um em *S. saprophyticus*/*S. xylosus* e um *S. succinus*, sendo que este último apresentava também o gene *msrA*. O gene *ermA* não foi detectado em nenhum isolado.

Este estudo constituiu uma primeira abordagem para averiguar se estafilococos provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais municipais podem actuar como agentes de disseminação de resistência a antibióticos. Neste aspecto, o estudo da sobrevivência destes organismos nos cursos de água receptores pode contribuir para esclarecer o potencial efeito de reservatório das estações de tratamento de águas.

## ABSTRACT:

The main objective of this work was to characterize the resistance patterns to antibiotics, metals and disinfectants of staphylococci isolated from raw and treated water from a wastewater treatment plant receiving mainly domestic effluents.

This study included thirty nine isolates from raw and treated wastewater. Isolates were identified at species level by genotyping and 16S rRNA sequence analysis. Resistance patterns of antibiotics (amoxicillin, tetracycline, sulfamethoxazole-trimethoprim, ciprofloxacin, gentamicin, erythromycin, vancomycin, methicillin, oxacillin, clindamycin, lincomycin and penicillin), disinfectants (hydrogen peroxide and sodium hypochloride) and heavy metals (nickel, cadmium, mercury and zinc) were determined using the agar diffusion method. Isolates with erythromycin resistant phenotype were tested for inducible clindamycin resistance using the D-test. In order to assess the possible association between resistance or susceptibility phenotypes of different antimicrobial agents a correlation analysis was used. The genetic determinants responsible for erythromycin (*ermA*, *ermC* and *msrA/B*) and methicillin (*mecA*) resistance were detected by PCR.

The isolates identification revealed the presence of ten different species among the group of analyzed strains - *S. pettenkoferi*, *S. succinus*, *S. aureus*, *S.pasteuri*, *S.cohnii*, *S.arlettae*, *S. haemolyticus*, *S.equorum*, *S. saprophyticus/S.xylosus*. These two last species, that were impossible to discriminate by 16S rRNA sequence analysis, represented the most abundant group (77%). Concerning the predominance of resistance to antibiotics in the group of analyzed isolates, the highest values were observed for lincomycin (66,7%), erythromycin (23,1%), clindamycin (17,9%), gentamicin (17,9%) and tetracycline (7,7%). On the other hand, it was not observed resistance to amoxicillin, ciprofloxacin, vancomycin or sulfamethoxazole-trimethoprim. Comparing the inhibition halos produced by the different antimicrobial agents, possible associations of resistance or susceptibility phenotypes were detected, which were revealed by the occurrence of significant positive correlations ( $\alpha < 0,0001$ ) - for example between tetracycline and ciprofloxacin, tetracycline and gentamicin, clindamycin and lincomycin,

methicillin and oxacillin and penicillin and amoxicillin. The correlation analysis revealed that in these isolates there were no associations of resistance phenotype between antibiotics and disinfectants or heavy metals. All erythromycin resistant isolates had, at least, one of the two genes *msrA* and *msrB* which encode a resistance mechanism by active efflux. *ermC* was detected in two isolates, one *S. saprophyticus/S.xylosus* and one *S.succinus* that also revealed *msrA*. No *ermA* was detected.

This study is a first approach to assess the potential effect of staphylococci from a municipal wastewater treatment plant as dissemination agents of resistance to antibiotics. Considering this, the study of the survival of these organisms in the receiving water courses, can contribute to explain the potential reservoir effect of wastewater treatment plants.

# ÍNDICE

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	1
1.1 ENQUADRAMENTO .....	2
1.2 O CICLO URBANO COMO VEÍCULO DE DISSEMINAÇÃO DE MICRORGANISMOS .....	4
1.3 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL COM AGENTES ANTIMICROBIANOS .....	7
1.4 MECANISMOS DE ACÇÃO E RESISTÊNCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS .....	10
1.5 AQUISIÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS. ....	13
1.5.1 RESISTÊNCIA ADQUIRIDA E NATURAL .....	13
1.5.2 MECANISMOS DE AQUISIÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS .....	14
1.6 FACTORES QUE PODEM PROMOVER A SELECÇÃO DE RESISTÊNCIA .....	17
1.7 O GÉNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i> .....	18
1.8 DISTRIBUIÇÃO DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS NO MEIO AMBIENTE .....	20
CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
2.1 AMOSTRAS .....	23
2.2 MANIPULAÇÃO DE CULTURAS, MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO .....	24
2.2.1 MANIPULAÇÕES DE CULTURAS E DNA .....	24
2.2.2 MEIOS DE CULTURA .....	24
2.3 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR .....	25
2.3.1 COLORAÇÃO DE GRAM .....	25
2.3.2 TESTE DA CATALASE .....	26
2.3.3 TESTE DA CITOCROMO C OXIDASE .....	26
2.3.4 TESTE DA COAGULASE .....	26
2.4 DETERMINAÇÃO DE FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS, DESINFECTANTES E METAIS PESADOS .....	27
2.4.1 ESTIRPES DE REFERÊNCIA .....	27
2.4.2 DETERMINAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS - ANTIBIOGRAMAS .....	28

2.4.3 DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS – ATB™ STAPH 5 .....	30
2.4.4 DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA À CLINDAMICINA INDUZIDA POR ERITROMICINA .....	32
2.5 DETERMINAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE A DESINFECTANTES E METAIS PESADOS.....	32
2.6 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA .....	34
2.6.1 EXTRACÇÃO DE DNA .....	34
2.6.2 GENOTIPAGEM POR <i>RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA</i> .....	34
2.6.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE PARA O RNAR 16S E SUA SEQUENCIAÇÃO.....	36
2.6.4 DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS .....	37
CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....	39
3.1 MÉTODOS FENOTÍPICOS .....	40
3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS .....	40
3.3 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS, DESINFECTANTES E METAIS .....	45
3.3.1 FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS .....	45
3.3.2..PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE A DESINFECTANTES E A METAIS PESADOS .....	52
3.4 PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	55
CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO .....	59
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO .....	69
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Esquema geral de tratamentos de uma ETAR.....	6
Figura 2 – Vias possíveis de exposição de antibióticos nos recursos hídricos .....	9
Figura 3 – Produtos de amplificação RAPD gerados a partir de DNA de 12 isolados <i>Staphylococcus</i> spp. da ETAR, usando o <i>primer</i> M13, num gel de agarose a 1,5%..	41
Figura 4 – Correlação de Pearson ( $\alpha < 10^{-4}$ ) entre halos de inibição produzidos por antibióticos, desinfetantes e metais..	54
Figura 5 – Gel de agarose (1%) apresentando os produtos de PCR, usando os <i>primers</i> <i>msrA</i> , <i>msrB</i> e <i>ermC</i> .....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Consumo anual de antibióticos na medicina humana e respectivas percentagens de excreção de antibióticos na Alemanha.....	8
Tabela 2 - Mecanismos de acção e de resistência a antibióticos. ....	12
Tabela 3 - Halos de inibição (mm) aceitáveis para as estirpes de referência para os antibiogramas. ....	27
Tabela 4 - Concentrações de antibióticos e classificação de bactérias como S (Susceptível), I (Intermédio), ou R (Resistente) para <i>Staphylococcus</i> spp.. ....	30
Tabela 5 - Interpretação de ATB™ STAPH 5 quando os antibióticos são testados com 2 concentrações. ....	31
Tabela 6 - <i>Primers</i> usados para a detecção de genes.....	37

Tabela 7 - Identificação dos isolados com base na análise da sequência do gene para o rRNA 16S por consulta da base de dados de GenBank/EMBL. ....	42
Tabela 8 - Prevalência de diferentes espécies <i>Staphylococcus</i> spp. nas águas residuais, águas residuais tratadas e totais na ETAR.....	45
Tabela 9 e 9a - Halos de inibição (mm) de antibióticos em <i>Staphylococcus</i> spp. ....	46
Tabela 10 - Prevalência (%) de fenótipos de resistência e intermédio a antibióticos em <i>Staphylococcus</i> spp. provenientes de águas residuais e águas residuais tratadas da ETAR.....	50
Tabela 11 - Halos de inibição (mm) de antibióticos para o teste D .....	52
Tabela 12 - Halos de inibição (mm) de desinfetantes e metais em isolados <i>Staphylococcus</i> spp.. ....	53
Tabela 13 - Distribuição dos genes <i>ermA</i> , <i>ermC</i> e <i>msrA/B</i> nos isolados em estudo. ....	57
Tabela 14 - Fenótipo(s) de resistência associados ao perfil genético.....	58

**CAPÍTULO 1:**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

# CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 ENQUADRAMENTO

A resistência aos antibióticos não é um problema novo. O início da antibioterapia foi um período bem sucedido levando a que numerosas doenças infecciosas provocadas por bactérias pudessem ser controladas (Levy, 2002). Em 1928, Alexander Fleming descobriu o primeiro antibiótico natural, a penicilina. Este antibiótico foi isolado a partir de culturas de fungos do género *Penicillium* e, posteriormente, em finais dos anos 30, produzido em larga escala por Chain & Florey. A sua eficácia no combate às infecções bacterianas foi posta à prova durante a Segunda Guerra Mundial, permitindo salvar muitas vidas. Desde então, numerosos antibióticos foram isolados de seres vivos e produzidos laboratorialmente em larga escala. Assim, rapidamente os antibióticos tornaram-se fundamentais no combate às infecções de origem bacteriana, permitindo o aumento da esperança de vida no século XX. Além da medicina, também outras áreas, como a pecuária e aquacultura, beneficiaram do uso de antibióticos (Mazel & Davies, 1999; Kümmerer, 2004).

Perante este cenário, as bactérias, conhecidas pela sua plasticidade, foram capazes de desenvolver uma série de mecanismos que permitiram torná-las resistentes aos antibióticos. Desta forma, a emergência e disseminação da resistência a antibióticos tornou-se inevitável, sendo considerado actualmente um problema de saúde pública (Levy, 2002; 2004).

Quando se analisa o problema da resistência a antibióticos devem considerar-se dois pontos fundamentais: a selecção de microrganismos resistentes por acção de agentes antimicrobianos e a aquisição de genes de resistência por transferência horizontal de genes. O primeiro ponto decorre da ocorrência de antibióticos e/ou dos seus produtos de degradação no ambiente, permitindo a selecção de bactérias detentoras de genes de resistência em detrimento das que não são portadoras de tais elementos genéticos (Alonso *et al.*, 2001; Kümmerer, 2003). O meio século de uso abusivo e excessivo de antibióticos teve, sem dúvida, impacto na população microbiana (Mazel & Davies, 1999; Levy, 2004). O consumo mundial de antibióticos na agricultura e nas áreas da medicina humana e veterinária ronda

os milhões de quilogramas por ano (Levy, 2004). Segundo Levy (2000), a selecção de estirpes resistentes pode ocorrer não só durante o tratamento antimicrobiano mas também após esse tratamento. Os antibióticos não metabolizados e/ou os seus produtos de degradação são excretados juntamente com as fezes e a urina, chegando desta forma às estações de tratamento de águas residuais (ETARs) (Kümmerer, 2003, 2004; Hirsch *et al.*, 1999). Estudos levados a cabo por Al-Ahmad *et al.* (1999) demonstraram que alguns antibióticos permanecem inalterados, ou seja, não se degradam, no meio aquático por longos períodos de tempo, mesmo depois das águas residuais serem sujeitas a tratamentos em ETARs, podendo, assim, exercer pressões selectivas sobre as bactérias. Para além dos antibióticos, outros agentes com acção bactericida e/ou bacteriostática, como os desinfetantes e alguns metais pesados, poderão exercer um efeito de pressão selectiva (McDonnel & Russell., 1999; Levy, 2004; Kümmerer, 2004). Além disso, também a aquisição de genes de resistência por transferência horizontal de genes pode ocorrer nestes ambientes. Diversos estudos demonstram fortes evidências de que a transferência horizontal de genes é um processo comum em locais tão diversos como águas superficiais, águas residuais, solo e animais (Kruse & Sorum, 1994; Nikolisch *et al.*, 1994; Davison, 1999; Ohlsen *et al.*, 2003). As ETARs podem ser consideradas como locais favoráveis para a transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos entre bactérias, pelo facto de reunirem condições óptimas para essa ocorrência, como sejam as elevadas quantidades de biomassa e de nutrientes (Guardabassi *et al.*, 2001). De facto, a transferência horizontal de genes envolvendo resistência a antibióticos já foi descrita em lamas activadas e em câmaras imersas *in situ* em águas de ETARs em bactérias do género *Enterococcus* (Marcinek *et al.*, 1998). Neste aspecto, a presença de resíduos de agentes antimicrobianos pode favorecer não só a transferência de genes, mas também a selecção de organismos tolerantes a antibióticos. Todas estas condições resultam numa ecologia microbiana completamente diferente da da era pré-antibiótica.

São vários os estudos relativos a bactérias resistentes a antibióticos em meios hospitalares (Fontaine & Hoadley, 1976; Walter, 1985; Schmitz, 1999; Kümmerer, 2004). Contudo, estudos que foquem outros habitats são bem mais escassos. Actualmente, são várias as estirpes bacterianas que não respondem aos

tratamentos clínicos aplicados por já não serem susceptíveis a antibióticos. A maioria destas são bactérias comensais dos humanos, e com grande dispersão ambiental, contudo é ao nível clínico que mais se tem vindo a evidenciar o problema de resistência a antibióticos nestes isolados. Os estafilococos, que incluem diversos patogénios oportunistas, são exemplo de tais organismos, frequentemente associados a infecções nosocomiais (Kloos and Bannerman, 1994; Hiramatsu *et al.*, 1997). Alguns estudos, realizados nos Estados Unidos da América, Canadá e América latina, reportam que cerca de 50% das infecções nos cuidados intensivos são devidas a *Staphylococcus aureus* e a diversas espécies de estafilococos coagulase negativo (Pfaller *et al.*, 1997; Fridkin *et al.*, 1999; Lowy, 2003).

## **1.2 O CICLO URBANO DA ÁGUA COMO VEÍCULO DE DISSEMINAÇÃO DE MICRORGANISMOS**

A água é um dos habitats mais importantes para as bactérias e, por isso, representa um dos principais vectores para a sua disseminação. A água destinada ao consumo é captada nos rios, lagos ou lençóis freáticos, transportada até às Estações de Tratamento de Água (ETA), onde é sujeita a processos de purificação, e seguidamente encaminhada para Estações Elevatórias e Reservatórios que depois a conduzem até às torneiras dos consumidores. Depois de usada, a água, então designada por residual, é drenada para as Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs), e, depois de tratada, devolvida ao meio aquático.

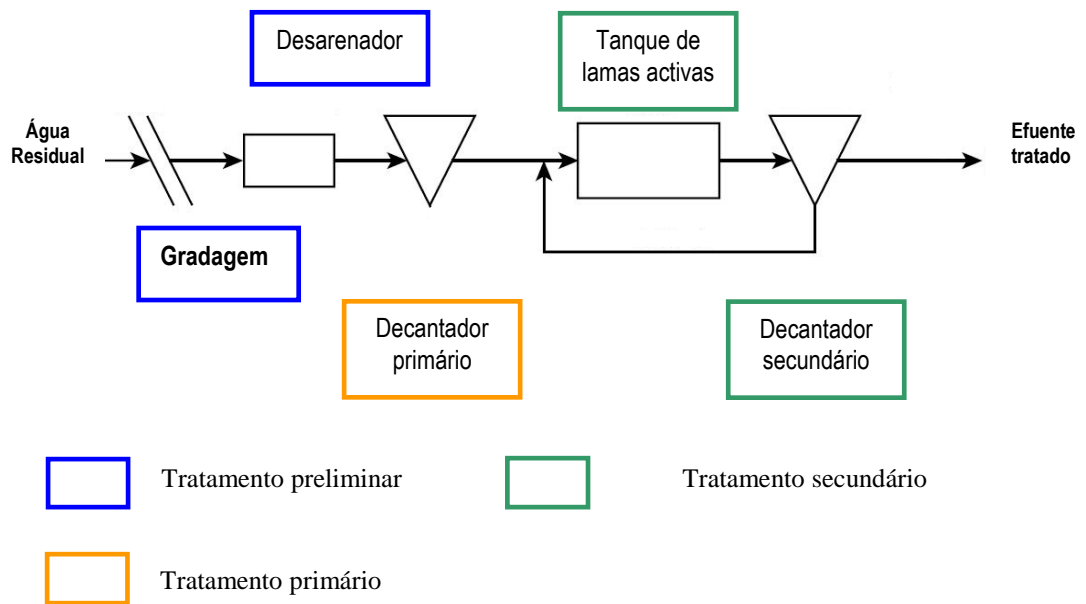
No que diz respeito à purificação da água, este é um processo que pretende remover os contaminantes que eventualmente contenha, tornando-a potável, isto é, própria para o consumo humano. Os tratamentos a que as águas captadas são sujeitas dependem da sua origem e podem incluir processos de tamização, filtração e desinfecção.

Vários microrganismos, alguns dos quais patogénicos ou oportunistas, demonstraram ser capazes de sobreviver nos sistemas de distribuição de água, (Marshall, 1992). Os microrganismos podem entrar nos sistemas de distribuição através de várias vias, como, por exemplo, durante os processos de tratamento (Characklis, 1998), ou através de deficiências nas infraestruturas dos sistemas de distribuição (Sibille *et al.*, 1998). O desenvolvimento de biofilmes nas superfícies das condutas permite que microrganismos e/ou partículas presentes na água adiram, contribuindo para o seu crescimento. O biofilme pode proteger os microrganismos da desinfecção, bem como aumentar a corrosão das condutas (Allen *et al.*, 1980; Ridgway & Olson., 1981).

Durante o transporte das águas através das condutas da rede de distribuição, as bactérias que aí vivem são expostas a diversas substâncias, como por exemplo, a metais. A exposição de populações bacterianas a metais, que se encontram à superfície das condutas, e a materiais de corrosão, que se depositam e acumulam no sistema de distribuição, pode conduzir à eliminação das bactérias susceptíveis a metais em detrimento de outras que são tolerantes. Alguns metais pesados têm sido apontados como possíveis factores na selecção bacteriana para a resistência a antibióticos (Alonso *et al.*, 2001). Armstrong *et al.* (1981) comparou a sensibilidade a antibióticos entre bactérias provenientes de águas captadas e de sistemas de distribuição e observou que a frequência de resistência a antibióticos era mais elevada nos isolados após tratamento (67,8%) do que antes (18,6%). Segundo os autores, estes resultados sugeriram que a selecção de bactérias resistentes a antibióticos podia estar associada ao tratamento das águas, mas também podia resultar da exposição a alguns metais pesados presentes nas condutas (Armstrong *et al.*, 1981).

As ETARs, por sua vez, têm como objectivo o tratamento das águas residuais produzidas diariamente nas múltiplas actividades domésticas, permitindo uma possível reutilização destas, através de um processo faseado que inclui processos mecânicos, físico-químicos e microbiológicos.

Na Figura 1 apresenta-se um esquema ilustrativo do tratamento a que as águas residuais podem ser sujeitas.



**Figura 1** – Esquema geral de tratamentos de uma ETAR.

(Adaptado de Ferreira & Sousa, 1998)

O tratamento pode incluir três etapas: a remoção de objectos de maiores dimensões e eventualmente de gorduras (tratamento preliminar); a remoção de sólidos decantáveis sob a forma de lamas (tratamento primário); e a degradação de substâncias orgânicas pela acção de microrganismos (tratamento secundário). Em algumas ETARs, as águas são também sujeitas a um tratamento terciário constituído por uma série de processos físico-químicos que têm como finalidade remover poluentes mais específicos ou promover a desinfecção da água (Brock & Madigan, 2000). Porém, em Portugal este tratamento é raro.

As ETARs são reconhecidas como locais favoráveis para a disseminação de determinantes de resistência a antibióticos, por várias razões. Além de constituírem um meio rico em nutrientes, recebem bactérias resistentes a antibióticos e podem tratar efluentes industriais, domésticos, hospitalares ou provenientes da agricultura, onde a presença de metais pesados, desinfectantes ou antibióticos pode ser um problema (Guardabassi *et al.*, 2001). São vários os estudos que demonstram a existência de bactérias resistentes a antibióticos e de

elementos genéticos que transportam resistência a antibióticos em comunidades bacterianas residentes em ETARs (Mach & Grimes, 1982; Blázquez *et al.*, 1996; Smalla & Sobczyk, 2002; Szczepanowski *et al.*, 2004; Auerbach *et al.*, 2007).

Outros estudos referem que bactérias resistentes a antibióticos persistem nos efluentes finais de ETARs (Reinthal *et al.* 2003; Ferreira da Silva *et al.*, 2006; Ferreira da Silva *et al.*, 2007). Uma vez que estes efluentes são lançados nos cursos de água naturais, as ETARs podem constituir uma forma de disseminação de bactérias resistentes a antibióticos e/ou dos seus genes.

As normas e os critérios que avaliam a qualidade dos efluentes finais de ETARs encontram-se legislados. Os parâmetros de descarga das águas residuais ao contrário das águas de consumo não incluem a análise de parâmetros microbiológicos.

### **1.3 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL COM AGENTES ANTIMICROBIANOS**

A produção total de antibióticos na Alemanha, em 1994, foi de 1831 toneladas, das quais 624 são penicilinas (Hirsch *et al.*, 1999). Embora não seja possível estimar as quantidades de antibióticos aplicados na medicina veterinária, os valores correspondentes à medicina humana são calculáveis. O mesmo estudo refere que uma elevada percentagem de cada antibiótico e dos seus metabolitos, que são excretados via urina e/ou fezes, é registada no meio ambiente (Tabela 1) (Hirsch *et al.*, 1999).

**Tabela 1**– Consumo anual de antibióticos na medicina humana e respectivas percentagens de excreção de antibióticos na Alemanha.

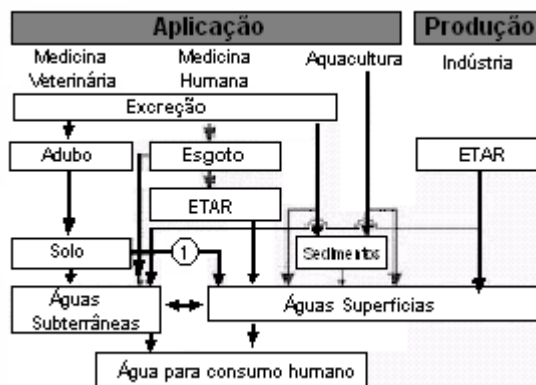
(Adaptado de Hirsch *et al.*, 1999)

Antibióticos	Doses diárias prescritas (milhões)	Dose diária (gramas)	Quantidade prescrita (toneladas)	Inalterada 80-90	Metabolitos 10-20
Amoxicilina	34	750 - 2250	25,5 – 127,5	30-60	20-30
Ampicilina	0,6	3000-6000	1,8 – 3,6	40	~60
Penicilina V	70	2000	140	~ 40	~60
Oxacilina	-	-	-	50-70	30-50
Penicilina G	0,1	240-720	1,8-3,6	~ 65	~20
Dicloxacilina	-	-	-	~ 15	-
Sulfametoxazol/ trimetoprim	41,6	400-1600	16,6-76	~ 60	-
Trimetoprima	41,6	80-360	3,3-15	>60	-
Eritromicina	19,8	200-1000	3,9-19,8	>60	-
Claritromicina	10,5	125-250	1,3-2,6	5-10	70-90
Cloranfenicol	20,1	-	-	>70	-
Clorotetraciclina	1,9	-	-	80-90	-
Tetraciclina	-	-	-	~60	~40
Minociclina	8	100-200	0,8-1,6	>80	-
Oxitetraciclina	-	-	-	>70	-
Doxiciclina	80,2	100-200	8-16		

Um estudo semelhante foi desenvolvido na Dinamarca por Halling-Sørensen *et al.* (1998), e revelou que os antibióticos usados para tratamento humano e animal atingem valores de consumo muito elevados. Neste país, a quantidade total anual de antibióticos foi calculada em 37,7 toneladas no caso de tratamento humano, enquanto 49,7 toneladas foram aplicadas na medicina veterinária.

A quantidade de antibióticos aplicada na União Europeia, durante o ano de 1996, rondou as 10 200 toneladas, sendo que 50% foram usados na medicina veterinária e como promotores de desenvolvimento. De acordo com Wise (2002), o consumo mundial de antibióticos estima-se entre as 100 000 – 200 000 toneladas por ano (Kümmerer, 2003).

A entrada dos antibióticos no ambiente pode dar-se por várias vias, resultando na contaminação das águas de superfície e residuais. A Figura 2 apresenta um esquema das possíveis vias de exposição das águas aos antibióticos (Hirsch *et al.*, 1999).



**Figura 2** – Vias possíveis de exposição de antibióticos nos recursos hídricos (o número 1 indica o processo de lixiviação).

(Adaptado de Hirsch *et al.*, 1999)

As vias de exposição podem ser subdivididas em dois grupos: substâncias usadas para tratamento humano e para tratamento veterinário (Jørgensen & Halling-Sørensen, 2000).

De acordo com as vias de exposição apresentadas, os antibióticos aplicados na medicina humana e/ou veterinária ao serem descarregados nos esgotos domésticos, podem chegar às ETARs (Kümmerer, 2004). Também os que são aplicados na medicina veterinária, depois da defecação ou micção, podem atingir o solo e afectar os organismos que aí vivem. Os excrementos dos animais são, muitas vezes, usados como adubo que é conservado em tanques durante algum tempo antes da dispersão nos campos. Após lixiviação, os antibióticos e os seus metabolitos podem atingir as águas subterrâneas (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Jørgensen & Halling-Sørensen, 2000).

Os antibióticos são extensamente usados em aquacultura. As principais classes de fármacos usadas são as tetraciclina, sulfonamidas e cloranfenicol. O meio receptor vai ser exposto directamente aos antibióticos, pois estes, bem como os outros quimioterápicos, são aplicados em conjunto com aditivos alimentares. No entanto, verifica-se a acumulação de antibióticos devido ao excesso de alimento aplicado e à produção de excrementos por parte dos peixes. A maior parte das drogas em excesso permanece nos sedimentos, onde pode ocorrer degradação ou

lixiviação para as águas subterrâneas circundantes (Hirsch *et al.*, 1999). Outra fonte que contribui para o aumento de antibióticos e metabolitos nos recursos hídricos refere-se à descarga de resíduos provenientes de indústrias farmacêuticas. Se os antibióticos não forem degradados ou metabolizados durante o tratamento nas ETARs, vão acabar por contaminar o solo e, assim, atingir os lençóis freáticos, as águas superficiais e, em última instância, a água para consumo humano (Hirsch *et al.*, 1999). Todas as vias de dispersão discutidas até aqui, aplicam-se igualmente aos diversos metabolitos de antibióticos, capazes de gerar também efeitos de pressão selectiva (Richardson & Bowron, 1985; Kümmerer, 2004).

Também os metais e os desinfectantes têm sido referidos como agentes geradores de pressão selectiva. O sector industrial é o principal responsável pela existência de metais pesados nas águas residuais. Por outro lado, os desinfectantes, usados em ambientes, superfícies e utensílios, são introduzidos no meio hídrico através dos efluentes produzidos pelos hospitais, quintas e estabelecimentos de processamento de alimentos.

#### **1.4 MECANISMOS DE ACÇÃO E RESISTÊNCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS**

Os antibióticos são substâncias produzidas por microrganismos, bactérias ou fungos, e que têm capacidade para inibir a multiplicação bacteriana, exercendo acção bacteriostática, ou bactericida, provocando a morte de bactérias alvo. Atendendo ao sentido etimológico da palavra, as substâncias produzidas sinteticamente (por exemplo, sulfonamidas ou quinolonas) não devem ser designadas por antibióticos mas antes por agentes antimicrobianos. Desta forma, o conceito de agente antimicrobiano inclui todas as substâncias capazes de causar a morte e inibir o crescimento dos microrganismos (Brock & Madigan, 2000; Garret *et al.*, 1998). Os antibióticos constituem uma das classes de substâncias mais importantes produzidas, em larga escala, por processos microbianos.

O principio da antibioterapia radica no facto de os antibióticos serem substâncias que afectam mais adversamente os microrganismos do que os hospedeiros,

actuando como agentes tóxicos selectivos. O grau de toxicidade selectiva depende dos mecanismos de acção do fármaco. Existe uma grande pluralidade de classificações para os antibióticos. Estes podem agrupar-se de acordo com o seu modo de acção ou mais vulgarmente segundo a sua estrutura química. Cada classe é caracterizada pelo respectivo princípio activo e os vários membros distinguem-se através da adição ou subtracção de grupos químicos suplementares.

Os mecanismos de acção e de resistência dos antibióticos encontram-se bem documentados. Os mecanismos de acção compreendem a inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese proteica por acção sobre os ribossomas, alteração da síntese dos ácidos nucleicos e inibição de diversas enzimas do metabolismo citoplasmático (Garret, 1998; Brock & Madigan, 2000; Fluit *et al.*, 2001).

Os principais processos de resistência a antibióticos podem envolver a inactivação do antibiótico através de ataque enzimático, mecanismos de efluxo, diminuição de permeabilidade ou alteração dos locais alvo. A Tabela 2 apresenta resumidamente as principais famílias de antibióticos, os seus mecanismos de acção e de resistência.

**Tabela 2** – Mecanismos de acção e de resistência a antibióticos.

(Garret *et al.*, 1998; Brock & Madigan, 2000, Fluit and *et al.*, 2001)

<b>Família</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Mecanismo de acção</b>	<b>Mecanismos de resistência</b>
<b><math>\beta</math>-lactâmicos</b>	Penicilinas		Hidrólise enzimática do anel $\beta$ -lactâmico ( $\beta$ -lactamases)
	Amoxicilina	Inibição da síntese de peptidoglicano, através da acção das PBP <sup>a</sup>	Alteração das PBPs por mutação
	Meticilina		
	Oxacilina		Redução da permeabilidade
	Alteração das enzimas		
<b>Quinolonas</b>	Ciprofloxacina	Bloqueio da acção das topoisomerases do tipo II, DNA girase e topoisomerase IV	Mecanismo de efluxo Redução da permeabilidade por alteração das porinas
<b>Tetraciclina</b>	Tetraciclina	Inibição da síntese proteica ao nível da subunidade 30S dos ribossomas	Fraca incorporação intracelular e efluxo do antibiótico Impermeabilização da membrana citoplasmática Protecção do ribossoma por proteínas citoplasmáticas
<b>Aminoglicosídeos</b>	Gentamicina	Inibição da síntese proteica por acção sobre a subunidade 30S dos ribossomas	Inactivação enzimática dos antibióticos Alteração dos ribossomas por mutação Mecanismo de efluxo
<b>Glicopéptidos</b>	Vancomicina	Inibição da síntese de peptidoglicano	Alteração enzimática dos ribossomas
<b>Macrólidos</b>	Eritromicina	Inibição da síntese proteica ao nível da subunidade 50S dos ribossomas	Mutação ribossomal
<b>Sulfamidas</b>	Sulfametoxazol-trimetropim	Inibição competitiva da dihidrofolato redutase (DHFR), bloqueando a síntese de DNA e RNA	Aumento da produção de DHFR Alteração no gene estrutural da DHFR por mutação
<b>Lincosamidas</b>	Lincomicina Clindamicina	Actuação ao nível da subunidade 50S dos ribossomas	Alteração enzimática do ribossoma Impermeabilização do invólucro bacteriano

<sup>a</sup> *Penicillin-Binding-Proteins*

Contrariamente ao que se verifica com os antibióticos, os mecanismos de acção dos metais e desinfectantes nem sempre estão bem esclarecidos e descritos na literatura. Relativamente aos desinfectantes testados neste estudo, sabe-se que o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), usado como biocida para a esterilização, desinfecção e anti-sepsia, funciona como agente oxidante, produzindo radicais livres  $OH^\cdot$ , que oxida grupos tiol de enzimas e outras proteínas, enquanto o hipoclorito de sódio, mais conhecido por lixívia, inibe a síntese de DNA (McDonnell & Russel, 1999).

Metais referidos frequentemente como contaminantes ambientais foram seleccionados para serem testados neste estudo. Os compostos de mercúrio são capazes de se combinar com grupos  $-SH$  (tiol) das proteínas, inactivando-as através da enzima redutase ( $Hg^{2+} \rightarrow Hg^0$ ). Também os iões de prata interagem com os grupos tiol das enzimas e outras proteínas inactivando as bactérias (McDonnell & Russel, 1999).

## **1.5 AQUISIÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS**

### **1.5.1 RESISTÊNCIA ADQUIRIDA E NATURAL**

A resistência aos antibióticos pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca/natural ocorre em bactérias que são insensíveis ao agente sem que tenha havido aquisição de factores de resistência e são devidas a aspectos fisiológicos e estruturais da célula (Murray, 1997). Por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* é naturalmente resistente à penicilina, devido principalmente à incapacidade da substância atravessar a membrana externa e à desactivação do antibiótico através de enzimas. Por outro lado, a resistência adquirida surge numa população bacteriana como consequência da ocorrência de modificações no DNA da bactéria por mutação cromossómica ou por transferência horizontal de genes (Guardabassi & Dalsgaard, 2002; Sundsfjord *et al.*, 2004). A resistência intrínseca resulta de um longo processo de evolução genética, enquanto a

adquirida pode surgir num curto espaço de tempo (Guardabassi & Dalsgaard, 2002).

## 1.5.2 MECANISMOS DE AQUISIÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

### MUTAÇÕES CROMOSSÓMICAS

As mutações são alterações na sequência nucleotídica e podem ocorrer espontaneamente durante o processo de replicação do DNA. A probabilidade de ocorrência de uma mutação assume valores relativamente baixos: estima-se em  $10^{-8}$  por par de nucleotídeos e por geração, isto é, em  $10^8$  bactérias descendentes de uma célula pode ocorrer apenas um organismo detentor de uma mutação (Garrett *et al.*, 1998).

A resistência conferida por mutação é geralmente isolada, para um só composto ou grupo de compostos semelhantes, e a probabilidade de desenvolvimento de resistência simultânea a vários fármacos é pequena. Se a frequência de mutantes resistentes para um antibiótico fosse de  $10^{-6}$ , a frequência de mutação para uma resistência simultânea a dois fármacos seria de  $10^{-12}$ , a três  $10^{-18}$ , a quatro  $10^{-24}$  (Brock & Madigan, 2000; Ferreira & Sousa, 1998; Garrett *et al.*, 1998). Deste modo, a multirresistência, observada em numerosos microrganismos que demonstram reduzida susceptibilidade a antibióticos não pode ser explicada apenas por mutação, mas antes por recombinação genética.

### TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES

Durante muitos anos assumiu-se que a transferência genética entre diferentes espécies de microrganismos era um fenómeno raríssimo. Estudos recentes vieram contrariar a ideia de que a resistência a antibióticos era adquirida apenas por mutação espontânea; durante a evolução bacteriana, a capacidade de explorar novas condições ambientais e responder a novas pressões selectivas surge, principalmente, como fruto da aquisição de genes por transferência horizontal

entre bactérias. O processo de transferência horizontal de genes (THG) contribuiu para a diversidade genética existente nas bactérias.

A transferência horizontal de genes (THG) consiste na dádiva de material genético entre uma célula dadora e uma receptora. Este conceito aparece em contraposição à transferência vertical de genes que ocorre entre os progenitores e as células-filhas (Stansfield *et al.* 1998; Miller, 1998). Os possíveis mecanismos de THG são a conjugação, a transdução e a transformação.

Através da transformação há entrada de DNA livre, geralmente proveniente da lise celular, e sua posterior incorporação estável em células competentes. (Brock & Madigan, 2000; Miller, 1998). A transformação natural entre bactérias distantemente relacionadas parece ser possível (Dröge *et al.*, 1998).

A transdução consiste na transferência de DNA mediada por um bacteriófago e pode ser de dois tipos, generalizada ou especializada. A transdução generalizada envolve o ciclo lítico, em que qualquer fragmento de DNA da bactéria hospedeira pode, por engano, ser encapsidado, originando partículas denominadas de partículas transdutoras que podem então transferir DNA para outras bactérias. Por outro lado, a transdução especializada está associada ao ciclo lisogénico de bacteriófagos temperados. Na presença de um estímulo, por exemplo radiações UV, o ciclo vegetativo do bacteriófago é induzido e ocorre a excisão do DNA viral do genoma bacteriano. Porém, por vezes, esta separação pode ser defeituosa e retirar não só sequências virais mas também sequências bacterianas vizinhas do local de integração (Brock & Madigan, 2000; Miller, 1998). A transdução não é considerada um mecanismo muito importante na troca de material genético na natureza, pois o seu espectro de acção é muito reduzido (Dröge *et al.*, 1998).

A conjugação consiste na transferência unidireccional de DNA, plasmídico ou integrado em cromossomas, por contacto directo entre bactérias através de um tubo de conjugação (*pilus*). O processo de conjugação é mediado por plasmídeos F, que contém genes localizados que codificam proteínas envolvidas na formação de *pilus* e processo de conjugação. Há a passagem de DNA plasmídico de uma célula dadora que apresenta factor (F<sup>+</sup>), para uma célula receptora, que não contém factor (F<sup>-</sup>), e o DNA é replicado pelo processo do círculo rolante. Alternativamente, o factor F pode ser integrado no cromossoma, designando-se a

estirpe dadora por Hfr (*High frequency of recombination*) (Brock & Madigan, 2000; Roy, 1999; Miller, 1998; Dröge *et al.*, 1998). Os processos de transferência de material genético anteriormente referidos podem ocorrer em vários habitats, tais como a água, sedimentos, solo, plantas e animais (Guardabassi & Dalsgaard, 2002).

### MIGRAÇÃO INTRACELULAR DE GENES QUE CONFEREM RESISTÊNCIA

A disposição dos genes no genoma não é necessariamente estável. Existem segmentos de DNA, como por exemplo aqueles que conferem resistência aos antibióticos, capazes de migrar de um ponto para o outro do genoma bacteriano. Este movimento pode ocorrer ou ser facilitado por transposões e integrões. Os transposões podem ser sequências de inserção, na sua versão mais simples, ou transposões complexos. As sequências de inserção consistem em pequenos segmentos de DNA com um gene que codifica para a transposase ladeado por extremidades com sequências de repetição invertida (SRI). Os transposões complexos são segmentos maiores com uma região central que contem vários genes, sendo que alguns conferem resistência a antibióticos e metais pesados, factores de virulência e outros, flanqueados por SRI. Estes últimos movem-se como uma unidade, podendo saltar do cromossoma para um plasmídeo ou para o genoma de um bacteriófago, ou vice-versa. Existem, também, transposões conjugativos que apresentam a capacidade de transferência por conjugação permitindo a sua transferência não só de um local para o outro do genoma bacteriano mas também de uma bactéria para outra.

Segundo Hall & Collis (1999), os integrões são unidades genéticas que incluem componentes de um sistema de recombinação sítio-específica que permite capturar e mobilizar genes contidos em elementos genéticos móveis, por vezes cassetes de genes. A expressão de tais cassetes de genes inseridas nos integrões é possível, devido à existência de um promotor localizado a montante da zona de integração. Desta forma, transposões e integrões agem como vectores naturais de clonagem e de expressão. Além disso, as barreiras de dispersão destes elementos são reduzidas, uma vez que estes elementos genéticos não necessitam de regiões de homologia entre transposição/integrão e o local onde vão ser inseridos (Bennett,

1999). Deste modo, as transposições e as integrões facilitam a propagação de genes de resistência pela população bacteriana através de mecanismos de THG (Brock & Madigan, 2000; Garret *et al.*, 1998).

## **1.6 FACTORES QUE PODEM PROMOVER A SELECÇÃO DE RESISTÊNCIA**

Apesar de existir uma série de factores que podem influenciar o desenvolvimento de resistência numa população de bactérias, a exposição contínua e prolongada de bactérias tolerantes a concentrações subterapêuticas de antibióticos pode promover a selecção de organismos resistentes. Este fenómeno designa-se por pressão selectiva e pode ocorrer no hospedeiro ou no meio ambiente (Kümmerer, 2004). A exposição de bactérias a concentrações subterapêuticas de agentes antimicrobianos, que ocorre, por exemplo, quando os antibióticos são usados como promotores de crescimento (Khachatourians, 1998; Witte *et al.*, 1999; Aarestrup *et al.*, 2001) ou devido ao uso impróprio na medicina humana e veterinária (Teubner, 1999), pode aumentar a velocidade com que as bactérias resistentes são seleccionadas. Também os metais e desinfectantes são referidos como factores de selecção para a resistência a antibióticos (Alonso *et al.*, 2001; Levy, 2002; Kümmerer, 2004; Summers, 2006). Os metais pesados e desinfectantes conduzem ao desenvolvimento de resistência a antibióticos através de duas formas possíveis. Os genes que codificam resistência a metais pesados podem localizar-se na mesma estrutura genética que os da resistência a antibióticos, sendo o exemplo mais frequente a coexistência no plasmídeo ou em elementos genéticos móveis (Wireman *et al.*, 1997). Alternativamente, as bactérias podem apresentar mecanismos de resistência não específicos a metais pesados, desinfectantes e antibióticos, como é o exemplo do sistema codificado pelos genes *marA* em *Escherichia coli*, que confere resistência a mercúrio e a tetracilina (Seoane & Levy, 1995). Em qualquer um dos casos, a exposição a uma substância resulta na selecção de bactérias resistentes a outra substância (co-selecção) (Rasmussen & Sørensen, 1998; Guardabassi & Dalsgaard, 2002).

São vários os estudos que revelam o risco dos genes que conferem resistência a antibióticos serem disseminados pela comunidade bacteriana através de selecção indirecta por metais (Alonso *et al.*, 2001; Levy, 2002; Kümmerer, 2004; Summers, 2006). A hipótese da ocorrência de co-selecção é corroborada pela evidência indirecta de que as bactérias isoladas a partir de sedimentos marinhos poluídos com metais pesados são significativamente mais resistentes a antibióticos do que aquelas que vivem em ambientes não poluídos (Rasmussen & Sørensen, 1998). Outro estudo, levado a cabo por Berg *et al.* (2005), demonstra que a introdução de cobre em solos para agricultura seleccionam não só resistência a esse metal mas também indirectamente a resistência a antibióticos. McArthur *et al.* (2001) concluiu que em rios em que não eram descarregadas quaisquer bactérias resistentes a antibióticos as elevadas concentrações de metais, de origem industrial, contribuíam para a selecção indirecta de resistência a antibióticos.

## **1.7 O GÉNERO *STAPHYLOCOCCUS***

O género *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococceae*. Os estafilococos são cocos Gram positivos, apresentam diâmetro entre 0,5 e 1,5 µm e são desprovidos de motilidade. Agrupam-se caracteristicamente em cachos, embora possam ocorrer como cocos isolados, aos pares ou em cadeias curtas. São aeróbios facultativos e produzem ácidos por degradação da glicose. A parede celular contém peptidoglicano e ácidos teicóicos. Os *Staphylococcus* são susceptíveis à acção da lisostafina, mas resistentes à lise pela lisozima (Kloos & Jorgensen, 1985; Kloos *et al.*, 1992; Ferreira & Sousa, 1998). Os estafilococos formam colónias de 2 a 3 mm de diâmetro, brilhantes, lisas e opacas. A cor das colónias pode variar de branco a amarelo dourado ou alaranjado. Toleram elevado teor de NaCl (10%) e crescem entre os 18°C e 40°C. É prática corrente incorporar sal quando se quer obter um meio selectivo para estafilococos (Kloos & Jorgensen, 1985; Kloos *et al.*, 1992; Ferreira & Sousa, 1998).

Os estafilococos apresentam alguns factores de virulência, isto é, mecanismos que permitem a invasão do hospedeiro ou a evasão ao sistema imunitário (Kloos

& Jorgensen, 1985; Kloos *et al.*, 1992; Ferreira & Sousa, 1998). Estes mecanismos encontram-se mais extensamente estudados na espécie *Staphylococcus aureus*. Um desses factores consiste na capacidade de produzirem coagulase. Trata-se de uma enzima extracelular que estimula a reacção de coagulação no plasma formando um complexo com a protombina, conduzindo ao depósito de fibrina em redor dos estafilococos protegendo-os, assim, da fagocitose. Todavia, só uma espécie patogénica para os humanos é capaz de a produzir, *Staphylococcus aureus*. Desta forma, esta enzima torna-se importante na identificação desta espécie (Kloos & Jorgensen, 1985; Kloos *et al.*, 1992; Ferreira & Sousa, 1998). Os estafilococos são conhecidos pela sua ubiquidade no meio ambiente (Kloos, 1980), podendo ser encontrados em produtos alimentares (carne, leite e queijo), em solo ou areia, em água doce ou salgada e em poeiras na atmosfera (Kloos *et al.*, 1992). No entanto, a maior parte dos estafilococos são descritos como habitantes da pele e mucosas de humanos, podendo existir em densidades até  $10^4$ - $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup> (Kloos *et al.*, 1992; Huebner, *et al.*, 1999).

Os estafilococos são importantes patogénicos para os humanos. De entre os estafilococos, os *S. aureus* são considerados como os principais agentes etiológicos nas infecções nosocomiais. Podem causar uma série de infecções superficiais e profundas em humanos e animais, como furúnculos, impetigo, abscessos, celulite, osteomielites, artrites, pneumonias, empiemas, meningites, bactériemia, septicemias, endocardites e síndrome da pele escaldada (Kloos & Jorgensen, 1985). Por outro lado, durante muito tempo, considerou-se que os estafilococos coagulase negativo tinham reduzida virulência (Kloos *et al.*, 1992; Kloos & Bannerman, 1994, Huebner, *et al.*, 1999). Contudo, tem-se verificado um número crescente de estudos que os referem como patogénicos oportunistas (Kloos *et al.*, 1992; Kloos & Bannerman, 1994; Kessie *et al.*, 1998). Os estafilococos coagulase negativo encontram-se em meios hospitalares e muitos são considerados como agentes importantes na aquisição de infecções, especialmente, em doentes imunodeprimidos, recém-nascidos e pacientes com próteses (Kloos & Bannerman, 1994).

As principais espécies de estafilococos coagulase negativo encontradas em seres humanos são *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (Huebner, *et al.*, 1999). *S.*

*epidermidis* é habitante regular da pele e mucosas, sendo considerado, de entre os coagulase negativo, a espécie com maior prevalência na pele humana e com maior potencial patogénico, sendo também apontado como importante agente de bactéremia e endocardites em serviços hospitalares. A sua virulência deve-se à produção de um exo-polissacarido, que aumenta a aderência do microrganismo a superfícies inertes, formando biofilmes, ficando, assim, protegido da acção do sistema imunitário e dos antibióticos (Huebner, *et al.*, 1999). *S. saprophyticus* é considerado um organismo patogénico do aparelho urinário, especialmente, em mulheres jovens e sexualmente activas. É considerado um dos agentes mais frequentes em infecções urinárias, estando a sua patogenicidade relacionada com a capacidade de adesão às células do sistema urinário (Kloos *et al.*, 1992).

Alguns estudos mostram que pode haver transmissão directa, através do contacto com a pele de um paciente infectado, ou transmissão indirecta, via contacto com as mãos dos prestadores de cuidados saudáveis ou com equipamentos contaminados como cateteres e próteses (Emmerson, 1994). Além disso, a contaminação de alimentos, como por exemplo a carne, também é referida com veículo de transmissão de *Staphylococcus* spp. (Kloos *et al.*, 1992; Rodríguez-Calleja *et al.*, 2006).

## **1.8 DISTRIBUIÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS NO MEIO AMBIENTE**

São vários os estudos que revelam resistência a antibióticos em *Staphylococcus* spp. de proveniência clínica, como por exemplo, para a lincomicina (Mee-Marquet *et al.*, 2004; Haroche *et al.*, 2003), para a eritromicina (Randrianirina *et al.*, 2007), para a tetraciclina (Ardic *et al.*, 2005), para a clindamicina (Steward *et al.*, 2005) e para a gentamicina (Cafferkey *et al.*, 1983).

Também se conhecem diversos estudos relativamente à existência de estafilococos resistentes a antibióticos em isolados de animais. Num estudo realizado por Patel *et al.* (1998), foram isolados *Staphylococcus* da pele e

mucosas de gatos, sendo que 22 em 187 demonstraram resistência a antibióticos como a lincomicina, a oxitetraciclina, cotrimoxazol e enrofloxacin. Morris *et al.* (2006) detectaram 35% de *S. aureus*, 17% de *S. intermedius* e 40% de *S. schleiferi* resistentes à metilina em isolados de cães e gatos.

Os escassos estudos relativos a *Staphylococcus* spp. de origem ambiental referem a existência de *S. simulans*, *S. lentiscus*, *S. xylosus* e *S. hyicus*, isolados de águas poluídas de Marrocos, detentores de determinantes genéticos que codificam resistência a antibióticos, tais como a tetraciclina e o cloranfenicol (Kessie *et al.*, 1998).

**CAPÍTULO 2:**  
**MATERIAIS E MÉTODOS**

## CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAS

Foram estudados 39 isolados de estafilococos provenientes de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) situada na região Norte de Portugal. Esta ETAR está dimensionada para servir uma população de 100 000 habitantes de uma área com uma densidade populacional de 1000 habitantes por Km<sup>2</sup>. Trata um caudal constituído por efluentes domésticos (cerca de 70%) e industriais pré-tratados (cerca de 30%). O afluente (água residual bruta) é submetido a um tratamento preliminar (gradagem) para a remoção de objectos de grandes dimensões, e depois sujeito a tratamento primário (tanque de sedimentação primário e desarenação) que remove principalmente os sólidos em suspensão sedimentáveis. O tratamento secundário do efluente primário é realizado por lamas activadas. Após a sedimentação das lamas activadas (tanque de decantação), o efluente tratado é descarregado num sistema de água natural. O tempo total de retenção hidráulica é de aproximadamente 12 h.

A amostragem e o isolamento das bactérias foram realizados previamente, conforme se descreveu em Ferreira da Silva *et al.* (2007), em 4 períodos diferentes: Novembro de 2004, Janeiro, Abril e Julho de 2005. Recolheu-se 1 litro de amostra de água residual afluente (entrada no tanque de lamas) e de água tratada proveniente do decantador secundário num recipiente estéril que, seguidamente, foi transportado para o laboratório e analisado.

Os presumíveis estafilococos foram isolados em Mannitol Salt Agar (Pronadisa) a 30°C e purificados por subcultura em meio nutritivo. Os isolados foram caracterizados preliminarmente através da coloração de Gram e presença de citocromo *c* oxidase e de catalase. As culturas puras foram conservadas a -80°C, em meio nutritivo LB (5 g/l triptona; 2,5 g/l) suplementado com glicerol a 15% (v/v).

## **2.1 MANIPULAÇÃO DE CULTURAS, MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO**

### **2.2.1 MANIPULAÇÕES DE CULTURAS E DNA**

Todas as manipulações de culturas e DNA foram efectuadas numa câmara de fluxo laminar (Telstar, Bio-II-A).

### **2.2.2 MEIOS DE CULTURA**

a. Meio selectivo utilizado para isolar e manusear as culturas: Mannitol Salt Agar (MSA, Pronadisa). Preparou-se suspendendo 111 g num litro de água destilada. A suspensão foi aquecida até ebulição e agitada vigorosamente, durante 1 min.

b. Meio nutritivo usado na purificação e manuseio das culturas: Plate Count Agar (PCA, Pronadisa). Preparou-se suspendendo 23,5 g de meio num litro de água desmineralizada.

c. Meio utilizado para realizar os antibiogramas pelo método de difusão em agar: Mueller-Hinton (Oxoid). Preparou-se suspendendo 38 g num litro de água destilada. Para testar os antibióticos vancomicina (V5), metilina (MET) e oxacilina (OX) este meio foi suplementado com NaCl 2% (p/v).

Todos os meios foram esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos. Depois de autoclavados, arrefeceram até cerca de 45°C e, em condições de assepsia, foram distribuídos por placas de Petri de 90 mm. No caso do meio Mueller-Hinton (Oxoid) usaram-se placas de 9 cm de diâmetro, em que este se colocou de modo a ter uma superfície plana e uma altura uniforme de aproximadamente 4 mm. Quando os meios estavam solidificados, as placas foram invertidas e armazenadas até serem usadas.

## 2.3 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR

Os isolados criopreservados foram cultivados quinzenalmente em meio nutritivo (PCA ou MSA) e foram incubados a 30°C, durante um período máximo de 24 h. Todos os isolados foram sujeitos aos seguintes testes de caracterização fenotípica preliminar: coloração de Gram, morfologia celular e presença de citocromo *c* oxidase, de catalase e de coagulase.

### 2.3.1 COLORAÇÃO DE GRAM

A partir de células crescidas em PCA, durante 16-24 h, fez-se e fixou-se um esfregaço de cada isolado. Posteriormente, cobriu-se o esfregaço com solução de cristal de violeta e deixou-se actuar durante 60 s; lavou-se o corante com água destilada. Após o uso da solução de cristal de violeta, em que todas as células ficam coradas, seguiu-se a aplicação de soluto de Lugol, o mordente, que, uma vez combinado com o corante primário, forma um complexo insolúvel intracelular. De seguida, aplicou-se álcool etílico a 95%, durante 30 s e lavou-se, novamente, com água destilada. Finalmente, seguiu-se a aplicação de safranina O, um corante secundário, que permite observar as bactérias Gram-negativas com cor vermelha. Estas distinguem-se das bactérias que coram de roxo, designadas Gram-positivas. Esta técnica, além de permitir distinguir Gram-positivos de Gram-negativos, também permitiu determinar a forma dos organismos (cocos, cocobacilos ou bastonetes). Como estirpes de controlo foram usadas *Staphylococcus aureus* DSM 1104 (controlo positivo) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (controlo negativo).

#### Reagentes para a coloração de Gram:

<b>Violeta de Cristal</b>	2 g violeta de cristal 20 ml álcool etílico a 95% 0,8 g oxalato de amónia 100 ml água destilada
<b>Soluto de Lugol</b>	2 g KI 1 g cristais de iodo 100 ml água destilada
<b>Safranina O</b>	2,5 g de safranina O a 100 ml de álcool etílico a 95% adicionou-se 10 ml desta solução a 100 ml de água destilada

### **2.3.2 TESTE DA CATALASE**

Para detectar a presença da enzima catalase adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogénio (3 %, p/p) sobre uma lâmina de microscópio limpa e seguidamente colocou-se uma ansa de células crescidas em PCA. A observação imediata de formação de bolhas de oxigénio indicou uma reacção positiva. Como controlo positivo foi usada a estirpe *Staphylococcus aureus* DSM 1104.

### **2.3.3 TESTE DA CITOCROMO C OXIDASE**

A técnica utilizada para detectar a presença de citocromo *c* oxidase consistiu em colocar numa tira de papel Whatman algumas gotas de reagente tetrametil-p-fenilenediamina dihidroclorato (TMDP) a 1%. Com um palito, retirou-se uma colónia de uma cultura em PCA que foi esfregada sobre o papel.

Uma reacção positiva corresponde ao aparecimento de cor azul e negativa quando não há aparecimento de cor. Esta coloração resulta da oxidação do reagente pela citocromo *c* oxidase; o reagente oxidado é azul e a forma reduzida é incolor. Como estirpes de controlo foram usadas *Staphylococcus aureus* DSM 1104 (controlo negativo) e *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 (controlo positivo).

### **2.3.4 TESTE DA COAGULASE**

Realizou-se a pesquisa da enzima coagulase através da metodologia em tubo (pesquisa de coagulase livre), utilizando plasma de coelho liofilizado (Biokar Diagnostics). Inoculou-se com uma ansa de células crescidas em meio PCA, 0,3 ml de plasma reconstituído e incubou-se a 37°C. As leituras realizaram-se após 4 e 24 h de incubação. A formação de coágulo foi indicativa de uma reacção positiva. Utilizou-se como controlo positivo a estirpe *Staphylococcus aureus* DSM 1104.

## 2.4 DETERMINAÇÃO DE FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS, DESINFECTANTES E METAIS PESADOS

### 2.4.1 ESTIRPES DE REFERÊNCIA

As estirpes de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* DSM 1104 foram incluídas em cada ensaio de modo a controlar a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados obtidos. Os halos de inibição (mm) esperados para estas estirpes de referência estão indicados na Tabela 3.

**Tabela 3: Halos de inibição (mm) aceitáveis para as estirpes de referência para os antibiogramas.**

(Adaptado de SFM\*, 2006)

Antibióticos	Halos de inibição (mm) para estirpes de referência	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 1104
Amoxicilina (AML)	22,0 – 26,5	---
Ciprofloxacina (CIP)	31,0 – 38,0	---
Gentamicina (CN)	19,0 – 26,0	19,0 – 27,0
Sulfametoxazol/trimetoprim (SXT)	25,5 – 30,5	28,0 – 32,5
Tetraciclina (TE)	18,0 – 25,0	24,0 – 30,0

\* Société Française de Microbiologie

## 2.4.2 DETERMINAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS – ANTIBIOGRAMAS

A resistência a antibióticos foi testada pelo método de Kirby-Bauer, com base nas recomendações do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006).

A susceptibilidade bacteriana a agentes antimicrobianos pode ser medida *in vitro* usando o método de difusão em agar. Usando esta metodologia, os agentes antimicrobianos são aplicados sob a forma de discos de papel de filtro. Simultaneamente, os discos absorvem a água do meio, dissolvendo o antibiótico, que, assim, fica livre para se difundir através do agar, de acordo com as leis físicas da difusão. O resultado é a formação de um gradiente de concentração de antibiótico que decresce com a distância ao disco. Este processo é mais rápido do que a multiplicação celular. Quando esta ocorre será condicionada pela concentração de antibiótico nos diferentes pontos da placa, permitindo determinar a zona de inibição (Washington, 1985).

### a) Preparação do inóculo

De acordo com as recomendações, utilizou-se um inóculo com uma densidade celular correspondente a 0,5 na escala de McFarland. Em primeiro lugar, preparou-se o inóculo-padrão, usando colónias de *Staphylococcus aureus* DSM 1104 crescidas em PCA que foram homogeneizadas em solução salina estéril (NaCl 0,85%, p/v). A densidade óptica (DO) da suspensão foi medida num espectrofotómetro a 625 nm de forma a atingir valores de absorvância compreendidos entre 0,220 e 0,240, que corresponde a 0,5 unidades McFarland ( $\sim 10^8$  CFU/ml) (SFM, 2006). De seguida, fez-se uma suspensão directa em solução salina para todas as amostras para obter uma turvação coincidente com a da suspensão-padrão preparada previamente. A comparação entre a suspensão-padrão e as demais amostras foi facilitada pelo uso de um fundo branco com uma linha contrastante preta.

### b) Inoculação do meio de cultura

Procurou-se que o período de tempo entre a preparação do inóculo e a inoculação do meio de cultura não fosse superior a 15 min. A inoculação foi feita com auxílio de uma zaragatoa previamente mergulhada na suspensão bacteriana, tendo

o cuidado de a apertar e rodar três vezes contra as paredes do tubo e de seguida o mesmo número de vezes acima do nível do líquido, com a finalidade de eliminar o líquido em excesso. Posteriormente, com a mesma zaragatoa semearam-se por estrias apertadas as placas de Mueller-Hinton (Oxoid), em três direções, perpendiculares entre si, por toda a superfície do meio. Deixou-se secar o inóculo durante 5 min.

**c) Aplicação dos discos de antibióticos**

Os discos impregnados de antibiótico (Tabela 4, Oxoid) foram retirados do frigorífico e deixados atingir a temperatura ambiente, de forma a minimizar a condensação do ar. Os discos foram aplicados sobre o meio Mueller-Hinton (MH) ou Mueller-Hinton (MH) com NaCl 2% inoculado, com a ajuda de um dispensador (Oxoid). O dispensador permite o preciso posicionamento dos discos com igual espaçamento de 54 mm de circunferência. Os discos são colocados firmemente sobre a superfície de agar permitindo uma perfeita difusão.

**d) Incubação**

Antes que tivessem passado 15 min após a preparação, as placas foram invertidas e colocadas numa incubadora a 35-37°C durante 18-24 h.

**e) Leitura dos halos de inibição**

Após 18-24 h de incubação, mediram-se os halos de inibição, com a ajuda de uma régua. A placa fechada foi observada sobre um fundo negro. Segundo a inibição de crescimento verificada, as bactérias são classificadas como Susceptível (S), Intermédio (I) ou Resistente (R), de acordo com a seguinte tabela, como recomenda o CLSI (Tabela 4).

**Tabela 4** – Concentrações de antibióticos e classificação de bactérias como S (Susceptível), I (Intermédio), ou R (Resistente) para *Staphylococcus* spp.

(Adaptado de CLSI, 2006)

Antibióticos	Concentração do antibiótico	Halos de inibição (mm)		
		S	I	R
Amoxicilina (AML)	25 µg	≥21	14-20	<14
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	≥22	19-21	<19
Gentamicina (CN)	10 µg	>15	-----	≤14
Sulfametoxazol/trimetoprim (SXT)	25 µg	≥16	10-15	<10
Tetraciclina (TE)	30 µg	≥19	17-18	<17
Eritromicina (E)	15 µg	≥22	17-21	<17
Vancomicina 5 (VA)	5 µg	≥12	-----	≤11
Meticilina (MET)	5 µg	≥15	-----	<15
Oxacilina (OX)	5 µg	≥15	-----	<15
Clindamicina (CLI)	2 µg	≥15	-----	<15
Lincomicina (LIN)	2 µg	≥15	17-20	<17
Penicilina G (PE)	6 µg	≥29	8-28	<8

Para verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos para os antibiogramas, repetiram-se 65% dos mesmos.

### 2.4.3 DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS – ATB™

#### STAPH 5

Quatro isolados que apresentavam perfis de resistência mais infrequentes e dois que não apresentavam fenótipo de resistência a nenhum dos antibióticos referidos acima foram testados também com o *kit* comercial ATB™ STAPH5

(BioMérieux® SA), seguindo as instruções do fabricante. O *kit* comercial inclui 15 antibióticos, em uma ou duas concentrações (c e C): 0,12 mg/l penicilina (PE), 38 mg/l sulfametoxazol/trimetoprim (TSU), 4-8 mg/l gentamicina (CN), 0,5-4 mg/l eritromicina (E), 0,5-2 mg/l clindamicina (CLI), 4-8 mg/l tetraciclina (TE), 4-8 mg/l minociclina (MIN), 4-16 mg/l vancomicina (VA), 8-16 mg/l teicoplanina (TEC), 1-2 mg/l rifampicina (RFA), 4-8 mg/l norfloxacin (NOR), 2-4 mg/l levofloxacin (LVX), 2-16 mg/l ácido fusídico (FUC), 32-64 mg/l nitrofurantoina (FUR), 1-2 mg/l de quinupristina-dalfopristina (QDA), 0,25 mg/l de oxacilina coagulase (-) (OXAE) e 2 mg/l de oxacilina (OXA).

De acordo com as recomendações do fabricante, preparou-se uma suspensão para as amostras com uma densidade celular correspondente a 2 na escala de McFarland. De seguida, transferiu-se 200 µl de cada uma das suspensões para ampolas de meio ATB e o mesmo volume para ampolas de meio ATB Na 2% (para os testes OXAE/OXA). Posteriormente, inoculou-se a galeria e procedeu-se à incubação durante 18-24 h a 37°C, em aerobiose. A leitura visual dos resultados consistiu em pesquisar em cada cúpula a presença de turvação.

Segundo a presença ou ausência de turvação, as estirpes são consideradas como Susceptível (S), Intermédio (I) ou Resistente (R), de acordo com as instruções do fabricante que se encontram resumidas na seguinte tabela.

**Tabela 5** – Interpretação de ATB™ STAPH 5 quando os antibióticos são testados com 2 concentrações.

Aspecto das cúpulas		Resultados		Estirpe
c	C	c	C	
translúcido	translúcido	-	-	<b>S</b>
turvo	translúcido	+	-	<b>I</b>
turvo	turvo	+	+	<b>R</b>

#### **2.4.4 DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA À CLINDAMICINA INDUZIDA POR ERITROMICINA**

A expressão de resistência a clindamicina pode ser constitutiva ou induzida por eritromicina. Para se testar este fenótipo, os discos de eritromicina e clindamicina são colocados a uma distância adequada, de modo a que ambos os antibióticos se cruzem no meio agarizado. Uma zona de inibição em forma de D indica que a eritromicina induziu a resistência à clindamicina (Leclercq, 2002; Steward *et al.*, 2005). Por este motivo, este teste designa-se por D e no presente trabalho foi realizado conforme descrito por O'Sullivan *et al.* (2006). Após inoculação das placas, aplicaram-se, com a ajuda de uma pinça, os discos de clindamicina (2 µg, Oxoid) e eritromicina (15 µg, Oxoid) sobre a superfície do meio Mueller-Hinton, que ficaram à distância de 15 mm. As placas foram incubadas a 35-37°C durante 18-24 h.

A leitura dos resultados consistiu na medição dos halos de inibição dos antibióticos e de acordo com a Tabela 4. A ocorrência de indução de resistência a clindamicina por eritromicina foi indicada por uma zona de inibição em forma de D. Quando não houve efeito de indução a zona de inibição foi circular.

#### **2.5 DETERMINAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE A DESINFECTANTES E METAIS PESADOS**

Para a detecção de susceptibilidade a desinfetantes e metais, recorreu-se ao método descrito por Ferreira da Silva *et al.* (2007). A preparação do meio de cultura PCA, das suspensões bacterianas, bem como da inoculação das placas foi realizado como referido, respectivamente, nos pontos 2.2.2, 2.4.2 a) e b).

As soluções de metais pesados (Merck) testadas foram 50 mM Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 200 mM ZnSO<sub>4</sub>, 200 mM NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e 50 mM HgCl<sub>2</sub>, e os desinfetantes foram peróxido de hidrogénio (1,5 %, p/p) e lixívia comercial (< 2,5 %, p/p hipoclorito de sódio).

Após a inoculação, procedeu-se à aplicação dos desinfectantes e das soluções de metais pesados. Para os desinfectantes usaram-se 2 discos brancos (Oxoid) que, depois de colocados sobre a superfície de agar ficaram à distância de 54 mm, foram impregnados com 5 µl de hipoclorito de sódio ou com igual volume de peróxido de hidrogénio. As soluções de metais pesados, 10 µl das soluções de cádmio e mercúrio, e 15 µl das de níquel e zinco, foram colocadas directamente sobre o meio de cultura.

A incubação e leitura dos halos de inibição foram realizados como descrito nos pontos 2.4.2 d) e e).

Devido ao facto de não haver tabelas de referência que relacionem os halos de inibição com os fenótipos de resistência ou susceptibilidade, a análise dos dados foi, neste caso, realizada de modo diferente. Para o efeito, realizou-se uma análise de correlação que permitisse inferir sobre a possível associação de resistência a antibióticos, metais pesados e desinfectantes. Para o efeito utilizou-se o programa SPSS 14.0 para Windows, que permitiu calcular os valores de correlação (Correlação de Pearson) existente entre os diferentes agentes antimicrobianos.

## **2.6 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA**

### **2.6.1 EXTRACÇÃO DE DNA**

A extracção de DNA realizou-se a partir de células crescidas em meio PCA, incubadas a 30°C durante 16-24 h. Ressuspendeu-se 1 ansa de células em 100 µl de Tris-EDTA (10 mM, pH 8,0) contendo lisostafina (2 mg.ml<sup>-1</sup>, Sigma) (20:1, v/v) e homogeneizou-se com vórtex. As amostras incubaram em banho-maria durante 3 h a 37°C, com agitação ocasional. A lisostafina é uma enzima específica que permite a lise da parede de peptidoglicano dos estafilococos e, por isso, é adicionada ao tampão.

Adicionou-se 10 µl dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2% (p/v) e incubaram-se as amostras a 60°C, durante 60 min, arrefecendo em gelo de seguida. O SDS é um detergente usado para permeabilizar a membrana por solubilização da camada lipídica. Este composto desempenha ainda um papel importante ao ligar-se aos compostos proteicos, facilitando depois a sua extracção. Seguidamente, adicionou-se proteinase K (0,1 mg/l, QBiogene) e incubou-se durante 60 min a 37°C.

A seguir, adicionou-se 100 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) e centrifugou-se durante 10 min a 12 000 rpm. Por acção do clorofórmio, as proteínas são desnaturadas, e ficam insolúveis na fase aquosa, onde se encontra o DNA. Transferiu-se a fase aquosa para outro tubo *Eppendorf* e precipitou-se o DNA da fase aquosa através da adição de 100 µl de etanol frio a -20°C. De seguida, removeu-se a fase líquida com o cuidado de não tocar no sedimento e eliminaram-se os resíduos de etanol por secagem à temperatura ambiente durante 18 h. O DNA foi ressuspendido em 30 µl de água ultra-pura e conservado a -20°C.

### **2.6.2 GENOTIPAGEM POR *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA***

A tipagem por *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) foi usada com o intuito de comparar e agrupar os isolados. A reacção de PCR foi realizada conforme descrito por Ferreira da Silva *et al.* (2006), com a excepção da

concentração do *primer* que sofreu um aumento de 5 vezes. As misturas de reacção foram preparadas para um volume final de 25 µl contendo 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 5 mM de *primer* M13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT3'), 0,75 U de *Taq* DNA polimerase (Reagente 5), tampão de reacção 1x concentrado e 0,5 µl de DNA molde.

A amplificação realizou-se num termociclador (Biometra) com a seguinte programação: 5 min a 94°C para desnaturação da dupla cadeia de DNA, seguido de 45 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturação), 1 min a 34°C (emparelhamento dos *primers*) e 2 min a 72°C (extensão do *primer*), finalizando com 10 min a 72°C, para extensão final de todas as cadeias simples.

Para analisar os produtos de PCR, preparou-se um gel de agarose (1,5 %, p/v), suspendendo 2,4 g de Agarose D-1 (Pronadisa) em 160 ml de tampão de corrida 1x Tris-Acetato-EDTA (TAE). De seguida, aqueceu-se até total fusão da agarose que correspondeu ao momento em que a solução se apresentou transparente. Adicionou-se 32 µl de brometo de etídeo para uma concentração final de 0,5 µg/l. Colocou-se a solução no suporte do gel, juntamente com os pentes e deixou-se polimerizar durante 30 min. Depois de polimerizado, colocou-se na tina de electroforese, cujo volume foi preenchido com 1x TAE. De seguida, carregou-se o gel com 5 µl de tampão de carga (0,25% azul bromofenol, glicerol 30%) juntamente com 10 µl do produto de PCR. A electroforese ocorreu a 90 V durante 100 min (Power Pac Basic, Bio-Rad). Para a normalização e calibração dos diferentes géis incluiu-se na extremidade de cada gel, um produto de RAPD de *Escherichia coli* obtido com o *primer* M13. Finalmente, os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV, através de um transiluminador *Gel Doc* (BIO-RAD).

Os electroforegramas dos produtos de PCR obtidos para cada isolado foram analisados visualmente, e, através da comparação dos perfis de RAPD, aguparam-se os organismos.

### 2.6.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE PARA O RNA RIBOSSOMAL 16S E SUA SEQUENCIAÇÃO

Os isolados foram também caracterizados e identificados por análise da sequência parcial do gene para o RNA ribossomal 16S.

O gene para o RNA ribossomal 16S foi amplificado usando os *primers* 27F (5'-GAC TTT GAT CCT GGC TCA G3') e 1492R (5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3').

As reacções de PCR foram realizadas para um volume final de 50 µl, contendo 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas Recombinante), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 1x tampão de reacção (75 mM Tris-HCl, pH 8,8 a 25 °C, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Tween 20), 1 µM de cada um dos *primers* 27F e 1492R e 2 µl de DNA molde. A reacção de amplificação foi efectuada num termociclador (Biometra) programado para gerar uma desnaturação inicial de 5 min a 95°C, e 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 1,5 min a 75°C, seguidos de uma extensão final de 72°C a 10 min.

Um fragmento de aproximadamente 1500 pb (pares de bases) foi observado por electroforese de 5 µl de produto de reacção de PCR em gel de agarose a 2%. Posteriormente, o produto de PCR foi purificado com o *GFX PCR DNA and Purification Kit* (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. A purificação consistiu em 4 passos: começou-se por adicionar 500 µl de tampão de captura e 50 µl de produto de PCR à coluna GFX (desnaturação de proteínas e captura de DNA); seguidamente procedeu-se à lavagem da coluna GFX adicionando 500 µl tampão etanólico para remover sais e outros contaminantes; e, finalmente, eluiu-se o DNA com 50 µl de tampão TE (pH 8,0). O produto de PCR purificado foi enviado para uma empresa de serviços (Macrogen) onde foi sequenciado pelo método de Sanger *et al.* (1997). A sequência do gene rRNA 16S foi analisada usando a aplicação BioEdit (Hall, 1999) e quando a sua qualidade era boa foi comparada com as sequências disponíveis na base de dados da EMBL/GenBank, usando o programa BLASTN do NCBI, de forma a se obter informação relativa à percentagem (%) de similaridade com outras aí depositadas.

## 2.6.4 DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Nos isolados que mostraram reduzida susceptibilidade à meticilina pesquisou-se o gene *mecA*. Além disso, os possíveis genótipos responsáveis pela resistência à eritromicina, *msrA/B*, *ermA* e *ermC*, foram pesquisados em todos os isolados. Utilizaram-se os *primers* listados na Tabela 6.

**Tabela 6** - *Primers* usados para a detecção de genes.

Gene	Sequência do <i>primer</i>	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>msrA</i> <sup>a</sup>	5' GGC ACA ATA AGA GTG TTT AAA GG 3' 5' AAG TTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT 3'	940	Lina <i>et al.</i> , 1999
<i>msrB</i> <sup>a</sup>	5' TAT GAT ATC CAT AAT AAT TAT CCA ATC 3' 5' AAG TTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT 3'	595	Lina <i>et al.</i> , 1999
<i>ermA</i> <sup>b</sup>	5' AAG CGG TAA ACC CCG CTG A 3' 5' TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC 3'	190	Ardic <i>et al.</i> , 2005
<i>ermC</i> <sup>b</sup>	5' AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT 3' 5' TAA TCG TGG AAT ACG GGT TTG 3'	299	Ardic <i>et al.</i> , 2005
<i>mecA</i> <sup>b</sup>	5' CCT AGT AAA GCT CCG GAA 3' 5' CTA GTC CAT TCG GTC CA 3'	314	Ardic <i>et al.</i> , 2005

A reacção de PCR foi preparada para um volume final de 25 µl contendo tampão de reacção a 1x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 1 µM de cada *primer*, 0,5 U de *Taq* polimerase (Fermentas) e 5 µl de DNA molde. A reacção de amplificação foi efectuada num termociclador (Biometra) programado com o seguinte programa de temperaturas: 10 min a 94°C, e 25 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C (para os genes *msrA/B*, *ermA* e *ermC*) ou 45°C (para o gene *mecA*), 1 min a 70°C, seguidos de uma extensão final de 72°C a 10 min. De seguida, os produtos de PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1% em TAE (pH 8), utilizando um marcador molecular de peso, 1000 – 500 pb, (BioLabs), de forma a verificar a amplificação do fragmento pretendido.

A análise do gel permitiu verificar o tamanho dos fragmentos e, assim, concluir a presença ou ausência dos genes. Da amplificação por PCR com os *primers msrA* esperava-se um fragmento com tamanho 940 pb, os *msrB* com 595 pb, os *ermA* com 190 pb, os *ermC* com 299 pb e os *mecA* com 314 pb (Lina *et al.*, 1999;

Ardic *et al.*, 2005). Cada PCR foi realizado com um controlo negativo (sem DNA) para verificar contaminações, e um controlo positivo, sendo que para os genes *msrA*, *msrB* e *ermC* se usou como controlo positivo o isolado A5M8 e para o gene *ermA* o isolado EET9, cuja presença foi confirmada previamente por análise da sequência do amplicão.

<b>Reagentes para mistura de PCR e preparação de gel</b>	
<b>TAE</b>	4,84 g/l Tris 0,68 g/l de ácido acético glacial 0,37 g/l ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) acertar pH 8,0 com ácido acético
<b>TE – Tris-EDTA</b>	4,82 g/l Tris 0,37 g/l EDTA acertar pH 8,0 com HCl
<b>Tampão de carga</b>	0,25% azul bromofenol glicerol 30%
<b>SDS</b>	2 g SDS dissolvido em 100 ml água destilada aquecimento a 68° C acertar pH 7,2 com HCl
<b>Água ultra-pura</b>	água destilada filtrada com membrana (Pall Supor®-200), 0,2 µm de porosidade e autoclavada a 121° C durante 15 minutos; a autoclavagem foi repetida duas vezes.
<b>Brometo de etídeo</b>	solução aquosa a 2,5 mg/ml.

# **CAPÍTULO 3:**

# **RESULTADOS**

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DOS ISOLADOS

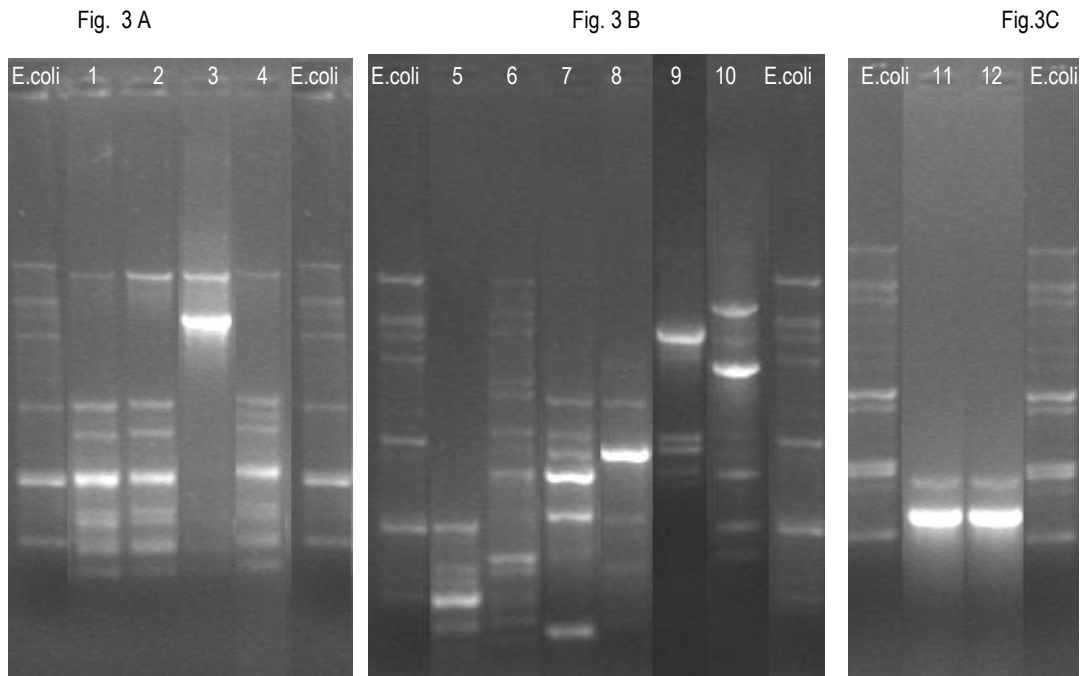
Os isolados foram designados por um código constituído por letras e números, sendo que A e E representam, respectivamente, afluentes (água residual) e efluentes (água residual tratada) e o número que se segue a esta letra identifica o número de amostragem (5-Novembro de 2004, 6-Janeiro de 2005, 7-Abril de 2005, 8-Julho de 2005); M significa Mannitol Salt Agar, o meio selectivo usado para isolar *Staphylococcus* spp.; e, finalmente, o último número significa o número do isolado em cada amostragem.

Antes de os isolados terem sido caracterizados fenotipicamente, foram cultivados no meio Mannitol Salt Agar. Através da coloração de Gram e dos testes de catalase e citocromo *c* oxidase confirmou-se se os isolados eram efectivamente estafilococos. Os isolados seleccionados para integrar o estudo subsequente foram os que apresentavam morfologia de cocos, com coloração de Gram positiva, positivos para o teste da catalase e negativos para o teste da citocromo *c* oxidase. Estes testes distinguem os estafilococos de outros com os quais se poderiam confundir, designadamente dos géneros *Enterococcus* (catalase negativo) e *Micrococcus* (oxidase positivo). Após esta caracterização preliminar obteve-se um conjunto de 39 isolados. Destes, apenas um (E6M1) apresentou reacção de coagulase positiva. Para a confirmação da identificação dos isolados como estafilococos, bem como para a sua distinção ao nível de espécie, recorreu-se à genotipagem e à análise da sequência do gene para o rRNA 16S.

### 3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Através da comparação dos diferentes perfis produzidos pelo RAPD com o *primer* M13, foi possível estabelecer 4 grupos de similaridade, que se designaram por grupos RAPD I, II, III e IV. Vinte e seis isolados integraram o grupo RAPD I, três o grupo RAPD II, dois o grupo RAPD III, dois ao grupo RAPD IV e seis apresentaram perfis únicos. Os perfis representativos dos grupos de RAPD (I, II,

II e IV), bem como dos perfis únicos encontram-se representados na Figura 3. Considerou-se como pertencentes a um mesmo grupo RAPD, perfis que diferiam por 1-2 bandas.



**Figura 3** – Produtos de amplificação RAPD gerados a partir de DNA de 12 isolados *Staphylococcus* spp. da ETAR, usando o *primer* M13, num gel de agarose a 1,5%. Isolados 1 (A5M4), 2 (A5M21), pertencentes ao grupo I; 3 (E5M2), perfil único; 4 (E7M21), grupo IA; 5 (A7M30) e 6 (A8M14), perfis únicos; 7 (E5M7), grupo II; 8 (A5M7), grupo III; 9 (E7M26) e 10 (E8M22) perfis únicos; 11 (A6M1) e 12 (A6M7), grupo IV.

De modo a identificar os isolados integrados em cada grupo RAPD, procedeu-se à análise da sequência parcial do gene para o rRNA 16S. Porém, estes resultados viriam a demonstrar o baixo poder de discriminação do método de RAPD para identificar estafilococos ao nível de espécie e optou-se por realizar esta análise para todos os isolados em estudo. No entanto, foi impossível sequenciar quatro isolados que revelaram pertencer ao grupo RAPD I. A análise da sequência dos cerca de 800 primeiros nucleótidos do gene para o rRNA 16S demonstrou que do total de trinta e cinco isolados sequenciados, 20 isolados, do grupo RAPD I, e 3 isolados, do grupo RAPD II, pertenciam à espécie *S. saprophyticus/S.xylosus*; 2 isolados, do grupo RAPD III, pertenciam à espécie *S. cohnii*; e os 2 isolados do grupo RAPD IV pertenciam a espécies diferentes, designadamente, *S. pettenkoferi* e *S. haemolyticus* (Tabela 7).

**Tabela 7** – Identificação dos isolados com base na análise da sequência do gene para o rRNA 16S por consulta da base de dados de GenBank/EMBL.

Estirpes	Grupo RAPD	Identificação com base na sequência do gene rRNA 16S	Número de acesso (Genbank)	Referências	% Similaridade
A5M2	I	<i>S. saprophyticus</i>	AP008934	Kuroda <i>et al.</i> , 1997	99
		<i>S. xylosus</i>	AY395016	Broderick <i>et al.</i> 2004	99
A5M3*	I	<i>S. saprophyticus</i>	AP008934	Kuroda <i>et al.</i> , 1997	99
		<i>S. xylosus</i>	EU095643	Li <i>et al.</i> , 2007	99
A5M5*	I	<i>S. saprophyticus</i>	AP008934	Kuroda <i>et al.</i> , 1997	100
		<i>S. xylosus</i>	EU095643	Li <i>et al.</i> , 2007	99
A5M7	III	<i>S. cohnii</i>	AJ717378	Tiago <i>et al.</i> , 2005	99
A5M8*	III	<i>S. cohnii</i>	AJ717378	Tiago <i>et al.</i> , 2005	99
A5M12*	I	<i>S. saprophyticus</i>	AP008934	Kuroda <i>et al.</i> , 1997	99
		<i>S. xylosus</i>	EU095643	Li <i>et al.</i> , 2007	99
A5M13	I	<i>S. saprophyticus</i>	EF204303	Hantsis <i>et al.</i> , 2007	97
		<i>S. xylosus</i>	AY395016	Broderick <i>et al.</i> , 2004	97
A5M14	I	<i>S. saprophyticus</i>	AP008934	Kuroda <i>et al.</i> , 1997	99
		<i>S. xylosus</i>	AY395016	Broderick <i>et al.</i> 2004	99
A5M21	I	<i>S. saprophyticus</i>	AP008934	Kuroda <i>et al.</i> , 1997	99
		<i>S. xylosus</i>	AY395016	Broderick <i>et al.</i> 2004	99
A6M1	IV	<i>S. pettenkoferi</i>	DQ538520	Trulzsch <i>et al.</i> , 2007	99
A6M7*	IV	<i>S. haemolyticus</i>	EU071616	Nellen <i>et al.</i> , 2007	99
A6M9	I	<i>S. saprophyticus</i>	AP008934	Kuroda <i>et al.</i> , 1997	99
A6M27	I	<i>S. saprophyticus</i>	EF204303	Hantsis <i>et al.</i> , 2007	99
		<i>S. xylosus</i>	AY395016	Broderick <i>et al.</i> 2004	99
A7M30	único	<i>S. saprophyticus</i>	DQ462328	Fang <i>et al.</i> , 2006	100
		<i>S. xylosus</i>	D83374	Takashi <i>et al.</i> , 1999	99
A8M14b	único	<i>S. succinus</i>	AY748916	Xu <i>et al.</i> , 2004	100
A8M42	I	<i>S. saprophyticus</i>	AP008934	Kuroda <i>et al.</i> , 1997	99
		<i>S. xylosus</i>	AY395016	Broderick <i>et al.</i> 2004	99
E5M1	I	<i>S. saprophyticus</i>	AP008934	Kuroda <i>et al.</i> , 1997	99
		<i>S. xylosus</i>	AY395016	Broderick <i>et al.</i> 2004	99
E5M2	único	<i>S. saprophyticus</i>	AM237352	Alenius <i>et al.</i> , 2006	100
		<i>S. xylosus</i>	D83374	Takashi <i>et al.</i> , 1999	99
E5M6*	I	<i>S. saprophyticus</i>	AM237352	Alenius <i>et al.</i> , 2006	98
		<i>S. xylosus</i>	EU095643	Li <i>et al.</i> , 2007	98
E5M7	II	<i>S. saprophyticus</i>	EF204303	Hantsis <i>et al.</i> , 2007	99
		<i>S. xylosus</i>	AY395016	Broderick <i>et al.</i> 2004	99
E5M9	I	<i>S. saprophyticus</i>	EF522127	Velazquez <i>et al.</i> , 2007	98
		<i>S. xylosus</i>	AY395016	Broderick <i>et al.</i> 2004	98
E5M20	I	<i>S. saprophyticus</i>	AP008934	Kuroda <i>et al.</i> , 1997	99
		<i>S. xylosus</i>	AF515587	Jiang <i>et al.</i> , 2002	99
E6M1	I	<i>S. aureus</i>	AP009324	Hiramatsu <i>et al.</i> , 2007	100
E6M6	I	<i>S. saprophyticus</i>	AP008934	Kuroda <i>et al.</i> , 1997	99

		<i>S. xylosus</i>	AY395016	Broderick <i>et al.</i> 2004	99
E6M8*	I	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. xylosus</i>	AP008934 EU095643	Kuroda <i>et al.</i> , 1997 Li <i>et al.</i> , 2007	99 99
E6M20	II	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. xylosus</i>	EF204303 AY395016	Hantsis <i>et al.</i> , 2007 Broderick <i>et al.</i> 2004	99 99
E6M39	I	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. xylosus</i>	AP008934 AY395016	Kuroda <i>et al.</i> , 1997 Broderick <i>et al.</i> 2004	99 99
E7M2	I	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. xylosus</i>	AP008934 AY395016	Kuroda <i>et al.</i> , 1997 Broderick <i>et al.</i> 2004	99 99
E7M8*	I	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. xylosus</i>	EF204303 AM882700	Hantsis <i>et al.</i> , 2007 Dib <i>et al.</i> , 2007	99 99
E7M21	IA	<i>S. equorum</i>	AM422806	Deng <i>et al.</i> , 2007	99
E7M26	Único	<i>S. arlettae</i>	AB009933	Takashi <i>et al.</i> , 1998	100
E7M28	II	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. xylosus</i>	AP008934 AY395016	Kuroda <i>et al.</i> , 1997 Broderick <i>et al.</i> 2004	99 99
E7M29*	I	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. xylosus</i>	AP008934 AY126271	Kuroda <i>et al.</i> , 1997 Baliotta <i>et al.</i> , 2005	94 94
E8M1	único	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. xylosus</i>	AP008934 AY395016	Kuroda <i>et al.</i> , 1997 Broderick <i>et al.</i> 2004	99 99
E8M22	único	<i>S. pasteurii</i>	AJ717376	Tiago <i>et al.</i> , 2004	100

\*, Resultados obtidos posteriormente à data de conclusão do trabalho apresentado.

A comparação da análise genotípica com os resultados obtidos com base na sequenciação do gene para o rRNA 16S, permitiu constatar a limitação do método RAPD para diferenciar as espécies de estafilococos em estudo. Contudo, também a análise da sequência do gene para o rRNA 16S se revelou insuficiente para distinguir *S. saprophyticus* de *S. xylosus*. Vinte e seis isolados foram identificados como *S. saprophyticus/S. xylosus*, 20 destes pertencentes ao grupo RAPD I, 3 ao grupo RAPD II e 3 apresentaram perfis únicos. Os quatro isolados que não foram sequenciados apresentaram perfil RAPD I, pelo que foram considerados como *S. saprophyticus/S. xylosus*. Para as estirpes identificadas como *S. saprophyticus/S. xylosus* foram observados 5 perfis de RAPD diferentes. Os isolados E5M7, E7M28 e E6M20, pertencentes ao grupo II foram, tal como os do grupo I, identificados como *S. saprophyticus/S. xylosus*, embora apresentassem um perfil de RAPD distinto. Além disso, os perfis de RAPD obtidos para os isolados A7M30, E5M2 e E8M1, também identificados como *S. saprophyticus/S. xylosus*, são completamente diferentes dos outros *S. saprophyticus/S. xylosus* e entre si (perfis únicos). O perfil de RAPD obtido para um isolado (E7M21), designado por IA, apresentou apenas uma banda a mais relativamente ao perfil do grupo I, contudo com base na análise do gene rRNA 16S foi identificado como *S. equorum*.

Três dos isolados com perfis RAPD únicos foram identificados como pertencentes às espécies *S. succinus* (A8M14), *S. arlettae* (E7M26) e *S. pasteurii* (E8M22). Os isolados A6M1 e A6M7, com perfis de RAPD iguais (IV) foram identificados, respectivamente, como *S. pettenkoferi* e *S. haemolyticus*. O isolado coagulase positivo foi identificado como *S. aureus*. A distribuição das espécies de estafilococos identificadas nas águas da ETAR encontra-se sumariada na seguinte tabela.

**Tabela 8** – Prevalência de diferentes espécies *Staphylococcus* spp. nas águas residuais, águas residuais tratadas e totais na ETAR.

Espécies	Frequência (%)		
	Águas residuais (n=19)	Águas residuais tratadas (n=20)	Total (n=39)
<i>S. saprophyticus</i> / <i>S. xylosus</i> (n=30)*	63,2 (14/19)	85 (16/20)	76,9 (30/39)
<i>S. pasteurii</i> (n=1)	0	1/20	2,6 (1/39)
<i>S. cohnii</i> (n=2)	10,5 (2/19)	0	(2/39)
<i>S. pettenkoferi</i> (n=1)	5,3 (1/19)	0	2,6 (1/39)
<i>S. arlettae</i> (n=1)	0	5,3 (1/19)	2,6 (1/39)
<i>S. haemolyticus</i> (n=1)	5,3 (1/19)	0	2,6 (1/39)
<i>S. succinus</i> (n=1)	5,3 (1/19)	0	2,6 (1/39)
<i>S. equorum</i> (n=1)	0	5,3 (1/19)	2,6 (1/39)
<i>S. aureus</i> (n=1)	0	5,3 (1/19)	2,6 (1/39)

\*4 dos quais, apesar de não terem sido sequenciados, apresentaram perfil RAPD I

### 3.3 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS, DESINFECTANTES E METAIS

#### 3.3.1 FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Os fenótipos de susceptibilidade a antibióticos foram determinados através do método descrito anteriormente que permitiu categorizar os microrganismos como R (Resistente), I (Intermédio) ou S (Susceptível). Os valores obtidos para os halos de inibição para as estirpes de referência usadas (*Staphylococcus aureus* DSM 1104 e *Escherichia coli* ATCC 25922) estiveram sempre dentro dos valores aceitáveis. O desvio médio dos halos de inibição calculado foi de 1-2,6 mm. Dos 25 antibiogramas repetidos verificou-se concordância total de resultados.

Os halos de inibição obtidos e as respectivas categorias (R, I ou S) encontram-se apresentadas nas tabelas 9 e 9a.

**Tabela 9** - Halos de inibição (mm) de antibióticos em *Staphylococcus* spp.

Estirpe	Amoxicilina		Ciproflaxina		Gentamicina		Sulfametoxazol/ trimetoprim		Tetraciclina		Eritromicina	
	Halo de inibição (mm)	Categoria	Halo de inibição (mm)	Categoria	Halo de inibição (mm)	Categoria	Halo de inibição (mm)	Categoria	Halo de inibição (mm)	Categoria	Halo de inibição (mm)	Categoria
A5M2	25	S	30	S	13	R	27	S	13	R	10	R
A5M3	32	S	31	S	27	S	30	S	34	S	29	S
A5M4	32	S	37	S	25	S	37	S	31	S	28	S
A5M5	35	S	27	S	26	S	28	S	30	S	27	S
A5M7	44	S	34	S	34	S	32	S	40	S	12	R
A5M8	44	S	34	S	34	S	32	S	38	S	10	R
A5M9	32	S	29	S	26	S	28	S	30	S	30	S
A5M12	34	S	26	S	25	S	30	S	29	S	27	S
A5M13	26	S	25	S	0	R	29	S	10	R	10	R
A5M14	34	S	24	S	24	S	27	S	30	S	26	S
A5M21	42	S	30	S	27	S	27	S	30	S	10	R
A6M1	42	S	40	S	30	S	30	S	42	S	0	R
A6M7	40	S	30	S	30	S	31	S	35	S	22	S
A6M9	34	S	30	S	24	S	30	S	30	S	26	S
A6M23	32	S	36	S	30	S	32	S	36	S	10	R
A6M27	27	S	24	S	11	R	26	S	29	S	28	S
A7M30	35	S	28	S	29	S	24	S	27	S	10	R
A8M14	27	S	28	S	24	S	28	S	29	S	8	R
A8M42	38	S	34	S	32	S	34	S	32	S	34	S
E5M1	34	S	30	S	30	S	32	S	33	S	22	S
E5M2	16	I	26	S	26	S	28	S	9	R	27	S
E5M6	36	S	30	S	24	S	30	S	30	S	28	S
E5M7	36	S	34	S	28	S	29	S	34	S	27	S
E5M9	32	S	28	S	30	S	32	S	29	S	28	S
E5M20	30	S	21	I	20	S	21	S	24	S	23	S
E5M33	30	S	32	S	22	S	30	S	26	S	22	S
E6M1	33	S	28	S	20	S	30	S	26	S	24	S
E6M6	34	S	34	S	26	S	28	S	30	S	27	S
E6M8	34	S	27	S	19	S	26	S	29	S	27	S

E6M20	32	S	26	S	26	S	28	S	30	S	26	S
E6M39	32	S	21	I	26	S	28	S	30	S	27	S
E7M2	31	S	26	S	23	S	27	S	26	S	26	S
E7M8	32	S	27	S	13	R	31	S	25	S	26	S
E7M21	34	S	26	S	26	S	26	S	30	S	27	S
E7M26	27	S	32	S	28	S	38	S	32	S	28	S
E7M28	28	S	28	S	28	S	28	S	32	S	27	S
E7M29	32	S	30	S	30	S	34	S	36	S	30	S
E8M1	30	S	24	S	23	S	27	S	28	S	28	S
E8M22	20	I	32	S	25	S	34	S	31	S	32	S

Tabela 9a – Halos de inibição (mm) de antibióticos em isolados de *Staphylococcus* spp. (continuação)

Estirpe	Vancomicina 5		Meticilina		Oxacilina		Clindamicina *		Lincomicina *		Penicilina G	
	Halo de inibição (mm)	Categoria	Halo de inibição (mm)	Categoria	Halo de inibição (mm)	Categoria	Halo de inibição (mm)	Categoria	Halo de inibição (mm)	Categoria	Halo de inibição (mm)	Categoria
A5M2	14	S	22	S	23	R	17	S	8	R	24	I
A5M3	14	S	25	S	26	S	21	S	18	I	25	I
A5M4	14	S	22	S	23	S	19	S	9	R	21	I
A5M5	14	S	21	S	22	S	20	S	10	R	25	I
A5M7	17	S	40	S	38	S	26	S	21	S	25	I
A5M8	16	S	24	S	25	S	17	S	9	R	36	S
A5M9	16	S	27	S	28	S	20	S	8	R	21	I
A5M12	14	S	25	S	25	S	16	S	12	R	20	I
A5M13	15	S	0	R	0	R	0	R	0	R	11	I
A5M14	16	S	23	S	23	S	16	S	8	R	30	S
A5M21	16	S	23	S	23	S	25	S	18	I	34	S
A6M1	20	S	28	S	30	S	26	S	17	I	41	S
A6M7	15	S	28	S	28	S	31	S	24	S	47	S
A6M9	15	S	22	S	24	S	16	S	8	R	27	I
A6M23	14	S	24	S	25	S	23	S	17	I	18	I
A6M27	16	S	23	S	22	S	0	R	0	R	19	I
A7M30	16	S	36	S	34	S	17	S	0	R	36	S
A8M14	14	S	24	S	25	S	26	S	13	R	24	I
A8M42	16	S	25	S	25	S	0	R	0	R	0	R
E5M1	14	S	24	S	24	S	19	S	0	R	24	I
E5M2	13	S	20	S	19	S	27	S	21	S	8	I
E5M6	13	S	23	S	24	S	22	S	8	R	26	I
E5M7	15	S	17	S	18	S	12	R	10	R	27	I
E5M9	15	S	24	S	24	S	21	S	9	R	32	S
E5M20	15	S	26	S	28	S	24	S	0	R	30	S
E5M33	20	S	18	S	21	S	10	R	0	R	30	S
E6M1	14	S	24	S	26	S	25	S	18	I	37	S

E6M6	28	S	25	S	26	S	28	S	10	R	37	S
E6M8	26	S	24	S	26	S	17	S	22	S	28	I
E6M20	28	S	18	S	17	S	25	S	17	I	27	I
E6M39	28	S	21	S	22	S	0	R	0	R	28	I
E7M2	27	S	23	S	24	S	19	S	11	R	25	I
E7M8	31	S	22	S	26	R	0	R	0	R	28	I
E7M21	26	S	26	S	26	S	19	S	0	R	27	I
E7M26	38	S	19	S	19	S	23	S	12	R	21	I
E7M28	28	S	21	S	21	S	23	S	21	S	26	I
E7M29	34	S	20	S	21	S	28	S	20	I	26	I
E8M1	27	S	26	S	25	S	22	S	0	R	22	I
E8M22	34	S	20	S	21	S	26	S	20	I	15	I

\* 50% dos resultados de antibiogramas relativos à LIN e CLI foram realizados em estudos posteriores, mas incluídos neste estudo para uma melhor análise.

A prevalência de resistência nos isolados analisados encontra-se descrita na tabela 10.

**Tabela 10** – Prevalência (%) de fenótipos de resistência e intermédio a antibióticos em *Staphylococcus* spp. provenientes de águas residuais e águas residuais tratadas da ETAR.

		AML	TE	SXT	CIP	CN	E	MET	VA	OX	PE	CLI	LIN	R1	R2	R≥3
Águas residuais brutas	<b>Total</b>	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
	<b>Susceptíveis</b>	19	17	19	19	16	10	18	19	18	6	16	2	--	--	--
	<b>Intermédios</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	4	--	--	--
	<b>Resistentes</b>	0	2	0	0	3	9	1	0	1	1	3	13	10	3	4
	<b>% Intermédios</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	63,2	0,0	21,1	--	--	--
	<b>% Resistentes</b>	0,0	10,5	0,0	0,0	15,8	47,4	5,3	0,0	5,3	5,3	15,8	68,4	52,6	15,8	21,1
Águas residuais tratadas	<b>Total</b>	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	<b>Susceptíveis</b>	18	19	20	18	19	20	20	20	20	5	16	3	--	--	--
	<b>Intermédios</b>	2	0	0	2	0	0	0	0	0	14	0	4	--	--	--
	<b>Resistentes</b>	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	4	13	8	4	1
	<b>% Intermédios</b>	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	66,7	0,0	20,5	--	--	--
	<b>% Resistentes</b>	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	20,0	65,0	40,0	20,0	5,0
	<b>% Total de resistentes</b>	0,0	7,7	0,0	0,0	10,3	23,1	2,6	0,0	2,6	5,1	17,9	66,7	46,2	17,9	12,8

AML, amoxicilina; TE, tetraciclina; SXT, sulfametoxazol/trimetoprim; CIP, ciprofloxacina, CN, gentamicina; E, eritromicina; MET, metecilina; VA, vancomicina 5; OX, oxacilina; PE, penicilina; CLI, clindamicina; LIN, lincomicina; R1, R2, R3: resistentes a pelo menos um, dois ou três antibióticos, respectivamente.

Tendo em consideração a totalidade dos isolados, a prevalência de resistência a antibióticos registou valores abaixo dos 10%, com a excepção da eritromicina, lincomicina, clindamicina e gentamicina que apresentaram prevalências relativamente elevadas, respectivamente, 23,1% (9/39), 66,7% (26/39), 17,9% (7/39), e 10,3% (4/39). Os valores de resistência mais elevados verificaram-se para a lincomicina, sendo que 73,3% (22/30) dos *S. saprophyticus/S. xylosus* isolados das águas de ETAR se revelaram resistentes a este antibiótico. Relativamente à eritromicina, que apresentou uma elevada percentagem de resistência, verificou-se que o fenótipo de resistência a este antibiótico foi mais prevalente nas águas residuais (47,4%) do que nas águas residuais tratadas, em que não se observou resistência. Dos isolados resistentes a eritromicina, 12,8% (5/39) eram *S. saprophyticus/S. xylosus*, dois eram *S. cohnii*, um *S. succinus* e outro *S. pettenkoferi*. Relativamente à resistência a clindamicina, gentamicina e tetraciclina foi observada apenas em isolados de *S. saprophyticus/S. xylosus*. O único isolado que mostrou reduzida susceptibilidade a meticilina e a oxacilina foi também identificado como *S. saprophyticus/S. xylosus*.

Relativamente à resistência a penicilina (PE), apresentou um valor de cerca de 5% (2/39) e observou-se apenas em isolados de *S. saprophyticus/S. xylosus*. Todavia mais de 60% (66,7%, 26/39) apresentaram fenótipo intermédio, sendo que 81% (21/26) eram *S. saprophyticus/S. xylosus*, um *S. cohnii*, um *S. succinus*, um *S. equorum*, um *S. arlettae* e outro *S. pasteurii*. Não foram observados fenótipos de resistência para os antibióticos amoxicilina, ciprofloxacina, vancomicina e sulfametoxazol/trimetoprim. Os fenótipos de resistência a mais do que um antibiótico foram observados em isolados identificados como *S. saprophyticus/S. xylosus* (26%), um *S. cohnii* e um *S. succinus*.

Quatro isolados que apresentavam perfis de resistência mais infrequentes e dois que não apresentavam resistência a nenhum dos antibióticos testados foram submetidos a testes de susceptibilidade a antibióticos para estafilococos com o Kit ATB<sup>TM</sup> STAPH 5 (BioMérieux® SA), com o objectivo de confirmar os resultados obtidos em alguns dos antibiogramas. Os resultados obtidos foram concordantes com os obtidos nos antibiogramas realizados pelo método de difusão em disco.

Atendendo à elevada prevalência de resistência à eritromicina, optou-se por testar se nestes isolados havia indução de resistência a clindamicina por eritromicina (Tabela 11).

**Tabela 11-** Halos de inibição (mm) de antibióticos para o teste D (O’Sullivan *et al.*, 2006).

<b>Estirpe</b>	A5M2	A5M7	A5M8	A5M13	A6M1	A5M21	A6M23	A7M30	A8M14
<b>Teste D R1/ R2</b>	5/5	13/13	8,5/8,5	0	10/10	12/12	9/9	8,5/8,5	14/8

R1, raio medido do halo de inibição do lado oposto ao disco de eritromicina; R2, raio medido do halo de inibição do lado do disco de eritromicina

Apenas um isolado, A8M14, identificado como *S. succinus*, apresentou resistência a clindamicina induzida por eritromicina. Neste caso, o raio do halo de inibição da clindamicina do lado que está mais perto do disco de eritromicina foi menor que do lado oposto (forma D), indicando que a eritromicina funciona como indutor para a resistência à clindamicina.

### **3.3.2 PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE A DESINFECTANTES E A METAIS PESADOS**

Uma vez que para estes agentes antimicrobianos não há valores tabelados nem estirpes e referências recomendadas, esta análise incluiu referenciais similares aos usados para os antibiogramas. Assim, em cada ensaio realizado foram incluídas as estirpes de referência, *Staphylococcus aureus* DSM 1104 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Além disso, repetiram-se os ensaios para cerca de 25% dos isolados, verificando-se que eram totalmente concordantes. Para os diferentes isolados verificou-se um desvio médio dos halos de inibição de 0,7-2,6 mm. A variação dos diâmetros de inibição (mm) obtida para desinfetantes e metais pesados compreendeu os seguintes valores: hipoclorito de sódio, 17-42; peróxido de hidrogénio, 23-42; Hg, 12-38; Cd, 18-32; Zn, 16-28; Ni, 10-28. Os resultados obtidos para os halos de inibição (mm) para desinfetantes e metais pesados encontram-se resumidos na Tabela 12.

**Tabela 12 – Halos de inibição (mm) de desinfetantes e metais em isolados *Staphylococcus* spp.**

Estirpes	Desinfetantes		Metais			
	Lixívia	Peróxido de hidrogénio	Mercúrio	Cádmio	Zinco	Níquel
A5M2	21	34	24	24	21	25
A5M3	26	30	24	24	26	23
A5M4	32	26	16	26	22	20
A5M5	24	34	15	26	22	23
A5M7	23	34	20	32	28	30
A5M8	21	30	16	25	23	24
A5M9	24	36	14	22	21	24
A5M12	17	33	16	22	22	22
A5M13	42	40	20	25	26	21
A5M14	25	38	14	24	22	23
A5M21	20	30	12	18	22	23
A6M1	40	30	14	22	22	17
A6M7	31	28	15	24	25	23
A6M9	26	36	14	22	21	22
A6M23	18	35	14	23	25	22
A6M27	26	36	14	25	15	15
A7M30	30	42	21	27	26	28
A8M14	38	24	15	25	25	23
A8M42	30	34	16	24	23	23
E5M1	30	30	13	25	25	24
E5M2	30	30	21	27	21	22
E5M6	20	41	16	22	19	22
E5M7	34	25	27	26	13	22
E5M9	20	34	14	30	22	21
E5M20	28	32	16	26	21	22
E5M33	28	32	14	25	17	15
E6M1	20	31	19	30	21	22
E6M6	22	40	13	25	17	15
E6M8	26	38	14	25	13	10
E6M20	28	36	15	21	16	14
E6M39	40	34	15	26	20	26
E7M2	30	34	15	22	22	26
E7M8	26	40	38	32	27	17
E7M21	26	38	14	24	24	25
E7M26	21	42	15	33	28	32
E7M28	34	30	26	26	20	32
E7M29	18	40	20	21	21	21
E8M1	27	26	17	30	24	21
E8M22	17	40	17	26	27	27

Uma vez que para estes agentes, os halos de inibição não podiam ser convertidos em fenótipos de resistência ou susceptibilidade, e atendendo a que o objectivo era averiguar o possível efeito de pressão selectiva ou de resistência cruzada, os resultados foram analisados através de uma correlação de Pearson (Figura 4).

AML															
AML															
CIP															
CN															
SXT															
TE		0,5 ( $<10^{-4}$ )	0,7 ( $<10^{-4}$ )												
E															
VA															
MET															
OX								0,9 ( $<10^{-4}$ )							
CLI															
LIN									0,7 ( $<10^{-4}$ )						
PE	0,5 ( $<10^{-4}$ )														
HC															
HP															
Hg															
Cd															
Zn															
Ni														0,6 ( $<10^{-4}$ )	

**Figura 4** – Correlação de Pearson ( $\alpha < 10^{-4}$ ) entre halos de inibição produzidos por antibióticos, desinfetantes e metais. AML, amoxicilina; CIP, ciprofloxacina; CN, gentamicina; SXT, sulfametoxazol/trimetoprim; TE, tetraciclina E, eritromicina; VA, vancomicina 5; MET, metilina; OX, oxacilina; CLI, clindamicina; LIN, licomicina PE, penicilina; HC, hipoclorito de sódio; HP, peróxido de hidrogénio; Hg, mercúrio; Cd, cádmio; Zn, zinco; Ni, níquel.

Das correlações observadas, apenas se consideraram as que tinham um valor de significância correspondente a  $\alpha < 0,0001$ . Quando os halos de inibição produzidos por um agente antimicrobiano variam (aumentam ou diminuem) da mesma forma que aqueles produzidos por outro agente antimicrobiano, diz-se que ambos apresentam uma correlação positiva. No caso da correlação negativa, esta resulta da variação oposta de halos de inibição. Verificou-se que todas as correlações existentes são positivas.

Das correlações positivas observadas ( $\alpha < 0,0001$ ) entre antibióticos, destacam-se as da amoxicilina e penicilina, tetraciclina e ciprofloxacina, da tetraciclina e gentamicina, da metilicina e oxacilina, e da clindamicina e lincomicina.

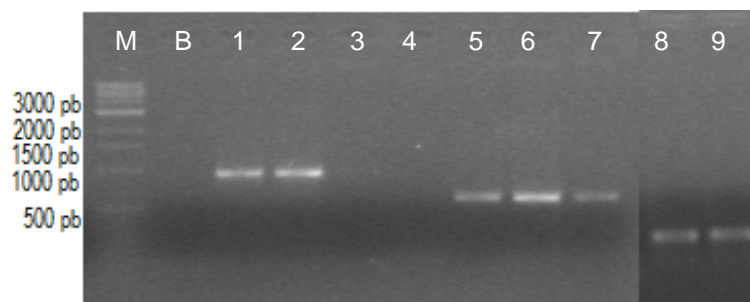
Como já era previsível, a amoxicilina, metilicina, oxacilina e penicilina, pertencentes à mesma família de antibióticos, apresentaram uma correlação positiva entre si.

Constatou-se a correlação significativa e positiva ( $\alpha < 0,0001$ ) entre os metais níquel e zinco. Verificou-se, ainda, a ausência de correlações significativas entre antibióticos e metais pesados ou desinfetantes.

### **3.4 PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS**

Todos os isolados foram sujeitos à detecção dos genes *ermA*, *ermC* e *msrA/B*. Da mesma forma, pesquisou-se o gene *mecA* no isolado que exibiu fenótipo de resistência à metilicina (MET).

A Figura 5 apresenta os produtos de PCR para os fragmentos *msrA*, *msrB* e *ermC* obtidos num gel de agarose (1%).



**Figura 5** – Gel de agarose (1%) apresentando os produtos de PCR, usando os *primers msrA* (1, 2 e 3), *msrB* (4, 5, 6 e 7) e *ermC* (8 e 9). M, marcador de peso molecular 500 pb; B (branco), controle negativo; 1, A5M7; 2, controle positivo; 3, A5M12; 4, A5M7; 5, controle positivo; 6, A5M21; 7, A7M30; 8, controle positivo; 9, A8M14.

A presença de fragmentos com peso molecular específico para *msrA/msrB*, *ermC* e *ermA*, foram comparados com um marcador de peso molecular 500 pb em gel de agarose 1%. A presença de um fragmento com tamanho de 940 pb, 595 pb, 190 pb, 299 pb e 314pb, correspondia à presença, respectivamente de amplicões dos genes *msrA*, *msrB*, *ermA*, *ermC* e *mecA*.

Na tabela 13 constam os resultados obtidos para todos os isolados testados.

**Tabela 13** – Distribuição dos genes *ermA*, *ermC* e *msrA/B* nos isolados em estudo.

Estirpe	Detecção de genes			
	<i>ermA</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>	<i>msrB</i>
A5M2	-	-	+	-
A5M3	-	-	-	-
A5M4	-	+	-	-
A5M7	-	-	+	-
A5M5	-	-	-	-
A5M8	-	-	+	+
A5M9	-	+	-	-
A5M12	-	-	-	-
A5M13	-	-	+	+
A5M14	-	-	-	-
A5M21	-	-	+	+
A6M27	-	-	-	-
A6M1	-	-	+	+
A6M7	-	-	-	-
A6M9	-	-	-	-
A6M23	-	-	+	+
A7M30	-	-	+	+
A8M14	-	+	+	-
A8M42	-	-	-	-
E5M1	-	-	-	-
E5M20	-	-	-	-
E5M2	-	-	-	-
E5M6	-	-	-	-
E5M7	-	-	-	-
E5M9	-	-	-	-
E5M33	-	-	-	-
E6M1	-	-	-	-
E6M6	-	-	-	-
E6M8	-	-	-	-
E6M20	-	-	-	-
E6M39	-	-	-	-
E7M2	-	-	-	-
E7M21	-	-	-	-
E7M26	-	-	-	-
E7M28	-	-	-	-
E7M29	-	-	-	-
E7M8	-	-	-	-
E8M1	-	-	-	-
E8M22	-	-	-	-

+, gene presente; - gene ausente.

O gene *mecA* não foi detectado no isolado que mostrava reduzida susceptibilidade a metilina e a oxacilina.

Os isolados fenotipicamente resistentes à eritromicina (E) apresentaram, pelo menos, um dos genes *ermC*, *msrA* ou *msrB*, mas nunca o gene *ermA*. A resistência a macrólidos devido aos genes *msrA/B* revelou-se como a mais frequente, sendo que todos os isolados que apresentavam fenótipo de resistência à eritromicina eram portadores de um ou dois desses genes. De entre esses isolados, três, pertencentes às espécies *S. saprophyticus/S. xylosus*, *S. succinus* e *S. cohnii*, apresentaram apenas *msrA* mas não *msrB*. O gene *ermC* foi detectado em três isolados, dois *S. saprophyticus/S. xylosus* e um *S. succinus*. Este último, além do gene *ermC*, apresentava também o gene *msrA*. A tabela 14 resume a presença de genes (*ermC*, *msrA* e *msrB*) e os respectivos perfis de resistência associados.

Tabela 14 – Fenótipo(s) de resistência associados ao perfil genético.

Estirpes	Espécies	Gene(s) presente(s)	Fenótipo de resistência*
A5M2	<i>S. saprophyticus/S. xylosus</i>	<i>msrA</i>	TE, CN, E, LIN
A5M4	<i>S. saprophyticus/S. xylosus</i>	<i>ermC</i>	LIN
A5M7	<i>S. cohnii</i>	<i>msrA, msrB</i>	E
A5M8	<i>S. cohnii</i>	<i>msrA, msrB</i>	E, LIN
A5M9	<i>S. saprophyticus/S. xylosus</i>	<i>ermC</i>	LIN
A5M13	<i>S. saprophyticus/S. xylosus</i>	<i>msrA, msrB</i>	TE, CN, E, MET, OX, CLI, LIN
A5M21	<i>S. saprophyticus/S. xylosus</i>	<i>msrA, msrB</i>	CN, LIN
A6M1	<i>S. pettenkoferi</i>	<i>msrA, msrB</i>	E
A6M23	<i>S. saprophyticus/S. xylosus</i>	<i>msrA, msrB</i>	E
A7M30	<i>S. saprophyticus/S. xylosus</i>	<i>msrA, msrB</i>	E, LIN
A8M14	<i>S. succinus</i>	<i>ermC, msrA</i>	E, LIN, CLI <sup>(i)</sup>

\*TE, tetraciclina; CN, gentamicina; E, eritromicina; LIN, lincomicina, MET, metilina, OX, oxacilina; CLI, clindamicina; CLI<sup>(i)</sup>, clindamicina induzida.

## **CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO**

## CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO

Inicialmente, assumia-se que as unidades hospitalares eram as principais responsáveis pela descarga de bactérias resistentes a agentes antimicrobianos em ETARs (Kümmerer, 2004), pelo que vários foram os estudos que se dedicaram a acompanhar a evolução e perfis de resistência a agentes antimicrobianos em isolados, com proveniência clínica, em vários locais geográficos (Stelling *et al.*, 2005). Hoje, sabe-se que a comunidade também contribui com bactérias resistentes a agentes antimicrobianos para as ETARs (Kümmerer, 2004). Dos escassos estudos disponíveis sobre a ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos em ETARs, a maioria tem focado as populações de coliformes, sendo muito pouco conhecido acerca de outros grupos bacterianos (Guardabassi & Dalsgaard, 2002). Um aspecto original deste estudo foi incidir sobre estafilococos. Além disso, uma vez que a ETAR estudada recebe principalmente efluentes domésticos, o estudo pode dar-nos uma perspectiva geral dos perfis de resistência a agentes antimicrobianos em estafilococos comensais humanos e avaliar se a água residual poderá ser considerada um reservatório e veículo para a disseminação de estafilococos resistentes a agentes antimicrobianos.

Uma correcta análise dos resultados requeria, porém, que os isolados fossem identificados ao nível de espécie. Numa triagem inicial, tentou-se utilizar o método de RAPD, para posterior identificação. O método de RAPD é muito usado graças à facilidade e rapidez de execução. Este método baseia-se na amplificação ao acaso de segmentos de DNA da cadeia original recorrendo a oligonucleótidos iniciadores de sequência aleatória (Williams *et al.*, 1990). O perfil de DNA, ou seja o conjunto de fragmentos, obtido é característico dos genomas em particular e permite a determinação de identidade taxonómica ou grau de parentesco. O RAPD tem sido aplicado em vários microrganismos com resultados satisfatórios. Contudo, no presente estudo apresentou algumas limitações, que talvez pudessem ser resolvidas utilizando um método alternativo para a extracção de DNA ou substituir por outros *primers*.

A análise da sequência do gene para o rRNA 16S é também um método muito utilizado para identificar isolados bacterianos pertencentes a diferentes grupos.

Contudo, por vezes pode apresentar algumas limitações. Um exemplo é a reconhecida incapacidade para discriminar *S. xylosus* de *S. saprophyticus* (Takahashi *et al.*, 1999). No presente estudo, a análise da sequência do gene para o rRNA 16S não permitiu distinguir *S. saprophyticus* de *S. xylosus*. Apesar de a análise do gene 16S rRNA ser um método adequado para a classificação de géneros, nem sempre permite discriminar efectivamente membros do mesmo género, pois estes apresentam um elevado grau de similaridade mesmo nas regiões mais variáveis do gene (Stackebrandt & Goebel, 1994). Takahashi *et al.* (1999) compararam filogeneticamente 38 espécies do género *Staphylococcus*, usando a análise da sequência parcial do gene rRNA 16S, e confirmaram as relações filogenéticas muito próximas entre os vários membros do mesmo género.

Dos 30 isolados identificados como *S. saprophyticus*/*S. xylosus*, 24 partilharam o mesmo perfil de RAPD (tipo I), sugerindo existência de um genótipo semelhante; três isolados apresentaram perfil RAPD II, distinto do perfil dominante, revelando um genótipo diferente do grupo I, e outros três revelaram perfil de RAPD único. Além disso, um dos isolados de estafilococos identificado como *S. equorum* apresentou um perfil de RAPD muito semelhante ao do tipo I, pelo que foi designado por perfil IA. Estes resultados revelaram a similaridade entre genótipos de *S. saprophyticus*, *S. xylosus* e *S. equorum*. Segundo o estudo realizado por Takahashi *et al.* (1999), também a similaridade das sequências do gene rRNA 16S entre os estafilococos das espécies *S. saprophyticus*, *S. xylosus* e *S. equorum* é grande.

A existência de perfis RAPD diferentes demonstram variabilidade genotípica entre os isolados identificados como *S. saprophyticus*/*S. xylosus* podendo ser eventualmente explicada pelo facto da ETAR receber efluentes de várias proveniências e, assim, receber bactérias com património genético diferente.

*S. saprophyticus*/*S. xylosus* foram as espécies mais abundantes encontradas nas águas da ETAR (76,9%). *S. saprophyticus* tem sido descrita como habitante em ambientes aquáticos (rio e mar) (Harakeh, 2006) e em produtos alimentares (Bockelmann *et al.*, 2005), enquanto *S. xylosus* tem sido considerado um habitante de animais e humanos (Kloos & Schleifer, 1975). Nagase *et al.* (2001)

estudou a distribuição de *S. saprophyticus* na pele de vários animais, e verificou que esta espécie é particularmente abundante em galinhas. Esta espécie tem sido isolada também de produtos alimentares, tais como, queijo, salsichas e leite (Rantsiou, 2005; Simeoni *et al.*, 2007). *S. equorum*, espécie da qual apenas se recuperou um isolado, foi originalmente detectada em cavalos saudáveis (Schleifer *et al.*, 1984), e posteriormente em isolados com proveniências alimentar, como leite (Meugnier *et al.*, 1996) e queijo (Place *et al.*, 2002), e clínica (Marsou *et al.*, 2001; Pinna *et al.*, 1999). No presente estudo, apenas um isolado foi identificado como *S. pasteurii*. *S. pasteurii* foi descrita por Chesneau *et al.* (1993), cujo estudo sugeriu a sua ubiquidade dado terem-se encontrado isolados em humanos, animais e produtos alimentares. Desde então são raras as referências à sua ocorrência. Porém, estudos posteriores a este, realizados em águas de consumo, referem esta espécie como a mais abundante nas águas de consumo (Faria *et al.*, comunicação pessoal)

Apenas um isolado foi identificado como *S. aureus* não apresentando qualquer fenótipo de resistência. *S. aureus* é reconhecidamente uma bactéria ubíqua, pelo que já foi descrita em habitats semelhantes ao do presente estudo (Ohlsen *et al.*, 2003; Fracchia *et al.*, 2006), bem como em águas de rios (Harakeh *et al.*, 2006) e produtos alimentares (Rodríguez-Calleja *et al.*, 2006; Simeoni *et al.*, 2007).

São conhecidos estudos que revelam a prevalência de *S. cohnii* em habitats semelhantes ao deste estudo (De Luca *et al.*, 2001). Neste caso, foram encontrados dois isolados de *S. cohnii*. Esta espécie foi descrita com base em isolados recuperados de humanos (Kloos & Schleifer, 1975). Em 1991 verificou-se a existência de duas subespécies de *S. cohnii*, nomeadamente, *S. cohnii subsp. cohnii*, proveniente de humanos, e *S. cohnii subsp. urealyticum*, proveniente de humanos e outros primatas (Kloos & Schleifer, 1975). Estudos recentes revelam a sua presença também em alimentos (Drosinos *et al.*, 2007). Não se tem conhecimento de estudos que registem *S. arlettae* como habitante de águas provenientes de ETARs, todavia, neste estudo, foi detectada a ocorrência de um isolado desta espécie. Schleifer *et al.* (1984) depreveu isolados de *S. arlettae* em animais, pelo que a presença desta espécie em água residual não é surpreendente.

No presente estudo, encontrou-se um isolado de cada uma das espécies mais recentemente descritas do género *Staphylococcus*, nomeadamente, *S. pettenkoferi*, já detectado em isolados humanos (Trülzsch *et al.* 2002), e *S. succinus*, encontrado em queijo (Place *et al.*, 2002) e em âmbar (Lambert *et al.*, 1998).

Neste estudo, foram detectadas espécies de *Staphylococcus* que se sabem colonizar humanos e outros animais, facto que explica a sua existência nas águas desta ETAR municipal, pois facilmente entram no ciclo urbano da água.

A análise dos perfis de resistência obtidos para os isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes da ETAR municipal estudada permitiu verificar que todos os isolados analisados eram susceptíveis a alguns antibióticos, como a amoxicilina, ciprofloxacina, vancomicina e sulfametoxazol/trimetoprim. Porém, registaram-se prevalências elevadas de resistência a alguns antibióticos, destas destacam-se as observadas para lincomicina, 66,7%, eritromicina, 23,1%, clindamicina, 17,9%, gentamicina, 10,3%, e tetraciclina, 7,7%.

São vários os estudos sobre resistência a antibióticos em *Staphylococcus* spp. de proveniência clínica, por exemplo para a lincomicina (Mee-Marquet *et al.*, 2004; Haroche *et al.*, 2003), para a eritromicina (Randrianirina *et al.*, 2007), para a tetraciclina (Ardic *et al.*, 2005), para a clindamicina (Steward *et al.*, 2005) e para a gentamicina (Cafferkey *et al.*, 1983). Todavia, como já se referiu, não se conhecem estudos similares relativos a *Staphylococcus* spp. de origem ambiental, por exemplo de águas residuais. Porém, tais estudos são justificados, pois a presença de antibióticos e seus metabolitos na ordem dos  $\mu\text{g/L}$ , entre os quais, fluoroquinolona ( $0,5 \mu\text{g/L}$ ) e eritromicina ( $2,5 \mu\text{g/L}$ ) tem sido reportada em esgotos municipais (Ralloff, 1998; Halling-Sørensen, 1998). Além disso, também foram detectados antibióticos na ordem dos micrograma por litro e nanograma por litro em vários compartimentos ambientais, como efluentes hospitalares, efluentes provenientes de ETARs, águas de superfície e, em alguns casos, águas profundas (Richardson *et al.*, 1985; Hirsch *et al.*, 1999; Zuccato *et al.*, 2000; Kolpin *et al.* 2002; Kümmerer, 2003; Kümmerer, 2004). Neste estudo, a disseminação de estafilococos resistentes a antibióticos pode ser eventualmente explicada pela ocorrência e estabilidade de antibióticos que podem contribuir

para que as bactérias face a um ambiente favorável, sejam seleccionadas, e, assim desenvolvam resistência a estes antibióticos.

Apesar de se verificar uma prevalência de resistência relativamente elevada de eritromicina, especialmente nas águas residuais (47,4%) em relação às águas residuais tratadas, não é possível concluir a selecção ou não de bactérias portadoras de resistência pois o número de isolados testados, neste estudo, resume-se apenas a 39, o que não é suficiente para obter uma conclusão.

Verificou-se que 40,0% dos isolados apresentaram resistência a um só antibiótico, e 17,9% apresentavam resistência a 3 ou mais antibióticos. Quando as bactérias são resistentes a uma série de antibióticos de diferentes famílias designam-se por multiresistentes (Alekhun & Levy, 2007). Segundo Levy (2002), a emergência de bactérias multiresistentes é consequência de pressões selectivas contínuas de diferentes agentes antimicrobianos. Esta situação pode reflectir a aquisição de diferentes determinantes que conferem resistência na mesma molécula de DNA, ou a aquisição de um só determinante, como por exemplo, um que confira mecanismos de efluxo para diferentes agentes antimicrobianos (Lewis *et al.*, 1997).

Apesar de os *Staphylococcus* analisados apresentarem uma prevalência de resistência à penicilina (PE) abaixo dos 6%, o fenótipo intermédio foi bastante mais prevalente (cerca de 70%). Este resultado deve-se presumivelmente ao facto de mais de 90% dos *Staphylococcus* poderem produzir penicilinasas (Lowy, 2003). Estas enzimas, predominantemente extracelulares, são produzidas quando os isolados são expostos aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Lowy, 2003). Estes actuam ao nível das PBPs, que estão envolvidas na síntese da parede celular, pelo que inibem a síntese mas não a degradação do peptidoglicano (Murray *et al.*, 2002).

Segundo Lowy *et al.* (2003), a importância das estirpes de *Staphylococcus aureus* deve-se não só à sua capacidade de causar infecções, mas principalmente por desenvolver com facilidade resistência a antibióticos. Neste estudo, o único

isolado de *Staphylococcus aureus* não apresentou fenótipo de resistência a nenhum dos antibióticos testados.

De forma a avaliar a associação entre fenótipos de resistência a antibióticos, desinfectantes e metais pesados, usou-se a correlação de Pearson. Pares de antibióticos como a tetraciclina e a ciprofloxacina, a tetraciclina e a gentamicina, a clindamicina e a lincomicina, a metilicina e a oxacilina, e a penicilina e a amoxicilina apresentaram uma relação positiva e significativa entre si, ou seja, quando o halo de inibição de um antibiótico é elevado/baixo também o é para o outro antibiótico. Este resultado, relativamente aos quatro últimos antibióticos, pode ser explicado pelo facto de pertencerem à família dos  $\beta$ -lactâmicos e por isso terem o mesmo mecanismo de acção.

As correlações positivas observadas entre antibióticos sugerem que a selecção de resistência a antibióticos pode não surgir como o aparecimento sequencial de cada fenótipo de resistência. Estes resultados podem ser devidos à existência de diferentes determinantes de resistência na mesma estrutura genética ou devido a um mecanismo de efluxo complexo, responsável por mais de um fenótipo de resistência (Alonso *et al.*, 2001; Summers *et al.*, 2006).

Apesar de alguns autores descreverem a resistência cruzada entre antibióticos e desinfectantes como sendo a responsável pela selecção de bactérias resistentes a antibióticos em ambientes domésticos (Levy, 2002, Kümmerer, 2004), outros demonstram a inexistência de associação entre os dois fenótipos (Cole *et al.*, 2003; Ferreira da Silva *et al.*, 2007). No presente estudo, nenhum dos desinfectantes testados demonstrou correlações, positivas ou negativas, com antibióticos.

Apesar de a detecção fenotípica de resistência a antibióticos ser importante, principalmente na escolha da terapia antimicrobiana mais adequada, esta apresenta algumas limitações. A abordagem genotípica é independente de categorias fenotípicas como susceptibilidade, susceptibilidade intermédia e resistência cujos *breakpoints* podem variar entre países. Além disso, os mecanismos de resistência que envolvem níveis baixos de resistência podem ser mais fáceis de detectar recorrendo a métodos genotípicos. Naturalmente, a detecção genotípica também apresenta algumas limitações, como por exemplo a

existência de outros genes que podem causar resultados falso-positivos ou então o aparecimento de mutações na região dos *primers* que podem gerar resultados falso-negativos (Sundsfjord *et al.*, 2004).

Por estas razões e também por ser importante avaliar a diversidade de determinantes genéticos de resistência em isolados ambientais para posterior comparação com isolados clínicos, recorreu-se também a métodos genotípicos para a detecção de resistência a antibióticos. Como a prevalência de resistência aos macrólidos e lincosamidas se revelaram elevadas, recorreu-se à detecção dos genes *ermA*, *ermC* e *msrA/B*. No presente estudo, o mecanismo de resistência mediado por bombas de efluxo codificado pelos genes *msrA/B* foi o mais prevalente, sendo que se verificou em todos os isolados (9) que apresentavam resistência à eritromicina. Este mecanismo de resistência encontra-se documentado em alguns estudos (Eady *et al.*, 1993; Lina *et al.*, 1999; Schwitz *et al.*, 2000). A resistência devida ao gene *msrA* foi detectada primeiro em *S. epidermidis*, mas já foi identificada em outras espécies de estafilococos, designadamente, *S. aureus*, *S. cohnii*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* (Lina *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 1999; Leclercq, 2002; Otsuka *et al.*, 2006). Eady e colaboradores (1993) observaram que o mecanismo de efluxo é mais prevalente em *Staphylococcus* coagulase negativos do que em *S. aureus*. No presente estudo os genes *msrA/B* foram encontrados em *S. saprophyticus*/ *S. xylosus*, 16,7% (5/30), em dois *S. cohnii*, um *S. pettenkoferi* e um *S. succinus*.

O gene *ermC*, que codifica uma metilase, foi detectado em dois isolados *S. saprophyticus*/*S. xylosus* e um *S. succinus*. Este mecanismo que confere resistência a macrólidos, lincosamidas e streptogaminas B, denominado por MLS<sub>Bi</sub>, envolve a modificação do sítio-alvo da subunidade 23S do ribossoma mediada por uma metilase, sendo esta enzima expressada na presença de um indutor, como, por exemplo, a eritromicina (Schmitz *et al.*, 1999; Leclercq, 2002; Otsuka *et al.*, 2006). A realização do teste D (O' Sullivan *et al.*, 2006), permitiu confirmar que o isolado *S. succinus* possuía fenótipo de indução, pois apenas na presença de eritromicina apresentava resistência à clindamicina. Estes resultados são consistentes com alguns estudos recentes que demonstram que o mecanismo indutivo parece estar relacionado com a presença do gene *ermC*, ao passo que o constitutivo com o gene *ermA* (Lina *et al.*, 1999; Schwitz *et al.*, 1999; Otsuka *et*

*al.*, 2006). No isolado *S. succinns* (A8M14), para além do determinante *ermC* também se observou a presença do gene *msrA*. Eady *et al.* (1993) detectaram várias combinações de determinantes *erm* e *msrA* em estafilococos de origem clínica. Lina *et al.* (1999), num estudo posterior, identificou também esta combinação de genes numa estirpe de *Staphylococcus haemolyticus*. Relativamente aos dois isolados de *S. saprophyticus*/*S. xylosus* que apresentaram o gene *ermC*, mas não expressaram fenótipo de resistência à eritromicina, pode ser devido, por exemplo, a uma mutação ou à falta de um promotor.

Relativamente à resistência MLS<sub>B</sub> constitutiva, a metilase é codificada pelo gene *ermA* na ausência de um indutor (Schmitz *et al.*, 1999; Leclercq, 2002; Otsuka *et al.*, 2006). No presente estudo, em nenhum dos isolados testados foi detectada a presença do gene *ermA*.

A detecção dos determinantes genéticos demonstrou haver maior prevalência de genes *msrA/B* do que *ermC*. De acordo com um estudo semelhante a este mas em águas de consumo (Faria *et al.*, comunicação pessoal), o mecanismo de resistência por bombas de efluxo, codificado por *msrA/B*, também foi predominante em relação ao mecanismo MLS<sub>B</sub>. Outros estudos, realizados em isolados de *S. aureus* de origem clínica com resistência à eritromicina, os genes mais abundantes foram *ermA* (67%), seguidos de *ermC* (23%) e *msrA/B* (6%). Menos frequente revelou-se o gene *ermB*.

Além dos genes *ermA*, *ermC* e *msrA/B*, também se procedeu à detecção do gene *mecA* no único isolado que apresentou fenótipo de resistência à meticilina. Este isolado apresentou também resistência à oxacilina. A resistência à meticilina e oxacilina deve-se à presença da proteína PBP2 (Fluit *et al.*, 2001; Schito, 2006). Por serem antibióticos análogos, já era previsível que apresentassem o mesmo fenótipo de resistência. A resistência à meticilina em *Staphylococcus* spp., especialmente *S. aureus*, é actualmente uma causa de alarme, pois as taxas de resistência globais são elevadas. Segundo estudos realizados por Tiemersama *et al.* (2004), entre 1999 e 2002, a prevalência de resistência à meticilina de estirpes de *Staphylococcus* spp. de vários hospitais de 26 países europeus foi inferior a 1% em países como a Suécia, Dinamarca e Holanda mas superior a 40% na Grécia, Grã-Bretanha e Itália. Portugal, nos mesmos estudos, apresentou uma prevalência bastante elevada (34,7%).

Relativamente ao *S. saprophyticus*/*S. xylosus* fenotipicamente resistente à meticilina, que foi sujeito à detecção do gene *mecA*, verificou-se não existir correspondência entre genótipo e fenótipo. A resistência à meticilina resulta da existência do gene *mecA* localizado no cromossoma. O determinante *mecA* codifica uma proteína PBP2 que apresenta reduzida afinidade para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Chambers, 1997; Lee, 2003; Schito, 2006). Este resultado pode significar que o isolado, que apresentou resistência intermédia para penicilina, pode ter desenvolvido resistência através de um outro mecanismo como a hiperprodução de  $\beta$ -lactamases (Barg *et al.*, 1991), modificação da capacidade de ligação de PBPs normais (Tomasz *et al.*, 1989) ou devido a uma meticilinase (Massida *et al.*, 1992). A detecção genotípica do gene *mecA* é considerado como o método por excelência para detectar resistência à meticilina (Fang *et al.*, 2003; Atoum *et al.*, 2003), pelo que se pode concluir que, pelos critérios adoptados em microbiologia clínica, nenhum isolado apresentou resistência a este antibiótico.

Curiosamente, verificou-se uma prevalência de isolados resistentes à lincomicina que não é acompanhada da mesma forma pela eritromicina. Estes resultados podem ser explicados por outro tipo de resistência mais específico para as lincosamidas. A inactivação de lincosamidas já foi detectada em vários géneros de bactérias, inclusivamente em *Staphylococcus* de origem humana e animal (Devriese, 1980). Isolados clínicos de *Staphylococcus* demonstraram ser resistentes à lincomicina, mas susceptíveis à clindamicina. Nestas estirpes existe uma lincosamida O-nucleotidietransferase, codificada por dois genes *linA* e *linA'* (Brisson-Noël, 1988).

Este estudo demonstrou que águas provenientes de uma ETAR municipal podem constituir-se como reservatório e veículo de disseminação de estafilococos resistentes a antibióticos, especialmente da família dos macrólidos, como a eritromicina, e das lincosamidas. Um dos problemas que resulta da persistência e disseminação de bactérias resistentes em águas tratadas é a possível contaminação do ambiente, nomeadamente das águas receptoras.

**CAPÍTULO 5:**  
**CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO**

## CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

As principais conclusões deste estudo podem ser sumariadas pelos seguintes pontos:

- Este estudo permite concluir que os *Staphylococcus* fazem parte da microflora das águas residuais domésticas.
- Encontrou-se uma grande variedade de *Staphylococcus* spp. nas águas provenientes da ETAR, sendo que as espécies predominantes foram *S. saprophyticus*/ *S. xylosus*.
- Nenhum dos isolados testados revelou resistência aos antibióticos amoxicilina, ciprofloxacina, vancomicina e sulfametoxazol/trimetoprim.
- O único *Staphylococcus aureus* isolado não apresentou resistência a nenhum dos antibióticos testados.
- A prevalência de resistência a alguns antibióticos como a eritromicina e lincomicina é elevada e por isso um problema preocupante.
- O gene responsável pelo mecanismo de resistência a macrólidos mais prevalente foi o *msrA*, que codifica um mecanismo de resistência por bomba de efluxo.
- As correlações entre os pares de antibióticos como a tetraciclina e a ciprofloxacina, a tetraciclina e a gentamicina, a clindamicina e a lincomicina, a meticilina e a oxacilina, e a penicilina e a amoxicilina foram positivas e significativas.
- Não se detectaram correlações, positivas ou negativas, entre desinfetantes e antibióticos.

## TRABALHO FUTURO

Sugere-se que estudos posteriores devam começar por discriminar os isolados que no presente estudo foram identificados como *S. saprophyticus*/*S. xylosus*. Como já foi discutido anteriormente, a análise da sequência do gene para o rRNA 16S não permitiu a discriminação entre *S. saprophyticus* e *S. xylosus*. Assim, seria importante proceder a métodos de ribotipagem que são referidos por alguns autores como técnicas aplicadas com sucesso em estudos para a identificação de estafilococos ao nível da espécie e subespécie (Chesnau *et al.*, 1993; Webster *et al.*, 1994; DeBusyer *et al.*, 1992).

Uma segunda sugestão é avaliar se a elevada prevalência de resistência à lincomicina registada nesta ETAR está associada à existência dos genes *linA* e *linA'*. Para esse efeito, dever-se-ia detectar a presença dos respectivos genes.

Estudos futuros deveriam, também, incluir a determinação dos perfis de resistência e genótipos relativamente a streptogaminas B para uma análise mais global relativamente à resistência MLS<sub>B</sub>. Para a avaliação dos determinantes de resistência sugere-se a detecção de genes *vatA*, *vatB* e *vgaA*.

Por fim, sugere-se que um estudo, no mesmo âmbito do presente mas mais alargado e global deveria ser realizado nesta e noutras ETARs de Portugal. Além disso, seria também importante desenvolver estudos em todo o ciclo urbano da água para melhor compreender a disseminação de estafilococos no meio ambiente.

**CAPÍTULO 6**  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS & Bager F (2001) Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in faecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 5: 2054-2059.
2. Al-Ahmad A, Daschner FD & Kömmerer K (1999) Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulphamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37:158-163.
3. Alekshun, MN & Levy SB (2007) Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128; 1-14.
4. Allen MJ, Taylor RH & Geldreich EE (1980) The occurrence of microorganisms in water encrustations. *Journal of American Water Works Association* 72: 614-625.
5. Alonso A, Sánchez P & Martínez JL (2001) Environmental selection of antibiotic resistance genes. Minireview. *Environmental Microbiology* 3: 1-9.
6. Amábile-Cuevas CF & Chicurel ME (1992) Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* 70: 189-199.
7. Ardic N, Ozyurt M, Sareyyupoglu B & Haznedaroglu T (2005) Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26: 213-218.
8. Armstrong J, Shigeno D, Calomiris J *et al.* (1981) Antibiotic resistance bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 42: 277-283.
9. Atoum MF, Akel H & Battikhi MN (2003) Comparison of PCR and disc diffusion methods in detecting methicillin resistance among *Staphylococcus* species from nosocomial infections. *Saudi Medical Journal* 24: 1410-1412.

10. Auerbach A, Seyfried EE & McMahon KD (2007) Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Research* 41: 1143-1151.
11. Azap OK, Arslan F, Timurkaynak F, Yapar G, Oruç E & Gagi ü (2005) Incidence of inducible clindamycin resistance in staphylococci: first results from Turkey. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 11: 577-596.
12. Barg N, Chambers H & Kernodle D (1991) Borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins is not conferred exclusively by the overproduction of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35: 1975-1979.
13. Bennett PM (1999) Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43: 1-4.
14. Berg J, Tom-Petersen A & Nybroe O (2005) Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Letters in Applied Microbiology* 40: 146-151.
15. Blázquez J, Navas A, Gonzalo P, Martinez JL & Baquero F (1996) Spread and evolution of natural plasmids harboring transposon Tn5. *FEMS Microbiology Ecology* 19: 63–71.
16. Bockelmann W, Willems KP, Neve H & Heller KH (2005) Cultures of the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* 15: 719-732.
17. Brisson-Noël A, Delrieu P, Samain D & Courvalin P (1988) Inactivation of lincosamide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of lincosaminide O-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. *Journal of Biological Chemistry* 263: 15880-15887.
18. Brock TD, Madigan & MT (2000) *Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall International Inc. Englewood Cliffs.
19. Cafferkey MT, Hone R, Falkiner FR, Keane CT & Pomeroy H (1983) Gentamicin and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Dublin hospitals: clinical and laboratory studies. *The Journal of Medical Microbiology* 16: 117-127.

20. Calomiris JJ, Armstrong JL & Seiler RJ (1984) Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. *Applied Environmental Microbiology* 47: 1238-1242.
21. Calvi BR, Hong TJ, Findley SD, Gelbart WM (1991) Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in drosophila and plants: hobo, Activator and Tam3. *Cell* 66: 465-471.
22. Characklis, WG. 1988. Bacterial Regrowth in Distribution Systems. American Water Works Association Research Foundation. Denver, CO.
23. Chamber HF (1997) Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews* 10:781-791.
24. Chesneau O, Morvan A, Gromint F, Labischinski H & el Sohl N (1993) *Staphylococcus pasteurii* sp. nov., isolated from human, animal, and food specimens. *International Journal Systematic Bacteriology* 43: 237-244.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100-S16, 16th informational supplement. CLSI, Wayne, PA.
26. Cole EC, Addison RM, Rubino JR, Leese KE, Dulaney PD, Newell MS, Wilkins J, Gaber DJ, Wineinger T & Criger DA (2003) Investigation of antibiotic and antibacterial agent cross-resistance in target bacteria from homes of antibacterial product users and nonusers. *Journal of Applied Microbiology* 95: 664-676.
27. Comité de L'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, <http://www.sfm.asso.fr/>, 2006.
28. Davison J (1999) Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42:73-91.
29. De Luca G, Zanetti F, Perari AC & Stampi S (2001) Airborne coagulase negative staphylococci produced by sewage treatment plant. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 4: 231-238.
30. Devriese LA (1980) Two types of resistance to lincomycin in pathogenic staphylococci from animals. *Annales de microbiologie*. 131B: 261-266.

31. Dröge M, Puhler A & Selbitschka W (1998) Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. *Journal of Biotechnology* 64: 75-90.
32. Drosinos EH, Paramithiotis S, Kolovos G, Tsikoura I & Metaxopoulos I (2007) Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in southern Greece. *Food Microbiology* 24: 260-270.
33. Eady EA, Ross JI, Tipper JL, Walters CE, Cove JH & Noble WC (1993) Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 31: 211-217.
34. Emmerson M (1994) Nosocomial staphylococcal outbreaks. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplement* 93: 47-54.
35. Fang H & Hedin G (2003) Rapid screening and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples by selective-broth and Real-Time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2894-2899.
36. Faria C, Vaz-Moreira I, Serapicos E, Nunes OC & Manaia CM. Antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from water (não publicado).
37. Ferreira WFC & Sousa JCF (1998) *Microbiologia*. Volume II. Lidel, edições técnicas.
38. Ferreira da Silva M, Tiago T, Veríssimo A, Boaventura AR, Nunes OC & Manaia CM (2006) Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology* 55: 322-329.
39. Ferreira da Silva M, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuelo M, Nunes OC & Manaia CM (2007) Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology* 60: 166-176.
40. Fluit AC, Visser MR & Scmitz FJ (2001) Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 836-871.

41. Fontaine TD & Hoadley AW (1976) Transferrable drug resistance associated with coliforms isolated from hospital and domestic sewage. *Health Laboratory Science* 4: 238–245.
42. Fracchia L, Pietronave S, Rinaldi M & Giocanna Martinotti M (2006) Site-related airborne biological hazard and seasonal variations in two wastewater treatment plants. *Water Research* 40: 1985-1994.
43. Fridkin SK, Steward CD, Edwards JR, Pryor EE, Mc Gowan JE, Archibald LK, Gaynes RB, Tenover FC & Project Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology Hospitals (1999) Surveillance of antimicrobial use and antimicrobial resistance in the United States hospitals: Project ICARE phase 2. *Clinical Infectious Diseases* 29: 245-252.
44. Furner IJ, Huffman GA, Amasino RM, Garfinkel DJ, Gordon MO & Nester EW (1986) An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature* 319: 422-427.
45. Garrett J, Osswald W & Guimarães S (1998) *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas*. II Volume, 3ª ed. Porto Editora.
46. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J & Timersma E (2006) Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 368: 74-85
47. Guardabassi L & Dalsgaard A (2002) Occurrence and fate of antibiotic resistance bacteria in sewage. Danish Environmental Protection Agency, projecto nº 722, <http://www.mst.dk/udgiv/publications/2002/87-7972-266-0/pdf/87-7972-9.pdf>.
48. Guardabassi L, Danilo MA, Wong LF & Dalsgaard A (2001) The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. *Water Research* 36:1955-1964.
49. Guardabassi L, Dijkshoorn L, Olsen JE, Collard JM & Dalsgaard A (2000) Distribution of tetracycline resistant determinants A to E and transfer *in vitro* of tetracycline resistance in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *Journal of Medical Microbiology* 49: 929-936.

50. Hall RM & Collis CM (1999) Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology* 43: 1-4.
51. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
52. Halling-Sørensen B, Nielsen NS, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten LHC & Jørgensen SE (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – A review. *Chemosphere* 36: 357-393
53. Harakeh S, Yassine H, Hajjar S & El-Fadel M (2006) Isolates of *Staphylococcus aureus* and *saprophyticus* resistant to antimicrobials isolated from the Lebanese aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin* 52: 912-919.
54. Hardy CM, Clark-Walker GD (1991) Nucleotide sequence of the COX1 gene in *Kluyveromyces lactis* mitochondrial DNA: evidence for recent horizontal transfer of a group II intron. *Current Genetics* 20: 99-114.
55. Haroche J, Morvan A, Dav M, Allignet J, Bimet F, El Solh N (2003) Clonal diversity among Streptogramin A-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in French Hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 586-591.
56. Heuer H, Krogerrecklenfort E, Wellington EMH, Egan S, Elsas JD, Overbeek LS, Collard JM, Guillaume G, Karagouni A, Nikolopoulou D & Smalla K (2002) Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 289-302.
57. Hiramatsu K, Arikata N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y & Kobayashi I (1997) Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40: 135-136.
58. Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz KL (1999) Occurrence of antibiotics in the environment. *Science Total Environment* 225: 109-18.
59. Holmgren A, Bränden CI (1989) Crystal structure of chaperone protein PapD reveals an immunoglobulin fold. *Nature* 342:248-251.

60. Houck MA, Clark JB, Peterson KR & Kidwell MG (1991) Possible transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. *Science* 253: 1125-1128.
61. Huebner J & Godmann DA (1999) Coagulase-Negative Staphylococci: Role as Pathogens. *Annual Review of Medicine* 50: 223-236.
62. Jørgensen SE, Halling-Sørensen B (2000) Drugs in the Environment. *Chemosphere* 40: 691-699.
63. Katz LA (1996) Transkingdom transfer of the phosphoglucose isomerase gene. *Journal of Molecular Evolution* 43: 453-459.
64. Kessie G, Ettayebi M, Haddad AM, Shibl AM, Al-Shammary FJ, Tawfik AF & Al-Ahdal (1998) Plasmid profile and antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci isolated from polluted water. *Journal of Applied Microbiology* 84 : 417-422
65. Khachatourians G (1998) Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association Journal* 159: 1129-1136.
66. Kloos WE, Schleifer K-H & Götz F (1992) The genus *Staphylococcus*, capítulo 63, vol 2, In *The Prokaryotes*, 2ª edição, pp. 1369-1420.. Editado por A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. New York: Springer.
67. Kloos WE & Bannerman TL (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 7:117-140.
68. Kloos WE (1980) Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annual Review of Microbiology* 34: 559-592.
69. Kloos WE & Jorgensen JH (1985) *Staphylococci* in Lennette EH, Ballows A, Hausler WJ & Shadony. *Manual of Clinical Microbiology*. 4ª edição. American Society for Microbiology, Washington DC.
70. Kloos WE & Wolfshohl JF (1991) *Staphylococcus cohnii* subspecies: *Staphylococcus cohnii subsp. cohnii subsp. nov.* and *Staphylococcus cohnii subsp. urealyticum subsp. nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 284-289.

71. Kolpin D, Furlong ET, Meyer MET, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB & Buxton HT (2002) Pharmaceuticals, hormones, and their organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36: 1202-1211.
72. Koltz MG, Klassen GR & Loewen PC (1997) Phylogenetic relationships among procaryotic and eucaryotic catalases. *Molecular Biology and Evolution* 14: 951-958.
73. Kolwzan B, Traczewska T & Pawlaczyk-Szipilowa M (1991) Examination of resistance of bacteria isolated from drinking water to antibacterial agents. *Environmental Protection Engineering* 17: 53-60.
74. Kruse H & Sorum H (1994) Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied Environmental Microbiology* 60: 4015-4021.
75. Kümmerer, K. (2004) Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 311-320.
76. Kümmerer K (2003) The significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 5-7.
77. Lambert LH, Cox T, Mitchell K, Rosselo-Mora RA, Del Cueto C, Dodge DE, Orkand P & Cano RJ (1998) *Staphylococcus succinus* sp. nov. isolated from Dominican amber. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 511-518.
78. Leclercq R (2002) Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases* 34:482-492.
79. Lee JH (2003) Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6489-6494.
80. Lévesque C, Piche L, Larose, C & Roy PH (1995) PCR Mapping of Integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *American Society for Microbiology* 39: 85-191.
81. Lewis K, Hooper D, Ouillette M (1997) Microbial multidrug efflux pumps: new developments and clinical significance. *ASM News* 63: 605-610.

82. Levy SB & Marshall B (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10: 122-129.
83. Levy SB (2002) Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49:25-30.
84. Levy SB (2000) Antibiotic and antiseptic resistance: impact on public health. *Pediatric Infectious Disease Journal* 19: 120-122.
85. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F & Etienne J (1999) Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among *Staphylococci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1062-1066.
86. Lowy FD (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation* 111:1265-1273.
87. Mach PA & Grimes DJ (1982) R-Plasmid transfer in a wastewater treatment plant. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 1395-1403.
88. MacKenzie FM, Bruce J, Struelens MJ, Goossens H, Mollison J & Gould IM (2006) Antimicrobial drug use and infection control practises associated with the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in European hospitals. *Clinical Microbiology and Infection* 13: 269-276.
89. Marcinek H, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A & Gauer M (1998) *Enterococcus faecalis* gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants. *Applied Environmental Microbiology* 64:626-632.
90. Marshall KC (1992) Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. *American Society for Microbiology News*. 58: 202-207.
91. Marsik FJ & Bake S (1982) Species identification and susceptibility to 17 antibiotics of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 15: 640-645.
92. Marsou R, Bes M, Brun Y, Boudouma M, Idrissi L, Meugnier H, Freney J & Etienne J (2001) Molecular techniques open up new vistas for typing of coagulase-negative staphylococci. *Pathologie-Biologie* 49: 205-215.

93. Massida O, Montanari MP & Varaldo PE (1992) Evidence for a methicillin-hydrolysing beta-lactamases in *Staphylococcus aureus* strains with borderline susceptibility to this drug. *FEMS Microbiology Letters* 92:223-228.
94. Mazel D & Davies J (1999) Antibiotic resistance in microbes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56: 742-754.
95. McArthur J & Tuckfield RC (2001) Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: effects of industrial pollution. *Applied Environmental Microbiology* 66: 3722-3726.
96. McDonnell G & Russell AD (1999) Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 147-179.
97. Mee-Marquet, N, Domelier AS, Girard N, Quentin R & the Blood stream infection study group of the Relais d'Hygiène du Centre (2004) Epidemiology and Typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 5650-5657.
98. Mendes B & Oliveira JF (2004) Qualidade da água para consumo humano. Lidel, edições técnicas.
99. Meugnier H, Bes M, Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Brun Y, Freney J & Fleurette J (1996) Identification and ribotyping of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* strains isolated from goat milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology* 31: 325-331.
100. Meyer AD, Ichikawa T, Meiins J (1995) Horizontal gene transfer: regulated expression of a tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes* rolC gene. *Molecular and General Genetics* 249: 265-273.
101. Miller RV (1998) Bacterial Gene Swapping in Nature. *Scientific American* 278: 47-51.
102. Morris DO, Rook KA, Shofer FS, Rankin SC (2006) Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). *Veterinary Dermatology* 17: 458-460.

103. Murray BE (1997) Antibiotic Resistance. *Advances in Internal Medicine* 42: 339-367.
104. Nagase N, Sasaki A, Yamashita K, Shimizu A, Wakita Y, Kitai S & Kawano J (2001) Isolation and species distribution of Staphylococci from animal and human skin. *Journal of Veterinary Medicine* 64: 245-250.
105. Nikolisch MP, Hong G, Shoemaker NB & Salyers AA (1994) Evidence for natural horizontal transfer of tetQ between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3255-3260.
106. Novotná G, Adamkova V, Janata J, Melter O & Spizek J (2005) Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides. *Agents and Chemotherapy* 49: 3586-3589.
107. Ohlsen K, Ternes T, Werener G, Wallner U, Löffler D, Ziebuhr W, Witte W & Hacker J (2003) Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage. *Environmental Microbiology* 5: 711-716.
108. O'Sullivan MVN, Cai Y, Kong F, Zeng X & Gilbert GL (2006) Influence of disk separation distance on accuracy of the disk approximation test for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus spp.* *Journal of Clinical Microbiology* 44: 4072-4076.
109. Otsuka T, Zaraket H, Takano T, Saito K, Dohmae S, Higuchi W, & Yamamoto T (2006) Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and genotypes among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Japan 13: 316-34.
110. Patel A, Lloyd DH, Lamport AI (1999) Antimicrobial resistance of feline staphylococci in south-eastern England. *Veterinary Dermatology* 10: 257-261.
111. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Kugler KC & Beach ML (1999) Survey of bloodstream infections due to gram-positive cocci: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY antimicrobial

surveillance program Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 33: 283-299.

112. Place RB, Hiestand D, Burri S & Teuber M (2002) *Staphylococcus succinus subsp. casei subsp. nov.*, a dominant isolate from a surface ripened cheese. Systematic and Applied Microbiology 25: 353-359.

113. Pinna A, Zanetti S, Sotgiu M, Sechi LA, Fadda G & Carta F (1999) Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated in corneal/external infections. British Journal of Ophthalmology 83: 771-773.

114. Raloff J (1988) Drugged waters. Science News 153: 187-189.

115. Randrianirina F, Soares JL, Ratsima E, Carod JF, Combe P, Grosjean P, Richard V & Talarmin A (2007) In vitro activities of 18 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from the Institut Pasteur of Madagascar. Annals of Clinical Microbiology Antimicrobials 6: 5.

116. Rantsiou K, Iacumin L, Cantoni C, Comi G & Cocolin L (2005) Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages. International Journal of Food Microbiology 97: 277-284.

117. Rasmussen LD & Sørensen SJ (1998) The effect of longterm exposure to mercury on the bacterial community in marine sediment. Current Microbiology 36: 291-297.

118. Reinthaler FF, Posch J, Feierl G, Wust G, Has D, Ruckebauer G, Mascher F & Marth E (2003) Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. Water Research 37: 1685-1690.

119. Richardson ML & Bowron JM (1985) The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. Journal of Pharmacy and Pharmacology 37: 1-12.

120. Ridgway HF & Olson BH (1981) Scanning electron microscope evidence for bacterial colonization of a drinking-water distribution system. Applied and Environmental Microbiology 41: 274-287.

121. Rodríguez-Calleja JM, García-Lopez, Santos JA, Otero A & Garcia-Lopez ML (2006) Molecular and phenotypic typing of *Staphylococcus aureus* isolates from rabbit meat. Research in Microbiology 157: 496-502.

122. Rosser SJ, Young, HK (1999) Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from aquatic environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44: 11-18.
123. Roy, PH. (1999) Horizontal transfer of genes in bacteria. *Microbiology Today* 26: 168-170.
124. Salyers, AA (2002) An overview of the genetic basis of antibiotic resistance in bacteria and its implications for agriculture. *Animal Biotechnology* 13: 1-5.
125. Sanger T, Nicken S, Coulsen AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74: 5463-5467.
126. Saribas Z, Tunckanat F & Pinar A (2006) Prevalence of *erm* genes encoding macrolide-lincosamide-streptogamin (MLS) resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in a Turkish university hospital. *Clinical Microbiology and Infection* 12: 797-799
127. Schito GC (2006) The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* 12: 3-8.
128. Schwartz T, Kohnen T, Jansen B & Obst U (2003) Detection of antibiotic resistance bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 289-302.
129. Schleifer KH, Kilpper-Bälz R, Devriese LA (1984) *Staphylococcus arlettae* sp. nov., *S. equorum* sp. nov. and *S. kloosii* sp. nov. Three new coagulase-negative, novobiocin-resistant species from animal. *Systematic and Applied Microbiology* 5:501-509.
130. Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC & The Sentry Participants Group (1999) Prevalence of resistance to MLS antibiotics in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43: 783-792.
131. Seoane AS & Levy SB (1995) Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 177: 3414-3419.

132. Sibille I, Sime-Ngando T, Mathieu L & Block JC (1998) Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 197-202.
133. Simeoni D, Rizzotti L, Cocconcelli P, Gazzola S, Dellagio F & Torriani S (2007) Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. *The New England Journal of Medicine* 25: 196-201.
134. Smalla K & Sobecky PA (2002) The prevalence and diversity of mobile genetic elements in bacterial communities of different environmental habitats: insights gained from different methodological approaches. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 165-175.
135. Spencer R (1996) Predominant pathogens found in the European prevalence of infections in intensive care study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15:3-12.
136. Spiliopoulou I, Petinaki E, Papandreou P & Dimitracopoulos G (2004) *erm(C)* is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53:814-817.
137. Stackebrandt E & Goebel BM (1994) A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Biology* 44:846-849.
138. Stansfield WD, Colomé JS, Cano RJ (1998) *Molecular and Cellular Biology*. McGraw-Hill Editor, Portugal.
139. Steward CD, Raney PM, Morrell AK, Williams PP, McDougal LK, Jevitt L, McGowan JE & Tenover FC (2005) Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 1716-1721.
140. Stelling JM, Travers K, Jones RN, Turner OJ, O'Brien TF & Levy SB (2005) Integrating *Escherichia coli* antimicrobial susceptibility data from multiple surveillance programs. *Emerging Infectious Diseases* 11: 873-882.

141. Summers, AO (2006) Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multiresistance problem. *Animal Biotechnology* 17:125-135.
142. Sundsfjord A, Simonsen GS, Halorsen B, Haaheim H, Hjelmevoll S, Littauer P & Dahl KH (2004) Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 112:815-837.
143. Szczepanowski R, Krahn I, Linke B, Goesmann A, Pühler A & Schlöter A (2004) Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. *Microbiology* 150: 3613-3630.
144. Takahashi T, Satoh I & Kikuchi N (1999) Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 725-728.
145. Teubner M (1999) Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56. 755–63.
146. Thakker VS, Jenssen WD, Moon-McDermott I, Weinstein MP & Dubin DT (1989) Molecular epidemiology of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 33: 541-550.
147. Tiemersma EW *et al.* (2004) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerging Infectious Diseases* 10: 1627-1634.
148. Tilloston LE, Jenssen WD, Moon-McDermott L & Dubin DT (1989) Characterization of a novel insertion of the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance transposon Tn554 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 33: 541-550.
149. Tomasz A, Drugeon HB, Lencastre HM, Jabes D, McDougall L & Bille J (1989) New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding

proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33: 1869-1874.

150. Trülzsch K, Grabein B, Schumann P, Mellmann A, Antonenka U, Heesemann J & Becker K (2007) *Staphylococcus pettenkoferi* sp. nov., a novel coagulase-negative staphylococcal species isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1543-1548.

151. Walter MV & Vennes JW (1985) Occurrence of multiple-antibiotic-resistant enteric bacteria in domestic sewage and oxidation lagoons. *Applied Environmental Microbiology* 60: 792–800.

152. Washington JA (1985) Susceptibility Tests in Lennette EH, Ballows A, Hausler WJ & Shadony. *Manual of Clinical Microbiology*. 4<sup>a</sup> edição. American Society for Microbiology, Washington DC.

153. Westh H, Hougaard DM, Vuust J & Rosdahl VT (1995) Prevalence of *erm* gene classes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated between 1959 and 1988. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 39: 369-373.

154. Wise R (2002) Antimicrobial resistance: priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49: 585-586.

155. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA & Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

156. Wireman J, Liebert CA, Smith T & Summers AO (1997) Association of mercury resistance with antibiotic resistance in the gram-negative fecal bacteria of primates. *Applied Environmental Microbiology* 63: 4494-4503.

157. Witte W, Klare I & Werner G (1999) Selective pressure by antibiotics as feed additives. *Infectio*; 27: 35-37.

158. Zuccato E, Calamari D, Natangelo M & Fanelli R (2000) Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 335: 1789-1790.