



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

ALBERTO JORGE GOMES DE ARAUJO

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *Enterococcus*
spp. ISOLADAS DO ENTORNO DA PLUMA DO EMISSÁRIO SUBMARINO DE
FORTALEZA – CE**

FORTALEZA – CE

2013

ALBERTO JORGE GOMES DE ARAUJO

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *Enterococcus*
spp. ISOLADAS DO ENTORNO DA PLUMA DO EMISSÁRIO SUBMARINO DE
FORTALEZA – CE**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto
de Ciências do Mar da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Marinhas
Tropicais. Área de concentração:
Microbiologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dra. Regine
Helena Silva dos Fernandes Vieira

FORTALEZA – CE

2013

ALBERTO JORGE GOMES DE ARAUJO

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *Enterococcus*
spp. ISOLADAS DO ENTORNO DA PLUMA DO EMISSÁRIO SUBMARINO DE
FORTALEZA – CE**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto
de Ciências do Mar da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Marinhas
Tropicais. Área de concentração:
Microbiologia Ambiental.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Renata Albuquerque Costa
Faculdade do Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

Prof. Dra. Leda Cristina Santana de Mendonça Hagler
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

A meus pais, Socorro e Francisco.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Socorro e Francisco, por todo apoio, carinho, compreensão e incentivo sempre, mesmo apesar da distância se fizeram próximo pelas palavras e amor;

A meus irmãos, Vanessa e João Pedro pelo amor, apoio, por todas as risadas e amizade;

À Professora Dra. Regine Vieira pela iniciação na ciência da microbiologia, pela orientação, por sua contribuição valiosa no desenvolvimento deste trabalho, pela compreensão, atenção e disponibilidade;

À Professora Dra. Oscarina Viana, por sempre ter respostas para minhas dúvidas e dicas sempre importantes inclusive para a minha formação;

Às minhas co-orientadoras Edirsana e Gleire, pela atenção, amizade e compreensão. Agradeço imensamente à Edirsana por dedicar muito do seu tempo na fase inicial e mais trabalhosa desse trabalho e à Gleire pelo acompanhamento na fase final, nas tentativas de biologia molecular;

Às super queridas, Camilla Brandão e Rayza Araujo, pela amizade, carinho, brincadeiras, pelo companheirismo em todos os momentos;

Ao Rafael, pela valiosa disposição em ajudar sempre nas mais diferentes questões, contribuindo significativamente com o meu trabalho;

Aos amigos Gustavo Rocha, Jim Pearce e Marcos Barbosa pelo auxílio em algumas partes desse trabalho;

À Adalva, Beatrice, Camila, Cecília, Cristiane, Lana, Marina e Thalita, por sempre ajudarem com ideias, na bancada e fora dela, por sempre se fazerem disponíveis frente a pedidos como, retirar meios da geladeira, retirar ou colocar algo na autoclave, entre muitos;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, pela receptividade e bons momentos de convivências;

Às amigas Janaína, Marcionília e Tarciana, pela amizade e carinho, conversas e muitas risadas compartilhadas pelos corredores do LABOMAR;

À FUNCAP por ter colaborado financeiramente durante todo o desenvolvimento da pesquisa;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O Sistema de Disposição Oceânica dos Esgotos Sanitários (SDOES) de Fortaleza atua no tratamento e disposição final de parte dos esgotos gerados na região. A eficiência desse sistema se dá através do aproveitamento da elevada capacidade de autodepuração das águas marinhas que promovem a diluição, dispersão e decaimento de cargas poluentes a elas lançadas. O emissário submarino recebe e lança em profundidades de 12 metros e a uma distância de 3.204 m, das praias da Costa Leste, esgotos domésticos que sofreram apenas um pré-tratamento, sendo este um peneiramento para retirada de sólidos. As bactérias do gênero *Enterococcus* spp. por resistirem mais tempo na água do mar que os coliformes termotolerantes, são consideradas indicadores mais precisos de contaminação fecal recente do ambiente marinho e de doenças transmitidas ao homem pelo contato com a água. O objetivo desse trabalho foi identificar estirpes de *Enterococcus* spp. isoladas do entorno da pluma do emissário submarino, determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, Ampicilina – AMP (10 µg), Clindamicina – CLI (2µg), Cloranfenicol – CLO (30 µg), Estreptomicina – SM (300 µg), Gentamicina – GM (10 µg), Penicilina G – PEN (10 U.I.), Tetraciclina – TET (30 µg) e Vacomicina – VAN (30 µg), normalmente empregados em doenças onde estes microorganismos estão implicados, proceder a cura plasmidial das estirpes resistentes aos antimicrobianos e detectar fatores de virulência através da produção de gelatinase, hemolisina, substância de agregação e proteínas de superfície. Os resultados mostraram a ocorrência de sete espécies: *Enterococcus durans* (n=2), *E. faecalis* (n=18), *E. faecium* (n=9), *E. hirae* (n=29), *E. mundtii* (n=14), *E. pseudoavium* (n=3) e *E. raffinosus* (n=5). Cerca de 61,25% das estirpes apresentaram resistência a pelo menos um dos fármacos testados e 30% apresentaram-se multirresistentes, com variação do Índice de Múltipla Resistência (MAR) entre 0,33 e 0,5. Os maiores índices de resistência estavam relacionados aos fármacos CLI (61,2%), SM (27,5%) e TET (13,8%), enquanto que CLO, PEN e VAN mostraram-se 100% eficientes. Observou-se ainda a ocorrência de estirpes produtoras de gelatinase (n=16), de hemolisinas com atividades β-hemolítica (n=14), de substância de agregação (n=5) e proteínas de superfície formadoras de biofilme (n=30). A ocorrência de resistência e multirresistência a antimicrobianos no ambiente aquático é um motivo de preocupação, sugerindo que os *Enterococcus* spp. podem vir a constituir reservatórios de genes de resistência.

Palavras-chave: *Enterococcus* spp., emissário submarino, resistência antimicrobiana, virulência.

ABSTRACT

Fortaleza's Oceanic Disposal of Sewage system (SDOES) is responsible for the treatment and final disposal of a part of the sewage generated in the area. The efficiency of the system is due to the high capacity of sea water to treat waste released into it through dilution, dispersion and decay of pollutants in the waste. The submarine outfall pipe receives and throws away at depths of 12 meters and at a distance of 3,204 m, from the beaches of the East Coast, domestic sewage which suffered only one pre-treatment, consisting of a screening process to remove solids. The bacterias of genus *Enterococcus* spp. by living longer in seawater than faecal coliforms are considered the most accurate indicator of recent faecal contamination of the marine environment and transmission of diseases to humans by contact with water. The objective of this work was to identify strains of *Enterococcus* spp. isolated from the surrounding marine outfall plume, determine the susceptibility profile of the antimicrobial, Ampicillin – AMP (10 µg), Clindamycin – CLI (2µg), Chloranphenicol – CLO (30 µg), Streptomycin – SM (300 µg), Gentamicin – GM (10 µg), Penicillin G – PEN (10 U.I.), Tetracycline – TET (30 µg) e Vancomycin – VAN (30 µg), usually employed in diseases where these microorganisms are involved, the plasmidial cure of antimicrobial-resistant strains and verify the occurrence of virulence factors by producing gelatinase, hemolysin, aggregation substance and surface proteins. The results showed the occurrence of seven distinct species: *Enterococcus durans* (n=2), *E. faecalis* (n=18), *E. faecium* (n=9), *E. hirae* (n=29), *E. mundtii* (n=14), *E. pseudoavium* (n=3) and *E. raffinosus* (n=5). About 61.25% of the strains showed resistance to at least one of the drugs tested and 30% with multidrug-resistant variation of Multiple Resistance index (MAR) between 0.33 and 0.5. The highest rates of resistance were related to the drugs CLI (61.2%), (27.5%) SM and TET (13.8%), while CLO, PEN and VAN were 100% efficient. It was also noted the occurrence of strains producing gelatinase (n=16), hemolysins with activities β-hemolytic (n=14), aggregation substance (n=5) and surface biofilm-forming proteins (n=30). The occurrence of antimicrobial resistance and multidrug resistance in the aquatic environment is a cause for concern, suggesting that *Enterococcus* spp. may be reservoirs of genes of resistance.

Keywords: *Enterococcus* spp., submarine outfall, antimicrobial-resistant, virulence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Unidades componentes de um sistema de disposição oceânica de esgotos..	20
Figura 2 –	Localização geográfica do emissário submarino de Fortaleza – Ceará.....	36
Figura 3 –	Mapa de localização do emissário submarino de Fortaleza – CE indicando as 22 estações de coleta do entorno da pluma.....	37
Figura 4 –	Purificação das estirpes bacterianas.....	38
Figura 5 –	Caracterização do gênero <i>Enterococcus</i> e identificação das espécies.....	41
Figura 6 –	Percentual da resistência antimicrobiana das estirpes de <i>E. hirae</i> (29-80), <i>E. faecalis</i> (18-80), <i>E. mundtii</i> (14-80) e <i>E. faecium</i> (9-80), isoladas do entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.....	54
Figura 7 –	Percentual da resistência antimicrobiana das estirpes de <i>E. raffinosus</i> (5-80), <i>E. pseudoavium</i> (3-80) e <i>E. durans</i> (2-80) isoladas do entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.....	55
Figura 8 –	Produção de gelatinase em Caldo BHI acrescido de 4% de gelatina (esquerda) e de hemolisina em Ágar BHI suplementado com 5% de hemácias de carneiro (direita).....	63
Figura 9 –	Teste de agregação em vidro. Negativo (esquerda) e positivo (direita).....	63
Figura 10 –	Produção de biofilme em Ágar Vermelho Congo.....	65
Figura 11 –	Mapa de localização do emissário de Fortaleza – CE indicando as estações que apresentaram estirpes resistentes aos antimicrobianos testados e/ou positivas para os testes fenotípicos de virulência.....	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Identificação e frequência das espécies de <i>Enterococcus</i> isoladas do entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.....	45
Gráfico 2 –	Percentual de resistência antimicrobiana entre os isolados de <i>Enterococcus</i> spp. isolados do entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.....	50
Gráfico 3 –	Percentual de isolados multirresistentes por estação de coleta do entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.....	60
Gráfico 4 –	Percentual de isolados multirresistentes por espécie.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Provas bioquímicas para diferenciação de <i>Enterococcus</i> spp.....	45
Tabela 2 –	Número e espécies identificadas por estação de coleta no entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.....	46
Tabela 3 –	Número e percentagem de isolados de <i>Enterococcus</i> classificados como resistentes, susceptíveis e intermediários frente aos oito antimicrobianos testados.....	50
Tabela 4 –	Perfis de resistência verificados para as espécies de <i>Enterococcus</i> spp. isoladas do entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.	53
Tabela 5 –	Perfis de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) com seus respectivos índices e percentuais.....	59
Tabela 6 –	Número de estirpes de <i>Enterococcus</i> spp., oriundas do emissário submarino de Fortaleza, classificadas de acordo com o perfil de resistência cromossômica e plasmidial.....	61
Tabela 7 –	Perfis de virulência verificados para as espécies de <i>Enterococcus</i> spp. isoladas do entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.....	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Patógenos potencialmente presentes em esgotos domésticos.....	18
Quadro 2 –	Padrões de balneabilidade com os limites de coliformes termotolerantes, <i>E. coli</i> e enterococos por 100 mL de água, para cada categoria.....	25
Quadro 3 –	Padrões de qualidade bacteriológica com limites de coliformes termotolerantes para cada 100 mL de água para cada classe de águas salinas.....	26
Quadro 4 –	Interpretação dos diâmetros das zonas de inibição do crescimento microbiano para <i>Enterococcus</i> spp.....	42

ANEXO

Anexo 1 – Informações referentes aos testes realizados com as estirpes isoladas do 90 emissário submarino de Fortaleza- CE utilizadas no presente estudo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1	Contaminação dos corpos d'água por esgotos.....	17
3.2	Emissários submarinos.....	19
3.3	Balneabilidade.....	23
3.4	<i>Enterococcus</i> spp.....	26
3.5	Resistência aos antimicrobianos	28
3.5.1	Resistência a β -lactâmicos.....	29
3.5.2	Resistência a aminoglicosídeos.....	30
3.5.3	Resistência a glicopeptídeos.....	30
3.5.4	Resistência à tetraciclina.....	31
3.5.5	Resistência a cloranfenicóis.....	32
3.5.6	Resistência a macrolídeos.....	32
3.6	Fatores de virulência.....	33
3.6.1	Gelatinase.....	34
3.6.2	Citolisina/Hemolisina.....	34
3.6.3	Substâncias de agregação.....	34
3.6.4	Proteína de Superfície Enterocócica.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Origem das estirpes bacterianas	36
4.2	Purificação das estirpes bacterianas.....	37
4.3	Caracterização do gênero <i>Enterococcus</i>	38
4.3.1	Atividade de catalase.....	39
4.3.2	Hidrólise da esculina na presença de bile.....	39
4.3.3	Crescimento em caldo com 6,5% de cloreto de sódio (NaCl).....	39
4.4	Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i>	39
4.4.1	Prova para dihidroxilação de arginina.....	39
4.4.2	Fermentação de carboidratos: arabinose, lactose, manitol, rafinose, sacarose e sorbitol	40
4.4.3	Teste de motilidade	40

4.4.4	Produção de pigmento amarelo	40
4.4.5	Fermentação do piruvato de sódio a 1%	41
4.5	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	41
4.5.1	Antimicrobianos estudados	41
4.5.2	Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em ágar.....	42
4.5.3	Cura plasmidial.....	43
4.5.4	Cálculo do índice de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR)	43
4.6	Detecção de fatores de virulência.....	43
4.6.1	Detecção da produção de gelatinase.....	43
4.6.2	Detecção fenotípica da produção de hemolisina.....	44
4.6.3	Proteínas de Superfície Enterocócicas – Biofilme em Ágar Vermelho Congo.....	44
4.6.4	Substância de Agregação – Produção de Biofilme em Superfície de Vidro.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	Identificação das espécies.....	45
5.2	Perfil de resistência a antimicrobianos.....	49
5.3	Fatores de virulência.....	62
6	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

São muitas as fontes de poluição que comprometem as águas costeiras, sendo inclusive de diferentes naturezas como rios, galerias pluviais, emissários, extravasamentos de coletores de esgotos domésticos, resíduos que com frequência chegam a estes como efluentes hospitalares, resíduos de estabelecimentos comerciais, postos de gasolina e também resíduos de indústrias (ABESSA *et al.*, 2012; RODGERS-GRAY *et al.*, 2000).

Alguns dos impactos negativos mais importantes causados no ecossistema marinho são as manchas visíveis formadas nas proximidades dos locais de lançamentos, a depleção do oxigênio dissolvido, florações de algas, morte de peixes causada pela produção elevada de toxinas, enriquecimento de sedimentos com matéria orgânica, contaminação microbiológica da água, acúmulo de substâncias tóxicas no sedimento e no corpo de organismos aquáticos superiores (ABESSA, IMAI; HARARI, 2008; CETESB, 2006).

Bactérias, vírus e protozoários carregados ao mar em quantidades elevadas por esgotos sanitários são os principais responsáveis pela disseminação de doenças que acometem banhistas e frequentadores dessas áreas, constituindo um possível risco à saúde pública. De forma a assegurar condições adequadas à recreação de contato primário a resolução N° 274/2000 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) cita instrumentos para avaliar a qualidade das águas, em relação aos níveis estabelecidos para a balneabilidade.

Esta avaliação estabelece níveis máximos admissíveis para a classificação da área de banho como própria ou imprópria utilizando bactérias do grupo coliforme (coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*) e enterococos (*Enterococcus* sp.) como indicadores da presença de agentes patogênicos no corpo d'água (BRASIL, 2000), por outro lado a resolução do CONAMA N° 357 de 2005, estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e distribui as águas salinas em quatro classes em função de seus usos (BRASIL, 2005).

Já a Resolução N° 430 de 2011 trata especificamente das condições e padrões de lançamento de efluentes, exigindo que estes quando lançados por emissários submarinos devem apenas manter os mesmos padrões do corpo receptor, detalhados nas Resoluções 357 e 274 (BRASIL, 2011).

Os emissários submarinos são meios utilizados para lançar os esgotos gerados nas cidades costeiras a distâncias suficientemente longas da costa, considerando os fenômenos físicos, químicos e biológicos ocorrentes, os quais determinam a diluição e degradação do material contaminante (GONÇALVES; SOUZA, 1997). Com esse intuito, um emissário

submarino foi construído na cidade de Fortaleza em 1970, com o objetivo de evitar que descargas de esgotos domésticos não tratados contaminassem as praias da cidade (CASTRO; ARAUJO; SOUZA, 1997).

Contaminantes fecais têm chegado ao ambiente marinho por numerosas e variadas fontes, elevando assim os níveis de bactérias no meio, esse fato já tem sido relatado por diversos autores que mencionam além daquelas tradicionalmente bem conhecidas, as descargas pontuais de esgotos clandestinos nas praias, os emissários submarinos mal projetados ou operados, aporte fluvial, galerias pluviais, fontes difusas relacionadas às atividades humanas, fezes animais na areia das praias, além daquelas relacionadas com o escoamento superficial (ELMIR *et al.*, 2007; ARAUJO; MELO; DINIZ, 2011).

As bactérias do gênero *Enterococcus* são as que melhor representam a qualidade da água do mar devido às características que possuem permitindo que estes micro-organismos permaneçam maior tempo nesses ambientes, diferente dos coliformes termotolerantes (FUJIOKA, 2001). Devido à variedade de *habitats* em que ocorrem, os enterococos podem ser carregadas ao mar por diferentes vias (FRANZ *et al.*, 2001; GIRAFFA, 2002).

Por serem considerados patógenos oportunistas associados a uma grande variedade de infecções causadas ao homem (ZARRILLI *et al.*, 2005) têm sido muito estudadas. Além disso, possuem mecanismos de virulência que conferem resistência a muitas estirpes, podendo inclusive causar superinfecções em pacientes sob tratamento antimicrobiano (HUYCKE; SAHM; GILMORE, 1998; OLIVEIRA; PINHATA, 2008). Estas superinfecções ocorrem quando uma droga altera o equilíbrio bacteriano no organismo, permitindo o crescimento daqueles oportunistas, como os enterococos (LOWE; LAMBERT; SMITH, 1995; SIMJEE; GILL, 1997).

Aliado à resistência a antimicrobianos, outros fatores de virulência associados aos *Enterococcus* sp. são a produção de gelatinase, que tem capacidade de hidrolisar feromônios, colágeno, fibrinogênio e hemoglobina, de hemolisinas, que são toxinas hemolíticas e atingem eritrócitos e leucócitos, e síntese de substâncias de agregação capazes de auxiliar na aderência das células bacterianas e de formação de biofilmes (MAKINEN; MAKINEN, 1994; VERGIS *et al.*, 2002; MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000; EATON; GASSON, 2001).

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos identificar ao nível de espécie estirpes de *Enterococcus* spp. isoladas de amostras de água coletadas no entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – Ceará, bem como determinar o perfil de virulência das estirpes quanto à resistência a antimicrobianos e a produção de gelatinase, hemolisina, substância de agregação e proteínas de superfície enterocócicas (formação de biofilme).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Contaminação dos corpos d'água por esgotos

O meio ambiente tem passado por relevantes intervenções antrópicas, decorridas principalmente das necessidades crescentes de desenvolvimento e melhoria da qualidade de vida da população humana. Inevitavelmente, e em paralelo a esse desenvolvimento, seguem nas mesmas proporções, ou até em escalas maiores, os impactos sobre os ecossistemas, evidenciando a dificuldade que se tem em conciliar o bem-estar do homem com a preservação do ambiente (SILVA; MEIRELES, 2010).

Em todo o mundo, as regiões costeiras abrigam a maior parte da população. Também nessas regiões estão incluídas grandes metrópoles, polos industriais, portos e zonas turísticas (TOMMASI, 1987). As atividades humanas desenvolvidas nas regiões costeiras envolvem a produção de resíduos sólidos, efluentes e com destaque os esgotos domésticos (CETESB, 2006), que consideravelmente correspondem à forma mais comum e generalizada de poluição nas regiões costeiras (ABESSA *et al.*, 2012).

Por terem como destino final o mar, os esgotos domésticos não tratados têm sido considerados como fontes poluidoras desse ambiente. O relatório do Programa Global de Ação para Proteção do Ambiente Marinho de Atividades Baseadas em Terra (GPA) indicou que esse problema ocorre principalmente em países em desenvolvimento, onde apenas uma parcela do esgoto é coletada e as estações de tratamento existentes não são eficientes (UNEP/GPA, 2006). Gonçalves; Souza (1997) estudando a disposição oceânica de esgotos sanitários concluíram que no geral os esgotos domésticos apresentam uma composição típica, com altos teores de sólidos totais e nutrientes como carbono orgânico total, compostos nitrogenados, fósforo orgânico e inorgânico, sulfetos e cloretos e, com quantidades variáveis de contaminantes, como metais, pesticidas e outras substâncias potencialmente tóxicas.

Além disso, é grande a frequência de resíduos de diferentes naturezas que chega aos sistemas de coleta de esgotos domésticos, como efluentes hospitalares, águas pluviais, resíduos de estabelecimentos comerciais, postos de gasolina e também de indústrias de pequeno porte, finalizando em uma composição complexa e variável dependendo da sua origem (ABESSA *et al.*, 2012; RODGERS-GRAY *et al.*, 2000). Os esgotos podem apresentar também elevadas concentrações de micro-organismos, como vírus, fungos filamentosos e

leveduras, bactérias típicas do trato digestório de mamíferos, como *Escherichia coli* e enterococos, além de muitos outros patógenos (Quadro 1) (HAWKES, 1971.)

Quadro 1 – Patógenos potencialmente presentes em esgotos domésticos.

ORGANISMO	DOENÇA RELACIONADA
Vírus (<i>Poliomielites virus</i>)	Poliomielite, hepatite
Vírus (enterovírus, parvovírus, rotavírus)	Gastroenterite
Vírus (vírus da hepatite A)	Hepatite infecciosa
Bactéria (<i>Vibrio cholerae</i>)	Cólera
Bactéria (<i>Salmonella Typhi</i>)	Febre tifoide
Bactéria (<i>Salmonella Paratiphi</i>)	Febre paratifoide
Bactéria (<i>Salmonella spp.</i>)	Contaminação alimentar, diarreia.
Bactéria (<i>Shigella dysenteriae</i>)	Disenteria bacilar
Bactéria (<i>Bacillus anthracis</i>)	Antrax
Bactéria (<i>Brucella spp.</i>)	Brucelose, febre de malta.
Bactéria (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	Tuberculose
Bactéria (<i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i>)	Leptospirose
Bactéria (<i>Mycobacterium spp.</i>)	Dermatites, micoses
Trematódeo (<i>Schistosoma spp.</i>)	Esquistossomose
Platelminto (<i>Taenia spp.</i>)	Teníase, solitária
Nematódeo (<i>Ascaris spp.</i> e <i>Enterobios spp.</i>)	Ascariase (lombriga)
Protozoário (<i>Entamoeba histolytica</i>)	Amebíase, diarreia

Fonte – Hawkes, 1971.

Os problemas ocasionados pela descarga de esgotos não tratados no mar, ou ambientes estuarinos, incluem a contaminação microbiológica, o acréscimo de cargas elevadas de matéria orgânica e nutriente no meio, podendo levar à eutrofização, aumento da turbidez, florações de algas, inclusive nocivas, destruição de habitats, contaminação química, danos à biodiversidade, risco à saúde de banhistas, infecção pelo consumo de organismos marinhos contaminados e impactos negativos em atividades como pesca e turismo (ABESSA *et al.*, 2005; ABESSA *et al.*, 2008; ABESSA, IMAI; HARARI, 2008; CETESB, 2006).

Algumas regiões costeiras possuem sistemas de tratamento de águas residuais que realizam a descontaminação microbiológica antes da descarga final dos efluentes no meio aquático. Um dos sistemas mais eficientes de descontaminação microbiológica é o tratamento dos efluentes com luz Ultravioleta (UV), porém, a cloração ainda é o processo mais em uso atualmente, já que permite maiores taxas de redução de micro-organismos e também por possuir custo inferior ao dos processos com UV (LAZAROVA *et al.*, 1999; USEPA, 2000).

3.2. Emissários Submarinos

A disposição final dos esgotos domésticos, previamente tratados ou mesmo sem nenhum tratamento, através de emissários submarinos tem sido apontada como uma eficiente alternativa para o destino final de rejeitos urbanos. A principal vantagem desses sistemas em relação ao descarte de águas residuais na linha de costa se dá em virtude do elevado potencial de autodepuração das águas marinhas atuando de forma a realizar o tratamento dos efluentes sanitários, permitindo que ocorra uma redução nas concentrações dos poluentes a níveis satisfatórios (ABESSA *et al.*, 2012; FREITAS, 2010).

As águas oceânicas atuam no tratamento dos resíduos dos esgotos utilizando-se do seu grande poder de dispersão e diluição da matéria orgânica no mar. Esta capacidade reside na intensa energia disponível no ambiente marinho em função da ação das correntes de deriva, ocasionadas pelos ventos locais, na dispersão dos efluentes, disponibilidade suficiente de oxigênio dissolvido e por apresentar características hostis à sobrevivência de muitos micro-organismos, como a salinidade, proporcionando uma elevada taxa de mortalidade, favorecendo assim, a descontaminação do ambiente de forma natural (SALAS, 2000; YANG; CHANG; HUANG, 2000).

Os emissários submarinos fornecem uma tecnologia eficiente, segura e relativamente econômica em relação a outras formas de tratamento de esgotos para a disposição final dos efluentes sanitários. Quando projetados apropriadamente de acordo com as características do local de instalação, combinados com condicionamento prévio podem atingir os objetivos de qualidade de águas desejados e minimizar os impactos adversos ao ambiente e à saúde pública (FREITAS, 2010).

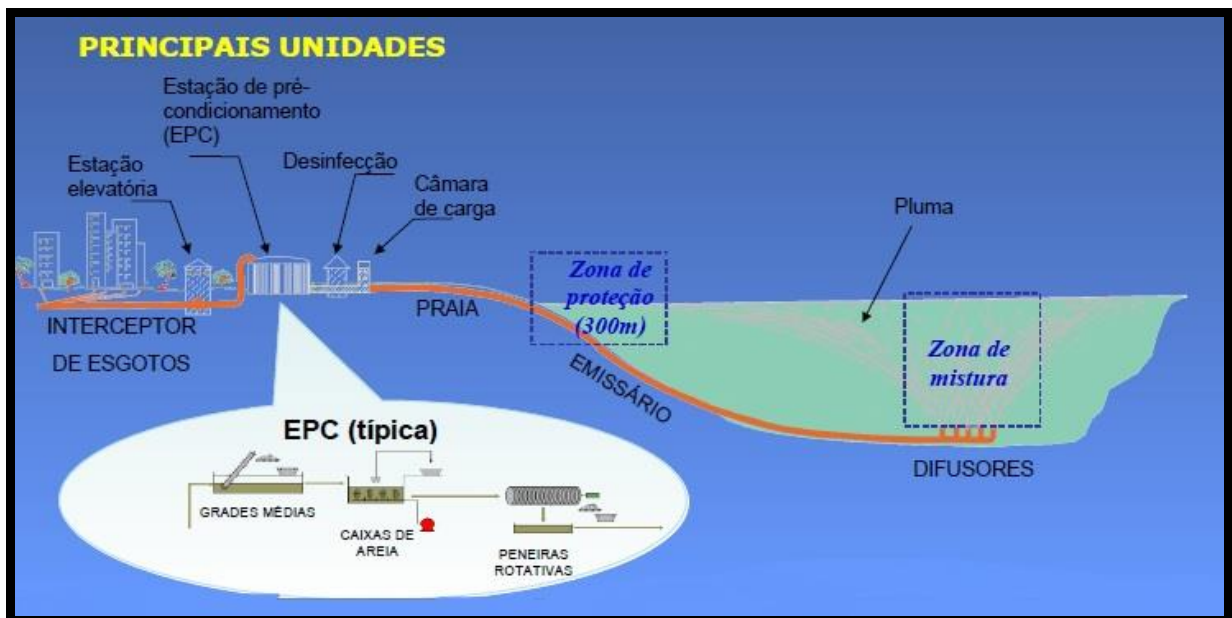
Devido às características supracitadas, os emissários oceânicos vêm-se mostrando como uma alternativa eficaz para a disposição final dos rejeitos domésticos, mas por outro lado também têm mostrado relevante contribuição de poluentes não degradáveis que, mesmo em baixas concentrações, acumulam-se no sedimentos de sua área de influência. Em determinados casos os processos naturais que se envolveriam no tratamento dos dejetos não são suficientemente rápidos e eficazes a ponto de se evitar que os micro-organismos atinjam as praias em concentrações acima do recomendado legalmente (SILVA; MEIRELES, 2010).

Alguns autores apontam a utilização dos emissários submarinos para a disposição oceânica de efluentes urbanos no Brasil como sendo o sistema mais viável e satisfatório, ecológica e economicamente, tendo sido adotado por diversas cidades litorâneas do país

(CETESB, 2006; RACHID, 2002; TOMMASI, 1987). Em uma de suas publicações sobre emissários, a CETESB (2006) evidenciou que tal opção está baseada principalmente em motivos econômicos de curto prazo e de engenharia enquanto que os fatores ambientais são de menor importância, principalmente quando relacionados à presença de contaminantes e nutrientes (ABESSA *et al.*, 2012; SALAS, 2000).

Os emissários oceânicos tem como função principal o transporte dos dejetos domésticos produzidos em uma zona urbana, e são constituídos basicamente por três unidades: Unidade de condicionamento prévio dos efluentes, Emissário e Tubulação difusora (Figura 1) (GONÇALVES; SOUZA, 1997).

Figura 1 – Unidades componentes de um sistema de disposição oceânica de esgotos.



Fonte – Gonçalves; Souza, 1997.

As Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) recebem os esgotos de uma área urbana e antes que sejam lançados ao mar, esse efluente passa pelas unidades de condicionamento prévio, onde serão removidos os sólidos grosseiros e materiais flutuantes. A legislação ambiental vigente de alguns lugares (DEP/Flórida) que possuem esse sistema de tratamento de efluentes sanitários exige a remoção da matéria orgânica antes da disposição oceânica, o que eleva bastante o custo final do sistema (GONÇALVES; SOUZA, 1997).

A segunda unidade básica de um sistema de disposição oceânica é o emissário, uma canalização que transporta os efluentes desde a ETE até o mar. É constituída de uma parte terrestre e outra oceânica ficando, esta última, assentada e ancorada no assoalho marinho. O comprimento ou a distância, do emissário, que os despejos serão lançados irão

variar com o nível de condicionamento prévio dado ao esgoto, com a profundidade de lançamento e com o regime de correntes marinhas da região. A tubulação difusora é a última unidade e fica na porção final do emissário, onde são dispostos vários bocais ou orifícios através dos quais o efluente será lançado no mar (GONÇALVES; SOUZA, 1997).

Um projeto de construção de um emissário oceânico deve incluir dentre os pontos a serem observados e estudados, para a preparação do projeto, a velocidade das correntes marinhas atuantes no local de instalação, concentração dos coliformes, diluição inicial, dispersão horizontal inicial, a mortalidade dos coliformes (T_{90}), redução total de coliformes e os materiais a serem empregados na construção (LUDWIG, 1988).

O estudo da velocidade das correntes marinhas e o monitoramento das mesmas tem grande importância para que se tenha conhecimento da intensidade e a frequência com que ocorrem aquelas desfavoráveis à instalação do emissário, possuidoras de componentes que apontam para a costa e tendem a arrastar a pluma poluente em direção à praia (LUDWIG, 1988). Em relação à concentração de coliformes, já existe no Brasil uma legislação ambiental específica para os efluentes lançados pelos emissários submarinos. A resolução do CONAMA N° 430/2001 determina que estes efluentes possuam as mesmas características do corpo receptor, sejam elas químicas, biológicas ou microbiológicas (BRASIL, 2011).

Enquanto que as Resoluções anteriores do CONAMA 274/2000 e 357/2005 classificam as águas superficiais do Território Nacional e estabelecem padrões de balneabilidade, fornecendo inclusive informações sobre os indicadores que devem ser observados durante a criação do projeto de um sistema de disposição (BRASIL, 2000; BRASIL, 2005).

A taxa de mortalidade dos coliformes é geralmente expressa pelo fator T_{90} , definido como o intervalo de tempo necessário para que ocorra a mortalidade de 90% da população de coliformes remanescente, após a diluição e dispersão. O valor de T_{90} para a água do mar da cidade de Fortaleza foi estimado em 1,3 horas (LUDWIG, 1988).

Outros fatores nas águas oceânicas também contribuem com a mortalidade das bactérias, tais como: a temperatura da água, a presença de substâncias tóxicas, adsorção, floculação, sedimentação, a ação da luz solar, a ação de protozoários e outros predadores que se alimentam das bactérias, além de fatores que, isoladamente ou em conjunto, promovem o decaimento na concentração dos coliformes (GRACE, 2009).

O projeto de um sistema de disposição de efluentes urbanos no oceano deve envolver diversos estudos a fim de se determinar o comprimento do emissário, a profundidade

de descarga dos despejos, o comprimento e orientação da tubulação difusora incluindo número, dimensões e espaçamento entre os orifícios difusores (LUDWIG, 1988).

A partir de 1992, o governo do Estado do Ceará, estabeleceu um programa de saneamento básico para o Município de Fortaleza, denominado Projeto SANEFOR, a ser desenvolvido no período 1992-2000. Os objetivos do projeto são principalmente a despoluição da orla marítima da cidade e de seus principais afluentes, visando alcançar com isso resultados positivos na melhoria da qualidade ambiental e da saúde da população (CASTRO; ARAUJO; SOUZA, 1997).

Tais projetos geram algumas intervenções, sendo seus efeitos acompanhados e controlados através de ações complementares, como o monitoramento e o controle da qualidade das águas das praias, rios, lagoas e açudes, da área de influência do Sistema de Disposição Oceânica de Esgotos (SDOES), dos efluentes industriais e das Plantas de Tratamento de Esgotos não ligadas à rede pública, cabendo a responsabilidade dessas ações à Superintendência Estadual do Meio Ambiente (SEMACE), órgão responsável pela política ambiental no Ceará (CASTRO; ARAUJO; SOUZA, 1997).

O Sistema de Disposição Oceânica de Esgotos de Fortaleza (SDOES) é responsável pelo tratamento e disposição dos esgotos de parte da cidade de Fortaleza, abrangendo as bacias hidrográficas da vertente marítima, tendo como destino final o oceano. O esgoto gerado é encaminhado à Estação de Pré-condicionamento (EPC), passando por um tratamento preliminar constituído por um gradeamento com limpeza manual (espaçamento entre barras de 15 cm), gradeamento mecanizado (espaçamento de 5 cm), peneiramento rotativo (espaçamento de 1,5 mm) e desarenação em caixas de areia (PEREIRA, 2012).

Após remoção de areia e resíduos sólidos na EPC, os efluentes são encaminhados para o emissário submarino de Fortaleza onde são liberados a uma profundidade de até 16 m e a 3.205 m de distância da costa por um conjunto de 120 difusores, localizados nos últimos 600 m com 10 cm de diâmetro cada. O emissário, construído em 1978, foi dimensionado para atender uma vazão de até 4,8 m³/s, porém, até o ano de 2011 era encaminhado em média 2,3 m³/s nas praias da Costa Leste (PEREIRA, 2012). Teoricamente, essas águas não deveriam refluir ou voltar às praias devido a Corrente Deriva - Litorânea que tem direção Leste – Oeste, carreando esses dejetos para o Oeste de Fortaleza.

O monitoramento e controle da área oceânica que está sob a influência do lançamento desses rejeitos vêm sendo executado pela SEMACE em parceria com o Instituto de Ciências Marinhas (LABOMAR), da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.3. Balneabilidade

O termo Balneabilidade é utilizado para designar a qualidade das águas destinadas à recreação de contato primário, sendo este compreendido como um contato direto e prolongado com a água (natação, mergulho, esqui-aquático, etc.), quando as chances de serem ingeridas quantidades apreciáveis de água são elevadas. Para que seja feita a avaliação da balneabilidade faz-se necessário o estabelecimento de critérios objetivos que devem se basear em indicadores a serem monitorados e seus valores confrontados com padrões já pré-estabelecidos, podendo assim ser feita uma averiguação sobre as condições de balneabilidade de um determinado local como favoráveis ou não (CETESB, 2006).

Alguns fatores podem ser apontados como influenciadores da balneabilidade, um dos parâmetros indicadores básicos para a classificação das praias quanto a sua balneabilidade em termos sanitários é a densidade de coliformes termotolerantes presentes no local analisado. Diversos são os meios que carregam esgotos para as praias, como por exemplo, a existência de sistemas de coleta e disposição dos despejos domésticos gerados nas proximidades, a existência de córregos e de galerias pluviais afluindo ao mar, o aumento da população em regiões costeiras durante o verão elevando a carga orgânica descarregada nas massas de água (PIANETTI *et al.*, 2004; SATO *et al.*, 2005).

Corpos d'água que tem como destino final as águas das praias, quando contaminados por esgotos domésticos, podem carrear grandes quantidades de bactérias, vírus, protozoários, entre outros patógenos, podendo causar danos à saúde dos banhistas, principalmente crianças, idosos e pessoas cuja imunidade esteja reduzida (WHO, 2003).

A World Health Organization deixa bem documentado o risco oferecido à saúde pública relacionado com a exposição de banhistas a águas balneares contaminadas com águas residuais não tratadas (PRÜSS, 1998; WHO, 2001). Tem se tornado cada vez mais evidente a relação existente entre os elevados níveis de indicadores bacteriológicos nestas águas com a incidência de doenças naqueles que as frequentam (TURBOW; OSGOOD; JIANG, 2003).

Águas contaminadas podem transmitir aos banhistas, doenças, geralmente não muito graves, como gastroenterites, doenças respiratórias, infecções nos olhos, ouvidos e pele, sendo a primeira a mais relacionada com o contato com água contaminada, já em locais de grande contaminação podem ser contraídas doenças mais graves como disenteria, hepatite A, cólera e febre tifoide (PRIETO *et al.*, 2001; WYER *et al.*, 1999).

Órgãos como a World Health Organization (WHO) (WHO, 2001), a United States Environmental Protection Agency (USEPA) (USEPA, 1986; USEPA, 2000) e o Conselho da Comunidade Europeia (CCE) (CCE, 2006), determinaram valores para servirem como guia da abundância de micro-organismos indicadores de contaminação fecal em águas utilizadas para a prática balnear. A USEPA, órgão responsável pela proteção do meio ambiente nos Estados Unidos, com base em inúmeros estudos, sobretudo epidemiológicos, reconhecendo as limitações dos coliformes como padrão de qualidade de águas marinhas recreacionais, iniciou em 1972 um projeto que teve a duração de 10 anos para testar vários outros indicadores, tais como *Escherichia coli*, enterococos e *Clostridium perfringens*.

Tais estudos abrangeram as águas de nove praias dos Estados Unidos, entrevistas com pessoas que nadaram nessas águas e com pessoas que não frequentaram esses locais. Os resultados mostraram que de todos os micro-organismos estudados, somente as concentrações dos enterococos mantiveram relação com as incidências de diarreias entre os banhistas. Com base no curto período de incubação e os sintomas apresentados por esses nadadores doentes, os cientistas da USEPA, que conduziam o estudo, concluíram que a maioria das diarreias eram atribuídas a infecções virais. No entanto, preocupados com o índice de enterococos nas águas, inicialmente, recomendaram que para um risco aceitável de seis doentes com diarreia para cada 1.000 nadadores, era necessário que a água apresentasse uma média de três enterococos por 100 mL. Finalmente, depois de certo tempo, concluíram que poderiam ampliar esse número e optaram por 35 enterococos / 100 mL, o que correspondia ao risco de 19 casos de diarreia para cada 1000 nadadores (FUJIOKA, 1997).

Países como os Estados Unidos (NEUMANN; HARDING; SHERMAN, 2006; USEPA, 2000), México (OROZCO-BORBÓN *et al.*, 2006), China (ZHOU *et al.*, 2007) e Comunidade Europeia (CCE, 2006), programaram planos de monitorização da qualidade das suas águas balneares, de forma que pudessem detectar eventuais problemas de contaminação e tomar medidas com o propósito de minimizar ou evitar problemas de saúde pública, baseados principalmente na verificação dos valores numéricos de análises periódicas da qualidade microbiológica das águas balneares, com a qual nem sempre é possível antever ou agir antecipadamente, de forma a evitar o contato dos banhistas com águas contaminadas (LEECASTER; WEISBERG, 2001).

Os enterococos, por viverem mais tempo na água do mar do que os coliformes são considerados pela USEPA-EUA indicadores mais precisos de doenças transmitidas pelo contato com a água (FUJIOKA, 2001). Essas bactérias são muito estudadas em função do

caráter de resistência que muitas das estirpes desenvolvem, tornando-as muito perigosas para saúde pública.

O Brasil através da Resolução N° 274 do CONAMA assegurou valores de micro-organismos em águas doces, salobras e salinas destinadas a balneabilidade (recreação de contato primário) para que assim pudessem ser classificadas como próprias ou impróprias. As águas consideradas como próprias ainda foram divididas em três categorias, sendo elas: excelente, muito boa e satisfatória (Quadro 2) (BRASIL, 2000).

Quadro 2 – Padrões de balneabilidade com os limites de coliformes termotolerantes, *E. coli* e enterococos por 100 mL de água, para cada categoria.

CATEGORIAS		Coliformes TT (/100 mL)	<i>Escherichia coli</i> (/100 mL)	Enterococos (/100 mL)
PRÓPRIA	Excelente	< 250 em 80% do tempo	< 200 em 80% do tempo	< 25 em 80% do tempo
	Boa	250 a 500 em 80% do tempo	200 a 400 em 80% do tempo	25 a 50 em 80% do tempo
	Satisfatória	500 a 1000 em 80% do tempo	400 a 800 em 80% do tempo	50 a 100 em 80% do tempo
IMPRÓPRIA	Imprópria	> 1000 em mais de 20% do tempo	> 800 em mais de 20% do tempo	> 100 em mais de 20% do tempo
		> 2.500 na última medição	> 2.000 na última medição	> 400 na última medição

Fonte – Resolução CONAMA N° 274/2000 (BRASIL, 2000).

A resolução do CONAMA N° 357 de 2005, classifica os corpos d'água e estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes e distribui as águas salinas em quatro categorias em função dos seus usos. A mais restritiva é a Classe Especial que destina-se à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral e à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas.

Além da Classe Especial foram criadas mais três classes, denominadas Classe I, II e III. A Classe I foi destinada à recreação de contato primário, à proteção das comunidades aquáticas, à aquicultura e à pesca, enquanto que a Classe II foi destinada à pesca amadora e à recreação de contato secundário, e a menos restritiva a Classe III destinada apenas à navegação e à harmonia paisagística (BRASIL, 2005).

Recreação de contato secundário é aquela associada a atividades em que o contato com a água é esporádico ou acidental e a possibilidade de ingerir quantidades de água é pequena, como na pesca e na navegação. Os padrões de qualidade bacteriológica adotados pela resolução CONAMA N° 357/2005 para as águas de classe I, II e III estão dispostos no quadro 3.

Quadro 3 – Padrões de qualidade bacteriológica com limites de coliformes termotolerantes para cada 100 mL de água para cada classe de águas salinas.

Classes	Coliformes Termotolerantes (/100 mL)
Classe Especial	Deverão ser mantidas as condições naturais do corpo d'água
I	≤ 1.000 em 80% das amostras
II	≤ 2.500 em 80% das amostras
III	≤ 4.000 em 80% das amostras

Fonte – Brasil (2005).

A Resolução N° 430/2011 altera e complementa a anterior N° 357/2005, tratando especificamente das condições e padrões de lançamento de efluentes, sendo alterados os padrões de lançamento de determinadas substâncias químicas e não havendo a inclusão de limites para contaminantes fecais. No que trata do lançamento de efluentes por emissários submarinos, em artigo específico, exige apenas que os padrões do corpo receptor, detalhados nas resoluções N° 254/2000 e N° 357/2005, sejam mantidos (BRASIL, 2011).

3.4. *Enterococcus spp.*

As bactérias do gênero *Enterococcus* pertenciam inicialmente ao gênero *Streptococcus*, mais precisamente aos estreptococos do grupo D de Lancefield, também conhecido como grupo dos “estreptococos fecais”. Entretanto, através de técnicas modernas de sequenciação de rDNA 16S foi possível obter evidências filogenéticas e juntamente com estudos sorológicos, levaram à divisão dos estreptococos do grupo D em três gêneros distintos: *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Enterococcus* (DEVRIESE; POT; COLLINS, 1993; SCHLEIFER; KILPPER-BÄLZ, 1984).

Os estreptococos fecais que se encontravam associados à flora gastrointestinal de mamíferos, de outros animais homeotérmicos, aves, répteis, insetos, a diversos produtos alimentícios, como queijos e defumados, e também a uma grande variedade de outros habitats, tais como plantas, solos e águas tornaram-se parte integrante do gênero *Enterococcus* (AERESTRUP; BUTAYE; WITTE, 2002; FRANZ *et al.*, 2001; GIRAFFA, 2002).

Desde 1984 que o número de espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* tem aumentado e hoje existem 48 espécies taxonomicamente validadas (EUZÉBY, 2013). Além de serem micro-organismos comensais e residirem além do trato gastrintestinal, na vagina e na cavidade bucal, são patógenos oportunistas estando associados a uma grande variedade de infecções no homem (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000; ZARRILLI *et al.*, 2005).

As bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* são cocos Gram-positivos, encontrando-se isolados, aos pares ou mesmo em cadeias curta, não esporulados, catalase-negativas, anaeróbias facultativas e a maioria das espécies produzem uma enzima Pirrolidonilarilamidase (PYR), sendo esta característica posta em discussão em vista que algumas espécies não apresentam positividade para a síntese desta enzima (HARDIE; WHILEY, 1997; FORTIN *et al.*, 2003).

São bactérias quimiorganotróficas, produtoras de ácido láctico a partir de hexoses por fermentação ácido-láctica homofermentativa (pertencem ao grupo das bactérias lácticas ou LAB – Lactic Acid Bacteria). Os enterococos distinguem-se de outras bactérias gram-positivas, catalase-negativas e cocos homofermentativos devido à sua capacidade de crescerem a temperaturas entre os 10 e 45°C, com ótimo de crescimento a 35° C, de crescerem em concentrações salinas de até 6,5% NaCl, de hidrolisar esculina na presença de 40% de sais biliares e de tolerarem valores de pH entre 4,6 e 9,6 (TEIXEIRA; FACKLAM, 2004).

As infecções causadas por enterococos incluem além de infecções urinárias, infecções de queimaduras e feridas cirúrgicas, bacteremia, endocardite, infecções intra-abdominais e pélvicas (estas infecções são habitualmente mistas, causadas por enterococos e outros agentes patogênicos), infecções de feridas e dos tecidos moles, sépsis neonatal, geralmente ocorrem em doentes internados, com maior frequência em casos após cirurgias ou instrumentações (por exemplo, algaliação) (AMBIENTE BRASIL, 2009).

Estes micro-organismos têm a capacidade de adquirir genes de resistência presentes em plasmídeos e por conjugação transferi-los intra e interespecificamente para outras bactérias (HUYCKE; SAHM; GILMORE, 1998; KÜHN *et al.*, 2005). Vários estudos têm sido realizados em corpos de água doce, estuários, água e sistemas de distribuição de esgotos para se determinar a distribuição de bactérias resistentes aos antimicrobianos (MUDRYK, 2005; MEIRELLES-PEREIRA *et al.*, 2002), mesmo assim existem poucos estudos relacionados à presença de bactérias resistentes em águas marinhas, menos ainda em águas e areias de praia (ARVANITIDOU; KATSOUYANNOPOULOS; TSAKRIS, 2001; JUNCO *et al.*, 2001) e efluentes de emissários.

Um dos gêneros mais importantes em relação à resistência antimicrobiana é o gênero *Enterococcus*, pois podem causar superinfecções em doentes internados sob terapêutica antibiótica, o que mostra a resistência intrínseca a muitos antimicrobianos (HUYCKE; SAHM; GILMORE, 1998). As superinfecções podem ocorrer quando os antibióticos alteram o equilíbrio bacteriano no organismo, permitindo o crescimento dos

agentes oportunistas, como os enterococos. Podem ser de difícil tratamento por ser necessário optar por fármacos eficazes contra todos os agentes que podem causá-la. Dados epidemiológicos também indicaram que dentre os enterococos isolados de enfermidades humanas o *E. faecalis* foi a espécie mais comum enquanto *E. faecium* esteve associado à maioria das infecções enterocócicas restantes (TAILOR; BAILEY; RYBAK, 1993; LOWE; LAMBERT; SMITH, 1995; SIMJEE; GILL, 1997; OLIVEIRA; PINHATA, 2008).

3.5. Resistência aos antimicrobianos

A preocupação em conter bactérias multirresistentes a fármacos antimicrobianos já atingiu níveis mundiais. A WHO e a Organização Pan-americana da Saúde (OPAS), além de outras organizações públicas ao redor do mundo já se encontram na busca, através de redes de monitoramento, de verificar o aumento da resistência a estes fármacos de diversos micro-organismos. No Brasil, em 2006, entrou em funcionamento a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (RM), vinculado à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) objetivando efetivar a assistência à saúde focando no uso racional dos antimicrobianos, detectar, prevenir e controlar a disseminação da resistência antimicrobiana nos serviços de saúde no país (LOPES *et al.*, 2006).

As bactérias do gênero *Enterococos* não são particularmente virulentas quando comparadas com outros micro-organismos que compõem a microbiota do trato intestinal (GOLDMANN, 1992; GORDTS *et al.*, 1995). Essas bactérias toleram altas temperaturas, desinfetantes e antimicrobianos, o que as tornam difíceis de serem erradicadas do ambiente hospitalar (CHENOWETH; SCHABERG, 1990).

Geralmente os enterococos possuem multirresistência intrínseca a vários antimicrobianos, podendo também ser adquirida através de genes de resistências em plasmídeos ou transposons de outros micro-organismos ou ainda por mutações cromossômicas espontâneas (FURTADO *et al.*, 2005) e muitos dos casos de infecções com estas estirpes tem diminuído as opções terapêuticas, levando ao surgimento de infecções graves (CHIEW; HALL, 1998; KAK; CHOW, 2002).

Possuem genes de resistência aos antimicrobianos do grupo dos macrolídeos, das lincosaminas, das estreptograminas (MLS), dos aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina), dos β -lactâmicos (penicilina e ampicilina), das tetraciclina e também dos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina). É uma das mais importantes e preocupantes

resistências apresentadas pelos enterococos para a comunidade médica é à vancomicina, do grupo dos glicopeptídeos, já que este antimicrobiano é um dos últimos recursos a ser utilizado contra infecções severas causadas por cocos Gram-positivos (FLUIT *et al.*, 2000; HENRIQUE, 2007; REMONATTO *et al.*, 2005).

Os enterococos apresentam ampla distribuição, ocorrendo nos mais variados tipos de *habitats*, permitindo que estes micro-organismos atuem como vetores para a propagação de itens de resistência antimicrobiana podendo transferi-los para os humanos, além de outros meios, através da cadeia alimentar, já que estudos anteriores mostraram que bactérias ácido lácticas têm a capacidade de transferir genes de resistência de patógenos entéricos e também de contaminantes alimentares (GEVERS; HUYS; SWINGS, 2003).

3.5.1. Resistência à β -lactâmicos

Os antimicrobianos pertencentes a este grupo têm a capacidade de inibem a síntese da parede celular, impedindo assim que as ligações cruzadas entre as fitas de glicopeptídeos se formem. Já foram descritos dois mecanismos de resistência à β -lactâmicos para a espécie *Enterococcus faecalis*, um deles é a produção da enzima β -lactamase que tem a capacidade de hidrolisar os antimicrobianos desse grupo e o outro é a baixa afinidade das proteínas de ligação à penicilina (PBP), presentes nos enterococos (HÖRNER *et al.*, 2005; LIGOZZI; PITTALUGA; FONTANA, 1996; ONO; MURATANI; MATSUMOTO, 2005).

As β -lactamases são enzimas sintetizadas na membrana celular, podendo também serem segregadas extracelularmente e encontradas nos cromossomos e plasmídeos, sendo assim transferíveis de uma célula para outra. A resistência a estes fármacos pode ser explicada pela união dos anéis β -lactâmicos do antimicrobiano a receptores situados na superfície interior da parede celular, as PBP, impedindo a reação de transpeptidação necessária à união das cadeias de peptídeoglicano e a síntese da parede celular (KONEMANN *et al.*, 2001). A resistência natural intrínseca dos enterococos aos β -lactâmicos difere dentre as drogas deste grupo, sendo as penicilinas mais eficientes frente a essas bactérias, seguidas pelos carbapenems e cefalosporinas menor atividade (KAK; CHOW, 2002; VALDES *et al.*, 1998).

3.5.2. Resistência à aminoglicosídeos

Os fármacos deste grupo em sua grande maioria são utilizados para combater infecções causadas por bactérias Gram-negativas, porém exercem efeito sinérgico com inibidores da síntese da parede celular em bactérias Gram-positivas agindo assim de forma bactericida. Dentro deste grupo estão inclusos os antimicrobianos amicacina, canamicina, dibenkacina, estreptomicina, gentamicina, neomicina e tobramicina (HERNÁNDEZ, 1998).

O mecanismo de ação dos aminoglicosídeos age após penetrar na célula bacteriana, exercendo atividade bactericida ao ligar-se ao ribossomo bacteriano, à subunidade 30S, e inibindo a síntese proteica ou produzindo proteínas defeituosas, o que leva a leitura incorreta do RNA mensageiro causando alterações no funcionamento da membrana celular com a saída de constituintes essenciais ao seu funcionamento, ocorrendo a morte celular (GONZALEZ III; SPENCER, 1998).

Todas as espécies de *Enterococcus* apresentam resistência intrínseca a moderadas concentrações de aminoglicosídeos, decorrente da reduzida penetração do antimicrobiano pela parede celular. A resistência adquirida a altas concentrações destas drogas pode ter duas explicações, uma delas é que pode ser decorrente de mutações, as quais ocasionam a diminuição da ligação do agente antimicrobiano ao ribossomo, como a que ocorre com a estreptomicina, chamada resistência ribossômica, enquanto que a outra explicação, mais frequente, é devido à aquisição de novos genes que codificam enzimas capazes de modificar os aminoglicosídeos, assim, resistência adquirida (TEIXEIRA; FACKLAM, 2004).

A terapêutica onde se tem utilizado os antimicrobianos contra as infecções causadas por enterococos tem sido bem complicada, os aminoglicosídeos não são efetivos contra *Enterococcus* quando ministrados individualmente, porém quando associados a um β -lactâmico ou a um glicopeptídeo, onde irão agir de forma sinérgica favorecendo o aumento da concentração intracelular deste agente levando a morte da bactéria (HÖRNER *et al.*, 2005).

3.5.3. Resistência à glicopeptídeos

Os glicopeptídeos exercem seu efeito bactericida por inibirem a síntese de glicopeptídeos (peptídeoglicano) da parede celular bacteriana em local diferente dos β -lactâmicos, juntamente com isso também podem prejudicar a síntese protética bacteriana e alterar o protoplasma da bactéria (PIÑERA *et al.*, 1998).

Pertencem a esse grupo a vancomicina e a teicoplanina, tendo sido relatado inicialmente estirpes resistentes à vancomicina nos Estados Unidos como patógenos nosocomiais. Na grande maioria essas estirpes são também resistentes a outros fármacos, incluindo a ampicilina, a estreptomicina e a gentamicina, sendo estes dois últimos de preocupação especial já que a combinação de um aminoglicosídeo a um inibidor de síntese de parede celular, até o presente, constitui o único esquema bactericida de confiança para o tratamento de endocardite causada por *Enterococcus* (LAZO; BRUNTON; PARKER, 2006).

Foram descritos cinco genes de resistência em *Enterococcus* para vancomicina conhecidos por terem sido adquiridos. Enquanto que um gene é uma característica intrínseca de espécies móveis, como *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus flavescens*. Os três mecanismos de resistência são mediados por plasmídeos, transposons e cromossômico. Nesses mecanismos, de modo simplificado, ao ser percebida a presença do glicopeptídeo, tais genes atuam de forma a modificar a produção do peptídeoglicano para o fenótipo de resistência e eliminam os precursores de peptídeoglicano normais, fazendo a célula sintetizar quase que exclusivamente precursores do fenótipo resistente (KAK; CHOW, 2002; KHAN *et al.*, 2005; TEIXEIRA; FACKLAM, 2004).

3.5.4. Resistência à tetraciclina

A tetraciclina é um antimicrobiano de ação bacteriostática, agindo contra uma gama de micro-organismos como bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, riquétsias, micoplasmas, clamídias, espiroquetas, borrelíias, actinomicetos, legionelas e algumas micobactérias (LAZO; BRUNTON; PARKER, 2006), entram na célula por difusão, inibindo a síntese proteica nos micro-organismos ao ligarem-se aos ribossomos, impedindo assim que o RNA-transportador (RNAt) se fixe a estes (SPEER; SHOEMAKER; SALYERS, 1992).

A tetraciclina tem sido amplamente empregada na agricultura e na piscicultura como promotora de crescimento, devido a isso a resistência a esse fármaco é a mais prevalente entre as espécies de *Enterococcus* (CHOPRA; ROBERTS, 2001). Os mecanismos de resistência a este fármaco culminam de três estratégias, ocorrendo à limitação do acesso do antimicrobiano ao seu alvo pelo efluxo deste através da membrana celular, alterações nos ribossomos que irão dificultar a ligação efetiva da droga ao seu alvo e a produção de enzimas que inativarão a tetraciclina (ROBERTS, 2005; ROSS *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2004).

3.5.5. Resistencia a cloranfenicóis

Este antimicrobiano possui amplo espectro de ação antimicrobiana, atuando contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, podendo atuar também nas células mitocondriais de mamíferos dificultando assim sua utilização devido a sua elevada toxicidade (KAK; CHOW, 2002; SOUSA, 2006).

Este antimicrobiano, de atividade bacteriostática, atravessa a membrana celular por solubilização e difusão até atingirem o citoplasma bacteriano, sem intervenção de transportadores, onde irão atuar inibindo a síntese proteica, na subunidade 50S ribossomal (LAZO; BRUNTON; PARKER, 2006). Os mecanismos de resistência apresentados pelos *Enterococcus* contra esse fármaco podem ser por impermeabilização dos invólucros bacterianos, por alterações ribossômicas, por bombas de efluxo e o mais frequente é a inativação enzimática (CASSENEGO, 2010; GAMA, 2008; SOUSA, 2006).

3.5.6. Resistência a macrolídeos

O termo macrolídeo origina-se das palavras macro (grande) e olideo (lactona). Todos os macrolídeos possuem anel de lactona, têm efeito bacteriostático e mecanismos de ação semelhantes, inibindo a síntese proteica bacteriana através de sua ligação reversível com a subunidade ribossomal 50S e também a sintetização de proteínas vitais, causando assim a morte celular (PECHÉRE, 2001; RETSEMA; FU, 2001). No grupo dos macrolídeos estão a azitromicina, a clindamicina e a eritromicina.

Apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas e positivas, e anaeróbias como, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* e *Legionella* sp., além de poderem tratar infecções causadas por patógenos intracelulares (RETSEMA; FU, 2001). Um dos principais mecanismos de resistência a macrolídeos apresentada por estirpes de *Enterococcus* é a modificação do ribossomo, resultando em uma dificuldade na ligação do antimicrobiano a este. Esse mecanismo de resistência é usualmente mediado pelo gene *erm(B)* que codifica uma proteína de efluxo que irá expulsar o antimicrobiano da célula (LECLERCQ; COURVALIN, 2002; XIONG; KORKHIN; MANKIN, 2005).

3.6. Fatores de Virulência

A ocorrência das infecções causadas pelos enterococos, a gravidade que vêm apresentando e a crescente dificuldade em se tratar tais infecções devido à resistência múltipla aos antimicrobianos fez com que esses micro-organismos fossem colocados entre os mais importantes patógenos oportunistas em humanos (GORDTS *et al.*, 1995).

Os *Enterococcus* não portam potentes fatores de virulência como os encontrados em outras bactérias Gram-positivas patogênicas, mas são dotados de características diferenciais de grande importância que contribuem para que seus fatores de virulência os tornem efetivos patógenos oportunistas (GIRAFFA, 2002).

Fatores de virulência são aquelas características que tornam algumas estirpes bacterianas potencialmente patogênicas. São quaisquer componentes do micro-organismo que possuam capacidade de provocar doença ou potencialize tal capacidade, causando algum dano ao hospedeiro (SCHAECHTER *et al.*, 1999). Uma vez presentes no micro-organismo esses fatores de virulência podem vir a favorecer a adesão das bactérias às superfícies epiteliais do hospedeiro, à evasão à resposta imunitária, à secreção de produtos tóxicos, à invasão e formação de abscesso, e também propagar-se em locais extra intestinais, o que faz com que determinadas estirpes de *Enterococcus* sp. se mostrem com maior capacidade de causar doenças (EATON; GASSON, 2001; MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000).

Existem algumas características presentes nas bactérias do gênero *Enterococcus* que determinam o potencial virulento e o nível de patogenicidade de algumas linhagens. Dentre os diversos fatores de virulência presentes nesse gênero bacteriano os mais estudados são os relacionados com *E. faecalis*, sendo um dos mais conhecidos, a resistência intrínseca a antimicrobianos, usualmente empregados no tratamento de doenças, e a grande habilidade de adquirir genes que conferem resistência a determinadas classes de antimicrobianos (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000).

Outros fatores conhecidos, adquiridos por trocas genéticas, também contribuem com a patogenicidade dos *Enterococcus* e muitos estudos têm mostrado que diversos fatores de virulência têm sido expressados pela espécie *E. faecalis*, como a gelatinase (*GelE*), lisinas (hemolisina / bacteriocina) (*CylLL*), substâncias de agregação (*Agg*), produção de feromônio (*Eep*) e proteínas de superfície de *Enterococcus* como *Ace* e *Esp* (SHANKAR *et al.*, 1999; NALLAPAREDDY *et al.*, 2005; FURUMURA *et al.*, 2001; POETA *et al.*, 2008).

3.6.1. Gelatinase

Gelatinase é uma metaloproteinase extracelular, contendo zinco, de *E. faecalis*, purificada e descrita pela primeira vez por Bleiweis; Zimmerman (1964). A gelatinase é um potencial fator de virulência, codificada pelo gene *GelE*, que tem capacidade de hidrolisar os compostos de gelatina, feromônios, colágeno, caseína, fibrinogênio, hemoglobina e outros peptídeos (MAKINEN; MAKINEN, 1994; VERGIS *et al.*, 2002).

Foi comprovada pela primeira vez em 1975 a contribuição potencial dessa protease na virulência de estirpes proteolíticas de *E. faecalis* induzindo a formação de cáries contrariamente às não proteolíticas (GOLD; JORDAN; HOUTE, 1975). Jones; Deshpande (2003) demonstraram que aumenta a endocardite em modelos animais.

3.6.2. Citolisina/Hemolisina

A citolisina, anteriormente chamada de hemolisina, é uma toxina hemolítica, descrita recentemente em enterococos, e tem aparecido constantemente em *E. faecalis* quando isolados de surtos (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000). É geralmente codificada por um plasmídeo podendo também ser codificado cromossomicamente (IKE; CLEWEE, 1992).

As células alvo da citolisina são os eritrócitos de cavalos, coelhos e humanos, leucócitos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos (BASINGER; JACKSON, 1968; MIYAZAKI *et al.*, 1993), agindo também contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas, (JETT; GILMORE, 1990). Esta toxina provoca uma reação β -hemolítica no ágar sangue humano e cavalo, mas não hemolisa ágar sangue de ovelhas, frequentemente utilizado em laboratórios de microbiologia (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000).

3.6.3. Substância de agregação

É uma proteína de superfície, feromônio-induzível codificada pelo gene *Agg* presente nos *E. faecalis* (JETT; HUYCKE; GILMORE, 1994). Essa proteína promove a formação de agregado durante a conjugação bacteriana tendo a capacidade de favorecer o contato enterocócico eficiente entre a célula doadora e receptora facilitando a transferência de plasmídeos (KREFT *et al.*, 1992), além disso, é um componente essencial do sistema de trocas genético que responde a ferormônios (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000).

A substância de agregação tem sido associada à endocardite causada por *Enterococcus*, à destruição do tecido pulmonar e cardíaco, podem contribuir com a patogenicidade das infecções enterocócicas através de um grande número de mecanismos, além de conferir adesão às células do tubo renal e aumentar a internalização de *E. faecalis* em células intestinais humanas. A maioria das estirpes que contêm os genes da citolisina possui também o gene do fator de agregação, estando associados à plasmídeos que respondem à ferormônios podendo atuar conjuntamente (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000).

3.6.4. Proteína de Superfície Enterocócica - Produção de biofilme

A formação de biofilme por micro-organismos é um exemplo da complexa organização e desenvolvimento microbiano, servindo como um excelente modelo para o estudo do comportamento destes indivíduos (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). Quando em seus *habitats* naturais as bactérias geralmente alternam entre suas formas planctônicas e sésseis, ocorrendo a transição para esta, por exemplo, quando os nutrientes se tornam escassos, levando ao aglomerado de células iniciando a formação do biofilme, podendo serem constituídos por populações de múltiplas espécies (LYNCH; ROBERTSON, 2008; MONDS; O'TOOLE, 2009).

A formação desses complexos bacterianos pode ser relacionada a muitas doenças como a endocardite, as osteomielites, as cáries dentais e também as infecções auriculares, sendo capazes de tolerarem altas concentrações de agentes antimicrobianos tornando-os, assim, extremamente difíceis de serem erradicados (WILLEMS *et al.*, 2001).

Uma variedade de bactérias já foi descrita quanto à capacidade de produzir biofilme, tendo como exemplo: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, algumas espécies do gênero *Staphylococcus* e a levedura *Candida* sp. (APARNA; YADAV, 2008; LYNCH; ROBERTSON, 2008).

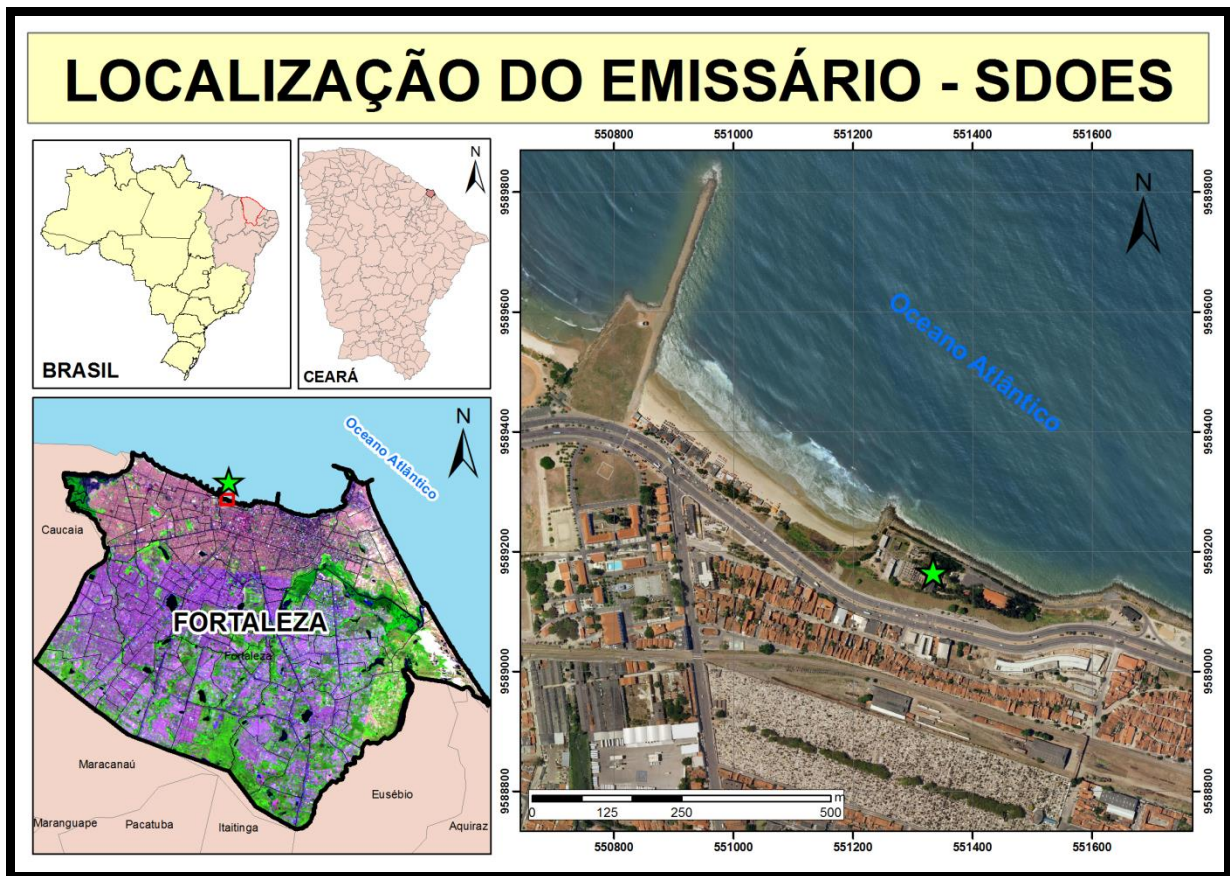
Alguns autores afirmam que a capacidade de formação de biofilme nos *Enterococcus* decorre de um fator de virulência, presente em algumas estirpes, a proteína de superfície da parede celular, que, dependendo da estrutura, tem a capacidade de fazer com que os *Enterococcus* não sejam detectados pelo sistema imunológico do hospedeiro, permanecendo nos sítios de infecção (ARCIOLA; BALDASSARRI; MONTANARO, 2001; HANCOCK; GILMORE, 2000; SHANKAR *et al.*, 1999).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem das estirpes bacterianas

O emissário submarino em estudo está localizado na cidade de Fortaleza – Ceará podendo ser melhor visualizado na figura 2.

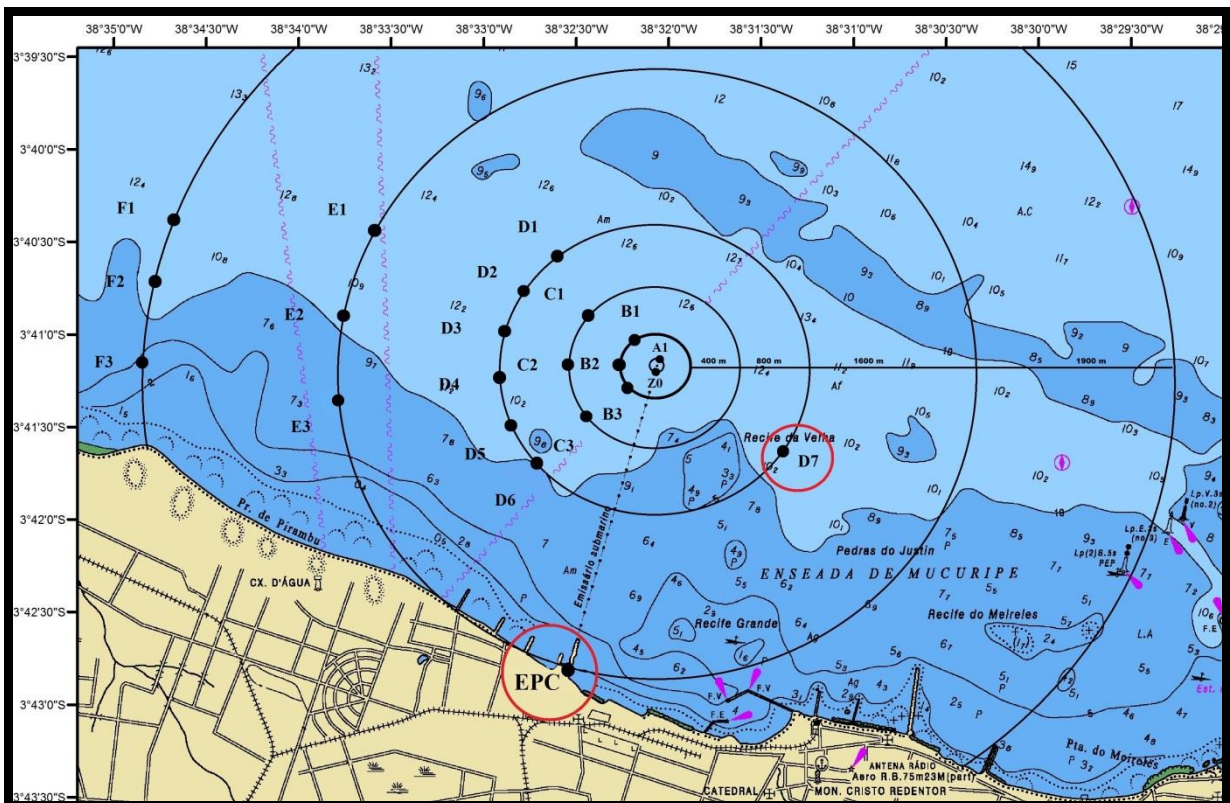
Figura 2 – Localização geográfica do emissário submarino de Fortaleza – Ceará.



Estabeleceu-se para a área de influência do Sistema de Disposição Oceânica dos Esgotos (SDOES) uma metodologia a fim de se realizar o monitoramento do emissário submarino, sendo determinadas 22 estações de coleta distribuídas em cinco perfis circulares, perpendiculares à costa, com raios variando entre 100 e 5.000 metros.

O primeiro ponto de coleta foi na Estação de pré-condicionamento do emissário, ainda em solo, denominado de EPC. Outras cinco estações (Z0, A1, B1, B2 e B3) foram demarcadas nas proximidades dos difusores (campo próximo), 15 estações (C1, C2, C3, D1, D2, D3, D4, D5, D6, E1, E2, E3, F1, F2 e F3) demarcadas após essa área e uma estação à montante dos difusores, D7, sendo utilizada como estação controle (Figura 3).

Figura 3 – Mapa de localização do emissário submarino de Fortaleza – CE indicando as 22 estações de coleta do entorno da pluma.



Fonte – DHN, Marinha do Brasil (adaptado pelo Autor).

Das amostras de água coletadas nas estações durante o segundo semestre de 2009 foram isoladas oitenta (80) estirpes, identificadas para o gênero *Enterococcus*. As estirpes foram obtidas da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LMAP), do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), na Universidade Federal do Ceará (UFC). Todas as cepas foram purificadas e posteriormente identificadas ao nível de espécie. Durante a realização do estudo foi utilizada a padrão *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

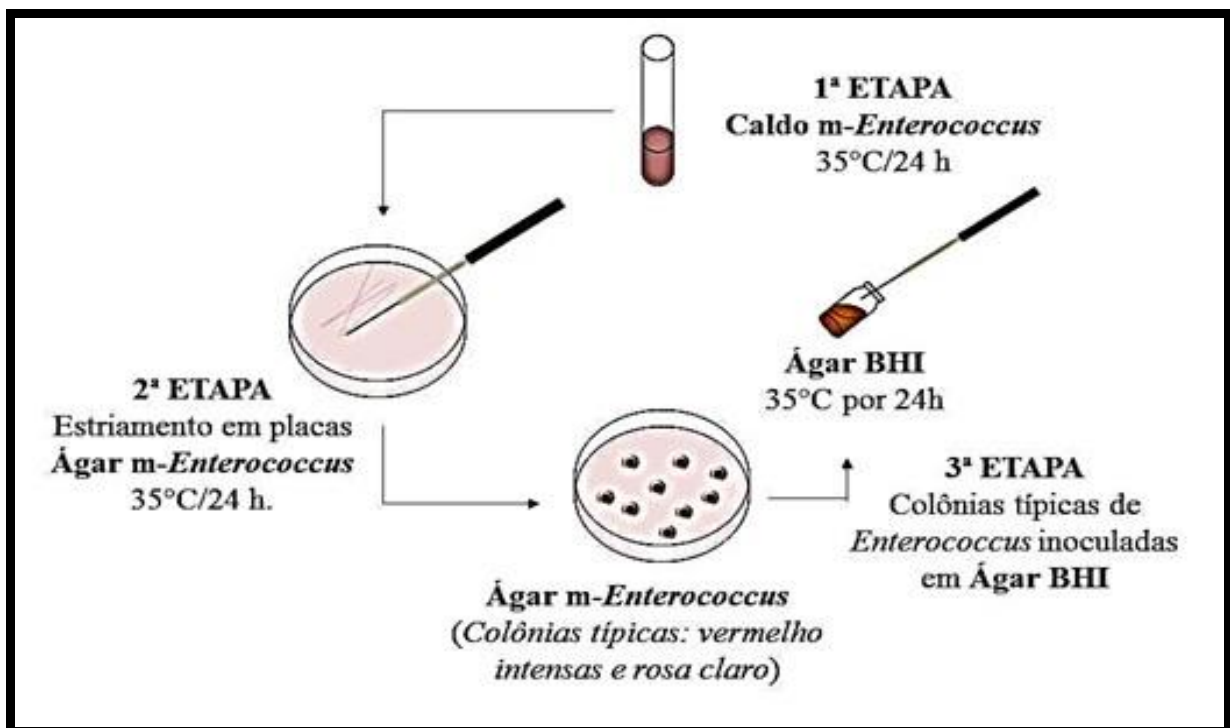
4.2. Purificação das estirpes bacterianas

A obtenção de culturas puras foi realizada em três etapas descritas a seguir (Figura 4). A primeira etapa foi a de crescimento das estirpes no meio seletivo Caldo M-*Enterococcus* (Caldo ME), incubadas a 35° C por 24 horas. Enquanto a segunda etapa consistiu em passar as estirpes cultivadas no Caldo ME para placas contendo o meio, também seletivo, Ágar M-*Enterococcus* (Ágar ME - DIFCO), pela técnica do esgotamento com alça de níquel-cromo, com incubação a 35° C por 24 horas. Nesta etapa visou-se a verificação da pureza das estirpes

e o re-isolamento das colônias com crescimento típico de *Enterococcus* spp. (colônias pequenas, circulares, convexas, coloração variando do rosa claro ao púrpura e com brilho).

A última etapa do processo de purificação das estirpes escolhidas resumiu-se no isolamento das colônias em duplicata para tubos de vidro contendo Ágar Brain Heart Infusion (Ágar BHI - DIFCO) com incubação a 35° C por 24 horas. Os tubos foram estocados após o período de incubação para posteriormente serem submetidos a testes de confirmação das espécies partindo sempre do crescimento em Caldo e/ou Ágar BHI incubados a 35° C por 24 horas (BRENNER, 1984; SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997; FACKLAM; SAHM; TEIXEIRA, 1999).

Figura 4 – Purificação das estirpes bacterianas.



4.3. Caracterização do gênero *Enterococcus*

Objetivando a confirmação prévia do gênero, foram realizados testes convencionais seguindo as recomendações de Facklam; Collins (1989) e Facklam; Carvalho; Teixeira (2002), que incluíram a determinação das características morfo-tintoriais em esfregaços corados pela técnica do Gram, produção de catalase, hidrólise da esculina e crescimento em caldo com 6,5% de NaCl, estes dois últimos com incubação a 35° C por 18-24 horas (Figura 5).

4.3.1. Atividade de catalase

A técnica consistiu na observação da formação, ou não, de bolhas um minuto após a adição de uma gota de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em uma gota de suspensão bacteriana, sendo os *Enterococcus* spp. negativos para esse teste.

4.3.2. Hidrólise da esculina na presença de bile

Utilizou-se Ágar Bile-Esculina (Ágar BE) inclinado em tubos de ensaio. A positividade da hidrólise da esculina foi evidenciada pelo escurecimento do meio.

4.3.3. Crescimento em caldo com 6,5% de cloreto de sódio (NaCl)

As estirpes em identificação foram inoculadas em Caldo BHI contendo 6,5% de NaCl. A turvação do meio ocasionada pelo crescimento bacteriano indicou teste positivo.

4.4. Identificação das espécies de *Enterococcus*

Para a identificação ao nível de espécie foi utilizado o método fenotípico convencional, simplificado, baseado nos esquemas propostos por Facklam; Collins (1989) e Facklam; Carvalho; Teixeira, (2002). As estirpes que se enquadraram no gênero *Enterococcus* após os testes descritos anteriormente foram submetidas às provas de produção de ácido a partir dos carboidratos: arabinose, lactose, manitol, rafinose, sacarose, sorbitol. Além das provas de produção de pigmento, motilidade, utilização do piruvato e hidrólise da arginina.

4.4.1. Prova para hidrolise da arginina

Os isolados crescidos por 24 horas a 35° C em Ágar BHI foram inoculados em tubos contendo 3,0 ml de meio basal adicionado de 0,05% de arginina (cor roxa) e posteriormente acrescidos de 1,0 ml de óleo mineral. Paralelamente, cada estirpe foi inoculada em um tubo contendo o mesmo meio basal, porém sem qualquer adição do aminoácido, sendo este o controle, com incubação a 35° C por um período de até 96 horas.

Após um período de 24 horas de incubação a coloração do inóculo encontrava-se alterada para amarelo, devido produção de ácido pelo micro-organismo pela utilização da glicose existente no meio basal. A reação foi positiva quando o meio tornou-se novamente alcalino, adquirindo coloração púrpura, indicando assim a utilização da arginina pela bactéria. O tubo controle permaneceu ácido mantendo a coloração amarela.

4.4.2. Fermentação de carboidratos: arabinose, lactose, manitol, rafinose, sacarose e sorbitol

Cada estirpe a ser identificada foi inoculada com o auxílio de uma agulha de inoculação em tubos contendo Caldo Púrpuro de Bromocresol (DIFCO) acrescido do carboidrato a ser testado, arabinose, lactose, manitol, rafinose, sacarose, sorbitol, separadamente. Após inoculação, os tubos foram incubados a 35° C por 24-48 horas. A reação ácida ocasionada pelo metabolismo bacteriano ao utilizar o carboidrato foi visualizada pela mudança na cor do meio de púrpura para amarelo.

4.4.3. Teste de motilidade

Foram utilizados 3,0 ml do meio de cultura semi-sólido Ágar Sulfeto-Indol-Motilidade (Ágar SIM - DIFCO) em tubos para avaliar a motilidade das estirpes. O crescimento foi observado após um período de 24-48 horas de incubação a 35° C, evidenciado pela turvação ao redor da linha de inoculação.

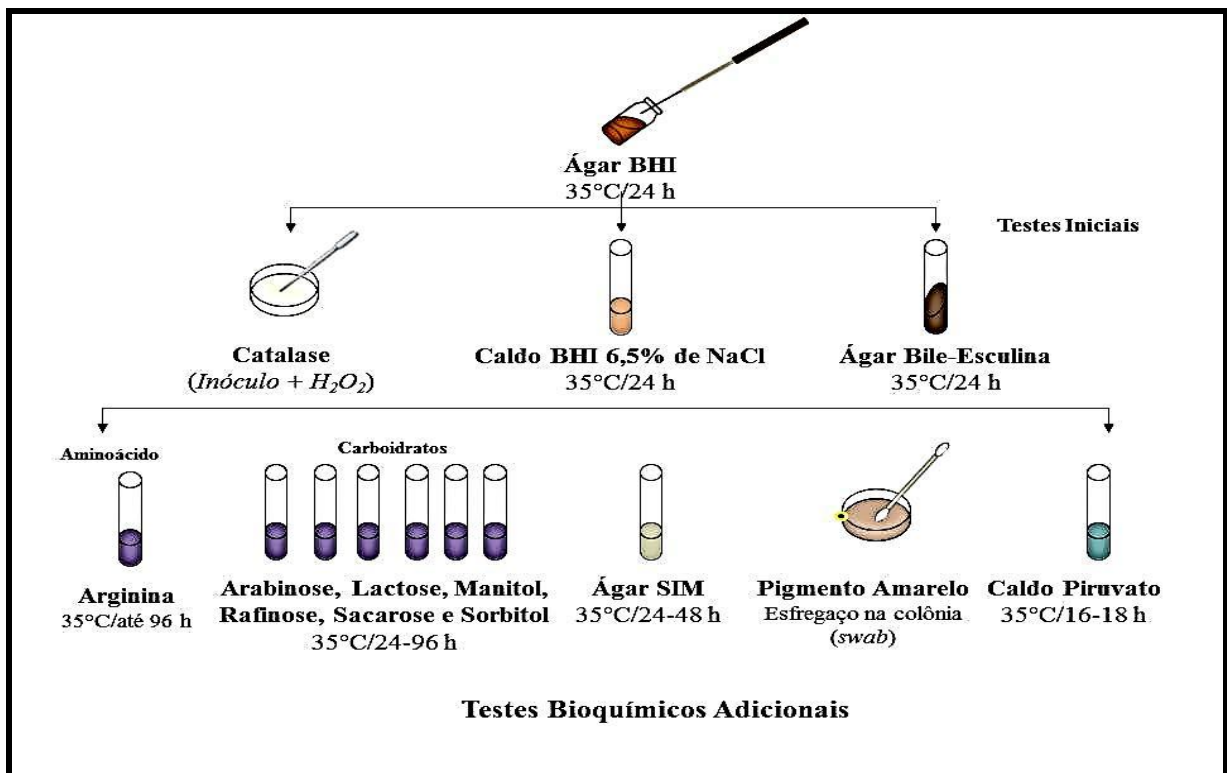
4.4.4. Produção de pigmento amarelo

A observação da produção de pigmento amarelo foi realizada através da análise de colônias crescidas na superfície de placas com Ágar BHI após incubação a 35° C por 18 – 24 horas. Com o auxílio de um *swab* previamente esterilizado foi feito um esfregão sobre as colônias e verificada a presença ou não da coloração amarela ou amarelo-alaranjada.

4.4.5. Fermentação do piruvato de sódio a 1%

Para a prova de fermentação do piruvato foi utilizado o meio modificado e proposto por Gross; Houghton; Senterfit (1975) o qual continha 10 g de triptona (Difco), 5 g de extracto de levedura (Difco), 5 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 5 g de cloreto de sódio (NaCl), 10 g de ácido pirúvico ($C_3H_4O_3$) (Sigma), 0,04 g de azul de bromotimol, 1,0 L de água destilada e pH ajustado para 7,2 a 7,4. O caldo foi autoclavado a $118^\circ C$ por 15 minutos. A evidência da utilização do piruvato como fonte de energia pelos *Enterococcus* foi observada quando o meio mudou de coloração para amarelo brilhante (ácido), após 16-18 h de incubação a $35^\circ C$. Quando não utilizado, o caldo permanece com a cor azul-esverdeada.

Figura 5 – Caracterização do gênero *Enterococcus* e identificação das espécies.



4.5. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

4.5.1. Antimicrobianos estudados

Oito antimicrobianos pertencentes a seis classes distintas foram testados frente às estirpes estudadas e estas categorizadas em susceptível, intermediária ou resistente conforme recomendado pelo CLSI (2011) (Quadro 5). Os fármacos utilizados foram Ampicilina – AMP

(10 µg/ml), Clindamicina – CLI (2 mcg/ml), Cloranfenicol – CLO (30 µg/ml), Estreptomicina – SM (300 µg/ml), Gentamicina – GM (120 µg/ml), Penicilina G – PEN (10 µg/ml), Tetraciclina –TET (30 µg/ml), Vancomicina –VAN (30 µg/ml) (TAVARES, 2002).

Quadro 5 – Interpretação dos diâmetros das zonas de inibição do crescimento microbiano para *Enterococcus* spp.

Antimicrobiano	Concentração	Diâmetro do halo total de inibição em mm		
		R ^b	I ^c	S ^d
AMP	10 µg	≤ 16	-	≥ 17
CLI	2 mcg	≤ 15	16 - 18	≥ 19
CLO	30 µg	≤ 12	13 - 17	≥ 18
SM ^a	300 µg	≤ 6	7 - 9	≥ 10
GM ^a	120 µg	≤ 6	7 - 9	≥ 10
PEN	10	≤ 14	-	≥ 15
TET	30 µg	≤ 14	15 - 18	≥ 19
VAN	30 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17

Fonte – CLSI (2011)

^a Aminoglicosídeos resistentes a altos níveis; ^b Resistente; ^c Intermediário; ^d Sensível.

4.5.2. Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em ágar

Foi utilizado o método de difusão em ágar (JORGENSEN; TURNIDGE; WASHINGTON, 2005) e os resultados interpretados seguindo as normas do CLSI (2011).

As estirpes identificadas foram semeadas em tubos com Ágar BHI e incubadas a 35° C por 24 horas. Posteriormente uma alçada de cada cultura foi emulsionada em solução salina estéril 0,85% e comparada com o padrão de turbidez 0,5 da Escala de McFarland. A turbidez foi comparada a partir da medida de densidade ótica (por absorvância) em espectrofotômetro (Micronal B542) utilizando-se o comprimento de ondas de 625 nm. Essa turbidez comparável ao tubo padrão da Escala de McFarland equivale a uma suspensão contendo aproximadamente 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL (CLSI, 2011).

Foram semeadas duas placas contendo ágar BHI com o auxílio de um *swab* esterilizado umedecido de cada emulsão bacteriana. Em seguida, as placas foram mantidas entreabertas por um período de três minutos, a fim de se permitir que o excesso de umidade fosse absorvido. Os discos dos antimicrobianos foram depositados individualmente, com o auxílio de uma pinça, previamente esterilizada, na superfície do ágar. Foram dispostos quatro discos de antimicrobianos por placa. Após a aplicação dos discos, as placas foram invertidas e

incubadas em estufa a 35° C por 18-24 horas. A medida dos halos de inibição do crescimento microbiano, foi efetuada utilizando-se paquímetro.

4.5.3. Cura plasmidial

As estirpes que apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano foram submetidas à técnica de cura dos plasmídeos pelo agente curagênico *acridine orange* (SIGMA A-6014) (MOLINA-AJA *et al.*, 2002), a fim de se classificar a natureza da resistência como potencialmente cromossômica ou plasmidial.

Para realização do teste, as estirpes foram cultivadas em Caldo Luria Bertani (Difco) suplementado com 0,05 mg mL⁻¹ de *acridine orange*, com incubação a 35° C por 24 horas. Após este período, foram retirados inóculos e semeados em BHI seguido de nova incubação a 35°C/24h. A partir do crescimento em BHI, foi realizado antibiograma como descrito no item supracitado. A resistência foi considerada potencialmente cromossômica quando observada após a cura do plasmídeo, do contrário, foi caracterizada como plasmidial.

4.5.4. Cálculo do Índice de Múltipla Resistência a Antimicrobianos (MAR)

Para determinação da multirresistência foi utilizado o índice de múltipla resistência a antibióticos (MAR) definido como a/b, em que “a” era o número de classes de antimicrobianos aos quais o isolado foi resistente e “b” o número de classes de antimicrobianos aos quais o isolado foi exposto (KRUMPERMAN, 1983).

4.6. Detecção de fatores de virulência

4.6.1. Detecção de gelatinase

A produção de gelatinase foi determinada utilizando-se tubos contendo Caldo BHI suplementado com 4% de gelatina. Após um período de incubação a 35° C por 48 horas, os tubos foram colocados em água com gelo por 30 minutos a fim de se atingir temperatura abaixo de 28° C (ponto de fusão da gelatina). A positividade para esse teste foi indicada quando após o período de 30 minutos em gelo, os tubos apresentaram conteúdo de consistência líquida, e negativo quando a consistência foi sólida (CLAUS, 1989).

4.6.2. Detecção fenotípica de hemolisina

A detecção da produção de hemolisina foi realizada utilizando-se placas de Ágar BHI suplementado com 5% de hemácias de carneiro, com incubação a 35° C por 18 – 24 horas. As estirpes que produziram β -hemólise (halo transparente ao redor do crescimento bacteriano) foram consideradas positivas para a produção de hemolisina (EATON; GASSON, 2001).

4.6.3. Substância de Agregação – Teste de aderência em vidro

As estirpes bacterianas foram cultivadas, em triplicata, em 5,0 ml de Caldo BHI (Difco) e incubadas a 35° C por 24 horas. Após esse período de incubação o conteúdo dos tubos foi descartado e a superfície interna dos tubos foi lavada três vezes com água destilada esterilizada. Os tubos foram invertidos para secagem. Com os tubos já secos foi adicionada solução de safranina (Merck – Darmstadt, Alemanha) a 0,1% por um minuto. Após o descarte da solução contida nos tubos e secagem foi realizada a leitura.

A observação de uma massa aderente formada no interior do tubo foi considerada como resultado positivo para a presença de substância de agregação, o crescimento de um anel na interface líquido-ar não foi considerado teste positivo (CHRISTENSEN *et al.* 1982).

4.6.4. Proteína de Superfície Enterocócica - Produção de biofilme em Ágar Vermelho Congo

Para avaliar a produção de biofilme pelas estirpes de *Enterococcus* spp. foi verificada através do cultivo em Ágar Vermelho Congo (Ágar VC) (Caldo BHI suplementado com 0,08 % de corante vermelho congo (Sigma) e 5 % de sacarose (Sigma)) (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989).

As placas de Ágar VC foram inoculadas e incubadas à 35° C por 24 horas, seguido por uma incubação à temperatura ambiente por 48 horas. A produção de colônias rugosas de coloração preta foi indicativo de positividade do teste, enquanto que estirpes não produtoras de biofilmes apresentam coloração vermelha ou branca. Foi utilizada a estirpe de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25.923), como controle positivo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação das espécies

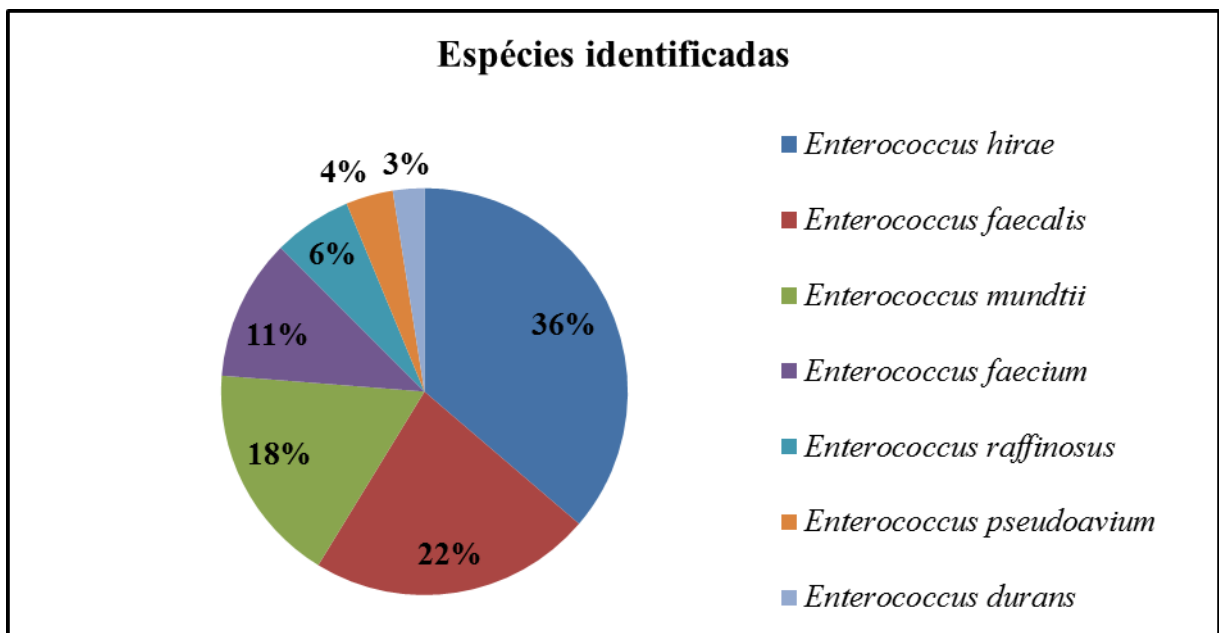
As estirpes oriundas, isoladas das 22 estações de coleta do entorno do emissário submarino de Fortaleza e submetidas à identificação fenotípica através de testes bioquímicos para diferenciação das espécies (Tabela 1), mostrou-se dominante a espécie *Enterococcus hirae* (n=29), seguida de *Enterococcus faecalis* (n=18) e *Enterococcus mundtii* (n=14) e em menores quantidades *Enterococcus faecium* (n=9), *Enterococcus raffinosus* (n=5), *Enterococcus pseudoavium* (n=3) e *Enterococcus durans* (n=2) (Gráfico 1).

Tabela 1 – Provas bioquímicas para diferenciação de *Enterococcus* spp.

Espécie	Testes Bioquímicos									
	ARG	ARA	LAC	MAN	RAF	SAC	SBL	MOT	PIG	PIR
<i>E. durans</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+/-	+	+/-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>E. mundtii</i>	+	+	+	+	+	+	+/-	-	+	-
<i>E. pseudoavium</i>	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>E. raffinosus</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Legenda: ARG – Arginina; ARA – Arabinose; LAC – Lactose; MAN – Manitol; RAF – Rafinose; SAC – Sacarose; SBL – Sorbitol; MOT – Motilidade; PIG – Pigmento amarelo; PIR – Piruvato.

Gráfico 1 – Identificação e frequência das espécies de *Enterococcus* isoladas do entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.



Na tabela 2 podem ser visualizadas o número de estirpes identificadas de acordo com as estações de coleta.

Tabela 2 – Número e espécies identificadas por estação de coleta no entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.

Estações	Número de espécies de <i>Enterococcus</i>							n
	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. raffinosus</i>	
EPC 1		3	5	3	5		3	19
Z0		4						4
A1		2		2				4
B1		3						3
B2					2			2
B3		1				1		2
C1						1	1	2
C2				2				2
C3				4				4
D1					1		1	2
D2				6				6
D3				7				7
D4				1		1		2
D5			1		1			2
D6			1		1			2
D7								0
E1		2						2
E2		1		2				3
E3	1				2			3
F1				1	2			3
F2		1	1	1				3
F3	1	1	1					3
$\Sigma= 22$	2	18	9	29	14	3	5	80

A EPC apresentou maiores níveis de contaminação, justificada pela maior ocorrência de estirpes isoladas deste ponto. Nas EPCs dos emissários ocorre a fase de tratamento primário dos resíduos recebidos pelo emissário, de esgotos domésticos, galerias pluviais, águas de escoamento superficial, etc. Nessa área os rejeitos passam por grades, de onde são removidos o material sólido em suspensão, seguido por caixas de areia para desarenação e parte da matéria orgânica e por fim pelo tratamento com cloro para a desinfecção (GONÇALVES; SOUZA, 1997).

A maior quantidade de isolados da EPC mostra que a concentração de enterococos nessa estação podendo ser justificada pela ausência da etapa de desinfecção. A ineficiência do tratamento desse efluente pode carrear ao mar cargas elevadas de contaminantes,

principalmente microbiológicos, podendo tornar a área do entorno do sistema fora dos padrões de águas balneares estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2011).

A estação de coleta D7 está localizada do lado oposto ao de abrangência da pluma do emissário, sendo, portanto, utilizada como estação controle, onde não deveriam ocorrer bactérias do gênero *Enterococcus*. Como o esperado, não foram encontrados *Enterococcus* na estação D7 nesse estudo, o mesmo, acontecendo com Carvalho *et al.* (2010) ao analisar a mesma área durante a estação chuvosa. As águas marinhas não estão dentre os *habitats* preferenciais dos enterococos, como aqueles descritos por Aarestrup; Butaye; Witte, (2002), confirmando assim o que fora relatado por esses autores.

Os enterococos fecais são utilizados como indicadores de contaminação fecal em ambientes aquáticos, sendo *E. faecalis* considerado como indicador mais preciso de qualidade de águas recreacionais (LLEÒ *et al.*, 2005). Dentre os isolados identificados a espécie *E. hirae* foi a mais prevalente, tendo sido identificada em 36% das estirpes (29/80) ocorrendo desde a EPC até a estação mais distante da pluma, por isso, mais diluída, F, com exceção da estação B.

Quando comparado ao presente estudo, outros autores, analisando amostras de águas marinhas, encontraram quantidades aproximadas da espécie supracitada (DICUONZO *et al.*, 2001; JUNCO *et al.*, 2001; OLIVEIRA; PINHATA, 2008). Em estudos recentes, a *E. hirae* foi relatada em menores quantidades em amostras de águas de praias (FERGUSON *et al.*, 2005; OLIVEIRA; PINHATA, 2008). Carvalho *et al.* (2010) analisando amostras do entorno da pluma do emissário do presente estudo durante a estação chuvosa não identificaram *E. hirae* dentre os isolados.

A espécie *E. hirae* tem como *habitat* natural o trato intestinal de suínos e frangos (FARROW; COLLINS, 1985), apesar de, inicialmente, ter sido verificada ocasionalmente como causadoras de infecções em humanos (TANNOCK; COOK, 2002) estudos mais recentes também a relacionaram como responsáveis por casos semelhantes de infecções em humanos (FURTADO *et al.*, 2005). O fato de ter ocorrido com maior frequência nas amostras obtidas do emissário pode ser, então, justificado, pela presença de quantidades elevadas de dejetos de animais despejados juntamente com esgotos domésticos no emissário de Fortaleza.

Embora não tenham sido as espécies de maior ocorrência neste estudo, as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* foram identificadas dentre as estirpes isoladas, constando de 22 (18/80) e 11% (9/80), respectivamente. Os isolados de *E. faecalis* ocorreram desde a EPC até a estação mais distante F, não tendo sido isolada nas estações C e D, enquanto que *E. faecium*

ocorreu na EPC e nas estações D e F. Carvalho *et al.* (2010) analisando amostras oriundas do mesmo emissário encontraram dentre seus isolados maiores percentuais para *E. faecalis* e *E. faecium*, podendo este resultado ser justificado por uma elevada quantidade de dejetos fecais humanos contidos no efluente do emissário durante esse período.

O fato dessas duas espécies não terem sido as de maior ocorrência no presente estudo, não concordando com grande maioria dos trabalhos realizados em amostras ambientais de água (DICUONZO *et al.*, 2001; JUNCO *et al.*, 2001; FERGUNSON *et al.*, 2005; GENTHNER *et al.*, 2005; KIMIRAN-ERDEM *et al.*, 2007; OLIVEIRA; PINHATA, 2008), não deve merecer menor importância. A ocorrência de isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* no local de coleta indica que a fonte de contaminação do ambiente é de origem humana e/ou animal, já que estas espécies são comumente encontradas em grande número em fezes (PINTO *et al.*, 1999; KÜHN *et al.*, 2005).

Há na literatura uma série de estudos sobre o isolamento de amostras clínicas e ambientais de enterococos fecais. *E. faecalis* e *E. faecium* estão entre as espécies de *Enterococcus* que ocorrem com maior predominância tanto em amostras clínicas quanto em amostras ambientais (CHOI *et al.*, 2003; KAÇMAZ; AKSOY, 2005), sendo inclusive os principais responsáveis (*E. faecalis* 80 a 90% e *E. faecium* menos de 5% dos casos) por infecções em humanos (KLARE *et al.*, 2003).

As espécies *E. mundtii* e *E. durans* compreenderam 18 % (14/80) e 3% (2/80) dos isolados, respectivamente. Em comparação com os resultados de Carvalho *et al.* (2010), *E. mundtii* foi mais frequente que na estação das chuvas, da mesma maneira *E. durans*. *E. mundtii* foi isolada desde a EPC até as estações mais distantes e mais diluídas da pluma: B, D, E e F. *E. durans* ocorreu somente em uma estação E e uma na F. *E. mundtii* foi isolada inicialmente de tetas de vacas, mãos de ordenhadores, de amostras de solo e de plantas (COLLINS; FARROW; JONES, 1986), enquanto que *E. durans* foi isolada de amostras de leite e de produtos lácteos (COLLINS *et al.*, 1984), sendo assim, caracterizadas como enterococos não-fecais. Essas duas espécies têm sido isoladas com baixa frequência de amostras ambientais (FERGUNSON *et al.*, 2005; JUNCO *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2005; OLIVEIRA; PINHATA, 2008). Porém, Bonilla *et al.* (2006) analisando águas a 3.000 metros da costa, na Florida – EUA, encontraram exclusivamente *E. durans*, *E. raffinosus*, *E. dispar*, *E. sulfureus* e *E. mundtii* que raramente tem sido associada com infecções em humanos (PINTO *et al.*, 1999), enquanto que *E. durans* está mais associada a enfermidades causadas em aves (CAUWERTS *et al.*, 2007).

Outras duas espécies que se mostraram presentes, foram *E. raffinosus* e *E. pseudoavium* apresentando percentuais relativamente baixos 6% (5/80) e 4% (3/80). Nos estudos de Carvalho *et al.* (2010), *E. raffinosus* esteve presente em 2,5% enquanto que *E. pseudoavium* não foi detectado. *E. raffinosus* foi isolada nas estações EPC, C e D e *E. pseudoavium* nas estações B, C e D. Embora ainda não tenha sido determinado o *habitat* natural de *E. raffinosus*, por ter sido isolado apenas de amostras clínicas (COLLINS *et al.*, 1989), a ocorrência desta espécie pode ser associada à contaminação fecal de origem animal (ARVANITIDOU; KATSOUYANNOPOULOS; TSAKRIS, 2001). *E. pseudoavium*, inicialmente isolado de amostras de mastite bovina, tem sido isolada com frequência de amostras de solo e grama, não tendo assim, muito valor como indicador de contaminação fecal (LECLERC; DEVRIESE; MOSEL, 1996). Pouco tem sido relatado sobre a ocorrência dessas duas espécies em amostras de águas marinhas. *E. raffinosus* foi isolado, em baixas quantidades, de amostras de praias no sul da Florida – EUA por Bonilla *et al.* (2006) reforçando assim os resultados deste estudo. Bender *et al.* (2009), em análise de amostras colhidas de pacientes internados em dois hospitais de Porto Alegre – Brasil, também identificaram em seus isolados *E. raffinosus*, apesar de constar na literatura poucos relatos sobre a ocorrência dessas espécies, já se sabe que ambas podem ser causadoras de infecções em humanos (MONDINO *et al.*, 2003; SANDOE; WITHERDEN; SETTLE, 2001).

A caracterização das espécies contaminantes é de grande utilidade quando se deseja identificar as fontes de poluição de águas naturais, podendo indicar se de origem fecal ou não-fecal, sendo útil também para melhor compreender a ecologia e epidemiologia dos *Enterococcus* (PINTO *et al.*, 1999).

5.2. Perfil de resistência aos antimicrobianos

Dos 80 isolados identificados, 31 (38,75%) foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados, 23 (28,75%) foram susceptíveis a pelo menos um antimicrobiano. Dentre os isolados susceptíveis a pelo menos um dos fármacos testados, 19 (23,75%) apresentaram susceptíveis à CLI, 3 (3,75%) à SM e 1 (1,25%) à GM.

Os isolados resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos foram considerados resistentes a múltiplas drogas (RMD), sendo que 24 (30%) dos isolados foram RDM. Todos os isolados foram susceptíveis aos antimicrobianos CLO, PEN e VAN,

enquanto que no geral, 61,2% apresentaram-se resistentes à CLI, 27,5% à SM, 13,8% à TET, 7,5% à GM e 1,2% à AMP (Gráfico 2 e Tabela 3).

Gráfico 2 – Percentual de resistência antimicrobiana entre os isolados de *Enterococcus* spp. isolados do entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.

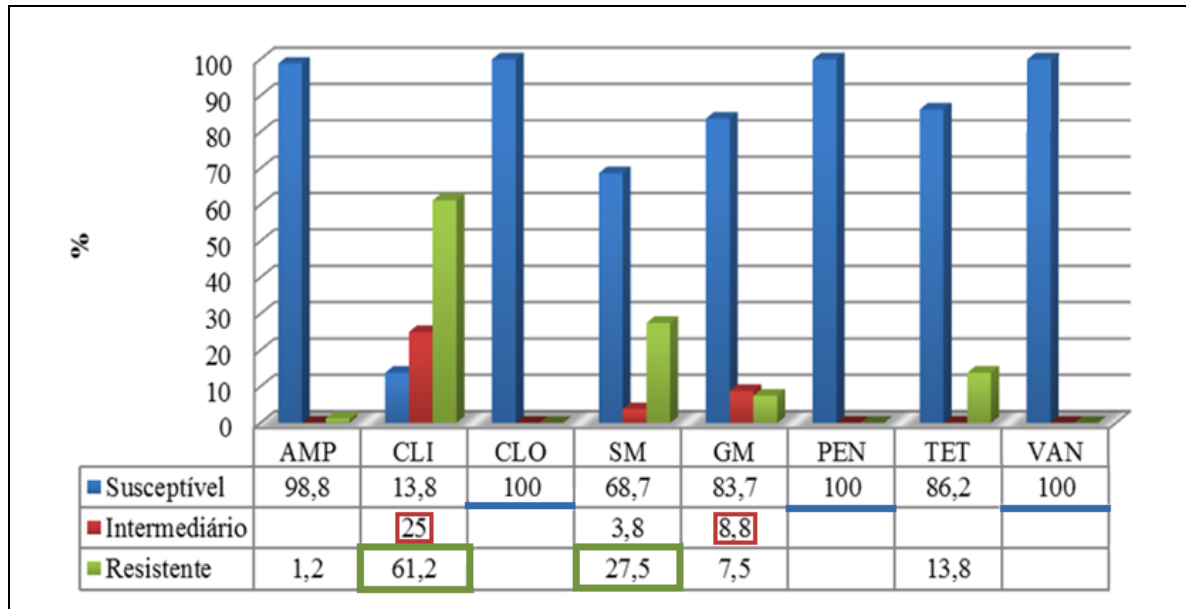


Tabela 3 – Número e percentagem de isolados de *Enterococcus* classificados como resistentes, susceptíveis e intermediários frente aos oito antimicrobianos testados.

Antimicrobiano	Susceptível (%)	Intermediário (%)	Resistente (%)
AMP	79 (98,8)		1 (1,2)
CLI	11 (13,8)	20 (25,0)	49 (61,2)
CLO	80 (100)		
SM	55 (68,7)	3 (3,8)	22 (27,5)
GM	67 (83,7)	7 (8,8)	6 (7,5)
PEN	80 (100)		
TET	69 (86,2)		11 (13,8)
VAN	80 (100)		

AMP – Ampicilina; CLI – Clindamicina; CLO – Cloranfenicol; SM – Estreptomicina; GM – Gentamicina; PEN – Penicilina; TET – Tetraciclina; VAN – Vancomicina.

Dentre as 22 estações de coleta do entorno do emissário submarino de Fortaleza, os isolados de apenas duas das estações, C2 e D1, não apresentaram resistência a nenhum dos antimicrobianos testados, por outro lado, foi verificada resistência em estirpes de todas as outras estações de coleta, inclusive nas estações mais distantes alcançadas pela pluma, F1, F2 e F3 (4.900 m). Perfis de multirresistência foram observados nas estações EPC, Z0, A1, B3,

C3, D4, E1, E2, E3, F1, F2 e F3. Os perfis de resistência as espécies identificadas podem ser visualizados na tabela 4 e nas figuras 6 e 7.

Os isolados de *E. faecalis* apresentaram resistência a cinco dos oito antimicrobianos testados (AMP, CLI, SM, GM e TET), *E. hirae*, *E. mundtii* e *E. faecium* mostraram-se resistentes a quatro antimicrobianos (CLI, SM, GM e TET). A espécie *E. raffinosus* (n=5) foi resistente a CLI, SM e a TET, enquanto que *E. pseudoavium* (n=3) a CLI e SM, e um isolado (50%) de *E. durans* (n=2) resistente apenas a CLI.

As bactérias são capazes de desenvolver mutações específicas para adaptarem-se às pressões seletivas impostas por ambientes desfavoráveis a sua sobrevivência (LEME; FERREIRA, 2001).

Os maiores percentuais de resistência observados nesse trabalho foram para a CLI, ocorrendo em isolados de todas as espécies identificadas. Esses dados estão de acordo com o CLSI (2011), que afirma que os enterococos são intrinsecamente resistentes às cefalosporinas, aos aminoglicosídeos (em baixas concentrações), ao cotrimoxazol e a clindamicina. Podem parecer ativos *in vitro*, mas pelo fato de não serem clinicamente eficazes não devem ser relatados na ocorrência de susceptibilidade.

As espécies *E. raffinosus*, *E. faecalis*, *E. pseudoavium* e *E. durans* apresentaram percentuais iguais ou acima de 50% de resistência à CLI (80, 72,2, 66,7 e 50%, respectivamente), enquanto que as outras três espécies restantes, identificadas nesse trabalho, apresentaram percentuais abaixo desse valor. Percentuais superiores a 50% de resistência a este fármaco também foi observado por Carvalho *et al.* (2010), concordando assim, os resultados encontrados neste trabalho.

Foi também a este antimicrobiano o maior percentual apresentado, de estirpes com perfil intermediário (25%), podendo-se reforçar mais ainda a ação ineficaz que este fármaco assumirá posteriormente, tendo em vista que esse perfil é possivelmente resultado de alguma pressão seletiva imposta às bactérias frente a concentrações reduzidas de antimicrobianos (AKOND *et al.*, 2009).

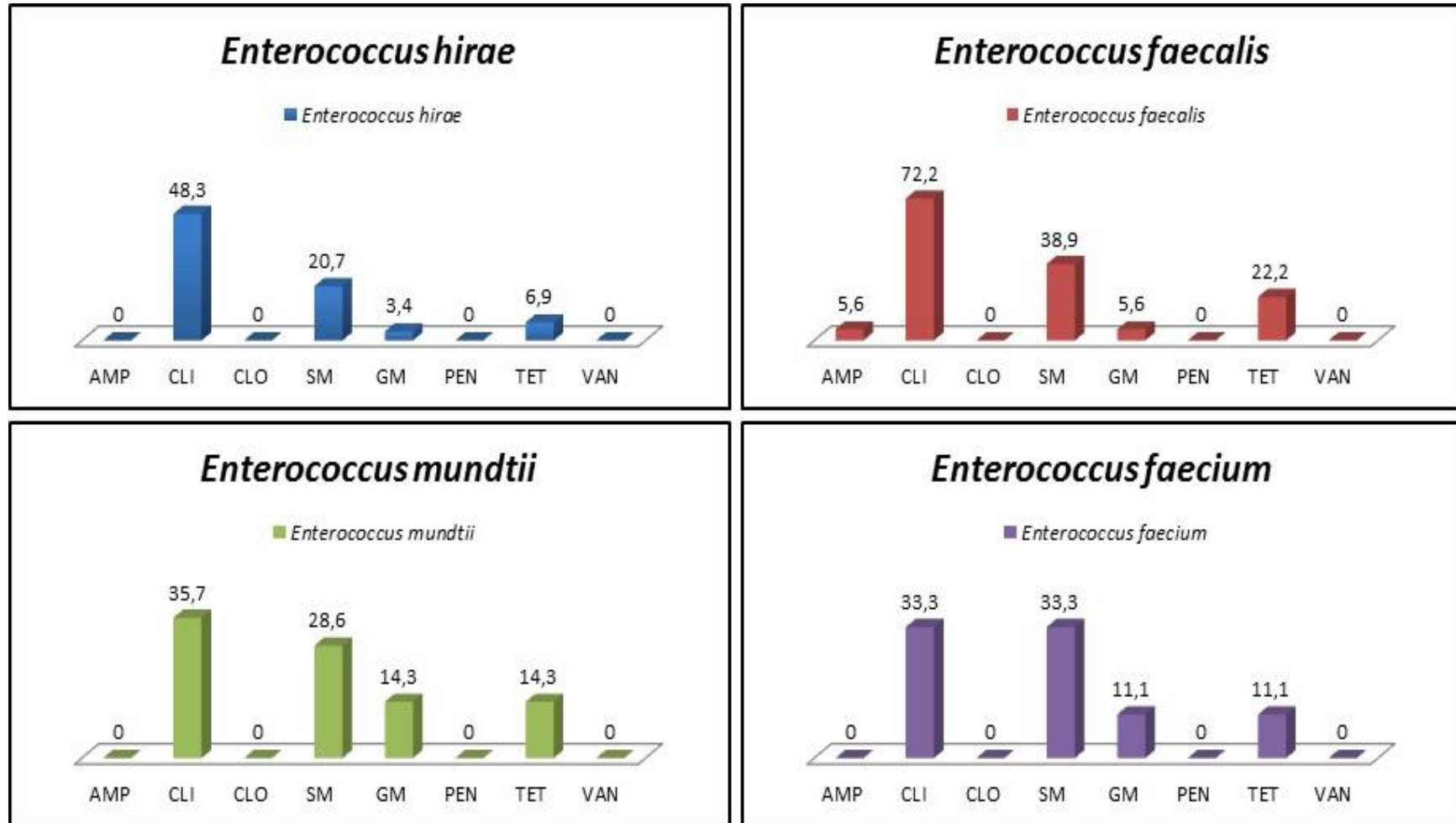
A predominância de isolados resistentes a macrolídeos (clindamicina e eritromicina) em amostras de águas marinhas foi relatado anteriormente (OLIVEIRA; PINHATA, 2008; ARVANITIDOU; KATSOUYANNOPOULOS; TSAKRIS, 2001; JUNCO *et al.*, 2001) o que reforça os resultados do presente estudo.

Tabela 4 – Perfis de resistência verificados para as espécies de *Enterococcus* spp. isoladas do entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.

Perfis de resistência	Número de isolados resistentes							Total
	<i>E. hirae</i> (n = 29)	<i>E. faecalis</i> (n = 18)	<i>E. mundtii</i> (n = 14)	<i>E. faecium</i> (n = 9)	<i>E. raffinosus</i> (n = 5)	<i>E. pseudoavium</i> (n = 3)	<i>E. durans</i> (n = 2)	
CLI	9	4	1	0	3	1	1	19
SM	1	0	1	1	0	0	0	3
GM	0	0	1	0	0	0	0	1
SM + GM	0	0	1	0	0	0	0	1
CLI + AMP	0	1	0	0	0	0	0	1
CLI + SM	4	3	2	1	0	1	0	11
CLI + TET	0	1	2	1	0	0	0	4
CLI + SM + GM	0	0	0	1	0	0	0	1
CLI + SM + TET	2	2	0	0	1	0	0	5
CLI + SM + GM + TET	1	1	0	0	0	0	0	2
$\Sigma =$	17	12	8	4	4	2	1	48

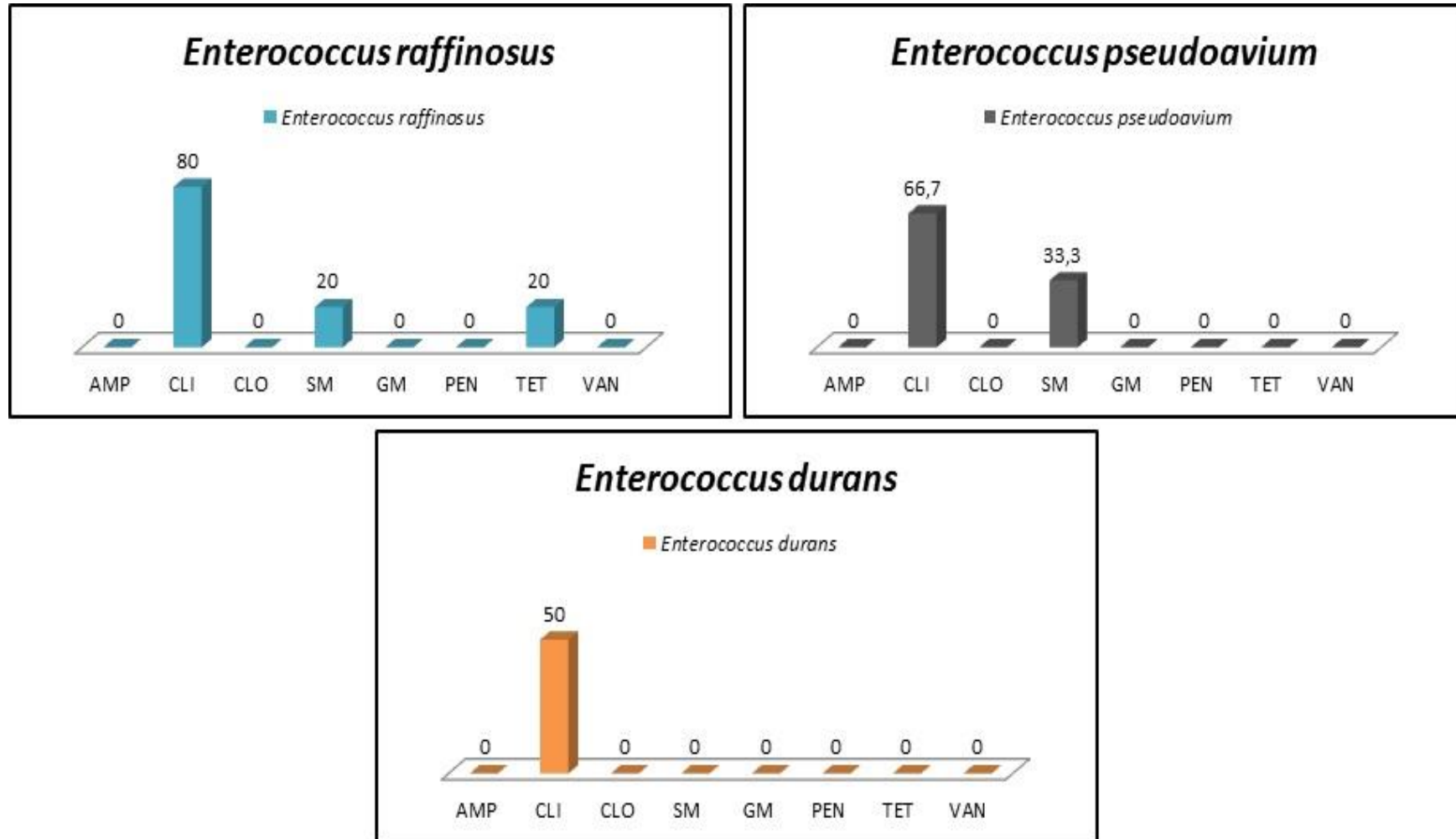
Legenda: AMP – Ampicilina; CLI – Clindamicina; SM – Estreptomicina; GM – Gentamicina; TET – Tetraciclina.

Figura 6 – Percentual da resistência antimicrobiana das estirpes de *E. hirae* (29/80), *E. faecalis* (18/80), *E. mundtii* (14/80) e *E. faecium* (9/80), isoladas do entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.



Legenda: AMP – Ampicilina; CLI – Clindamicina; CLO – Cloranfenicol; SM – Estreptomicina; GM – Gentamicina; PEN – Penicilina; TET – Tetraciclina; VAN – Vancomicina.

Figura 7 – Percentual da resistência antimicrobiana das estirpes de *E. raffinosus* (5/80), *E. pseudoavium* (3/80) e *E. durans* (2/80) isoladas do entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.



Legenda: AMP – Ampicilina; CLI – Clindamicina; CLO – Cloranfenicol; SM – Estreptomicina; GM – Gentamicina; PEN – Penicilina; TET – Tetraciclina; VAN – Vancomicina.

Outros antimicrobianos do grupo dos macrolídeos apresentaram baixos índices de efetividade quando testados em estirpes clínicas. A ocorrência de valores altos para resistência a estes antimicrobianos torna-os inadequados para a terapia de infecções causadas por enterococos (HÖRNER *et al.*, 2005; D'AZEVEDO *et al.*, 2004; BENDER *et al.*, 2009).

O lançamento de efluentes, provindos muitas vezes de ambientes seletivos a bactérias resistentes, como, esgotos domésticos, hospitais, indústrias, locais onde se realizam atividades veterinárias e também aquicultura, concorre para a ocorrência de genes de resistência bacteriana em ambientes aquáticos (SCHWARTZ *et al.*, 2003). Dentre as espécies do gênero *Enterococcus*, os fenótipos de resistência de maior importância são os relacionados aos aminoglicosídeos estreptomicina e gentamicina, aos β -lactâmicos amoxicilina e ampicilina e aos glicopeptídeos teicoplanina e vancomicina (D'AZEVEDO *et al.*, 2004). As espécies desse gênero bacteriano apresentam resistência intrínseca a baixos níveis de aminoglicosídeos devido à reduzida permeabilidade da parede celular aos antimicrobianos dessa classe (SARAIVA *et al.*, 1997). A utilização destes antimicrobianos no tratamento de infecções causadas por enterococos tem-se mostrado ineficiente devido ao surgimento de estirpes resistentes a altos níveis de aminoglicosídeos (HLAR), daí a importância que se dá a busca por resultados de sinergia na associação entre esses fármacos e um β -lactâmico ou um glicopeptídeo, que proporcionará um aumento da concentração intracelular deste agente e levará a morte do micro-organismo (SHEPARD; GILMORE, 2002; ZARRILLI *et al.*, 2005; HÖRNER *et al.*, 2005).

Foi observado no presente estudo a ocorrência de isolados de *Enterococcus* resistentes a SM (exceto na espécie *E. durans*) e a GM (exceto nas espécies, *E. durans*, *E. pseudoavium* e *E. raffinosus*), 27,5% e 7,5%, respectivamente. *Enterococcus* resistentes a SM ocorreram ao longo de todas as estações do entorno do emissário, enquanto que fenótipos resistentes a GM ocorreram na EPC, nas estações mais próximas Z e nas mais afastadas da pluma E e F, não ocorrendo nas estações B, C e D. Índices relativamente semelhantes foram encontrados por Carvalho *et al.*, (2010), reforçando esses resultados.

Em estudos anteriores Arvanitidou; Katsouyannopoulos; Tsakris (2001), Oliveira; Pinhata, (2008) e Henkes (2010) relataram a ocorrência de *Enterococcus* isolados de águas marinhas com fenótipos de resistência a SM e a GM com percentuais que vão de encontro aos encontrados neste trabalho corroborando, assim, com os mesmos. Por outro lado, em amostras clínicas, a ocorrência de estirpes resistentes aos aminoglicosídeos SM e GM é mais

frequentemente relatada (d'AZEVEDO *et al.*, 2004; BENDER *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2005; GAMA, 2008).

Tem sido descrito na literatura que a resistência a altos níveis de SM parece ser mediada por enzimas inativadoras de aminoglicósidos ou devido a alterações ribossômicas, enquanto que a ocorrência de resistência a altos níveis de GM está mais associada à produção de enzimas inativadoras (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000; CHOW *et al.*, 2001; ZARRILLI *et al.*, 2005).

Outros autores também confirmaram a prevalência de *Enterococcus* sp. com elevados níveis de resistência a aminoglicosídeos (KAÇMAZ; AKSOY, 2005; QUIÑONES *et al.*, 2005; BENDER *et al.*, 2009). Uma provável justificativa para a ocorrência de resistência a altos índices desses agentes antimicrobianos é a grande habilidade de disseminação de elementos genéticos, a troca de genes de resistência, que codificam enzimas com capacidade de modificar os aminoglicosídeos, bem como a pressão seletiva exercida pelo uso dos antimicrobianos em uma determinada população de micro-organismos.

Neste trabalho foi observado um baixo percentual de resistência aos antimicrobianos TET (13,8) e AMP (1,2%). Estirpes de *Enterococcus* resistentes a TET foram isoladas das estações EPC, Z e, das mais afastadas da pluma, D, E e F, tendo sido verificada nas espécies *E. hirae*, *E. faecalis*, *E. mundtii*, *E. faecium* e *E. raffinosus*. Os maiores percentuais de resistência a TET ocorreram nas espécies *E. faecalis* e *E. raffinosus*, com 22,2% e 20%, respectivamente.

No trabalho realizado por Carvalho *et al.* (2010) percentuais superiores de resistência a TET foram encontrados durante quadra chuvosa da região, sendo 2 vezes maior do que os dados observados na presente pesquisa. A resistência à TET tem sido um dos fenótipos de resistência adquirida mais observada nas bactérias do gênero *Enterococcus* (HUYS *et al.*, 2004), e é codificada por ação dos diferentes genes *tet* responsáveis pela proteção ribossomal, reduzindo, assim, a afinidade da célula à droga, ou pelos mecanismos de efluxo (KLARE *et al.*, 2003).

O uso indevido e desnecessário de medicamentos antimicrobianos em tratamento de seres humanos e em criações de animais tem promovido o desenvolvimento de estirpes resistentes que estão agora afetando inclusive habitats marinhos (AL-BAHRY *et al.*, 2009). Nas últimas décadas, o uso desses fármacos vem influenciando em muitos aspectos a ecologia microbiana por meio de mutações genéticas, seleções e também por fluxos de

informações genéticas (transferência intra, interespecífica e horizontal de genes) entre as bactérias (MAZEL; DAVIES, 1999).

O fato de a TET ser um antimicrobiano amplamente empregado no cultivo de produtos vegetais e nas rações utilizadas nas criações de animais como suínos e frangos e também no cultivo de organismos aquáticos pode explicar a resistência, geralmente elevada, a esse fármaco nas espécies de *Enterococcus* (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

Analisando amostras de água coletadas em ambientes marinhos, Vagnesh; Muthukumar; James (2012), Dicuonzo *et al.* (2001) e Junco *et al.* (2001) relataram valores relativamente baixos de resistência à TET e à AMP, fato que assemelha-se aos dados do presente trabalho.

Por outro lado, Oliveira; Pinhata, (2008) e Henkes (2010) também analisando amostras de águas litorâneas no Sudeste e Sul do Brasil observaram valores elevados de resistência à TET semelhantes aos resultados encontrados por Bender *et al.* (2009) em amostras clínicas e aos encontrados por Cassenego (2010) em fezes de frangos de corte e as de Corrêa; Fuentesfria; Corção (2005) em fezes de suínos. Tal ocorrência pode ser uma possível explicação para a disseminação de bactérias resistentes no ambiente aquático ocasionado pelo despejo de dejetos animais sem tratamento no meio aquático.

Os plasmídeos podem ser os responsáveis pela prevalência de resistência antimicrobiana no ambiente marinho (CHANDRASEKARAN; VENKATESH; LALITHAKUMARI, 1998). Bactérias que alcançam as águas do mar através de efluentes sem tratamento prévio adequado podem introduzir plasmídeos responsáveis pela transferência de genes de resistência nesses ecossistemas (TENDENCIA; PENA, 2001; DANG *et al.*, 2006; OLIVEIRA; PINHATA, 2008).

A terapia antimicrobiana comumente aplicada para as infecções enterocócicas tem se tornado complicada devido a maioria dos antimicrobianos não estarem mais exercendo efeito bactericida em concentrações clinicamente relevantes. Assim, endocardites, bacteremias e infecções enterocócicas sistêmicas graves têm sido tratadas com um agente que atue na parede celular, como um β -lactâmico (AMP) ou glicopeptídeos (VAN), e um aminoglicosídeo (SM e GM), atuando sinergicamente para promover a ação bactericida esperada (HÖRNER *et al.*, 2005).

O que tem se tornado um grande e importante problema no tratamento dessas enfermidades, além da resistência natural intrínseca aos β -lactâmicos, AMP e PEN, é a

resistência aos aminoglicosídeos e à VAN, fator contribuinte para a redução das opções de tratamento empírico (KAK; CHOW, 2002).

Dentre os fármacos da classe dos β -lactâmicos (AMP e PEN) testados no presente trabalho, não foram observadas estirpes resistentes à PEN e a única estirpe resistente à AMP foi isolada da EPC, sendo da espécie *E. faecalis*.

Este isolado resistente à AMP, após o teste de cura plasmidial mostrou que a resistência ao antimicrobiano foi potencialmente cromossômica, corroborando com os relatos existentes na literatura de que o gênero *Enterococcus* possui resistência intrínseca a este fármaco (MURRAY; WEINSTOCK, 1999).

A resistência do isolado à AMP encontrada neste estudo foi de 1,2% no geral, e 5,6% dentre os isolados da espécie, sendo semelhante aos resultados encontrados por outros autores que também analisaram amostras ambientais (OLIVEIRA; PINHATA, 2008; DICUONZO *et al.*, 2001; JUNCO *et al.*, 2001).

Carvalho *et al.* (2010) relataram percentuais superiores de enterococos resistentes durante da quadra chuvosa de Fortaleza - CE, para ambos os fármacos, sendo aproximadamente 10 e 20 vezes maior para a AMP e PEN, respectivamente. Quando comparados ao presente estudo, os resultados encontrados por Vignesh; Muthukumar; James (2012), Henkes (2010) e Kaçmaz; Aksoy (2005) também analisando amostras de águas marinhas e por Hörner *et al.* (2005) em amostras clínicas são semelhantes.

Diferenças encontradas nas porcentagens de espécies e resistência aos antimicrobianos podem ser justificadas pelas características geográficas dos locais de estudo e, no caso deste estudo, por períodos de estacionalidade distintas durante o processo de coleta.

A ocorrência de estirpes resistentes, como à ampicilina no ambiente marinho, põe-se como um fator preocupante devido à possibilidade de que tal resistência possa ser transferida por outros micro-organismos (LESTER *et al.*, 2006), desde que já está bem documentada a transferência de resistência por plasmídeos no ambiente marinho por uma grande variedade de bactérias (BAYA *et al.*, 1986; SANDAA, ENGER, 1994). A diminuição da afinidade das proteínas de ligação à penicilina presentes nos *Enterococcus* e a ocorrência de algumas estirpes com plasmídeos mediadores de enzimas β -lactamases podem ser os responsáveis por esta resistência (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000).

Os fármacos CLO e VAN (glicopeptídeo) foram, assim como a PEN, 100% eficazes frente os isolados das sete espécies identificadas no estudo. Neste sentido, pode-se

considerar esses antimicrobianos eficazes para o tratamento de enfermidades bacterianas causadas pelos *Enterococcus* spp.

Percentuais semelhantes de susceptibilidade à VAN também foram observados em amostras ambientais pelos autores Arvanitidou; Katsouyannopoulos; Tsakris (2001), Henkes (2010), Oliveira; Pinhata (2008) e Kimiran-Erdem *et al.* (2007). Enquanto que para o CLO, tem sido relatada baixa resistência na maioria dos estudos (CARVALHO *et al.*, 2010; KIMIRAN-ERDEM *et al.*, 2007; JUNCO *et al.*, 2001) e ausência de resistência (VIGNESH; MUTHUKUMAR; JAMES 2012).

Ocorrências de resistência mais elevadas aos fármacos supracitados têm sido relatadas com maior frequência em estirpes clínicas (IVERSEN *et al.*, 2002; LIGOZZI *et al.*, 2002; DICUONZO *et al.*, 2001).

Foi observada, além de mono resistência (28,75%), a ocorrência de múltipla resistência (30,0%) nos isolados de *Enterococcus* analisados. Apenas as estirpes de *E. durans* não apresentaram múltipla resistência aos antimicrobianos testados. O perfil mais frequentemente encontrado de multirresistência foi a CLI e SM. De forma geral, as estirpes de *Enterococcus* isoladas do entorno da pluma do emissário de Fortaleza apresentaram índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) variando entre 0,33 e 0,50. Valores acima de 0,2 caracterizam perfil de multirresistência (KRUMPERMAN, 1983), (Tabelas 5).

Tabela 5 – Perfis de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) com seus respectivos índices e percentuais.

Perfil	Quantidade	MAR	% de estirpes
CLI + AMP	1	0,33	1,25
CLI + SM	11	0,33	13,75
CLI + TET	4	0,33	5,0
CLI + SM + GM	1	0,33	1,25
CLI + SM + TET	5	0,50	6,25
CLI + SM + GM + TET	2	0,50	2,5
$\Sigma= 6$	24	-	30,0

Em todas as estações de coleta do entorno do emissário submarino, desde a EPC até as estações F, foram observados perfis de multirresistência, embora o de amostras (estirpes isoladas) de cada estação seja pequeno e variável, os valores percentuais obtidos indicam que nas estações Z, estações localizadas na saída dos difusores do efluente, e nas estações E estão os maiores índices de estirpes com múltipla resistência, 62,5% em cada, os menores valores

foram observados nas estações D, com 4,76%, mesmo tendo ocorrido nesta maior número de isolados (Gráfico 3).

A espécie *E. faecalis* apresentou maior percentual de isolados (50%), com perfil de multirresistência aos fármacos utilizados nesta pesquisa. Apesar de ter sido a espécie com maior número de isolados, apenas 24,1% das cepas de *E. hirae* revelaram-se multirresistentes frente as drogas testadas. Os dois únicos isolados da espécie *E. durans* não apresentaram perfil de multirresistência (Gráfico 4).

Gráfico 3 – Percentual de isolados multirresistentes por estação de coleta do entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.

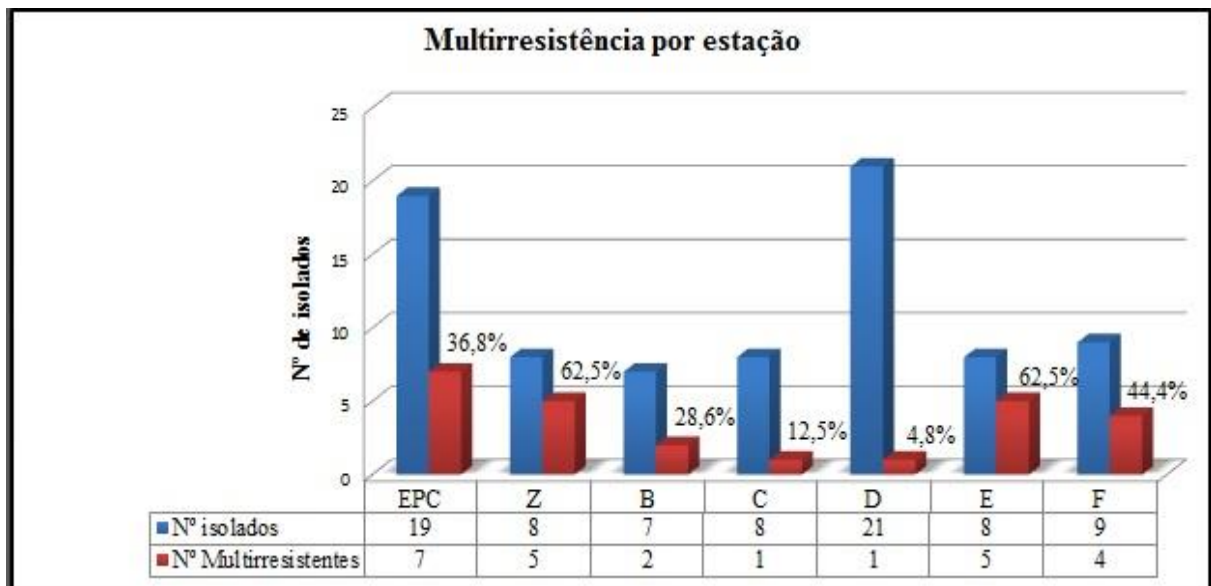
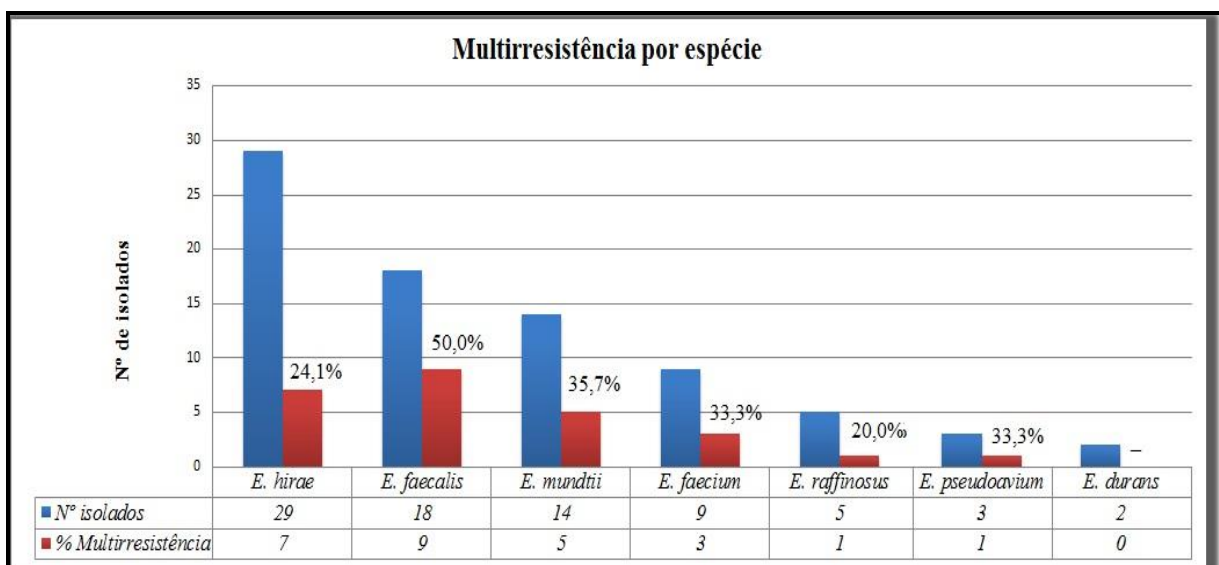


Gráfico 4 – Percentual de isolados multirresistentes por espécie.



Todas as estirpes que apresentaram mono ou múltipla resistência foram submetidas à cura dos plasmídeos. O único isolado com resistência a AMP mostrou que a resistência foi potencialmente cromossômica. As frequências de isolados com resistência plasmidial foi observada nas estirpes resistentes a CLI (18,6%, n=8), SM (25,0%, n=6), GM (20,0%, n=1) e TET (9,1%, n=1) (Tabela 6).

Resistência plasmidial a SM foi verificada nas espécies *E. faecalis* (n=1), *E. faecium* (n=1), *E. hirae* (n=2), *E. mundtii* (n=1) e *E. raffinosus* (n=1), enquanto que a GM foi um isolado de *E. faecalis* e a TET um isolado de *E. faecium*.

Tabela 6 - Número de estirpes de *Enterococcus* spp., oriundas do emissário submarino de Fortaleza, classificadas de acordo com o perfil de resistência cromossômica e plasmidial.

Antimicrobiano	Estirpes resistentes	Res. cromossômica	Res. plasmidial
AMP	1	1	-
CLI	43	35	8
SM	24	18	6
GM	5	4	1
TET	11	10	1

Mecanismos de transferência de genes de resistência desempenham um papel crucial na disseminação de resistência plasmidial entre bactérias no ambiente marinho (DANG *et al.*, 2006). Resistência a vários antimicrobianos não tem sido raridade entre os isolados de *Enterococcus* sp. oriundos de animais e seres humanos (AARESTRUP *et al.*, 2000).

Na literatura, já é vasto o número de referências que relata a pressão seletiva imposta aos micro-organismos comensais do trato gastrointestinal, de animais e de seres humanos, causada pela ampla e desenfreada disseminação do uso de antimicrobianos, implicando nos futuros padrões de resistência a estes fármacos (CHOI *et al.*, 2003).

Os resultados desta pesquisa, referentes à resistência a múltiplas drogas, concorda com relatos anteriores que afirmam que tal resistência em *Enterococcus* spp. provenientes de fontes aquáticas ocorre com menor frequência do que em amostras clínicas (PINTO *et al.*, 1999; DICUONZO *et al.*, 2001).

Os crescentes níveis de resistência a vários fármacos antimicrobianos mostram a necessidade de um monitoramento, frequente e próximo, da resistência bacteriana em ambientes aquáticos onde há interferências antrópicas, como no caso dos emissários. Sem esta medida de vigilância, o mais provável é que ocorra um declínio maior da eficiência dos

agentes antimicrobianos e, adicionalmente, conduzir a uma redução dos números destes disponíveis para tratar infecções humanas acometidas por *Enterococcus* spp.

A presença de estirpes multirresistentes a fármacos antibacterianos em corpos hídricos é alarmante pelo fato das infecções causadas por estas estirpes conduzirem a uma maior taxa de mortalidade do que aquelas provocadas pelas estirpes sensíveis a antimicrobianos (HOLMBERG; WELLS; COHN, 1984). Os glicopéptideos (por exemplo, vancomicina e teicoplanina) foram tomados como as drogas de escolha para o tratamento de infecções causadas por enterococos multirresistente. Porém, nas últimas décadas, a resistência a estes fármacos tem-se desenvolvido com uma frequência cada vez mais crescente em todo o mundo (KIM *et al.*, 2004; ROSENBERG *et al.*, 1997).

O potencial de disseminação de resistência é uma questão importante, uma vez que os genes de resistência poderiam ser transferidos entre os enterococos e destes para bactérias de outras espécies (KAÇMAZ; AKSOY, 2005). A resistência à AMP e à VAN por uma mesma estirpe isolada do ambiente marinho, assim também como à SM e à GM, drogas usualmente utilizadas no tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* spp., são fatores preocupantes devido à possibilidade de que resistência pode ser transferida horizontal e verticalmente entre bactérias (LESTER *et al.*, 2006; HUYCKE; SAHM; GILMORE, 1998).

A detecção de resistência múltipla das estirpes isoladas das águas do entorno da pluma do Emissário de Fortaleza observada neste trabalho e corroborada por Carvalho *et al.* (2010), pode ser um indicativo de contaminação intermitente nessa área da costa cearense pelo efluente do emissário. Tudo isso é exacerbado pela imensa capacidade de transferir resistência apresentada por *Enterococcus* spp., o que pode causar um aumento na proporção de bactérias com resistência múltipla aos antimicrobianos em águas recreacionais marinhas em curtos períodos.

5.3. Fatores de virulência

Dos 80 isolados, 50 (62,5%) apresentaram positividade para, pelo menos um dos quatro testes de virulência realizados. Foram positivos para apenas um dos fatores de virulência 36 estirpes (45,0%), 13 estirpes mostraram-se positivas para dois fatores, apenas um isolado foi positivo para três testes e nenhum apresentou 100% de positividade para os quatro testes.

Todas as espécies identificadas neste trabalho foram positivas em algum dos testes de virulência realizados, tendo sido observado nove diferentes perfis (Tabela 7).

Estirpes virulentas foram isoladas em quase todas as estações de coleta do entorno do emissário, desde a EPC até as estações F. Somente as estações D1 e D5 não apresentaram estirpes virulentas. Considerando o número de isolados por estação e o número de isolados virulentos observado, foram encontrados valores percentuais altos em quase todas as estações de coleta do entorno da pluma, sendo o percentual mais baixo de 38,21% (8/21) para as estações D (D2, D3, D4, e D6) e para as demais estações percentuais acima de 50%, inclusive 100% nas estações F (F1, F2 e F3) as mais distantes da pluma.

As figuras 8, 9 e 10 mostram os resultados positivos e negativos para os testes de gelatinase, citolisina, agregação em vidro e produção de biofilme.

Figura 8 – Produção de gelatinase em Caldo BHI acrescido de 4% de gelatina (esquerda) e de hemolisina em Ágar BHI suplementado com 5% de hemácias de carneiro (direita).

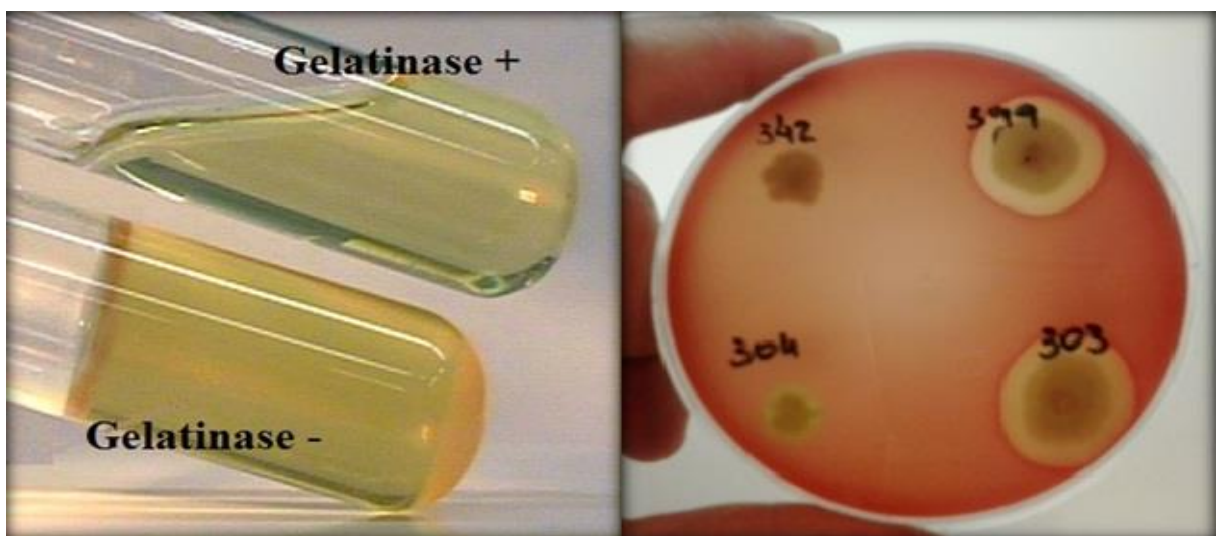


Figura 9 – Teste de agregação em vidro. Negativo (esquerda) e positivo (direita).



Tabela 7 – Perfis de virulência verificados para as espécies de *Enterococcus* spp. isoladas do entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE.

Perfis de virulência	Número de isolados virulentos							Total
	<i>E. hirae</i> (n = 29)	<i>E. faecalis</i> (n = 18)	<i>E. mundtii</i> (n = 14)	<i>E. faecium</i> (n = 9)	<i>E. raffinosus</i> (n = 5)	<i>E. pseudoavium</i> (n = 3)	<i>E. durans</i> (n = 2)	
AGR	1	0	0	0	0	0	0	1
BVC	9	4	2	3	2	0	0	20
GEL	1	4	1	1	0	0	0	7
β-Hm	3	2	2	0	0	0	1	8
GEL AGR	1	0	1	1	0	0	0	3
GEL β-Hm	0	1	0	0	0	0	0	1
GEL BVC	1	2	1	0	0	1	0	5
BVC β-Hm	1	1	0	0	1	1	0	4
BVC β-Hm AGR	0	0	0	0	0	1	0	1
Σ =	17	14	7	5	3	3	1	50

Legenda : AGR – Agregação em vidro; GEL – Gelatinase; BVC – Biofilme em vermelho Congo ; β-Hm – Produção de β-hemólise

Figura 10 – Produção de biofilme em Ágar Vermelho Congo.



OBS: Teste positivo = inóculo de coloração preta; Teste negativo = inóculos de coloração branca e vermelha.

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* têm sido responsáveis pela maioria das infecções nosocomiais causadas por enterococos e, na maioria das vezes, a ocorrência de genes codificadores de fatores de virulência tem sido associada aos isolados de *E. faecalis* (FRANZ *et al.*, 2001). Por outro lado, outros autores associam a ocorrência destes genes, como sendo, uma característica comum do gênero *Enterococcus* (SEMEDO *et al.*, 2003).

Considerando os dados tratados em valores percentuais, os isolados de *E. pseudoavium* apresentaram em 100% (n=3) dos casos a presença de algum fator de virulência, tendo entre eles, o isolado com maior potencial de virulência deste trabalho (BVC+AGR+ β -Hm), seguido dos isolados de *E. faecalis* com 77,8% dos isolados com algum perfil de virulência. Os fenótipos mais observados foram o de produção de biofilme e β -hemólise (Tabela 7).

Por outro lado, considerando que cada fator de virulência estudado nesse trabalho é codificado por um gene diferente (*GelE*, *Agg*, *cpd* e *CylLL*), os isolados da espécie *E. hirae* manifestaram fenotipicamente possuir pelo menos 20 genes codificadores de fatores de virulência, enquanto que *E. faecalis* 18.

Outros autores já relataram a ocorrência desses genes em isolados de *E. hirae*, porém, provindos de amostras clínicas, de animais e alimentos (SEMEDO *et al.*, 2003), sendo

maior os casos em que *E. hirae* não os manifestam (SÁNCHEZ *et al.*, 2007; MARTÍN-PLATERO *et al.*, 2009).

Há também relatos sobre pesquisas com estirpes de *E. faecium* e *E. durans*, com intuito de se verificar genes codificadores de fatores de virulência. Esses genes já foram confirmados em amostras clínicas oriundas de bacteremias, amostras de fezes de avestruz, produtos cárneos fermentados, e também em de queijo de ovelha (LOPES *et al.*, 2006; WORTH *et al.*, 2008; PEREIRA, 2010; BELGACEM *et al.*, 2010).

Dada *et al.* (2012) e Ahmed; Sidhu; Toze (2012) estudando amostras oriundas de águas de praia de Port Dickson na Malásia e de tanques de captação de água de chuva em Queensland, na Austrália, respectivamente, observaram atividade de gelatinase entre seus isolados, principalmente em *E. faecalis* e *E. faecium*.

Os resultados encontrados por Dada *et al.* (2012) estão de acordo com os de Franz *et al.* (2001) e Creti *et al.* (2004) que relataram frequência maior de atividade de gelatinase em isolados de *E. faecium*. Entretanto, os resultados do presente estudo diferiram dos encontrados pelos autores supracitados, sendo maior o percentual de estirpes positivas para a gelatinase de *E. faecalis*, 38,9% (7/18), enquanto que *E. faecium* 22,2% (2/9), reforçando os relatos de Ahmed; Sidhu; Toze (2012).

Estirpes de enterococos possuidoras do gene *GelE* têm sido detectadas frequentemente em isolados clínicos (EATON; GASSON, 2001). A prevalência desse gene de virulência em amostras oriundas do ambiente aquático é indicador de que algumas destas estirpes podem ser clinicamente significantes, uma vez que este gene de virulência foi relatado inicialmente como estando associado a isolados clínicos de *E. faecalis* (NALLAPAREDDY *et al.*, 2005).

A hemolisina desempenha um papel de grande importância na virulência dos enterococos, pois pode aumentar a gravidade da infecção (IKE *et al.*, 1990). Dentre as espécies identificadas neste trabalho, apenas *E. faecium* não manifestou atividade β -hemolítica. Esse fatos de virulência foi verificado em 14 isolados (Tabela 7).

Diferente do que consta na literatura, as estirpes utilizadas no presente estudo foram capazes de hemolisar sangue de carneiro, discordando assim de Mundy; Sahn; Gilmore (2000). Este resultado controverso poderia estar relacionado à penetração de marcadores de virulência causada pela evolução de patogenicidade dos enterococos por conjugação natural no ambiente aquático, podendo esse estar recebendo estirpes potencialmente patogênicas de

fontes como esgotos domésticos, atividades de pecuária intensiva e agropecuária, hospitais e resíduos industriais (LATA *et al.*, 2009).

Dada *et al.* (2012) não observaram isolados com capacidade de produzir β -hemólise quando estudaram amostras oriundas de ambiente marinho. Por outro lado, Lanthier *et al.* (2010), observaram, a ocorrência de genes codificadores de hemolisina em *Enterococcus* spp. também isolados de água.

Estudos anteriores têm mostrado a baixa frequência de estirpes de diferentes espécies de *Enterococcus* spp. com atividade β -hemolítica oriundos de isolados clínicos, de animais e alimentos (VUYST; MORENO; REVETS, 2003). Esse fato contrasta com a percepção de que a atividade de β -hemólise é comum entre as espécies desse gênero (SEMEDO *et al.*, 2003) e sugere que o risco de se contrair infecções em águas balneares por enterococos β -hemolítico é baixo, merecendo maior atenção e estudos nesses ambientes.

O gene *Agg*, codificador do fator de agregação, foi inicialmente descrito como presente apenas em *E. faecalis* (JETT; HUYCKE; GILMORE, 1994), porém, os resultados obtidos nesse trabalho estão em desacordo com esses autores, já que não foi verificada fenotipicamente a ocorrência de substância de agregação na espécie citada, tendo ocorrido em 6,25% (5/80) dos isolados estudados neste trabalho (Tabela 7).

Alguns autores já relataram que a transferência de genes que codifiquem o fator de agregação pode ser mediada por plasmídeos, podendo estar intimamente relacionado com a colonização do micro-organismo no hospedeiro, com os processos de inflamação e também de tornar a estirpe mais virulenta (KLARE *et al.*, 2003; KAYAOGLU; ØRSTAVIK, 2004).

A distribuição do gene *Agg* em estirpes de *Enterococcus* spp. Não é consenso entre os pesquisadores, ao mesmo tempo em que alguns autores concordam com a sua frequência entre enterococos, apresentando estudos que mostram a ocorrência em *E. faecalis* e não em *E. faecium* isolados de origem alimentar e clínica (EATON; GASSON 2001; FRANZ *et al.*, 2001; VALENZUELA *et al.*, 2008). Outros autores têm demonstrado a presença desse gene em *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de alimentos, amostras clínicas e origens ambientais (ABRIOUEL *et al.*, 2008; TOĞAY *et al.*, 2010) e em outras espécies de *Enterococcus* (SEMEDO *et al.*, 2003).

A incidência do fator de agregação nos isolados do entorno da pluma do emissário submarino foi reduzida, ocorrendo na EPC, e nas estações D4 e F3, sugerindo que esses genes tenham uma ampla distribuição em enterococos no ambiente aquático.

A produção de biofilme pelas estirpes de *Enterococcus* sp., foi o fator de virulência que ocorreu com maior frequência. Foram positivos para a produção de biofilme 37,5% dos isolados deste trabalho, não estando presente apenas nos isolados da espécie *E. durans*. Maior frequência foi observada para os isolados de *E. pseudoavium* 100% (3/3) e *E. raffinosus* 60% (3/5), respectivamente.

Corroborando com nossos resultados, Lata *et al.* (2009) também observaram a presença do gene *Esp* codificador do fator de agregação em isolados de *E. faecium* e *E. hirae* provindos de amostras de água, enquanto que Ahmed; Sidhu; Toze (2012), observaram nas espécies *E. faecalis* e *E. mundtii*. No presente trabalho, um maior número de isolados de *E. hirae* (n=11) e *E. faecalis* (n=7) apresentaram este fenótipo.

O fator de agregação tem sido associado a infecções do trato urinário, atuando de forma a aumentar a persistência de *E. faecalis* na bexiga urinária, servindo também para aumentar a resistência da célula a fagocitose (SHANKAR *et al.*, 1999; MARQUES; SUZART, 2004; LATA *et al.*, 2009). Esse fator de virulência também com frequência variável entre *Enterococcus* spp. isolados de outras fontes clínicas, de alimentos e amostras ambientais (EATON; GASSON 2001; SEMEDO *et al.*, 2003; ABRIOUEL *et al.*, 2008; MCGOWAN-SPICER *et al.*, 2008).

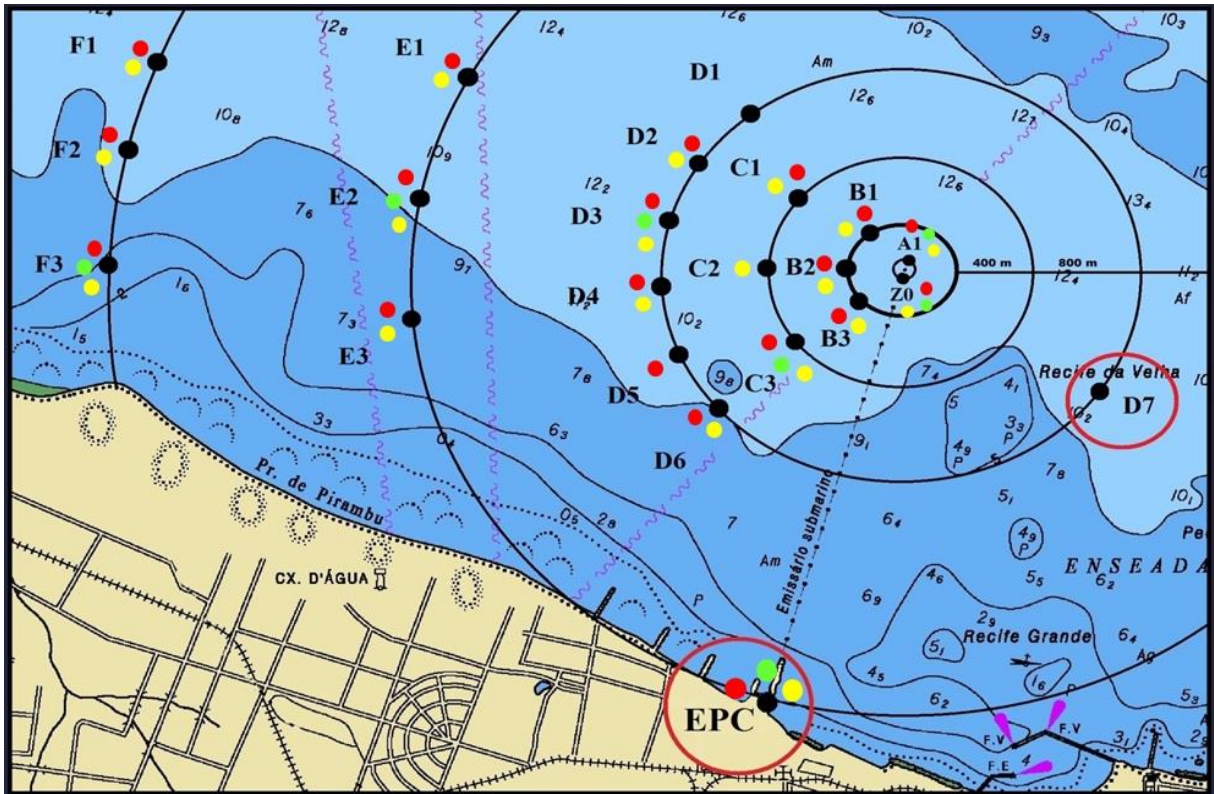
A produção de biofilme por *Enterococcus* sp., isolados de amostras de água, e de outras variedades de amostras ambientais tem sugerido que estas estirpes possuam outros fatores de virulência podendo ser de grande utilidade inclusive para a sua sobrevivência em diferentes ambientes (LANTHIER *et al.*, 2010).

Estudos recentes têm mostrado que a ocorrência do gene *Esp* em isolados de *Enterococcus* sp. não tem sido útil para indicar, quando rastreada, que a contaminação de um determinado ambiente está relacionada a dejetos humanos, pois não tem sido significativa quando comparados fezes humanas, de animais domésticos, de aves e de animais selvagens (WHITMAN *et al.*, 2007; BYAPPANAHALLI *et al.*, 2008; LAYTON *et al.*, 2009).

O impacto causado ao meio associado a fatores ambientais parece afetar a disseminação dos fatores de virulência nas bactérias, principalmente em locais onde há despejo de contaminantes hospitalares, esgoto domésticos e efluentes industriais (LATA *et al.*, 2009).

Na figura 11 estão marcadas as estações do entorno da pluma do emissário submarino que apresentaram estirpes resistentes aos antimicrobianos testados, positivas para algum dos testes fenotípicos de virulência e ocorrência de resistência plasmidial.

Figura 11 – Mapa de localização do emissário de Fortaleza – CE indicando as estações que apresentaram estirpes resistentes aos antimicrobianos testados, positivas para algum dos testes fenotípicos de virulência e resistência plasmidial.



Legenda - ●: Estações de coleta; ●: Ocorrência de resistência a algum antimicrobiano; ●: Ocorrência de resistência plasmidial entre as estirpes isoladas; ●: Ocorrência de positividade para algum dos testes de virulência.

As informações sobre as estirpes isoladas das estações do emissário submerso de Fortaleza, no que diz à positividade ou não aos testes realizados estão dispostos no anexo 1.

CONCLUSÕES

- A ocorrência de bactérias do gênero *Enterococcus* no entorno da pluma do emissário submarino de Fortaleza – CE indica que o tratamento dado ao efluente na EPC não tem sido adequado, o que pode vir a comprometer o ecossistema da área de despejo;
- A presença de estirpes com múltipla resistência aos antimicrobianos somada a positividade para outros fatores de virulência pode ser indicativa de risco para a saúde pública, se essas estirpes chegarem a atingir as áreas de praia utilizadas por banhistas;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M.; AGERSO, Y.; GERNER-SMIDT, P.; MADSEN, M.; JENSEN, L. B. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 37, n. 2, p. 127–137, 2000.
- AARESTRUP, F. M.; BUTAYE, P.; WITTE, W. Nonhuman reservoirs of enterococci. In: GILMORE, M. S.; CLEWELL, D. B.; COURVALIN, P.; DUNNY, G. M.; MURRAY, B. E.; RICE L. B. **The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. Washington D.C.: American Society for Microbiology. 2002. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1854/LU-923365>>. Acesso em: 21, mai. 2012.
- ABESSA, D. M. S.; CARR, R. S.; RACHID, B. R. F.; SOUSA, E. C. P. M.; HORTELANI, M. A.; SARKIS, J. E. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 8, p. 875-885, 2005.
- ABESSA, D. M. S.; CARR, R. S.; SOUSA, E. C. P. M.; RACHID, B. R. F.; ZARONI, L. P.; PINTO, Y. A. Integrative ecotoxicological assessment of a complex tropical estuarine system. In: HOFFER T. N. **Marine Pollution: new research**, New York: Nova Science Publishers Inc., p. 125-159, 2008.
- ABESSA, D. M. S.; IMAI, R. S.; HARARI, J. Toxicidade da Água na Baía de Santos. In: BRAGA, E. S., organizadora. **Oceanografia e Mudanças Globais**, São Paulo: IOUSP; p. 659-668, 2008.
- ABESSA, D. M. S.; RACHID, B. R. F.; MOSER, G. A. O.; OLIVEIRA, A. J. F. C. Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos: uma revisão. **Mundo da Saúde**, v. 36, n. 4, p. 643-661, 2012.
- ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; MOLINOS, A. C.; LOPEZ, R. L.; GRANDE, M. J.; MARTINEZ-VIEDMA, P.; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M. M.; GALVEZ, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, n. 2, p. 38-49, 2008.
- AHMED, W.; SIDHU, J. P. S.; TOZE, S. Speciation and frequency of virulence genes of *Enterococcus* spp. isolated from rainwater tank samples in Southeast Queensland, Australia. **Environmental Science and Technology**, n. 46, p. 6843–6850, 2012.
- AKOND, M. A.; HASSAN, S. M. R.; ALAM, S.; SHRIN, M. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. **American Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 1, p. 47-52, 2009.
- AL-BAHRY, S. N.; MAHMOUD, I.Y.; AL-BELUSHI, K. I.; ELSHAFIE, A. E.; AL-HARTHY, A.; BAKHEIT, C. K. Coastal sewage discharge and its impact on fish with reference to antibiotic resistant enteric bacteria and enteric pathogens as bio-indicators of pollution. **Chemosphere**, v. 77, n. 11, p. 1534–1539, 2009.

AMBIENTE BRASIL. Disponível em:

<<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./biotecnologia/index.html&conteudo=./biotecnologia/artigos/bacterias.html>>. Acesso em: 31 de março de 2009.

APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: Microbes and Disease. **Brazilian Journal Infectious Diseases**. v. 12, n. 6, p. 526-530, 2008.

ARAÚJO, A. L. C.; MELO, L. E. L.; DINIZ, R. F. A influência da estação chuvosa na balneabilidade. 26o. Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais...**, 2011. Porto Alegre: ABES, Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental.

ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2151-2156, 2001.

ARVANITIDOU, M.; KATSOUYANNOPOULOS, V.; TSAKRIS, A. Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing waters. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 1001-1005, 2001.

BASINGER, S. F.; JACKSON, R. W. Bacteriocin (hemolysin) of *Streptococcus zymogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 96, n. 6, p. 1895-1902, 1968.

BAYA, A. M.; BRYTON, P. R.; BROWN, V. L.; GRIMES, D. J.; RUSSEK-COHEN, E.; COWELL, R. R. Coincident plasmids and antimicrobial resistance in marine bacteria isolated from polluted and unpolluted Atlantic Ocean samples. **Applied Environmental Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1285-1292, 1986.

BELGACEM, Z. B.; ABRIQUEL, H.; OMAR, N. B.; LUCAS, R.; MARTÍNEZ-CANAMERO, M.; GÁLVEZ, A.; MANAI, M. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. **Food Control**, v. 21, p. 462-470, 2010.

BENDER, E. A.; FREITAS, A. L. P.; REITER, K. C.; LUTZ, L.; BARTH, A. L. Identification, antimicrobial resistance and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 693-700, 2009.

BLEIWEIS, A. S.; ZIMMERMAN, L. N. Properties of proteinase from *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v. 88, n. 3, p. 653-659, 1964.

BONILLA, T. D.; NOWOSIELSKI, K.; ESIÖBU, N.; MCCORQUODALE, D. S.; ROGERSON, A. Species assemblages of *Enterococcus* indicate potential sources of fecal bacteria at a south Florida recreational beach. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 7, p. 800-815, 2006.

BRASIL, **Resolução N° 274**. Brasília: Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, 2000.

BRASIL, **Resolução N° 357**. Brasília: Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, 2005.

BRASIL, **Resolução N° 430**. Brasília: Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, 2011.

BRENNER, D. J. Enterobacteriaceae. *In*: KRIEG, N, R.; HOLTZ, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore. Williams & Wilkins, 1984.

BYAPPANAHALLI, M. N.; PRZYBYLA-KELLY, K.; SHIVELY, D. A.; WHITMAN, R. L. Environmental occurrence of the enterococcal surface protein (*esp*) gene is an unreliable indicator of human fecal contamination. **Environmental Science Technology**, v. 42, n. 21, p. 8014–8020, 2008.

CARVALHO, E. M. R.; CARVALHO, F. C. T.; ARAÚJO, A. J. G.; PEREIRA, S. P.; VIEIRA, R. H. S. F. Identificação fenotípica de estirpes *Enterococcus* spp. isoladas do entorno do emissário oceânico de Fortaleza – Ce. *In*: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XLVI, 2010, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu – PR. 2010.

CASSENEGO, A. P. V. **Avaliação da colonização e resistência antimicrobiana de *Enterococcus* spp. isolados de “swabs” cloacais de frango de corte**. 2010. 89f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CASTRO, M. G. G. M.; ARAUJO, F. F. P.; SOUZA, J. W. H. Sistema de monitoramento e controle dos recursos hídricos da região metropolitana de Fortaleza – Ceará. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 19, 1997, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul – RS, 1997. p. 2203-2212.

CAUWERTS, K.; DECOSTERE, A.; GRAEF, E. M.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. **Avian Pathology**, v. 36, n. 5, p. 395-399, 2007.

CETESB 2006 - **Emissários submarinos: projeto, avaliação de impacto ambiental e monitoramento – Submarine outfalls: design, compliance and environmental monitoring**. LAMPARELLI, C. C.; ORTIZ, J. P.; AVANZINI, C.; MORITA, D.; ARASAKI, E.; JIRKA, G.; ALFREDINI, P.; SOBRINHO, P. A.; DONEKER, R.; BLENINGER, T. Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo. 2006. p. 240.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Review**, v. 13, n. 4, p. 686-707, 2000.

CHANDRASEKARAN, S.; VENKATESH, B.; LALITHAKUMARI, D. Transfer and expression of a multiple antibiotic resistance plasmid in marine bacteria. **Current Microbiology**, v. 37, p. 347–351, 1998.

CHENOWETH, C; SCHABERG, D. The epidemiology of enterococci. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v. 9, n. 2, p. 80-89, 1990.

CHIEW, Y. F.; HALL, M. C. Comparison of three methods for the molecular typing of Singapore isolates of enterococci with high-level aminoglycosides resistances. **The Journal of Hospital Infection**, v. 38, n. 3, p. 223-230, 1998.

- CHOI, S.; CHU, W.; BROWN, J.; BECKER, S. J.; HARWOOD, V. J.; JIANG, S. C. Application of enterococci antibiotic resistance patterns for contamination source identification at Huntington Beach, California. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 6, p. 748-755, 2003.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, cations, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.
- CHOW, J. W.; KAK, V.; YOU, I.; KAO S. J.; PETRIN, J.; CLEWELL, D. B.; LERNER, S. A.; MILLER, G. H.; SHAW, K. J. Aminoglycoside resistance genes *aph(2'')-Ib* and *aac(6')-Im* detected together in strains of both *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 45, n. 10, p. 2691-2694, 2001.
- CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; BISNO, A. L.; BEACHEY, E. H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infectious and Immunity**, v. 37, n. 1, p. 318-326, 1982.
- CLAUS, G. W. **Understanding Microbes: A Laboratory Textbook for Microbiology**. New York. W. H. FREEMAN. 1989. p. 250 – 252.
- CLEWELL, D. B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. **Cell**, v. 73, n. 1, p. 9-12, 1993.
- CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement: Supplement M100-S20, Wayne, PA, USA, 2011.
- COLLINS, M. D.; FACKLAM, R. R.; FARROW, J. A. E.; WILLIAMSON, R. *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. **FEMS Microbiology Letters**, v. 57, p. 283-288, 1989.
- COLLINS, M. D.; FARROW, J. A. E.; JONES, D. *Enterococcus mundtii* sp. nov. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 8-12, 1986.
- COLLINS, M. D.; JONES, D.; FARROW, J. A. E.; KILPPER-BÄLZ, R.; SCHLEIFER, K. H. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, n. 2, p. 220-223, 1984.
- CONSELHO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS – CCE. Directiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Fevereiro de 2006, relativa à gestão das águas balneares e que revoga a directiva 76/160/CE. **Jornal Oficial**, p. 37-51, 2006.
- CORRÊA, A. A.; FUENTEFRÍA, D. B.; CORÇÃO, G. Resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* isolados de amostras de fezes de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 2, p. 155-159, 2005.

- CRETI, R.; IMPERI, M.; BERTUCCINI, L.; FABRETTI, F.; OREFICI, G.; ROSA, R. D.; BALDASSARRI, L. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. **Journal of Medical Microbiology**, n. 53, p. 13-20, 2004.
- D'AZEVEDO, P. A.; DIAS, C. A. G.; LEMOS, S. B.; BITTENCOURT, J. A. F.; TEIXEIRA, L. M. Antimicrobial susceptibility among *Enterococcus* isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 199-204, 2004.
- DADA, A.; ASMAT, A.; GIRES, U.; HENG, L. Y. Antibiotic resistance and virulence among *Enterococci* isolated from Teluk Kemang Beach, Malaysia. **Our Nature**, v. 10, n. 1, p. 217-232, 2012.
- DANG, H.; ZHANG, X.; SONG, L.; CHANG, Y.; YANG, G. Molecular characterizations of oxytetracycline resistant bacteria and their resistance genes from mariculture waters in China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 11, p. 1494–1503, 2006.
- DEVRIESE, L. A.; POT, B.; COLLINS, M. D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 5, p. 399-408, 1993.
- DICUONZO, G.; GHERARDI, G.; LORINO, G.; ANGELETTI, S.; BATTISTONI, F.; BERTUCCINI, L. Antibiotic resistance and genotypic characterization by PFGE of clinical and environmental isolates of enterococci. **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, n. 2, p. 205–211, 2001.
- EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.
- ELMIR, S. M.; WRIGHT, M. E.; ABDELZAHER, A. *et al.* Quantitative evaluation of bacteria released by bathers in a marine water. **Water research**, v. 41, n. 1, p. 3–10, 2007.
- EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - Genus *Enterococcus*. Disponível em: < <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>>. Acesso em 23. Mai. 2013.
- FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G.; TEIXEIRA, A. L. M. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: GILMORE, M. S. **The enterococci pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. Washington, DC. American Society for Microbiology. 2002.
- FACKLAM, R. R.; COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 731 – 734, 1989.
- FACKLAM, R. R.; SAHM, D. F.; TEIXEIRA, A. L. M. *Enterococcus*. In: MURRAY, P. R. *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed. Washington DC. ASM. 1999.

- FARROW, J. A. E.; COLLINS, M. D. *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, n. 1, p. 73-75, jan. 1985.
- FERGUSON, D. M.; MOORE, D. F.; GETRICH, M. A.; ZHOWANDAI, M. H. Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in Southern California. **J Applied Microbiology**, v. 99, p. 598–608, 2005.
- FLUIT, A. C.; JONES, M. E.; SCHMITZ, F-J.; ACAR, J.; GUPTA, R.; VERHOEF, J. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. **Clinical Infectious Disease**, v. 30, n. 3, p. 454-460, 2000.
- FORTIN, M.; MESSIER, S.; PARÉ, J.; HIGGINS, R. Identification of catalase-negative, non-beta-hemolytic, Gram-positive cocci isolated from milk samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 106-109, 2003.
- FRANZ, C. M. A. P.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A. B.; YOUSIF, N. M. K.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; HOLZAPFEL, W. H. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4385-4389, 2001.
- FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, n. 8, p. 872-874, 1989.
- FREITAS, S. **Proposta de metodologia de projeto de sistemas de disposição oceânica de esgotos sanitários, em localidades de pequeno porte**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- FUJIOKA, R. S. Indicators of marine recreational water quality. *In: Manual of Environmental Microbiology*. HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; McINERNEY, M. J.; STET ZENBACH, L. M.; WALTER, M. V. Washington, D. C. ASM. 1997. p. 176-183.
- FUJIOKA, R.S. Indicators of marine recreational water quality. *In: Manual of Environmental Microbiology*. Washington DC. 2001.
- FURTADO, G. H. C.; MARTINS, S. T.; COUTINHO, A. P.; WEY, S. B.; MEDEIROS, E. A. S. Prevalence and factors associated with rectal vancomycin-resistant enterococci colonization in two intensive care units in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n.1, p. 64-69, 2005
- FURUMURA, M., T.; CARBONELL, G. V.; LEMES-MARQUES, E. G.; DARINI, A. L. C.; YANO, T. Características de hemolisina termo-estável produzida por *Enterococcus faecalis* provenientes de 102 infecções hospitalares. *In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, XXI*, 2001. Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu – PR, 2001, p.113.
- GAMA, B. A. **Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus spp.*** 2008, 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Pós-Graduação em

Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GENTHNER, F. J.; JAMES, J. B.; YATES, D. F.; FRIEDMAN, S. D. Use of composite data sets for source-tracking enterococci in the water column and shoreline interstitial waters on Pensacola Beach, Florida. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 7, p. 724-732, 2005.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from lactobacillus isolates to other Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 225, n. 1, p. 125-130, 2003.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Review**, v. 26, n. 2, p. 163-171, 2002.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; HOUTE, J. The prevalence of enterococci in the human mouth and their pathogenicity in animal models. **Archives of Oral Biology**, v. 20, p. 473-477, 1975.

GOLDMANN, D. A. Vancomycin resistant *Enterococcus faecium*: Headline News. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 13, n. 12, p. 695-699, 1992.

GONÇALVES, F. B.; SOUZA, A. P. **Disposição Oceânica de Esgotos Sanitários: História, Teoria e Prática**. Rio de Janeiro. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária. 1997. p. 348.

GONZALEZ III, L. S.; SPENCER, J. P. Aminoglycosides: A Practical Review. **American Academy of Family Physicians**, v.58, n. 8, p. 1811-1820, 1998.

GORDTS, B.; LANDUYT, H.; IEVEN, M.; VANDAMME, P.; GOOSSENS, H. Vancomycin resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2842-2846, 1995.

GRACE, R. A. **Marine Outfall Construction: Background, Techniques, and Case Studies**. Reston, Virginia. 2009.

GROSS, K. C.; HOUGHTON, M. P.; SENTERFIT, L. B. Presumptive speciation of *Streptococcus bovis* and other Group D Streptococci from human sources by using arginine and pyruvate tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 54-60, 1975.

HANCOCK, L. E.; GILMORE, M. S. Pathogenicity of Enterococci. *In: Gram-Positive Pathogens*. FISCHETTI, V.; NOVICK, R.; FERRETTI, J.; PORTNOY, D.; ROOD, J. Washington D.C. Ed. American Society for Microbiology. 2000.

HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Society for Applied Bacteriology Symposium Series**, v. 26, p. 1S-11S, 1997.

HAWKES, H. A. **Microbial Aspects of Pollution**. London. Academic Press. 1971.

HENKES, W. E. **Identificação de *Enterococcus* sp. e resistência a antimicrobianos em amostras de regiões costeiras da Lagoa dos Patos**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em

Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

HENRIQUE, P. M. **Caracterização molecular de elemento Van A em enterococos com genótipo e fenótipo discrepantes relativos à resistência aos glicopeptídeos.** 2007. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São paulo, Ribeirão Preto, 2007.

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

HOLMBERG, S. D.; WELLS, J. G.; COHN, M. L. Animal to-man transmission of antimicrobial-resistant Salmonella: investigation of U.S. outbreaks, 1971–1983. **Science**, v. 225, n. 4664, p. 833–835, 1984.

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

HUYCKE, M. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. S. Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging Infectious Disease**, v. 4, n. 2, p. 239-249, 1998.

HUYS, G.; D’HAENE, K.; COLLARD, J-M.; SWINGS, J. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. **Applied and Environmental Microbiologist**, v. 70, n. 3, p. 1555-1562, 2004.

IKE, Y., CLEWELL, D. B. Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *zymogenes* can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. **Journal Bacteriology**, v. 174, n. 24, p. 8172-8177, 1992.

IKE, Y.; CLEWELL, D.; SEGARRA, R.; GILMORE, M. Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 1, p. 155-163, 1990.

IVERSEN, A.; KÜHN, I.; FRANKLIN, A.; MÖLLBY, R. High prevalence of vancomycin-resistant *Enterococci* in Swedish sewage. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2838–2842, 2002.

JETT, B. D., GILMORE, M. S. The growth-inhibitory effect of the *Enterococcus faecalis* bacteriocin encoded by pAD1 extends to the oral streptococci. **Journal of Dental Research**, v. 69, n. 10, p. 1640-1645, 1990.

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Review**, n. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.

JONES, R. N.; DESHPANDE, L. M. Distribution of *fsr* among *Enterococcus faecalis* isolates from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 4004-4005, 2003.

JORGENSEN, J. H.; TURNIDGE, J. D.; WASHINGTON, J. A. Antimicrobial susceptibility testing: dilution and disk diffusion. *In*: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 2005. cap. 118.

JUNCO, M. T. T.; MARTÍN, M. G.; TOLEDO, M. L. P.; GÓMEZ, P. L.; BARRASA, J. L. M. Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 203, n. 4, p. 363-368, 2001.

KAÇMAZ, B.; AKSOY, A. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 6, p. 535-538, 2005.

KAK, V.; CHOW, J. W. Acquired antibiotic resistances in enterococci. *In*: Gilmore, M. S.; Clewell, D. B.; Courvalin, P.; Dunny, G. M.; Murray, B. E.; Rice, L. B. **The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. Whashington, ASM. 2002.

KALINA, A. P. The taxonomy and nomenclature of enterococci. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 20, n. 2, p. 185-189, 1970.

KAYAOGU, G.; ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004.

KHAN, S. A.; NAWAZ, M. S.; KHAN, A. A.; HOPPER, S. L.; JONES, R. A.; CERNIGLIA, C. E. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, n. 1, p. 27-34, 2005.

KIM, J. H.; GRANT, S. B.; MCGEE, C. D.; SANDERS, B. F.; LARGIER, J. L. Locating sources of surf zone pollution: a mass budget analysis of fecal indicator bacteria in Huntington Beach, California. **Environmental Science and Technology**. v. 38, n. 9, p. 2626-2636, 2004.

KIMIRAN-ERDEM, A.; ARSLAN, E. O.; YURUDU, N. O. S.; ZEYBEK, Z.; DOGRUOZ, N.; COTUK, A. Isolation and identification of Enterococci from seawater samples: assessment of their resistance to antibiotics and heavy metals. **Environmental Monitoring and Assessment**, n. 125, p. 219-228, 2007.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; BADSTÜBNER, D.; WERNER, G.; WITTE, W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 1-2, p. 269-290, 2003.

KONEMANN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. D.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro, MEDSI, 2001.

KREFT, B.; MARRE, R.; SCHRAMM, U.; WIRTH, R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 1, p. 25-30, 1992

- KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic indexing of *Escherichia coli* to identify high risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 165-170, 1983.
- KÜHN, I.; IVERSEN, A.; FINN, M.; GREKO, C.; BURMAN, L. G.; BLANCH, A. R.; VILANOVA, X.; MANERO, A.; TAYLOR, H.; CAPLIN, J.; DOMÍNGUEZ, L.; HERRERO, I. A.; MORENO M. A.; MÖLLBY, R. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant *Enterococci* in animals, humans, and the environment in different european regions. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5383-5390, 2005.
- LANTHIER, M.; SCOTT, A.; LAPEN, D. R.; ZHANG, Y.; TOPP, E. Frequency of virulence genes and antibiotic resistances in *Enterococcus* spp. isolates from wastewater and feces of domesticated mammals and birds, and wildlife. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 715–729, 2010.
- LATA, P.; RAM, S.; AGRAWAL, M.; SHANKER, R. Enterococci in river Ganga surface waters: Propensity of species distribution, dissemination of antimicrobial-resistance and virulence-markers among species along landscape. **BMC Microbiology**, n. 9, p. 140, 2009.
- LATA, P.; RAM, S.; AGRAWAL, M.; SHANKER, R. Real time PCR for the rapid detection of *vanA* gene in surface waters and aquatic macrophyte by molecular beacon probe. **Environmental Science and Technology**, v.43, n. 9, p. 3343-3348, 2009.
- LAYTON, B. A.; WALTERS, S. P.; BOEHM, A. B. Distribution and diversity of the enterococcal surface protein (*esp*) gene in animal hosts and the Pacific coast environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 5, p. 1521–1531, 2009.
- LAZAROVA, V.; SAVOYE, P.; JANEX, M. L.; BLATCHLEY III, E. R.; POMMEPUY, M. Advanced wastewater disinfection technologies: State of the art and perspectives. **Water Science and Technology**, v. 40, ed. 4-5, p. 203-213, 1999.
- LAZO, J. S.; BRUNTON, L. L.; PARKER, K. L. **Goodman e Gimán, as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro. McGraw Hill. 2006.
- LECLERC, H.; DEVRIESE, L. A.; MOSSEL, D. Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 5, p. 459-466, 1996.
- LECLERCQ, R.; COURVALIN, P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 2727-2734, 2002.
- LEECASTER, M. K., WEISBERG, S. B. Effect of sampling frequency on shoreline microbiology assessments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 11, p. 1150-1154, 2001.
- LEME, I. L.; FERREIRA, A. J. P. Enterococcias. In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. 2 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2001.

- LESTER, C. H.; FRIMODT-MØLLER, N.; SØRENSEN, T. L.; MONNET, D. L.; HAMMERUM, A. M. In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. **Ant Agents Chemother**, v. 50, n. 2, p. 596–599, 2006.
- LIGOZZI, M.; BERNINI, C.; BONORA, M. G.; FATIMA, M.; ZULIANI, J.; FONTANA, R. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant Gram-positive Cocci. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 5, p. 1681-1686, 2002.
- LIGOZZI, M.; PITTALUGA, F.; FONTANA, R. Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 2, p. 354-357, 1996.
- LLEÒ M. M.; BONATO, B.; BENEDETTI, D.; CANEPARI, P. Survival of enterococcal species in aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, n. 2, p. 189-196, 2005.
- LOPES, F. F. P.; SANTOS, A. A. M. S.; DANTAS, M. C. S.; STEMPLIUK, V. A. Monitoramento e prevenção da resistência Microbiana em Serviços de Saúde. Organização Pan-Americana da saúde (OPAS/OMS) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2006. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/index.htm>. Acesso: 27 out. 2012.
- LOWE, A. M.; LAMBERT, P. A.; SMITH, A. W. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 2, p. 703-706, 1995.
- LUDWIG, R. G. **Environmental Impact Assessment** – Siting and design of submarine outfalls. Monitoring and Assessment Research Centre, WHO, Londres, 1988.
- LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and Fungal Biofilms Infections. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 415-428, 2008.
- MAKINEN, P. L.; MAKINEN, K. K. The *Enterococcus faecalis* extracellular metalloendopeptidase inactivates human endothelin at bonds involving hydrophobic amino acid residues. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 200, n. 2, p. 981–985, 1994.
- MARQUES, E. B.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 1069-1073, 2004.
- MARTÍN-PLATERO, A. M.; VALDIVIA, E. ; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO. M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 24-32, 2009.
- MAZEL, D.; DAVIES, J. Antibiotic resistance in microbes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 742–754, 1999.

McGOWAN-SPICER, L. L.; FEDORKA-CRAY, P. J.; FRYE, J. G.; MEINERSMANN, R. J.; BARRETT, J. B.; JACKSON, C. R. Antimicrobial resistance and virulence of *Enterococcus faecalis* isolated from retail food. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 4, p. 760–769, 2008.

MEIRELLES-PEREIRA, F.; PEREIRA, A. M. S.; SILVA, M. C. G.; GONÇALVES, V. D.; BRUM, P. R.; CASTRO, E. A. R.; PEREIRA, A. A.; ESTEVES, F. A.; PEREIRA, J. A. A. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 4, p. 287-293, 2002.

MIYAZAKI, S.; OHNO, A.; KOBAYASHI, I.; UJI, T.; YAMAGUCHI, K., GOTO. S. Cytotoxic effect of hemolytic culture supernatant from *Enterococcus faecalis* on mouse polymorphonuclear neutrophils and macrophages. **Microbiology and Immunology**, v. 37, n. 4, p. 265-270, 1993.

MOLINA-AJA, A.; GARCIA-GASCA, A.; ABREU-GROBOIS, A.; BOLAN-MEJIA, C.; ROQUE, A.; GOMEZ-GILL, B. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 213, n. 1, p. 7-12, 2002.

MONDINO, S. S. B.; CASTRO, A. C. D.; MONDINO, P. J. J.; CARVALHO, M. G. S.; SILVA, K. M. F.; TEIXEIRA, L. M. Phenotypic and genotypic characterization of clinical and intestinal enterococci isolated from inpatients and outpatients in two Brazilian hospitals. **Microbiology Drug Resistance**. v. 9, n. 2, p. 167-174, 2003.

MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 73-87, 2009.

MUDRYK, Z. J. Occurrence and distribution antibiotic resistance of heterothrophic bacteria isolated from a marine beach. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 1, p. 80–86, 2005.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. S. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 513-522, 2000.

MURRAY, B. E.; WEINSTOCK, G. M. Enterococci: new aspects of an old organism. **Proceedings of the Association of American Physicians**, n. 111, p. 328-334, 1999.

NALLAPAREDDY, S. R.; WENXIANG, H.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5709-5718, 2005.

NEUMANN, C. A.; HARDING, A. K, SHERMAN, J. M. Oregon Beach monitoring program: bacterial exceedances in marine and freshwater creeks/outfall samples, October 2002 – April 2005. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 1270-1277, 2006.

O'TOOLE, G. A.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

OLIVEIRA, A. J. F. C.; PINHATA, J. M. W. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. **Water Research**, v. 42, n. 8-9, p. 2242-50, 2008.

ONO, S.; MURATANI T.; MATSUMOTO, T. Mechanisms of resistance to imipenem and ampicillin in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2954-2958, 2005.

OROZCO-BORBÓN, M. V.; RICO-MORA, R.; WEISBERG, S. B.; NOBLE, R. T.; DORSEY, J. H.; LEECASTER M. K., MCGEE C. D. Bacteriological water quality along the Tijuana-Ensenada, Baja California, México shoreline. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 1190-1196, 2006.

PECHÉRE, J. C. Introduction. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 18, n. 1, S1-S2, 2001.

PEREIRA, B. J. G. G. **Análise molecular de factores de virulência em *Enterococcus* spp. de animais**. 2010, 68 f. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular Comparativa), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, Portugal. p. 68, 2010.

PEREIRA, S. P. **Modelagem da qualidade bacteriológica das águas costeiras de Fortaleza (Nordeste do Brasil)**. 2012. 176 f. Tese (Doutorado em Eng. Civil) – Departamento de Engenharia Hidraulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

PIANETTI, A.; BRUSCOLINI, F.; SABATINE, L.; COLANTONI, P. Microbial characteristics of marine sediments in bathing area along Pesaro-Gabicce coast (Italy): a preliminary study. **Journal Applied Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 682–689, 2004.

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

PINTO, B.; PIEROTTI, R.; CANALE, G.; REALI, D. Characterization of faecal streptococci as faecal pollution and distribution in the environmental. **Letters in Applied Microbiology**, n. 29, p. 258-263, 1999.

POETA, P.; IGREJAS, G.; COSTA, D.; SARGO, R.; RODRIGUES, J., TORRES. C. Virulence factors and bacteriocins in faecal enterococci of wild boars. **Journal of Basic Microbiology**. v. 48, n. 5, p. 385-392, 2008.

PRIETO, M. D.; LOPEZ, B.; JUANES, J. A.; REVILLA, J. A.; LLORCA J.; DELGADO-RODRIGUEZ, M. Recreation in coastal waters: health risks associated with bathing in sea water. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 55, p. 442-447, 2001.

PRÜSS, A. A review of epidemiological studies from exposure to recreational water. **International Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 1, p. 1-9, 1998.

QUIÑONES, D.; GOÑI, P.; RUBIO, M. C.; DURAN, E.; GÓMEZ-LUS, R. *Enterococci* spp. isolated from Cuba: species frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile. **Diagnostic Microbiology and infectious Disease**, v. 51, n. 1, p. 63-67, 2005.

RACHID, B. R. F. **Avaliação ecotoxicológica dos efluentes domésticos lançados pelos sistemas de disposição oceânica da Baixada Santista**. São Paulo. USP: Instituto Oceanográfico. 2002. p. 286.

REMONATTO, G.; BOLZAN, V.; ZANCHI, A. C.; D'AZEVEDO, P. A. Detecção molecular da resistência bacteriana - Ênfase para *Enterococcus* e *Streptococcus*. **News Lab**, Ed. 70, p. 100-112, 2005.

RETSEMA, J.; FU, W. Macrolides: structures and microbial targets. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 18, S3-S10. 2001

ROBERTS, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, p. 195-203, 2005.

RODGERS-GRAY, T. P.; JOBLING, S.; MORRIS, S.; KELLY, C.; KIRBY, S.; JANBAKSH, A.; HARRIES, J. E.; WALDOCK, M. J.; SUMPTER, J. P.; TYLER, C. R. Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. **Environmental Science Technology**, v. 34, p. 1521-1528, 2000.

ROSENBERG, J.; TENOVER, F. C.; WONG, J.; JARVIS, W.; VUGIA, D. J. Are clinical laboratories in California accurately reporting vancomycin-resistant enterococci? **Journal Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2526-2530, 1997.

ROSS, J. I.; EADY, E. A.; COVE, J. H.; CUNLIFFE, W. J. 16S-rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 7, p. 1702-1705, 1998.

SALAS, H. J. Submarine Outfalls a Viable Alternative for Sewage Discharge of Coastal Cities in America and Caribbean. **Pan American Center for Sanitary Engineering and Environmental Sciences (CEPIS)**. Division of Health Environment / Pan American Organization OPS/CEPIS/PUB/00.57. nov. 2000.

SÁNCHEZ, J.; BASANTA, A.; GÓMEZ-SALA, B.; HERRANZ, C.; CINTAS, L. M.; HERNÁNDEZ, P. E. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of 48 bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 295-305, 2007.

SANDAA, R-A.; ENGER, Ø. Transfer in marine sediments of the naturally occurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4234-4238, 1994.

SANDOE, J. A.; WITHERDEN, I. R.; SETTLE, C. Vertebral osteomyelitis caused by *Enterococcus raffinosus*. **J Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1678-1679, 2001.

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

SATO, M. I. Z.; BARI, M. D.; LAMPARELLI, C.C. ; TRUZZI, A. C.; COELHO, M. C. L. S.; HACHICH, E. M. Sanitary quality of sands from marine recreational beaches of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36 n. 4, p. 321–326, 2005.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, C. N.; EISENSTEIN, I. B.; MEDOFF, G. **Mechanisms of microbial disease**. 3 ed. Ed. Lippincott, Williams & Wilkins. 1999.

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

SCHWARTZ, T.; KOHNEN, W.; JANSEN, B.; OBST, U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, n. 3, p. 325-335, 2003.

SEMEDO, T.; SANTOS, M. A.; LOPES, M. F. S.; MARQUES, J. J. F.; CRESPO M. T. B.; TENREIRO, R. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: A common trait in the genus? **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 13-22, 2003.

SHANKAR, V.; BAGHDAYAN, A. S.; HUYCKE, M. M.; LINDAHL, G.; GILMORE M. S. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 193-200, 1999.

SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**. v. 4, n. 2, p. 215-224, 2002.

SILVA, A. J.; LOYOLA, P. S.; GALLEGUILLOS, O. J.; RODRÍGUEZ, G. Y.; COLQUE-NAVARRO, P.; MÖLLBY, R.; KÜHN, I. Prevalencia de enterococos resistentes a antibióticos em águas servidas em el Chile. **Revista Médica del Chile**, v. 133, n. 10, p. 1201-1210, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Contagem de *Enterococcus*. In: **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos**. São Paulo. Varela, 1997.

SILVA, P. R. F. G.; MEIRELES, A. J. A. Avaliação Geológica Da Área De Influência Do Sistema De Disposição Oceânica Dos Esgotos Sanitários De Fortaleza, Ceará, Brasil. **Arquivo de Ciências do Mar**, v. 43, n. 1, p. 96-101, 2010.

SIMJEE, S.; GILL, M. J. Gene transfer, gentamycin resistance and enterococci. **Journal of Hospital Infection**, Birmingham, v. 36, n. 4, p. 249-259, ago, 1997.

SOUSA, J. C. **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. Porto. Edições Universidade Fernando Pessoa. 2006. p. 686.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 4, p. 387-399, 1992.

TAILOR, S. A. N.; BAILEY, E. M.; RYBAK, M. J. *Enterococcus* as emerging pathogen. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 27, n. 10, p. 1231-1242, 1993.

TANNOCK, G.W.; COOK, G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. *In: The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. GILMORE, M. S.; CLEWELL, D. B.; COURVALIN, P.; DUNNY, G. M.; MURRAY, B. E.; RICE, L. B. Washington, DC. ASM Press. 2002. p. 105.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos**. 3 ed. São Paulo. Atheneu. 2002.

TEIXEIRA, L. M.; FACKLAM, R. R. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance, *In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. Manual of Clinical Microbiology*. 8 ed. Washington, DC. ASM Press. 2004.

TENDENCIA, E. A.; PENA, L. D. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**, v. 195, p. 193–204, 2001.

TOĞAY, S. O.; KESKIN, A. C.; AÇIK, L.; TEMİZ, A. Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. **J Applied Microbiology**, v. 109, p. 1084–1092, 2010.

TOMMASI, L. R. **Impacto da disposição oceânica de esgotos municipais no ambiente costeiro: uma síntese**. Engenharia Sanitária. 1987.

TURBOW, D. J.; OSGOOD, N. D.; JIANG, S. C. Evaluation of recreational health risk in coastal waters based on *Enterococcus* densities and bathing patterns. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 4, p. 598-603, 2003.

United Nations Environment Programme (UNEP) - Global Programme of Action for the Protection of the Marine Environment from Land-based Activities (GPA). **The state of the marine environment: Trends and processes**. UNEP/GPA, Den Haag, p. 52, 2006.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1986. **Ambient water quality: criteria for bacteria**, p. 24, 1986.

USEPA. **Improved Enumeration Methods for the Recreational Water Quality Indicators: Enterococci and *Escherichia coli***. Office of Science and Technology, Washington, D C. 2000.

VALDES, D. L.; MUGUERCIA, H. L.; TORRES, M. I. H.; ARIAS, E. R.; MARÍN, R. Z.; PRADERES, L. J. Penicilinas. **Acta Medica**, v. 8, n. 1, p. 28-39, 1998.

VALENZUELA, A. S.; OMAR, N. B.; ABRIOUEL, H.; LOPEZ, R. L.; ORTEGA, E.; CANAMERO, M. M.; GALVEZ, A. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2648–2652, 2008.

VERGIS, E. N.; SHANKAR, N.; CHOW, J. W.; HAYDEN, M. K.; SNYDMAN, D. R.; ZERVOS, M. J.; LINDEN, P. K.; WAGENER, M. M.; MUDER, R. R. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. **Clinical Infectious Diseases**, v.35, n. 5, p.570-575, 2002.

VIGNESH, S.; MUTHUKUMAR, K.; JAMES, R. A. Antibiotic resistant pathogens versus human impacts: A study from three eco-regions of the Chennai coast, southern India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 4, p. 790–800, 2012.

VUYST, L.; MORENO, M. R. F.; REVETS, H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, n. 3, p. 299-318, 2003.

WHITMAN, R. L.; PRZYBYLA-KELLY, K.; SHIVELY, D. A.; BYAPPANAHALLI, M. N. Incidence of the enterococcal surface protein (*esp*) gene in human and animal fecal sources. **Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 17, p. 6090–6095, set. 2007.

WILLEMS, R. J. L.; HOMAN, W.; TOP, J.; SANTEN-VERHEUVEL, M.; TRIBE, D.; MANZIOROS, X.; GAILLARD, C.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E.; MASCINI, E. M.; KREGTEN, E.; EMBDEN, J. D. A.; BONTEN, M. J. M. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. **The Lancet**, v. 357, n. 9259, p. 853-855, 2001.

World Health Organization (WHO). **Bathing water quality and human health. Protection of the human environment water, sanitation and health**, Geneva. 2001.

World Health Organization (WHO). **Guidelines for safe recreational water environmental – Coastal and freshwater**. Geneva. v. 1, 2003

WORTH, L. J.; SLAVIN, M. A.; VANKERCKHOVEN, V.; GOOSSENS, H.; GRABSCH, E. A.; THURSKY, K. A. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* *vanB*: clonal distribution, prevalence and significance of *esp* and *hyl* in Australian patients with haematological disorders. **Journal of Hospital Infection**, v. 68, n. 2, p. 137-144, 2008.

WYER, M. D.; KAY, D.; FLEISHER, J. M.; SALMON, R. L.; JONES, F.; GODFREE, A. F.; JACKSON, G.; ROGERS, A. An experimental health-related classification for marine waters. **Water Research**, v. 33, n. 3, p. 715-722, 1999.

XIONG, L.; KORKHIN, Y.; MANKIN, A. S. Binding site of the bridged macrolides in the *Escherichia coli* ribosome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 281-288, 2005.

YANG, L.; CHANG, W-S.; HUANG, M-N. L.; Natural disinfection of wastewater in marine outfall fields. **Water Research**, v. 34, n. 3, p. 743-750, 2000.

YANG, W.; MOORE, I.; KOTEVA, K.; BAREICH, D.; HUGHES, D.; WRIGHT, G. TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 52346-52352, 2004

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

ZHOU, F.; HUANG, G. H.; HUAICHENG, G.; ZANG, W., HAO, Z. Spatio-temporal patterns and sources apportionment of coastal water pollution in eastern Hong Kong. **Water Research**, v. 41, n. 15, p. 3429-3439, 2007.

ANEXO

Anexo 1 – Informações referentes aos testes realizados com as estirpes isoladas do emissário submarino de Fortaleza - CE utilizadas no presente estudo.

Identificação			Espécie	Antimicrobianos (AMP, CLI, CLO, ST, GM, PEN, TET, VAN)		Valores de Virulência			
Numeração	Estação	Resistência		Resistência Pós-Cura Plasmidial	Gelatinase	Proteína de Superfície	Substância de Agregação	Hemólise	
1	221	C2	<i>Enterococcus hirae</i>			-	+	-	-
2	222	C2	<i>Enterococcus hirae</i>			-	+	-	-
3	233	C3	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI, EST	CLI	-	-	-	-
4	234	C3	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI	CLI	-	+	-	α
5	253	C3	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI	CLI	+	+	-	α
6	254	C3	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI	CLI	-	+	-	-
7	277	D2	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI	CLI	-	-	-	α
8	278	D2	<i>Enterococcus hirae</i>			-	+	-	α
9	295	D2	<i>Enterococcus hirae</i>			-	+	-	-
10	296	D2	<i>Enterococcus hirae</i>			-	+	-	-
11	297	D2	<i>Enterococcus hirae</i>			-	+	-	β
12	298	D2	<i>Enterococcus hirae</i>			-	-	-	α
13	303	D3	<i>Enterococcus hirae</i>			-	-	-	-
14	304	D3	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI	CLI	-	-	+	-
15	305	D3	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI		-	-	-	-
16	317	D3	<i>Enterococcus hirae</i>			-	-	-	-
17	318	D3	<i>Enterococcus hirae</i>			-	-	+	-
18	319	D3	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI	CLI	-	-	-	-
19	320	D3	<i>Enterococcus hirae</i>			-	-	-	-
20	321	A1	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI, EST		-	-	-	β
21	322	A1	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI, EST, TET	CLI, EST, TET	-	-	+	α
22	323	A1	<i>Enterococcus faecalis</i>			-	-	-	α
23	324	A1	<i>Enterococcus faecalis</i>	CLI		-	-	-	β
24	341	Z0	<i>Enterococcus faecalis</i>	CLI, EST, TET	CLI, EST, TET	-	-	-	-
25	342	Z0	<i>Enterococcus faecalis</i>	CLI,EST,GEN,TET	CLI, EST, TET	-	+	-	α
26	343	Z0	<i>Enterococcus faecalis</i>	CLI, EST	CLI	+	-	-	-
27	344	Z0	<i>Enterococcus faecalis</i>	CLI	CLI	+	-	-	-

28	357	EPC	<i>Enterococcus faecalis</i>			-	+	-	-
29	360	EPC	<i>Enterococcus raffinosus</i>	CLI	CLI	-	+	-	-
30	361	EPC	<i>Enterococcus raffinosus</i>	CLI, EST, TET	CLI, TET	-	+	-	-
31	365	EPC	<i>Enterococcus faecalis</i>			-	+	-	-
32	367	EPC	<i>Enterococcus mundtli</i>			-	-	-	-
33	368	EPC	<i>Enterococcus mundtli</i>	CLI, EST	CLI	-	-	-	-
34	369	EPC	<i>Enterococcus mundtli</i>			-	+	+	-
35	370	EPC	<i>Enterococcus faecium</i>			-	+	-	-
36	377	EPC	<i>Enterococcus faecium</i>			-	-	-	-
37	379	EPC	<i>Enterococcus faecium</i>			-	-	-	-
38	380	EPC	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI, EST	CLI, EST	-	-	+	-
39	381	EPC	<i>Enterococcus mundtli</i>	CLI, EST	CLI	+	-	-	-
40	382	EPC	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI,	CLI	+	-	+	-
41	383	EPC	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI	CLI	-	-	-	-
42	384	EPC	<i>Enterococcus faecium</i>	CLI, EST	EST	+	-	-	-
43	385	EPC	<i>Enterococcus mundtli</i>	GEN	GEN	-	-	-	-
44	386	EPC	<i>Enterococcus faecium</i>	CLI, EST, GEN	CLI, GEN	-	-	-	-
45	387	EPC	<i>Enterococcus raffinosus</i>	CLI		-	-	-	-
46	388	EPC	<i>Enterococcus faecalis</i>	AMP, CLI	AMP, CLI	+	+	-	α
47	389	B1	<i>Enterococcus faecalis</i>	CLI	CLI	+	-	-	-
48	390	B1	<i>Enterococcus faecalis</i>	CLI	CLI	-	-	-	α
49	391	B1	<i>Enterococcus faecalis</i>			-	-	-	α
50	392	B2	<i>Enterococcus mundtli</i>			-	-	-	-
51	396	B2	<i>Enterococcus mundtli</i>	CLI	CLI	-	+	-	-
52	397	B3	<i>Enterococcus faecalis</i>	CLI, EST	CLI, EST	+	-	-	β
53	398	B3	<i>Enterococcus pseudoavium</i>	CLI, EST	CLI, EST	+	+	-	-
54	399	C1	<i>Enterococcus raffinosus</i>	CLI	CLI	-	+	-	β
55	400	C1	<i>Enterococcus pseudoavium</i>	CLI	CLI	-	+	-	β
56	401	D1	<i>Enterococcus raffinosus</i>			-	-	-	-
57	404	D1	<i>Enterococcus mundtli</i>			-	-	-	-
58	405	D4	<i>Enterococcus pseudoavium</i>			-	+	+	β
59	406	D4	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI, EST, TET	CLI, EST, TET	-	+	-	-
60	407	D5	<i>Enterococcus faecium</i>	EST	EST	-	-	-	-
61	409	D5	<i>Enterococcus mundtli</i>			-	-	-	-
62	410	D6	<i>Enterococcus mundtli</i>	EST	EST	-	+	-	α

63	411	D6	<i>Enterococcus faecium</i>			-	-	-	-
64	413	E1	<i>Enterococcus faecalis</i>			+	-	-	-
65	414	E1	<i>Enterococcus faecalis</i>	CLI, TET	CLI, TET	-	-	-	-
66	415	E2	<i>Enterococcus faecalis</i>	CLI, EST, TET	CLI, EST, TET	+	+	-	-
67	416	E2	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI,EST, GEN, TET	EST,GEN,TET	-	+	-	-
68	418	E2	<i>Enterococcus hirae</i>	CLI, EST	EST	-	-	-	-
69	419	E3	<i>Enterococcus mundtti</i>			+	-	-	α
70	420	E3	<i>Enterococcus mundtti</i>	CLI, TET	CLI, TET	+	+	-	-
71	422	E3	<i>Enterococcus durans</i>	CLI	CLI	-	-	-	-
72	423	F1	<i>Enterococcus hirae</i>			+	-	-	-
73	424	F1	<i>Enterococcus mundtti</i>	CLI, TET	CLI, TET	-	-	-	β
74	426	F1	<i>Enterococcus mundtti</i>	EST, GEN	EST, GEN	-	-	-	β
75	427	F2	<i>Enterococcus hirae</i>	EST	EST	-	-	-	β
76	429	F2	<i>Enterococcus faecium</i>			-	+	-	α
77	430	F2	<i>Enterococcus faecalis</i>	CLI, EST	CLI, EST	-	-	-	β
78	431	F3	<i>Enterococcus durans</i>			-	-	-	β
79	432	F3	<i>Enterococcus faecium</i>	CLI, TET,		+	-	+	α
80	433	F3	<i>Enterococcus faecalis</i>	CLI, EST	CLI, EST	-	-	-	β