

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS
DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DAS ÁGUAS DO RIO DOS
SINOS, ESTEIO, RS.**

Trabalho de Conclusão de
Curso, para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas,
apresentado conforme as
normas técnicas do Brazilian
Journal of Microbiology.

Autor: Mariana Garcia Bahlis

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli Van Der Sand

Porto Alegre, 29 de junho de 2012.

Agradecimentos

A Dra. Sueli Van Der Sand, pela orientação, pelos momentos agradáveis e por ter confiado em mim.

As Dras. Ana Paula Guedes Frazzon e Mercedes Passos Geimba, que sempre estiveram presentes, pelas explicações, sugestões, carinho e amizade.

A Dra. Amanda de Souza da Motta pelo auxílio e paciência durante todo o semestre de monitoria.

A todas as amigas do Laboratório 164, pelas trocas de experiências e amizade, em especial à Ana Bárbara Hahn, Paula Martins e Ana Paula Basso.

Às grandes amigas Isadora Esperandio e Juliane Minotto, pelo apoio e amizade sincera durante esses mais de cinco anos.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho.

Aos meus pais, à Família Bahlis, pelo apoio e incentivo.

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DAS ÁGUAS DO RIO DOS SINOS, ESTEIO, RS.

Mariana Garcia Bahlis, Sueli Van Der Sand

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre

Resumo

Recursos hídricos como rios, lagos e lençóis subterrâneos correspondem a uma pequena porção da água doce disponível para consumo humano e, devido ao seu contato direto com o homem estes estão sendo poluídos. A água pode ser considerada como veículo para doenças causadas por microrganismos, tornando-se um risco ao bem estar da população. O Rio dos Sinos, um importante rio para o estado do Rio Grande do Sul, recebe ao longo de seu curso vários tipos de dejetos de esgotos. A resistência a antimicrobianos é um evento natural de pressão seletiva, de forma que a população microbiana deve se adaptar para sobreviver em ambientes com alta concentração dos mais diferentes compostos químicos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em bactérias Gram negativas isoladas das águas do Rio dos Sinos, buscando identificar e caracterizar a população de acordo com seu perfil de resistência aos antimicrobianos. Para isso, foram testadas 48 bactérias isoladas do Rio dos Sinos, ponto de Esteio, utilizando-se 12 antibióticos de 9 classes diferentes. Os resultados apontaram para um perfil de 75% dos isolados resistentes a pelo menos um antimicrobiano. O antimicrobiano com o maior índice de resistência foi a cefalotina (60,42%), e os mais eficientes foram o imipenem e a ceftriaxona com 100% de sensibilidade. Aproximadamente 34% dos isolados puderam ser considerados multirresistentes. Sendo 14% resistentes a duas classes de antimicrobianos, 8% a 3 e 4 classes e, 2% dos isolados foram resistentes a 5 e 6 classes de antimicrobianos. Apesar de o rio estar sendo muito poluído, os valores encontrados não foram tão elevados quanto esperado.

Palavras chave: Gram negativas, resistência, antimicrobianos.

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PROFILE OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA ISOLATED FROM RIO DOS SINOS WATERS, ESTEIO, RS

Mariana Garcia Bahlis, Sueli Van Der Sand

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre

Abstract:

Water resources like rivers, lakes and groundwater represent a small portion of the fresh water available for human consumption and because it is in direct contact with man they are been polluted all along. Water can be considered as a vector for diseases caused by microorganisms, making it a risk to the welfare of the population. Rio dos Sinos is important river for Rio Grande do Sul, it crosses many cities and along its course receives all kinds of wastewater. Resistance to antimicrobials is a natural event of selective pressure in the environment, so the microbial population must adapt to survive in environments with high concentrations of many different chemical compounds. The objective of this work was to evaluate antimicrobial susceptibility profile of Gram-negative bacteria isolated from Rio dos Sinos water, looking to identify and characterize the population according to their resistance profile to the antimicrobials used in the assay. Therefore, 48 bacteria isolated from Rio dos Sinos, at collection point in Esteio, were tested using 12 antibiotics of nine different classes. The results showed a profile of 75% of isolates resistant to at least one antimicrobial. The antibiotic with the highest rate of resistance was cephalothin (60.42%), and the most efficient were imipenem and ceftriaxone with 100% sensitivity. Approximately 34% of the isolates could be considered multiresistant of which 14% were resistant to two classes of antimicrobials, 8% at 3 and 4 classes, and 2% were resistant to 5 and 6 classes of antimicrobials. Although the river is very polluted, the values found were not as high as expected.

Key words: Gram negative, resistance, antimicrobials.

Introdução

A água é um recurso natural de valor inestimável. Mais que um insumo indispensável à produção é um recurso estratégico para o desenvolvimento econômico, é vital para a manutenção dos ciclos biológicos, geológicos e químicos que mantêm em equilíbrio os ecossistemas (8). Porém as atividades antrópicas intensas produzem muitos poluentes que, ao serem lançadas nos corpos hídricos, podem causar sérios problemas ambientais (4,18).

Recursos hídricos como lagos, rios e lençóis subterrâneos, de onde tem origem à água utilizada pela população, correspondem a uma pequena porção da água doce disponível para consumo humano. Esses locais sofrem com o contato direto e constante do homem e, conseqüentemente, acabam sendo poluídos com esgoto domésticos, industriais, agrícolas e outros tipos de resíduo (2). A água serve, também, como “veículo” de transmissão de doenças causadas por microrganismos e parasitas, tornando-se um risco à saúde e ao bem estar da população (17).

O Rio dos Sinos é um importante rio para o Rio Grande do Sul, banhando diversas das suas cidades. Nasce no município de Caraá, percorre cerca de 190 km, desembocando no delta do Jacuí, no município de Canoas (Figura 1). Ao longo do seu curso recebe vários tipos de dejetos oriundos de esgotos orgânicos e químicos, especialmente nos grandes

centros urbanos, que despejam diariamente grandes quantidades de resíduos domésticos e industriais nas suas águas (25).



Figura 1: Mapa das Estações de Tratamento de Água ao longo de toda extensão do Rio dos Sinos. Fonte: Google Earth

Os antibióticos são um dos mais importantes grupos de fármacos, amplamente usados para tratar os efeitos indesejados causados por microrganismo, e a resistência a eles é um grande desafio à medicina. A resistência pode estar naturalmente presente, tendo sido herdada de organismos da mesma espécie ao longo da divisão celular, mas pode, também, se desenvolver do contato do microrganismo com o antibiótico ou outros resíduos (1,13).

Há três principais estratégias pelas quais os microrganismos podem desenvolver resistência às drogas: produzindo enzimas que são capazes de inviabilizar o antimicrobiano; evitar a chegada da droga ao seu alvo, através de bombas de efluxo ou permeabilidade de membrana e; alterando

o alvo molecular do antimicrobiano (9). De forma geral, após o microrganismo desenvolver uma melhor estratégia de resistência, os novos genes que conferem resistência são disseminados entre organismos da mesma espécie e até mesmo para microrganismos de outras espécies através de diferentes estratégias de transferência gênica (22). Em bactérias Gram negativas o mais comum é uma combinação das duas primeiras estratégias (20).

A resistência de bactérias a antibióticos e outras drogas antimicrobianas é um fenômeno natural e de pressão seletiva. Devido ao uso indiscriminado e recorrente dos antimicrobianos, tornou-se um problema de saúde pública, pois elas são eliminadas e despejadas no ambiente sem qualquer prevenção e muitas dessas drogas são liberadas do organismo praticamente intactas (5).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em bactérias isoladas do Rio dos Sinos, especificamente do ponto de Esteio (Figura 2), uma vez que as consequências negativas desses eventos são relevantes, pois colocam a sociedade em risco pela dispersão de organismos multirresistentes patogênicos.

Materiais e Métodos

As coletas de água foram realizadas em três pontos do Rio dos Sinos (Novo Hamburgo, Três Coroas e Esteio) nas diferentes estações do ano (inverno, primavera, verão e outono). As amostras coletadas passaram por isolamento da população bacteriana através de semeadura por

esgotamento em placas contendo diferentes meios de cultura seletivos. Para esse trabalho, quarenta e oito isolados foram selecionados, todos crescidos em meio seletivo eosina azul de metileno (EMB) oriundos do ponto Esteio, pois, por ser o último ponto, é o mais impactado por resíduos de esgotos de toda região.

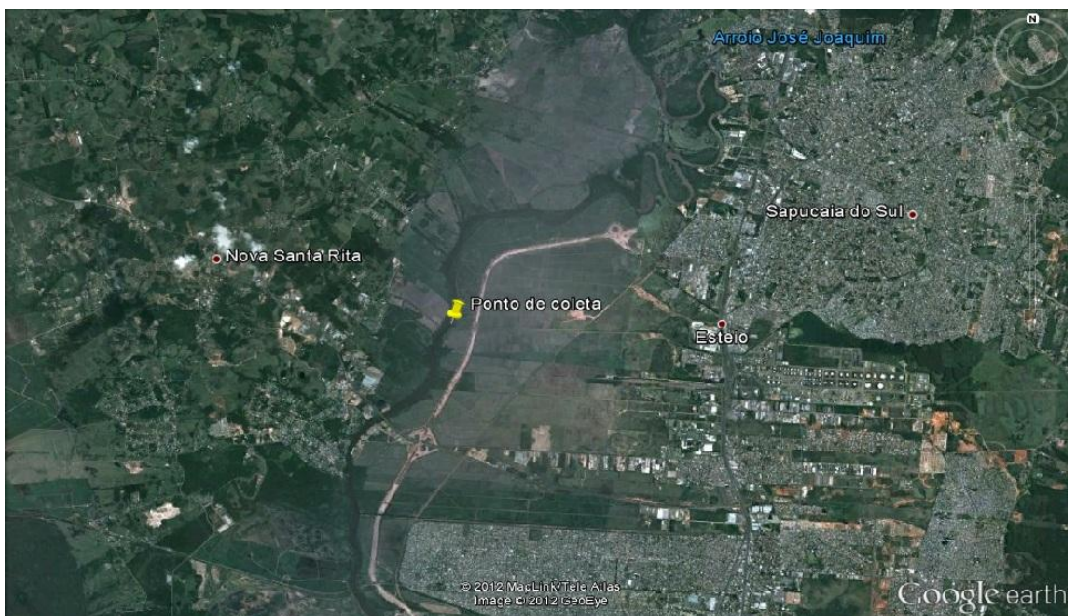


Figura 2 – Mapa mostrando a localização do ponto de coleta, em Esteio, RS. (29°51'40''S, 51°13'50''O). Fonte: Google Earth

Para a caracterização do perfil de resistência foi utilizado o método de difusão em ágar (Kirby-Bauer). Os isolados foram inoculados em caldo triptose de soja (TSB) e mantidos a 37°C por 24h. Após esse período, com uma concentração de 0,5 na escala de Mac Farland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹), suabes estéreis foram embebidos nas culturas, retirando-se o excesso de líquido, e semeados uniformemente em placas contendo ágar Müller Hinton. Os discos de antimicrobianos foram depositados de forma equidistante sobre a superfície do meio inoculado. Foram utilizados 12 antimicrobianos de 9 classes diferentes: nitrofurantoína (NIT 300 µg),

norfloxacina (NOR 10 µg), tetraciclina (TET 30 µg), estreptomicina (EST 10 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), ceftriaxona (CRO 30 µg), cefalotina (CFL 30 µg), cefoxitina (CFO 30 µg), sulfametoxazol + trimetoprim (SUT 25 µg), imipenem (IMP 10 µg), cloranfenicol (CLO 30 µg), gentamicina (GEN 10 µg). As placas foram incubadas a 37°C por 18-24h e, após este período, os halos de inibição foram medidos. A interpretação das zonas de inibição foi realizada de acordo com a tabela de valores de resistência e antibiogramas da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI/ 2007).

Resultados

Os antimicrobianos para os quais os isolados apresentaram maior suscetibilidade foram o imipenem e a ceftriaxona com nenhum isolado resistente. A gentamicina com um (2,08%) isolado resistente e cloranfenicol com 2 (4,17%) isolados. A cefalotina apresentou a menor eficiência com 29 (60,42%) isolados resistentes, seguida da cefoxitina com 20 (41,67%) isolados resistentes. A estreptomicina obteve 20,83% dos isolados resistentes e a tetraciclina 18,75%. Contra dez antimicrobianos foi detectada resistência bacteriana e 75% dos isolados foi resistente a pelo menos um antimicrobiano (Figura 3).

Na coleta 1 (inverno) dois isolados apresentaram resistência a um antimicrobiano cada um, cefalotina e a nitrofurantoína. Todos os demais foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Na coleta 2 (primavera) houve uma maior prevalência de isolados resistentes a cefoxitina e cefalotina, ambos com 100% dos isolados resistentes, e nitrofurantoina com 44,44% dos isolados. Houve resistência, também, à

tetraciclina e ao sulfametoxazol-trimetoprim, e todos os isolados foram sensíveis aos demais sete antimicrobianos.

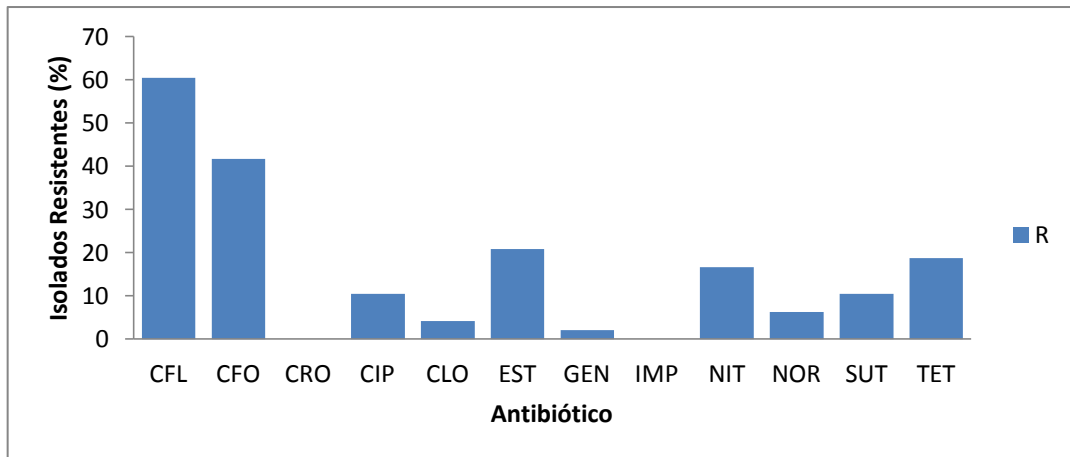


Figura 3. Percentual de bactérias isoladas das águas do Rio dos Sinos, ponto de Esteio, resistentes aos 12 antimicrobianos utilizados nos ensaios de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Na coleta 3 (verão) os antimicrobianos com o maior número de isolados resistentes foram a cefalotina e a cefoxitina com 55,56% e 50% dos isolados respectivamente, gentamicina, nitrofurantoína, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina com 5,56% dos isolados para cada antimicrobiano. Na coleta 4 (outono) o maior número de isolados resistentes foi observado para cefalotina (60%), estreptomicina (40,67%), tetraciclina (33,33%) e ciprofloxacina (26,67%), seguidos por cefoxitina, norfloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim com 20% (Tabela 1).

Isolados resistentes a pelo menos duas classes de antimicrobianos foi observado em 34% dos isolados (Figura 4), o que caracteriza um perfil de multirresistência. Uma maior prevalência de isolados multirresistentes foi observada na coleta da primavera, com 5/9 (55,55%) dos isolados com

esse perfil, seguido pelas coletas do outono com 8/15 (53,33%) e verão com 3/18 (16,66%) (Tabela 1). Doze (25%) isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Sete (14,58%) isolados foram resistentes a apenas um antimicrobiano, e 42% dos isolados foram resistentes a apenas uma classe de antimicrobianos. Foram observados isolados com múltipla resistência a até seis classes de antimicrobianos. Catorze por cento dos isolados foram resistentes a duas classes, 8% a 3 e 4 classes e, 2% dos isolados foram resistentes a 5 e 6 classes de antimicrobianos (Figura 4).

Tabela 1 – Perfil de resistência a antimicrobianos em relação às coletas realizadas no Rio dos Sinos, em Esteio, nas diferentes estações do ano (n=48).

Classe	Antibiótico	Numero de isolados resistentes			
		1*	2*	3*	4*
B - lactâmicos	Cefalosporinas				
	Cefalotina	1	9	10	9
	Cefoxitina	0	9	8	3
	Ceftriaxona	0	0	0	0
Carbepenam	Imipenem	0	0	0	0
Tetraciclina	Tetraciclina	0	2	2	5
Aminoglicosídeos	Gentamicina	0	0	1	0
	Estreptomicina	0	0	3	7
Sulfonamida	Sulfametazol+ Trimetoprim	0	1	1	3
Quinolona	Ciprofloxacina	0	0	1	4
Anfenicol	Cloranfenicol	0	0	0	2
Fluoroquinolona	Norfloxacina	0	0	0	3
Nitrofurano	Nitrofurantoína	1	4	1	2
	Total de isolados	6	9	18	15

*coleta 1 (primavera), coleta 2 (verão), coleta 3 (outono), coleta 4 (inverno).

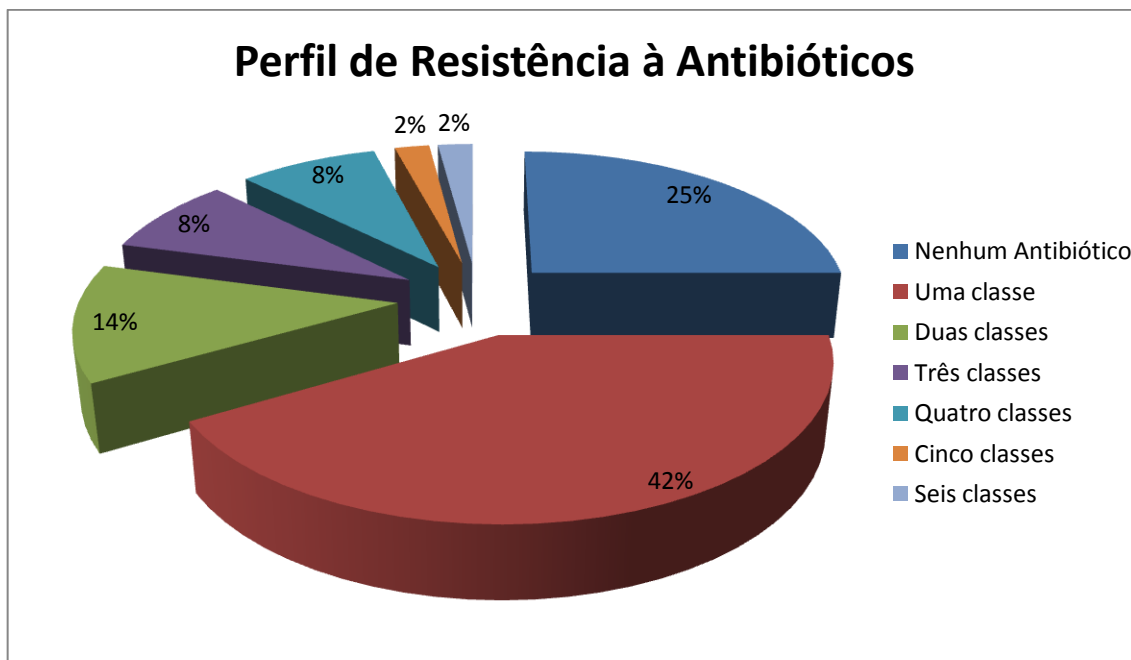


Figura 4. Frequência de resistência e resistência múltipla a antimicrobianos em bactérias isoladas do Rio dos Sinos, ponto de Esteio (n=48).

Discussão:

Comparando-se todas as coletas, observou-se na 1 o menor número de isolados resistentes. Uma possível explicação para essa diferença seria o volume de chuva, que foi bastante intenso no período da coleta. Em seus estudos Peak *et al.* (2007) encontraram maior número de isolados resistentes no período com maior nível de chuvas; ao contrario do que foi encontrado, nesse trabalho os níveis de resistência não aumentaram com o aumento das chuvas, e sim poucos isolados resistentes foram encontrados nas épocas de chuvas. Como justificativa é usada a ideia de que a chuva propicia o arraste de contaminantes da margem para o interior do rio (9). Essa explicação não pode ser dada para esse estudo, um provável argumento seria que as coletas foram realizadas bem próximas às margens.

Em seu trabalho na Lagoa dos Patos, Canal (2010) observou uma proporção semelhante de isolados resistentes à tetraciclina, que já tinha sido anteriormente relatada em bactérias de ambiente aquático. Henriques *et al.* (2006) encontraram frequentemente resistência a tetraciclina em isolados de enterobactérias provenientes de amostras de água estuárias. Apesar de os resultados desse estudo não serem surpreendentes em relação à resistência a tetraciclina, demonstram uma forte correlação de antimicrobianos e possíveis genes de resistências em águas superficiais.

As cefalosporinas, assim como outros β -lactâmicos, são alguns dos antimicrobianos mais prescritos atualmente e, em sua maioria são de fácil absorção para uso oral, podendo também ser administrados via intravenoso ou intramuscular. A cefalotina e a cefoxitina são cefalosporinas de 1ª e 2ª geração, respectivamente, administradas por via parenteral e, portanto, rapidamente metabolizadas, sendo liberadas pelas excretas, e muitas na sua forma inalterada. Enquanto a cefoxitina é utilizada no tratamento de infecções abdominais, a cefalotina é utilizada para infecções do sistema respiratório, e ambas são amplamente utilizadas na profilaxia em cirurgias. Dessa forma, esperava-se isolar bactérias resistentes a β -lactâmicos nesse estudo, pois estes são de uso recorrente na população.

Grande parte das bactérias Gram negativas possui uma resistência intrínseca aos antimicrobianos da classe de β -lactâmicos, alterando seu sítio de ligação, o que ocorre devido à capacidade de produção das enzimas β -lactamases (15), que realizam a clivagem do anel β -lactâmico, tornando-o inativo em relação ao sítio ligante na cadeia peptídica em

formação da parede bacteriana (7). As β -lactamases não possuem a capacidade de hidrolisar o anel β -lactâmico de antimicrobianos carbapenêmicos (15). Possivelmente, isso explica a grande sensibilidade observada nesse trabalho ao imipenem (100%), um carbapenêmico que atualmente tem uso restrito – fator que contribui para o baixo índice de resistência encontrado.

Segundo Kaye *et al.* (2004), bombas de efluxo possuem um papel importante na eliminação de substâncias nocivas que penetram na célula bacteriana, facilitando a sobrevivência de microrganismos em locais contaminados e sua adaptação e resistência a muitos produtos químicos e antibióticos.

A seleção de determinantes de resistência em ambientes aquáticos poderia ocorrer mesmo na ausência do antimicrobiano. Muitos determinantes de múltipla resistência são capazes de conferir simultaneamente resistência a compostos pertencentes a várias classes de compostos químicos, como detergentes e antissépticos (3). Outros estudos demonstram que a seleção de determinantes de resistência aos antimicrobianos no ambiente poderia ocorrer por meio da poluição por metais pesados e químicos (6). Logo, a seleção de bactérias resistentes poderia ocorrer através da seleção de resistência a compostos que não sejam antimicrobianos, mas que as selecionem com o mesmo mecanismo de resistência (3). Por exemplo, óleo de pinho causa a produção de sistema de efluxo e, conseqüentemente, pode selecionar bactérias resistentes a antimicrobianos que utilizam esse sistema (16).

Os perfis de resistência encontrado em isolados de ambientes aquáticos apresentam grande variabilidade segundo as características originais da água. Watkinson *et al.* (2007) mostraram que a resistência a antimicrobianos está fortemente ligada às águas superficiais adjacentes à estação de tratamento de esgoto. Isso poderia explicar o número de bactérias resistentes encontradas nesse trabalho, uma vez que o Rio dos Sinos recebe vários tipos de dejetos oriundos de resíduos domésticos e industriais que são despejados diariamente no rio e na grande maioria das vezes sem nenhum tipo de tratamento prévio (27). Esse é um grande problema ainda não solucionado e gera grande preocupação, uma vez que todas essas fontes de contaminação podem exercer pressões seletivas e com isso selecionar microrganismos multirresistentes a antimicrobianos e a outros compostos que podem estar associados com o mesmo tipo de mecanismo de resistência. Esses organismos selecionados estarão no ambiente, nas águas do Rio dos Sinos, desta forma, muito próximos à população de diversos municípios que o rio banha.

Concomitantemente a esse estudo, outros trabalhos estão sendo realizados para um melhor conhecimento da microbiota presente no rio, assim como uma melhor caracterização do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados, e sua interligação.

Referências:

1. ALANIS, A.J. (2005). Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? **Archives of Medical Research**, 36, 697-705.
2. ALBUQUERQUE, S.A. Cartilha ecológica: educação ambiental. (2001) Educarte. Curitiba.
3. ALONSO, A.; SÁNCHEZ, P.; MARTÍNEZ, J.L. (2001) Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, 3(1), 1-9.
4. BARBOSA, S.P.P.; CAMINHA, M.C.C.; PAZ, M.C.F.. (2007). Identificação da microbiota bacteriana autóctone de efluentes petroquímicos no município de Fortaleza. II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica João Pessoa – PB.
5. BATISTA, M.V.A.; SANTOS, M.I.S.; MENEZES, L.C.S.; CARNEIRO, M.R.P.; CÂNDIDO, A.L. (2007). *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* sp. Multiresistentes isoladas de efluentes urbanos em Aracaju, Sergipe. **Biologia Geral e Experimental**, São Cristóvão, SE, 7(1), 15-18.
6. CANAL, N. (2009). Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isoladas de amostras de água da lagoa dos Patos, RS. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós Graduação de Microbiologia Agrícola e do Ambiente/ UFRGS. Porto Alegre.
7. DA SILVA, K.H. (2011). Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em bactérias isoladas do processo de compostagem. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós Graduação de Microbiologia Agrícola e do Ambiente/ UFRGS. Porto Alegre.
8. DE ALMEIDA, C.R. (2011). Água – Um elemento básico para a vida. Monografia apresentada à Grande Loja Maçônica de Minas Gerais – Comissão de Meio Ambiente.
9. DE OLIVEIRA, D.V. (2011). Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias gram-negativas isoladas nas águas do arroio Dilúvio. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós Graduação de Microbiologia Agrícola e do Ambiente/ UFRGS. Porto Alegre.
10. HENRIQUES, I.S.; FONSECA, F.; ALVES, A.; SAAVEDRA, M.J.; CORREIA, A. (2006). Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. **Research in Microbiology** 157, 938–947.
11. KAYE, K.S.; ENGEMANN, J.J.; FRAIMOW, H.S.; ABRUTYN, E. (2004). Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management **Infectious Disease Clinics of North America**, 18, 467-511.
12. KÜMMERER, K. (2009 a). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, 75, 417-434.

13. KÜMMERER, K. (2009 b). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. **Chemosphere**, 75, 435-441.
14. LUCZKIEWICZ, A.; JANKOWSKA, K.; FUDALA-KSIAZEK, S.; OLANKZUK NEYMAN, K. (2010). Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. **Water research**, 44. 5089-5097.
15. MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; CALVO, J. (2010). El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 28(Supl 2), 25-31.
16. MOKEN, M.C.; MCMURRY, L.M.; LEVY, S.B. (1997). Selection of Multiple-Antibiotic-Resistant (Mar) Mutants of *Escherichia coli* by Using the Disinfectant Pine Oil: Roles of the *mar* and *acrAB* Loci. **Antimicrobial AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, 14(12), 2770–2772.
17. MOURA, A.C.; ASSUMPÇÃO, R.A.B.; BISCHOFF J. (2009). Monitoramento físico-químico e microbiológico da água do Rio Cascavel durante o período de 2003 a 2006. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo,76(1), 17-22.
18. NASCIMENTO, C.P. & NAIME. R. (2009). Panorama do uso, distribuição e contaminação das águas superficiais no Arroio Pampa na bacia do Rio dos Sinos. **Estudos Tecnológicos**, 5(1), 101-120.
19. PEAK, N.; KNAPP, C.W.; YANG, R.K.; HANFELT, M.M.; SMITH, M.S.; AGA, D.S.; GRAHAM, D.W.. (2007). Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. **Environmental Microbiology**, 9(1),143-51
20. RAWAT, D. & NAIR, D. (2010). Extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria. **Journal of Global Infectious Diseases**, 2, 263-273.
21. SILBERGELD, E.K.; GRAHAM, J.; PRICE, L.B. (2008). Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health. **Annual Reviews of Public Health**, 29, 151-169.
22. SUNDSFJORD, A.; SIMONSEN, G.S.; HALDORSEN, B.C.; HAAHEIM, H.; HJELMEVOLL, S.; LITTAUER, P.; DAHL, K.H. (2004). Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. **APMIS** 112: 815–37.
23. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. (2005) *Microbiologia*. 8ª Ed. Artmed, Porto Alegre, RS.
24. WATKINSON, A.J.; MICALIZZI, G.B.; GRAHAM, G.M.; BATES, J. B.; COSTANZO S. D. (2007). Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Wastewaters, Surface Waters, and

Oysters from an Urban Riverine System. **Applied and Environmental Microbiology**, 73(17), 5667–5670.

25. O Rio dos Sinos é nosso, 2012. Água é fundamental. Disponível em: <http://www.riodossinos.com.br/index.php/paginas/pagina/2>. Acessado em 6 de junho de 2012.
26. Antibiograma, 2011. Manual para antibiograma – difusão em disco. Disponível em: http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_190.pdf. Acessado em 6 de junho de 2012.
27. Diário de Canoas, 2011. Autoridades flagram lançamento de esgoto no Rio dos Sinos. Disponível em: <http://www.diariodecanoas.com.br/meio-ambiente/295786/autoridades-flagram-lancamento-de-esgoto-no-rio-dos-sinos.html>. Acessado em 11 de junho de 2012.
28. ANVISA, 2008. Uso racional de antimicrobiano e a resistência microbiana. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo1/res_principais.htm. Acesso em : 25 de junho de 2012.