



MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE

**DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS PRESENTES NO EFLUENTE
HOSPITALAR E NA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO DE
GOIÂNIA: PRESENÇA DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS
RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS.**

ALINE CRISTINA BATISTA RESENDE

GOIÂNIA
2009



MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE

**DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS PRESENTES NO EFLUENTE
HOSPITALAR E NA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO DE
GOIÂNIA: PRESENÇA DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS
RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS.**

ALINE CRISTINA BATISTA RESENDE

Orientador: Prof. Dr. José Rodrigues do Carmo Filho
Co-orientador: Prof. Dra. Renata B. A. Soares

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

GOIÂNIA
2009

DEDICATÓRIA

Primeiramente dedico este trabalho a Deus por mais uma etapa vencida, pelo objetivo alcançado e por ter me dado pais maravilhosos que puderam me oferecer todo o meu estudo.

Ao meu pai, trabalhador, vencedor e exemplo de determinação na minha vida. Dedico este trabalho ao senhor, pois foi graças ao seu esforço e apoio que eu pude obter mais esta conquista.

A minha mãe, o alicerce familiar e a grande alegria de toda a nossa família, pelo imenso apoio que me ofereceu em todos os momentos de desânimo e falta de esperança.

Vocês sempre serão exemplos a serem seguidos. Amo vocês.

Aos meus irmãos, pelo incentivo, carinho e amizade que me ofereceram durante esta trajetória.

Ao meu noivo, pela sua companhia durante os momentos mais inquietantes e difíceis, e por fazer parte da minha vida tornando-a mais alegre e especial. Espero que você esteja sempre ao meu lado. Amo você.

Dedico este trabalho a todos que acreditaram em mim e que me apoiaram de alguma maneira.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o. Dr. José Rodrigues do Carmo Filho, meu orientador, pela oportunidade de desbravar outras áreas de pesquisa e pelo aprendizado obtido.

À Prof^a Dra. Renata, minha co-orientadora por toda ajuda oferecida e objetividade.

A Prof^a. Edilaine Montalvão, professora de microbiologia da Universidade Católica de Goiás. Obrigada pelo seu entendimento, conhecimento, por suas dicas, pela tranqüilidade repassada, pela paciência. Obrigada por ter dedicado parte do seu tempo e dos seus conhecimentos a favor desta pesquisa.

A Daniela Braz, uma grande amiga, por todo o tempo dedicado a este trabalho, pela sua paciência em me ensinar todas as técnicas, pelos momentos de aflição e correria no qual você sempre me ajudou e me incentivou. Você é uma pessoa muito especial. Continue sendo essa pessoa cheia de determinação, inteligência, competência e paciência. Desejo a você muito sucesso e que todos os objetivos almejados por você sejam alcançados. Obrigada por tudo.

A Maura Silva, pela oportunidade e incentivo, por ter nos ajudado a encontrar o melhor caminho para a realização desta pesquisa, por ter nos disponibilizado pessoas maravilhosas da SANEAGO e da Estação de Tratamento de Esgoto de Goiânia para nos acompanhar nas visitas aos hospitais. Muito obrigada.

A Luzi e ao motorista Profeta, por ter disponibilizado seu tempo em me acompanhar nos hospitais e por todo o material que me ofereceram. Obrigada pela paciência que tiveram pela simpatia e auxílio para o desenvolvimento do presente estudo. Agradeço o empenho de vocês para que este momento pudesse se concretizar.

A todos que diretamente e indiretamente estiveram envolvidos com o desenvolvimento desta pesquisa. Muito obrigada.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A emergência de genes de resistência antimicrobiana está cada vez mais se tornando um problema ecológico. A pressão seletiva dos antimicrobianos é um importante fator de seleção e disseminação dos genes de resistência no meio ambiente. **OBJETIVO:** O presente trabalho teve como objetivo a detecção, o isolamento e identificação de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* de efluentes de esgoto de 10 hospitais localizados em Goiânia e a caracterização do perfil de susceptibilidade dos microrganismos isolados. **METODOLOGIA:** As amostras coletadas nos efluentes hospitalares e da Estação de Tratamento de Esgoto de Goiânia (ETE) foram identificadas e analisadas quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, por provas bioquímicas, com a coloração de Gram, bacterioscopia, teste de motilidade (MIO), uréia, catalase, oxidase, TAF, API 20E, API STAPH (Bio Merieux) e teste de bileculina. Após a identificação, a avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada através do método de antibiograma em placa, e depois classificada de acordo com o NCCLS (2002). Posteriormente, as cepas de *E.coli* foram analisadas quanto a possível produção de β -lactamase de amplo espectro (ESBL), utilizando-se testes fenotípicos. **RESULTADOS:** Foram identificados 73 microrganismos gram-negativos, dentre estes 10(14,92%) *E.coli*, 10(14,92%) *K.pneumoniae*, 3(4,47%) *P.aeruginosa* e 1(1,49%) *A.baumannii*. As cepas de *E.coli* apresentaram 100% de resistência total ao aztreonam, 40% à ampicilina, 30% à piperacilina, 20% à ciprofloxacina, 10% à gentamicina. Nenhuma cepa de *E.coli* resistente ao aztreonam foi identificada como produtora de β -lactamase de espectro ampliado (ESBL). *P.aeruginosa* apresentou 100% de resistência à ampicilina-sulbactam e 100% apresentaram resistência intermediária à gentamicina. 70% das cepas de *K.pneumoniae* apresentaram resistência à ampicilina e 50% apresentaram resistência intermediária a este mesmo antimicrobiano. Nenhuma resistência total foi detectada na amostra de *A.baumannii* apresentando apenas resistência intermediária ao aztreonam e a ceftriaxona. **CONCLUSÃO:** As amostras de *E.coli*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* e *A.baumannii* apresentaram baixas taxas de resistência aos antimicrobianos, em nenhum dos isolados foi detectada a produção de β -lactamase de espectro ampliado e carbapenemase e as amostras de *A.baumannii* apresentaram o maior perfil de susceptibilidade entre todos os microrganismos isolados.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência bacteriana, efluente hospitalar, meio ambiente.

ABSTRACT

Introduction: The emergence of antimicrobial-resistant genes is becoming an increasingly important ecological issue. The selective pressure of antimicrobials is a significant factor in the selection and dissemination of resistance genes in the environment. **Objective:** The objective of this present study was to detect, isolate and identify *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the sewage effluents of 10 hospitals located in Goiânia and to assess the susceptibility profile of the isolated microorganisms. **Methodology:** The samples collected in the hospital effluents and from the Goiânia sewage treatment station were identified using biochemical tests, Gram-staining, microscopy, *motility-indole-ornithine (MIO) medium*, urea, catalase, oxidase, TAF, API 20E, API STAPH (Bio Merieux) and bile-esculin agar. Following identification, the profile of susceptibility to the antimicrobials was evaluated using the agar diffusion disk susceptibility test, later classified according to the NCCLS (2002). Next, the *E. coli* strains were analyzed regards the possibility extended spectrum β -lactamase production (ESBL), using phenotypic tests. **Results:** A total of 73 microorganisms gram-negative were identified including 10 strains of *E. coli* (14,92%), 10 strains of *K. pneumoniae* (14,92%), 3 of *P. aeruginosa* (4.47%) and 1 of *A. baumannii* (1.49%). The *E. coli* strains presented 100% total resistance to aztreonam, 40% to ampicillin, 30% to piperacillin, 20% to ciprofloxacin and 10% to gentamicin. None of the aztreonam-resistant *E. coli* strains were identified as being extended spectrum β -lactamase producers. *P. aeruginosa* presented 100% resistance to ampicillin-sulbactam and 100% intermediary resistance to gentamicin. Strains of *K. pneumoniae* were resistant to ampicillin (70%) and to piperacillin (20%). Additionally, 50% showed intermediate resistance to piperacillin. No cases of total resistance were detected in the sample of *A. baumannii*, which presented only intermediary resistance to aztreonam and ceftriaxone. **Conclusion:** The *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *A. baumannii* isolates showed low resistance rates. None of the bacterial strains produced ESBL or carbapenems. The samples of *A. baumannii* had the highest susceptibility profile of all the microorganisms isolated.

KEY WORDS: bacterial resistance; hospital effluent; environment.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Impacto ambiental decorrente da disseminação de genes de resistência antimicrobiana sobre a saúde humana	11
1.2. Aspectos Gerais dos Microrganismos	21
1.2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	21
1.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
1.2.3. <i>Escherichia coli</i>	27
1.2.4. <i>Klebsiella pneumonia</i>	29
1.3. Mecanismos de resistência antimicrobiana	32
1.3.1. Enzimas modificadoras de antimicrobianos	34
1.3.2. β -lactamase de espectro ampliado ou estendido (ES β L – Classe A).....	35
1.3.2.1. TEM.....	36
1.3.2.2. SHV	38
1.3.2.3. CTX-M.....	39
1.3.2.4. OXA.....	40
1.3.3. Metalo- β -lactamase (M β L – Classe B)	41
1.3.3.1. IMP	44
1.3.3.2. VIM.....	46
1.3.3.3. SPM.....	49
1.3.3.4. GIM e SIM	49
1.3.4. Classe C (Amp C β -lactamase).....	50
1.3.5. Alteração do sítio de ação dos antimicrobianos	52

1.3.6. Alteração da permeabilidade da membrana externa.....	54
1.3.6.1. Porinas	54
1.3.6.2. Efluxo	55
1.3.6.3. Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos.....	57
2. OBJETIVO.....	60
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
3.1. Coleta das amostras de água de esgoto hospitalar	61
3.2. Identificação bacteriana.....	62
3.3. Avaliação da Sensibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos	63
3.4. Identificação fenotípica das cepas bacterianas prováveis produtoras de ESBL	64
4. RESULTADOS	66
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÃO.....	90
7. RECOMENDAÇÕES GERAIS	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
9. ANEXO.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI – *Amicacina*

ATM – *Aztreonam*

BGN – *Bacilo gram-negativo*

BHI- *Brain Heart Infusion Broth*

CAZ – *Ceftazidima*

CTX – *Cefotriaxona*

CFT – *Cefotaxima*

CONAMA – *Conselho Nacional do Meio Ambiente*

CPM – *Cefepime*

CIP – *Ciprofloxacina*

CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*

DNA – *Ácido Desoxirribonúcleico*

EDTA – *Ácido etilenodiaminotetracético*

ESBL – *Beta-lactamase de espectro ampliado*

ETE – *Estação de Tratamento de Esgoto*

GEN – *Gentamicina*

GIM- *German imipenemase*

IMP-2 – *Imipenemase 2*

LABMICA – *Laboratório de Microbiologia Clínica e Ambiental*

LPS – *Lipopolissacarídeos*

MIC- *Concentração inibitória mínima*

MIO – *Teste de Motilidade*

MBL – *Metallo- β -lactamase*

2-MPA – *ácido 2-mercapto-propiónico*

NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NNISS – *National Nosocomial Infections Surveillance System*

Omp – *Outer membrane protein*

PBPs – *Proteínas ligadoras de penicilinas*

PI – *Ponto isoelétrico*

PIP – *Piperacilina*

PTZ – *Piperacilina/tazobactam*

PB – *Polimixina B*

SENTRY – *Worldwide Antimicrobial Surveillance Program*

SPM-1 – *São Paulo metallo- β -lactamase*

TAF – *Tríplice Açúcar Ferro*

TCR – *Ticarcilina*

TSB – *Trypticase Soy Broth*

UTI – *Unidade de terapia intensiva*

VER – *Enterococcus resistente a vancomicina*

VIM-1 – *Verona imipenemase 1*

VIM-2 – *Verona imipenemase 2*

1. INTRODUÇÃO

A utilização indiscriminada de antimicrobianos para prevenir ou tratar infecções humanas contribui para o surgimento de cepas bacterianas cada vez mais resistentes a diversas classes de drogas, dentre elas, cefalosporinas de terceira e quarta geração, quinolonas, monobactâmicos, carbapenems e penicilinas.

Os microrganismos gram-negativos podem adquirir genes de resistência de outras bactérias presentes no solo, na água e nos efluentes hospitalares, e conseqüentemente transmitir esta resistência para outros patógenos de diferentes gêneros.

A presença destes microrganismos multi-resistentes, principalmente bacilos gram-negativos como *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *A. baumannii* e *E.coli* no meio ambiente está tornando um problema de saúde pública. Uma vez que a propagação destes patógenos contribui para o aumento das taxas de infecção hospitalar e comunitária com conseqüente elevação das taxas de morbidade e mortalidade.

1.1. Impacto ambiental decorrente da disseminação de genes de resistência antimicrobiana sobre a saúde humana

Muitos dos compostos utilizados na medicina são parcialmente metabolizados pelos pacientes e então são descartados dentro de um sistema de esgoto hospitalar ou direcionados para o esgoto municipal e correspondente estação de tratamento. Mas, estes compostos podem passar através do sistema de esgoto e acabar no meio ambiente (Kummerer, 2004).

Estudos conduzidos em vários países têm detectado um número de antibióticos em micrograma por litro ou nanograma por litro variando em diferentes compartimentos ambientais, tais como, efluente hospitalar, esgoto municipal, efluente de estação de tratamento de esgoto, superfícies de águas e em alguns casos em terrenos de água. Os componentes detectados são de diferentes classes de antibióticos importantes, tais como, macrolídeos, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas, dentre outros (Richardson & Bowron, 1985; Kummerer *et al.*, 2003; Kolpin *et al.*, 2002; Kummerer, 2004).

Genes de resistência estão cada vez mais se tornando problemas ecológicos. A pressão seletiva dos antibióticos é um importante fator de seleção e disseminação de resistência, a qual é favorecida pelo uso contínuo e altas concentrações de antimicrobianos (Davison, 1999; Bjorkman *et al.*, 2000).

Concentrações de ciprofloxacina entre 0,7 e 124,5mg/L foram encontradas em efluente hospitalar e foi assumido como a principal origem de efeitos genotóxicos mensurados. A ampicilina foi encontrada em concentrações entre 20 e 80mg/L no efluente de um grande hospital germânico (Hartmann *et al.*, 1998; Kummerer & Henninger, 2004).

Um estudo realizado por Schwartz *et al.*, (2003), encontrou bactérias carregando genes *vanA* em um efluente hospitalar. O gene *mecA* codificando resistência contra meticilina em *Staphylococcus* foi encontrado somente em esgoto hospitalar, e não em esgoto municipal. Genes de resistência a gentamicina foram detectados em *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae* em esgoto hospitalar (Heuer *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2003).

A presença de bactérias resistentes a antibióticos encontrados em rios tem sido documentada em diferentes países (French *et al.*, 1987; Young, 1993). Os

microrganismos resistentes na natureza podem resultar da produção natural de antibióticos pelos organismos presentes no solo, de comida animal, em produtos agrícolas e em resíduos de produtos utilizados para o tratamento de animais e de humanos (Davies, 1994; Witte, 1998).

O uso de recipientes de água utilizados para deposição de efluentes orgânicos tem aumentado com o crescimento populacional, agravando desta forma as condições sanitárias em diversas comunidades. A deposição destes efluentes dentro dos reservatórios de água, tão bem quanto, a promoção da eutrofização artificial, permite que esta água seja contaminada por microrganismos patogênicos, o que facilita a transferência de genes de resistência para vários antibióticos e quimioterápicos (Esteves, 1998). Estes ambientes podem tornar-se importantes lugares de contaminação humana por patógenos que poderão ser resistentes e multi-resistentes às diferentes classes de antimicrobianos (Pereira *et al.*, 2004).

O crescente problema da resistência bacteriana está difundido em todo o mundo, e pode ser conseqüente ao processo seletivo seguido do uso incorreto de antibióticos. A forte seleção de patógenos resistentes aos antimicrobianos ocorridos no meio ambiente, nos hospitais, indústrias, e atividades veterinárias, onde grandes quantidades de antibióticos são utilizados para prevenir infecções e promover o crescimento de animais, permitem o aumento na freqüência de genes bacterianos resistentes. As reservas naturais de genes de resistência podem contribuir para o surgimento de patógenos emergentes resultantes da transferência de genes (Linton, 1986; Davies, 1994; Mayhall, 1996; Van Elsas *et al.*, 2000).

A degradação das condições sanitárias dentro das comunidades pode levar a uma estabilização das rotas de disseminação dos microrganismos, e elementos genéticos móveis que podem agravar este problema contribuindo para o aumento da multi-resistência bacteriana (Linton, 1986; Mayhall, 1996).

Alguns microrganismos importantes para as infecções humanas, tais como, os bacilos gram-negativos (BGN), incluindo as enterobactérias, como *Enterobacter* spp. e outros BGNs como a *P. aeruginosa* podem persistir por um longo período no meio ambiente. Bactérias resistentes a antibióticos quimicamente modificados e sintetizados também estão presentes em larga escala no meio ambiente (Ash *et al.*, 2002). A presença de coliformes fecais resistentes em condições extra-intestinal é mais baixa quando comparadas ao trato intestinal, portanto sua presença pode indicar que houve contaminação fecal recente geralmente por humanos ou outros animais (Harihan & Weinstein, 1996). Outra enterobactéria, incluindo coliformes não fecais, e outros grupos de BGNs em adição aos *Enterococcus* spp. podem se manter por prolongado período de tempo no meio ambiente, como por exemplo, em recipientes de água. Esses microrganismos estão presentes na microbiota intestinal e podem em certas condições causar infecções endógenas e exógenas ou colonizar pele e mucosa. Por esta característica oportunista eles são conhecidos como amfibiontes (Mendonça-Hagler & Hagler, 1991).

Em um estudo realizado em 2002 nas lagoas de Cabiúnas, Geribá e Imbossaica no estado do Rio de Janeiro, foram isoladas colônias de bactérias pertencentes às espécies e gênero de BGNs que são importantes patógenos causadores de infecções em humanos, com potencial de transferência da resistência para outras bactérias. Os microrganismos encontrados no canal de

esgoto de Geribá foram *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, e bacilos gram-negativos não fermentadores como *Acinetobacter* sp. e *Aeromonas* (Pereira *et al.*,2004).

Os patógenos isolados tinham diferentes padrões de resistência como linhagens de *E.coli* resistente a ceftazidime e norfloxacina; *K. pneumoniae* resistente à amicacina e gentamicina, e *C. freundii* resistente à ceftazidime. Estes resultados demonstram que naquele ambiente ocorreu uma seleção moderada, possivelmente originária de atividades hospitalares ou clínicas locais. Este tipo de resistência foi originado de pacientes hospitalizados recentemente, ou pelo uso incorreto de antibióticos na comunidade (Pereira *et al.*, 2004).

Em outro estudo foram encontrados organismos resistentes e antibióticos modificados nos rios dos Estados Unidos. Grande proporção destes microrganismos eram portadores de plasmídeos contendo genes que codificam resistência a diferentes antimicrobianos. Neste estudo foram identificadas bactérias predominantemente gram-negativas não fermentadoras do gênero *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Proteus* resistentes a ampicilina, ceftazidima e cefotaxima. Muitos destes organismos localizados nos rios dos Estados Unidos possuíam resistência a no mínimo um antibiótico diferente da ampicilina, e uma fração substancial era resistente a um número de antibióticos. Contudo, relatos de linhagens de *Enterobacter asburiae* já tinham sido identificados nos rios dos Estados Unidos, sendo que esta bactéria era produtora natural de cefalosporinase, mas não de carbapenemase e foi responsável por infecções hospitalares (Brenner *et al.*, 1986; Ash *et al.*, 2002).

Em 2005 no meio oeste dos Estados Unidos, foram encontrados 29 isolados resistentes a imipenem, como: *Aeromonas hydrophila*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter* spp. identificados como *E. asburiae*. Este resultado indica que muitos rios dos Estados Unidos podem ser reservatórios de carbapenemases. A identificação de genes produtores de carbapenemase em Enterobactérias localizados nos rios pode ter importância clínica devido a sua alta presença no meio ambiente o que possibilita a colonização e ou a infecção de seres humanos e animais por estes patógenos (Aubron *et al.*, 2005).

Linhagens resistentes aos antibióticos podem em certas condições, transferir genes por meio dos plasmídeos para outras linhagens que não são resistentes a outros antibióticos, e este processo pode gerar linhagens resistentes a diferentes classes de antibióticos (Linton,1986). Estes elementos genéticos móveis que podem carregar genes de resistência são potencialmente transferidos de uma bactéria para outra, os quais podem ser formados por genes cassetes determinando a expressão de múltipla resistência (Broda,1979; Hardy,1987; Sonea,1988; Silver & Bostian,1993).

Genes transferidos e a ação da pressão seletiva ocorrida no meio ambiente são os responsáveis pelo aparecimento de linhagens resistentes, e também de fundamental importância para a dispersão dos genes de resistência (Davison,1999; Baquero *et al.*,1997). Dentro da comunidade, existe uma alta frequência da transferência de genes de resistência em situações decorrentes das más condições sanitárias nos domicílios e, principalmente, da contaminação dos recipientes de água (Pereira *et al.*, 2004).

Grandes esforços têm sido feitos nos hospitais em todo mundo para evitar a contaminação de pacientes por bactérias multi-resistentes, as quais podem

agravar o quadro clínico, aumentando desta forma as taxas de morbidade e mortalidade (Baquero *et al.*, 1997).

A liberação de bactérias resistentes a determinados antibióticos é de suma importância, pois elas podem proliferar no solo e nas superfícies das águas, persistindo e se espalhando em diferentes ambientes e transferindo genes de resistência entre diferentes espécies (Harwood *et al.*, 2001; Iversen *et al.*, 2002; Whitman *et al.*, 2003; Baquero, 2004; Guardahassi & Dallsgaard, 2004; Iversen *et al.*, 2004; Vilanova *et al.*, 2004). Como exemplo, temos os *Enterococcus*, os quais têm sido tradicionalmente considerados como indicadores de contaminação fecal em bebidas e águas recreacionais e podem estar presentes em altas concentrações em rios, esgotos e solos impróprios para atividade agrícola (Ator & Starzyk, 1976; Anonymous, 1999; Guardahassi & Dalsgaard, 2004). A população de *Enterococcus* spp. em esgotos de diferentes países europeus e nos Estados Unidos tem sido previamente avaliada, mas conhecimento sobre a relação existente entre a população de *Enterococcus* de esgotos e de superfícies de água e daqueles recuperados de pacientes hospitalizados é rara (Harwood *et al.*, 2001; Blanch *et al.*, 2003; Guardahassi & Dalsgaard, 2004).

Em um estudo realizado em Portugal no período de janeiro de 2001 a maio de 2002 foram coletadas 26 amostras de esgoto urbano em uma área perto de 4 hospitais e 5 amostras de águas do rio Douro. Destas amostras obtidas da rede de esgoto 96% eram de *Enterococcus* spp e 100% nas amostras dos rios também eram de *Enterococcus* spp. Dentre as amostras obtidas na rede de esgoto 79% eram resistentes à vancomicina e duas das amostras isoladas do estuário do rio Douro também eram resistentes à vancomicina. Taxas de resistência a ampicilina, ciprofloxacina, e eritromicina e altos níveis de resistência a streptomomicina,

gentamicina, ou kanamicina foram encontrados nos esgotos das instituições de saúde do centro da cidade se comparados às amostras coletadas do esgoto dos hospitais do Porto. Similares taxas de resistência a tetraciclina e clorafenicol foram encontradas entre as amostras dos dois esgotos. Os seguintes genes *van A*, *van B*, e *van C1* foram detectados nos isolados de *Enterococcus* resistente a vancomicina (Novais *et al.*, 2005). Com os resultados apresentados neste estudo pode-se concluir que resistência antimicrobiana, linhagens virulentas, e a presença do alelo *purk-1* nos isolados de *Enterococcus spp.* dos esgotos do centro da cidade e do estuário do rio Douro sugerem que a origem dessas linhagens seja hospitalar. A presença de *Enterococcus* resistente a vancomicina e a outros antimicrobianos no rio Douro é indicativo de contaminação fecal humana proveniente da comunidade e de hospitais. Este fato é observado frequentemente na Europa e na América (Harwood *et al.*, 2001; Dias Miguel, 2003; Guardahassi & Dalsgaard, 2004; Vilanova *et al.*, 2004).

A larga presença de *Enterococcus spp.*, principalmente de *E.faecium* nos hospitais portugueses sugerem uma ampla disseminação desta linhagem nas comunidades, as quais podem ser reintroduzidas nas instituições hospitalares (Iversen *et al.*, 2004; Novais *et al.*, 2004). O risco da aquisição destes genogrupos de *Enterococcus spp.* não pode ser descartado desde que esta área é usada para banhos, recreação e pesca. Este patógeno pode sobreviver por longo período no solo alagado, nos moluscos, e gaivotas (NCCLS, 2002; Choi *et al.*, 2003; Whitman *et al.*, 2003; Guardahassi & Dalsgaard, 2004; Iversen *et al.*, 2004). A presença de elementos móveis contendo genes de resistência a antibióticos ou características de virulência na comunidade pode favorecer a disseminação destas bactérias contendo elementos que codificam a resistência e/ou determinantes de virulência,

aumentando desta forma o risco da transmissão para outros ambientes (Tomita *et al.*, 2002; Baquero, 2004).

Em diferentes regiões da Europa, *Enterococcus spp.* resistente à vancomicina, principalmente *E. faecalis*. Este patógeno é comumente isolado da água de esgoto urbano, esgoto de hospital e de fezes de porcos. Dos *Enterococcus spp.* detectados na Espanha, no Reino Unido e na Suécia, 79% possuíam o gene *vanA* e apenas 21% possuíam o gene *vanB* (Iversen *et al.*, 2002 ;Kuhn *et al.* ,2005).

Em outro estudo realizado na Suécia com amostras isoladas de esgoto do hospital e da estação de tratamento de esgoto urbano foi identificado *Enterococcus spp.* clonal que era resistente à avoparcina e à ciprofloxacina. Dessa forma pode-se concluir que é possível que *Enterococcus spp.* resistente a antibióticos presentes na população humana disseminados nos hospitais, sejam liberados para a rede de esgoto onde permanecem, e então são transportados para a estação de tratamento de esgoto e transferidos de volta aos humanos. A disseminação de *Enterococcus spp.* resistente a vancomicina (VRE) pode ocorrer através de esterco contaminados por VRE utilizados como fertilizantes nas colheitas e posteriormente são consumidos por humanos (Torell *et al.*, 2003; Kuhn *et al.*, 2005).

Outro estudo, realizado na Costa Leste da Austrália nos rios Brisbane e Bremer e no Cabbage Tree Creek, investigou as taxas de resistência antimicrobiana entre *E.coli* de uma variedade de origens, incluindo estação de tratamento de esgoto e superfícies das águas que são influenciadas por estas estações. Verificou-se uma alta incidência de resistência para tetraciclina (51%), seguida por cefalotina (41%) e sulfafurazole (32%), dentre 462 isolados que foram

testados. A taxa de resistência a tetraciclina tinha previamente sido reportada variando de 1 a 24%. Concentrações de *E.coli* foram significativamente altas nas proximidades do Rio Brisbane (Parveen *et al.*, 1997; Boon & Cattanach, 1999; Edge & Stephen, 2005; Watkinson *et al.*, 2007b).

Os altos níveis de resistência antimicrobiana são devido à grande variedade de drogas utilizadas nos tratamentos humanos do que na agricultura e a potencial mudança nos elementos de resistência, tais como plasmídeos e integrons durante o processo de tratamento do esgoto. Pesquisas têm demonstrado altas taxas de mudança de elementos transferíveis dentro das estações de tratamento, mesmo na falta de antibióticos como agentes seletivos (Mach & Grimes, 1982; Fernandez-Astorga *et al.*, 1992)

Reinthal *et al.* (2003), tem demonstrado que a taxa de resistência antimicrobiana no efluente da estação de tratamento de esgoto é maior antes do processo de tratamento e tem proposto seleção de tratamento para organismos mais resistentes. Essa seleção pode ocorrer através de numerosos caminhos. Primeiramente a presença de baixas concentrações de antibióticos dentro das estações de tratamento os quais podem exercer pressão seletiva favorecendo a resistência dos microrganismos. A desinfecção do efluente pode contribuir para o aumento da prevalência da resistência bacteriana. Essas observações, quando combinadas, podem possibilitar a alta incidência de resistência antimicrobiana entre os isolados presentes nas proximidades dos rios do que nas estações de tratamento devido ao isolamento da bactéria nos pontos onde ocorre a liberação do efluente da estação de tratamento (Murray *et al.*, 1984; Alder *et al.*, 2001; McArdell *et al.*, 2003; Miao *et al.*, 2004; Batt *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2006; Watkinson *et al.*, 2007a).

Um estudo identificando a distribuição de diversos tipos e resistência antimicrobiana de *E.coli* nos rios St.Clair e no rio Detroit, detectou que os isolados de *E.coli* extraintestinal foram encontrados em todos os ecossistemas aquáticos analisados. Este tipo de patótipo de *E.coli* é responsável por uma estimativa de 40.000 mortes e um gasto de no mínimo \$2.6 bilhões de dólares anualmente nos Estados Unidos. O lugar que possuiu maior influência do esgoto urbano municipal demonstrou a mais alta porcentagem para os patótipos de *E.coli*, tão bem quanto *E.coli* carregando genes de resistência antimicrobiana. Isso pode refletir na influência do uso de antibióticos, sugerindo a importância de um esgoto municipal como potencial origem de *E.coli* resistentes a antimicrobianos (Russo & Johnson, 2003; Hamelin *et al.*, 2007).

A resistência antimicrobiana, particularmente a múltipla resistência, é um problema de saúde pública, e a presença de organismos resistentes no ambiente aquático é um problema emergente disseminado em todo o mundo (Watkinson *et al.*, 2007b).

O uso de antibióticos nas populações humanas e em animais deve ser feito de modo racional, a fim de minimizar a pressão seletiva e a disseminação de genes de resistência no meio ambiente hospitalar e fora dele.

1.2. Aspectos Gerais dos Microrganismos

1.2.1. *Acinetobacter* spp.

O gênero *Acinetobacter* spp. é constituído por bastonetes curtos ou cocóides que se apresentam comumente aos pares ou em cadeias de comprimento variável na fase estacionária de crescimento. São gram negativos, não esporulam e apresentam movimento por contração devido à presença de

fímbrias polares. São aeróbios estritos, apresentam metabolismo oxidativo, não fermentativo e crescem bem entre 33 e 35°C em meios de cultura comumente utilizados na rotina laboratorial. Alguns podem crescer em temperaturas acima de 40°C, característica esta, que pode ser utilizada na diferenciação das principais espécies. Apresentam os testes de oxidase negativa e catalase positiva. As espécies deste gênero crescem em meios definidos contendo uma única fonte de carbono e pode utilizar sais de amônio e nitrato como fonte de nitrogênio. As suas diferentes espécies não necessitam de fatores de crescimento (Brove, 1984).

Desde o primeiro relato de isolamento em 1909, a partir do solo, com a denominação de *Micrococcus calco-aceticus*, a situação taxonômica do gênero tem passado por uma série de modificações (Baumann *et al.*, 1968). A partir de 1984, os gêneros *Acinetobacter*, *Neisseria*, *Kingella* e *Moraxella* passaram a pertencer à família *Neisseriaceae*, porém, com base na hibridização DNA-DNA e na análise filogenética da seqüência do rDNA, foi sugerido que os gêneros *Acinetobacter*, *Moraxella* e *Psychrobacter* sejam removidos da família *Neisseriaceae* para a família *Moraxellaceae* (Proteobacteria subclasse γ) (Brove, 1984; Tjernberg & Ursing, 1993; Enright *et al.*, 1994; Dijkshoorn *et al.*, 1998; Pettersson *et al.*, 1998).

Por meio da hibridização do DNA o gênero *Acinetobacter* pode ser dividido em, pelo menos, 21 espécies (Ehrenstein *et al.*, 1996). Testes fenotípicos permitem identificação presuntiva da maioria das espécies, mas mesmo as principais baterias de testes bioquímicas são insuficientes para a identificação correta de todas as espécies do gênero de *Acinetobacter* (Bernards *et al.*, 1996).

O gênero *Acinetobacter* tem se destacado, desde o início dos anos setenta, como um patógeno oportunista emergente, causando freqüentemente graves

infecções nosocomiais que ocorrem principalmente na forma de surtos e, esporadicamente, casos de infecções na comunidade (Kanemoto *et al.*, 2003; Villegas & Hartstein, 2003). Apesar de sua baixa virulência, este patógeno constitui em um sério problema terapêutico devido ao aumento e disseminação de amostras multirresistentes no Brasil e no mundo (Sader *et al.*, 1999; Karlowsky *et al.*, 2003).

Seu caráter ubiqüitário é facilmente demonstrado, pois esse gênero pode ser freqüentemente encontrado em água doce ou salina, no solo e em esgotos, onde representam cerca de 50% dos microrganismos isolados podendo até mesmo ser isolados em solventes orgânicos aromáticos como o petróleo (Baumann *et al.*, 1968; Bifulco *et al.*, 1989; Petukhov *et al.*, 2000). Na espécie humana, pesquisadores distintos encontraram diferenças no percentual de colonização cutânea por espécies de *Acinetobacter*, variando de 10% até mais de 40% (Al Khoja & Darrell, 1979; Berlau *et al.*, 1999). Entretanto, independentemente do percentual de indivíduos colonizados, há consenso de que as espécies do gênero *Acinetobacter* podem ser encontradas como microbiota transitória da pele principalmente das mãos, e das mucosas das vias aéreas superiores, do trato intestinal, da genitália externa e ainda da conjuntiva de adultos sadios (Berlau *et al.*, 1999).

1.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

A família *Pseudomonadaceae* é formada por diversos gêneros dentre eles, o *Pseudomonas* que envolve um grande grupo de espécies de bastonetes gram-negativos, retos ou curvos, com aproximadamente 0,5 a 0,8µm de comprimento e 1,5 a 3,0µm de largura, móveis, apresentando flagelos polares que produzem

antígenos termo-lábeis, estritamente aeróbios e não formam esporos. Este gênero de bactérias pode ser encontrado na água, no solo, no esgoto e no ar e produzem pigmentos solúveis na água. Crescem em temperaturas que variam de 5°C a 42°C, sendo 37°C a temperatura ideal. Podem ser encontrados na pele de alguns indivíduos saudáveis e foram isolados principalmente da garganta (5%) e de fezes (3%) de pacientes hospitalizados. (Davis *et al.*, 1973; Pollack, 1995; Silva, 1999; Pollack, 2000; Reis, 2003).

Algumas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* produzem de um a quatro pigmentos diferentes, sendo os mais comuns, piomelanina (marrom para o preto) e a fluoresceína, sendo estes pigmentos atóxicos para os animais. Possuem a característica de emissão de odor de fruta adocicado e formação de colônias com diversos aspectos morfológicos, podendo ser diminutas ou até planas, difusas ou mucóides com bordos serrados e brilho metálico. (Gillardi, 1980; Visca *et al.*, 1992; Silva, 1999; Reis, 2003).

São bactérias “não fermentadoras”, ou seja, obtêm sua energia pelos processos oxidativos de carboidratos ao invés de fermentação. É uma bactéria ubíqua, de vida livre e muito encontrada em ambientes úmidos. O seu envoltório é semelhante à de outros bacilos gram-negativos e sua membrana externa é composta por proteínas, fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (LPS) (Silva, 1999; Reis, 2003).

Pseudomonas aeruginosa apresentam como característica para a sua identificação: oxidase positiva, β-hemólise em agar sangue, motilidade positiva, crescimento a 42°C, redução de nitrato a nitrito, lisina descarboxilase negativo, acetamida positivo, malonato positivo, citrato positivo, indol negativo, formação de ácido oxidativamente a partir da glicose e do manitol, incapacidade de oxidar

maltose e lactose, DNase negativo, sensibilidade à Polimixina B (Hugh & Leifson, 1953).

Em hospitais, *Pseudomonas aeruginosa* podem ser encontradas em alguns reservatórios como desinfetantes, equipamentos de respiração artificial e de soluções para diálise, alimentos, fossas, esgoto, torneiras e panos de chão. Pode também ser encontrada no solo, água, plantas, sobre superfícies e em fluidos de irrigação (Pitt *et al.*, 1997; Silva, 1999; Pollack, 2000).

A produção de biofilme permite a colonização de catéteres vasculares, peritoneais, urinários, tubos nasogástricos, dispositivos ortopédicos, reservatórios de armazenamento de água em farmácia e/ou laboratório (Cristina *et al.*, 1984; Dasgupta & Costerton, 1989; Nickel *et al.*, 1989).

Pseudomonas aeruginosa é a principal causa de infecções hospitalares em diversos continentes. Infecções ocasionadas por estes patógenos estão frequentemente associados com alta mortalidade independentemente da terapia antimicrobiana utilizada (Arakawa *et al.*, 2000; Poirel *et al.*, 2000a; Livermore, 2002; Pellegrino *et al.*, 2002; Pitout *et al.*, 2005).

No Brasil, um estudo realizado entre 1997 a 1999, relatou a prevalência de infecções hospitalares ocasionadas por *P. aeruginosa*. Este microrganismo foi o patógeno mais isolado de infecções do trato respiratório inferior (29,4%), o terceiro mais freqüente em infecções hospitalares (13,3%) e o sexto mais freqüente em infecções de corrente sanguínea (7,5%) (Nouér *et al.*, 2005; Sader *et al.*, 2005).

Resistência a agentes antimicrobianos contribui para o importante papel da *P.aeruginosa* como um patógeno oportunista, contribuindo para aumento da prevalência de infecções hospitalares. As opções de tratamento são usualmente

escassas devido a sua habilidade em adquirir resistência a diversas classes de drogas antimicrobianas (Sader *et al.*, 2001b; Livermore, 2002; Santos *et al.*, 2002; Reis, 2003; Sardelic *et al.*, 2003; Lagatolla *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2005).

No Brasil, um estudo envolvendo hospitais públicos e privados, revelou elevada prevalência de resistência entre bacilos gram-negativos, não fermentadores, tais como a *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. As drogas mais ativas foram; Imipenem (81%) e Meropenem (82%), seguidas por Ceftazidime (57%). Os mesmos microrganismos foram mais resistentes a Ciprofloxacina (54%), Piperacilina/tazobactam (54%) e Cefepime (53%) (Sader, 2000).

Infecção causada por este agente tem sido particularmente desafiante tendo em vista que o perfil de susceptibilidade deste patógeno vem se modificando com o passar dos tempos em consequência à pressão seletiva existente no meio ambiente hospitalar, sobretudo nas unidades de terapia intensiva. Tais condições fazem com que este microrganismo se adapte às condições ambientais a que está continuamente exposto, desenvolvendo novos mecanismos de resistência. Estas modificações fenotípicas podem ser responsáveis pelo agravamento do estado clínico, aumento do tempo de hospitalização e encarecimento do tratamento por haver necessidade de mais exames complementares, do uso de drogas cada vez mais potentes, tóxicas e caras (Jarvis, 1987; Martins, 2002; Pitout *et al.*, 2005; Nouér *et al.*, 2005; Marra, 2002).

Diferentes genótipos deste microrganismo determinam uma variação do perfil de sensibilidade, codificados por genes cromossomais ou genes transferíveis. Estes genes conferem maior capacidade de resistência e, portanto requerem atenção especial, sobretudo dentro dos estabelecimentos de saúde

(Arakawa *et al.*, 1995; Poirel *et al.*, 2000b; Livermore & Woodford, 2000; Michael, 2002; Pellegrino *et al.*, 2002; Lagatolla *et al.*, 2004).

1.2.3. *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* é composto por cinco espécies bacterianas: *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* e *Escherichia vulneris*. Este gênero pertence à família *Enterobacteriaceae*. Dessas cinco espécies, *E.coli* é a mais comumente isolada de espécimes humanos. Ela está presente na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e pode acarretar infecções intestinais e extraintestinais em indivíduos saudáveis e imunodeprimidos. As infecções do trato urinário, bacteremia, meningites em neonatos e doenças diarreicas são as síndromes clínicas mais comuns causadas por *E.coli*. Este microrganismo já esteve associado a doenças infecciosas envolvendo todos os tecidos e sistemas orgânicos humanos (Koneman 2001; Farmer, 2003).

As amostras de *E. coli* apresentam-se sobre a superfície do ágar sangue como colônias sobrelevadas, com diâmetros de 2 a 3 mm, opacas, de aspecto mucóide e com coloração acinzentada. Pela coloração de Gram, são visualizadas como bacilos gram-negativos isolados, aos pares ou em cadeias curtas. São bactérias encapsuladas, com 0,5 a 2,0 µm de diâmetro e 2,0 a 4,0 µm de comprimento, não esporuladas, com motilidade variável e anaeróbia facultativas. Caracterizam-se também por não utilizarem o citrato como fonte única de carbono e por fermentarem a glicose, sendo por isso denominada fermentadoras. As amostras de *E. coli* mostram bom crescimento em ágar MacConkey; porém, não

são capazes de crescer em meios contendo cianeto de potássio (Shigei, 1992; Koneman, 2001; Farmer, 2003).

O cromossomo de uma *E.coli* é composto por uma única fita dupla circular do ácido desoxirribonucléico (DNA), que possui mais de 1000µm de comprimento. Dessa maneira o DNA bacteriano deve sofrer um processo de compactação para se acomodar dentro da célula bacteriana, a qual mede aproximadamente 2µm de comprimento por 1 µm de largura (Worcel,1974; Trun & Marko, 1998).

Em um estudo realizado para investigar as taxas de resistência antimicrobacteriana entre *E.coli* de uma variedade de origens, verificou-se a presença de altas concentrações de resistência bacteriana entre amostras de *E.coli* coletadas de uma estação de tratamento de esgoto e sobre a superfície das águas do Rio Brisbane. Os altos níveis de microrganismos resistentes a múltiplos antibióticos, encontrados neste estudo, devem-se à elevada utilização de drogas no tratamento de humanos e no potencial de mudança de resistência destes elementos (plasmídeos e integrons) no meio ambiente (Watkinson *et al.*, 2007b).

A disseminação de resistência a antibióticos deve-se também a produção de β-lactamases de amplo espectro (ESBL) associada com resistência a cefalosporinas de amplo espectro presentes em *Escherichia coli*. A resistência a cefalosporinas de amplo espectro pode também estar associada em *E.coli* devido à produção de plasmídeo classe C, β-lactamases, tais como as enzimas CMY, ou com a superprodução de AmpC β-lactamase. Um estudo realizado em 200 hospitais na Inglaterra revelou uma variação regional na prevalência de resistência a ampicilina e trimethoprim entre linhagens de *E.coli* entre 1990 e 1997. Bacteremias por *E.coli* foram consideradas como mais freqüentes nos

hospitais da Inglaterra (Caroff *et al.*, 2000; Reacher *et al.*, 2000; Braford, 2001; Bonnet, 2004; Briñas *et al.*, 2005b; Mulvey *et al.*, 2005).

1.2.4. *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella*, assim como o gênero *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae*, a qual é constituída por um grupo heterogêneo de bactérias gram-negativas. Este gênero foi designado por Trevisan em 1885, sendo que este também foi responsável pela descrição da espécie *K.pneumoniae*. O gênero *Klebsiella* foi definido por hibridação do ácido desoxirribonucléico (DNA) e permitiu a identificação de cinco espécies: *K.oxytoca*; *K.planticola*; *K. terrígena*; *K.mobilis* e *K.pneumoniae*. Esta última é subclassificada em três subespécies: *Klebsiella pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis*. Entre as três subespécies de *Klebsiella pneumoniae* é a mais importante (Podschun & Ullmann, 1998; Umed, 2008; Martinez *et al.*, 2004).

K. pneumoniae é um bacilo gram-negativo anaeróbio facultativo, com melhor crescimento em condições aeróbias, não esporulado e cujo tamanho varia de 0,3 a 1µm de diâmetro e 0,6 a 6µm de comprimento, é imóvel, produz colônias grandes e gomosas quando cultivadas em placas com nutrientes. Apresentam colônias róseas, brilhantes, com aspecto sobrelevado e de consistência mucóide no agar MacConcKey. As colônias formadas são grandes devido à cápsula mucóide polissacarídica (Antígeno K) que protege contra a fagocitose por granulócitos, contra a ação de fatores bactericidas do soro e ainda tem função de auxiliar na aderência (Umed, 2008; Martinez *et al.*, 2004).

Este gênero possui características bioquímicas que permitem a sua identificação, tais como, oxidase negativa, fermenta glicose, reduz nitrato, lisina positiva, citrato e indol negativos, tríplice açúcar ferro (TAF) positivo com produção de gás, ornitina negativa, metaboliza a lactose, utiliza o citrato como fonte de carbono e também hidrolisa a uréia, formando gás ou não. A maioria das amostras é capaz de produzir o butilenoglicol como produto final da fermentação da glicose (Podschn *et al.*, 1992; Gales *et al.*, 1997; Koneman *et al.*, 2001).

Estes microrganismos podem ser encontrados em quase todos os ambientes naturais como solo, água e plantas. *K.pneumoniae* pode ser isolada da cavidade oral de indivíduos com ou sem doença periodontal e em orofaringe de portadores assintomáticos. As infecções causadas por este patógeno ocorrem em pessoas com sistema imunitário deprimido sendo responsável por alta taxa de mortalidade. Dentre as síndromes clínicas mais freqüentes estão: pneumonia, infecções do trato urinário, trato gastrintestinal e de feridas, bacteremia, rinite crônica atrófica, artrites, enterites, meningites em crianças e septicemia. Alguns estudos demonstraram que no mínimo 80% dos pacientes com infecção por *K.pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) apresentaram infecções carreadas do trato gastrintestinal. Desta forma deve-se considerar a tomada de precauções de contato para evitar que pacientes colonizados transmitam esta resistência a outros pacientes (Madson *et al.*, 1994; Shlaes, 1997; Piroth *et al.*, 1998; Ingham, 2000; Umed, 2008; Paterson & Bronomo, 2005).

A patogenicidade deste microrganismo pode ser atribuída à produção de enterotoxina estável ao calor; à habilidade em metabolizar a lactose; à presença de cápsula ou lipopolissacarídeo; à presença de adesinas com ou sem fímbrias

que favorece a sua adesão às mucosas; às células epiteliais do trato urogenital, respiratório e intestinal para produzir o processo infeccioso e protege a bactéria dos fatores bactericidas do soro acompanhado pela inibição da ativação dos componentes do complemento. A maioria dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* é encapsulada e adere *in vitro* a células intestinais com padrão agregativo. Estudos observaram que *K.pneumoniae* produtoras de ESBL do tipo SHV-4, possuem fimbrias adesinas do tipo KPF-28. A habilidade das *K.pneumoniae* produtoras de ESBL de escapar da atividade fagocítica dos neutrófilos polimorfonucleares pode ser responsável pelo grande potencial patogênico destas bactérias (Madson *et al.*, 1994; Podschun & Ullmann, 1998; Sahly *et al.*, 2004; Umed, 2008).

K.pneumoniae é importante causa de infecções comunitárias e hospitalares e a prevalência das infecções causadas por estas bactérias produtoras de ESBL varia conforme o país, a instituição de saúde e o sítio de isolamento. Um estudo realizado na Europa demonstrou que a prevalência de produção de ESBL entre isolados de *Enterobacteriaceae* varia de país para país, sendo que nos países baixos menos de 1% de *E.coli* e *K.pneumoniae* são produtoras de ESBL. Na França 40% dos isolados de *K.pneumoniae* produtoras de ESBL eram resistentes a ceftazidima. No Japão a resistência aos β -lactâmicos ainda é baixa, menos de 0,1% das *E.coli* e 0,3% das *K.pneumoniae* são produtoras de ESBL. Na Ásia as porcentagens de produção de ESBL em *E.coli* e *K.pneumoniae* variam de 4,8% na Coreia a 8,5% em Taiwan e mais de 12% em Hong Kong. Na Etiópia um estudo demonstrou que 94,7% das amostras deste patógeno eram resistentes à cefalosporinas e dentre estas 67% apresentaram altos níveis de resistência a múltiplas drogas (Philippon *et al.*, 1989; Jones, 2000; Braford, 2001; Marra, 2002).

Na América Latina a prevalência de amostras de *K.pneumoniae* produtoras de ESBL é bem maior que a média mundial, que varia entre 20 e 30%. No Brasil, alguns estudos realizados no Hospital São Paulo, hospital escola da Universidade Federal de São Paulo demonstraram que a prevalência de *K.pneumoniae* produtora de ESBL foi de 39%, em outro estudo constatou-se que 39% das cepas de *K.pneumoniae* isoladas da corrente sanguínea eram produtoras de ESBL. Neste mesmo hospital, Carmo Filho (2003) demonstrou que a prevalência de infecções causadas por *K.pneumoniae* em UTI de paciente adulto foi de 31% e destas 69% eram produtoras de ESBL e na UTI Neonatal a prevalência de infecção hospitalar causada pelo mesmo patógeno foi de 53,8% e destas 46,2% eram produtoras de ESBL (Gales *et al.*, 1997; Jones, 2000; Marra, 2002; Carmo Filho, 2003).

K.pneumoniae é o gênero que produz a maior variedade destas enzimas, o que poderia ser explicado pelo fato destes microrganismos serem bons vetores para plasmídeos ou por permitirem a evolução de genes que codificam ESBL mais rapidamente que outras *Enterobacteriaceae*. Muitos genes de ESBL são localizados em plasmídeos com poucos números de cópias (Livermore, 1995).

1.3. Mecanismos de Resistência Antimicrobiana

Resistência antimicrobiana pode ser definida como o conjunto de mecanismos de adaptação das bactérias contra os efeitos nocivos ou letais aos quais estas estão sendo submetidas. A resistência é considerada intrínseca quando o microrganismo possui naturalmente estruturas que lhe conferem resistência àquele antimicrobiano (Livermore, 1995).

Os padrões de resistência têm sido determinados por modificações na constituição da membrana externa de proteínas específicas, “outer membrane protein” (Omp), aperfeiçoamento da bomba de efluxo e produção de enzimas qualificadas e especializadas em hidrolisar antimicrobianos, fato este de muito interesse clínico, visto que, novos padrões de enzimas estão sendo recentemente identificados e determinados em isolados de diversos países do mundo. Além destes mecanismos, bactérias gram-negativas possuem a sua disposição mecanismos que conferem resistência aos carbapenems e aos antibióticos β -lactâmicos. Entre estes mecanismos estão: a falta de penetração da droga devido á mutações da Omp e bombas de efluxo, hiperprodução de β -lactamase do tipo AmpC e/ou β -lactamases hidrolisadoras de carbapenems (Bush,1995; Frere, 1995; Bush, 1998; Bush, 1999; Poirel *et al.*, 2000b; Bush,2001; Yan *et al.*, 2001; Michael, 2002; Livermore, 2002; Henrichfreise *et al.*, 2005; Pitout *et al.*, 2005; Nouér *et al.*, 2005).

O aumento da resistência antimicrobiana entre bactérias gram-negativas é um exemplo importante de como a bactéria pode procurar manter e expressar novas informações genéticas que podem conferir resistência a um ou mais antibióticos. Alguns estudos sobre resistência antimicrobiana podem variar, mas um consenso geral parece prevalecer, no qual, resistência a quinolonas e a β -lactâmicos de amplo espectro está aumentando nos membros da família *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter* spp. e os regimes de tratamento para erradicação das infecções causadas por *P. aeruginosa* estão tornando-se cada vez mais limitadas. Por exemplo, um estudo realizado durante cinco anos envolvendo diferentes centros da América Latina indicou que ano após ano resistência a *P. aeruginosa* tem crescido continuamente, sendo que 40% destes microrganismos apresentam resistência a drogas “antipseudomonas”,

incluindo carbapenems (Andrade *et al.*, 2003; Maniatis *et al.*, 2003; Neuhauser *et al.*, 2003).

Estes microrganismos possuem uma facilidade em adquirir resistência, por fenômeno de mutação, conjugação, transformação e transdução, o que torna a ação dos antimicrobianos ineficiente. A emergência de resistência aos agentes antimicrobianos, está relacionada à pressão seletiva exercida pelo uso intenso e indiscriminado desses medicamentos e a fatores relacionados às bactérias (Mary *et al.*, 1983, Friedrich *et al.*, 1999).

1.3.1. Enzimas modificadoras de antimicrobianos

Dentre os mecanismos de resistência bacteriana, a produção de enzimas é considerada a de maior relevância. Estas enzimas são responsáveis pela hidrólise do anel β -lactâmico, impossibilitando desta forma a sua atividade antimicrobiana (Livermore, 1995).

Os genes que codificam as β -lactamases podem ser cromossômicos ou plasmidiais, e a mobilidade genética pode ser ampliada por meio de transposons, que transportam os respectivos genes dos plasmídeos para os cromossomos, apesar de mais incomum, o inverso também pode ocorrer (Livermore, 1995; Tenover, 1995).

A classificação das β -lactamases foi proposta por Ambler em 1980 determinando quatro classes, designadas Classes A,B,C e D. Uma nova classificação foi proposta por Bush, mais tarde, em 1989, adaptada em 1995. A proposta classificava as β -lactamases de acordo com o seu substrato dentre o grupo das penicilinas, oxacilinas, carbenicilinas, cefalosporinas de espectro ampliado, imipenem e a susceptibilidade a inibição pelo clavulanato. Esta

classificação dividiu as β -lactamases em quatro grupos, denominados Grupos 1, 2, 3 e 4. As β -lactamases que possuem em seu sítio ativo o zinco foram classificadas na classe B de Ambler, enquanto as que foram encontradas serina em seu sítio ativo, foram classificadas nas classes A, C ou D (Jack *et al.*, 1970; Richmnound & Sykes, 1973; Ambler, 1980; Bush, 1989; Bush *et al.*, 1995).

A emergência da resistência aos antibióticos β -lactâmicos começou antes mesmo do primeiro β -lactâmico, a penicilina, ser desenvolvida. A primeira β -lactamase foi identificada em um isolado de *Escherichia coli* antes da liberação do uso da penicilina na prática médica (Abraham & Chain, 1940).

Agentes β -lactâmicos tais como penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems, estão entre os antibióticos mais frequentemente prescritos em todo o mundo. Em patógenos gram-negativos, β -lactamases são os principais fatores contribuintes para a resistência aos antibióticos β -lactâmicos, tão bem quanto sua alarmante evolução parece estar diretamente ligada ao uso clínico de novas sub-classes de β -lactâmicos (Medeiros, 1997).

1.3.2. β -lactamase de espectro ampliado ou estendido (ESBL) (Classe A)

As β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) foram primeiramente descritas em 1983, e possuem habilidade em hidrolisar oxymino-cefalosporinas, e monobactams, mas não cephamycinas ou carbapenems. Embora ESBLs tenham sido descritas em uma variedade de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* de diferentes partes do mundo, elas são frequentemente identificadas em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Essas enzimas pertencem à classe A e D de Ambler e a maior parte delas contém uma serina no seu sítio ativo, e são introduzidas dentro do grupo funcional 2be. As atividades das enzimas Classe A

são inibidas *in vitro* por inibidores de β -lactamase tais como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, mas aquelas pertencentes à classe D não podem ser inibidas (Ambler, 1980; Ambler, 1991; Bush *et al.*, 1995; Bradford, 2001).

As enzimas da classe A são caracterizadas por um sítio ativo de serina, uma massa molecular de aproximadamente 29,000Da, e hidrólise preferencial por penicilinas. Esta classe inclui enzimas como TEM-1, SHV-1, e penicillinase encontrada em *S.aureus* (Richmond & Sykes, 1973; Danel *et al.*, 1995).

As ESBLs não são ativas contra cefamicinas, e a maioria das linhagens é susceptível à cefoxitina e cefotetan. Entretanto, tem sido reportado que isolados produtores de ESBL podem tornar-se resistentes a cephamicinas devido à perda de uma membrana externa de proteínas (Omps) (Pangon *et al.*, 1989; Vatopoulos *et al.*, 1990; Martínéz-Martínéz *et al.*, 1996).

Atualmente existe uma grande variedade de ESBL distinguidas pelo perfil do substrato, reação com inibidores e ponto isoelétrico. A maior parte das ESBLs é derivada das enzimas TEM ou SHV. Em janeiro de 2006 havia 150 tipos de TEM, 32 de OXA, 86 de SHV, 53 de CTX e 3 de PER..As ESBLs do tipo TEM e SHV são mais frequentemente encontradas em *E.coli* e *K.pneumoniae*, entretanto, elas têm sido encontrada também em isolados de *Proteus* spp., *Providencia* spp., e outros gêneros de *Enterobacteriaceae* (Bush *et al.*, 1995; Gniadkowski *et al.*, 1998; Oliveira, 2007).

1.3.2.1. TEM

TEM-1 é a β -lactamase mais comumente encontrada em bactérias gram-negativas. Isolados de *E.coli* apresentam 90% de resistência a ampicilina devido à produção de TEM-1. Esta enzima é capaz de hidrolisar penicilinas e

cephalosporinas tais como, cephalotin e cephaloridine. TEM-2 é a primeira enzima derivada da TEM-1 pela substituição de um aminoácido simples. TEM-3, originalmente reportada em 1989 foi a primeira β -lactamase que exibiu um fenótipo de ESBL (Barthélémy *et al.*, 1985; Sougakoff *et al.*, 1988; Livermore, 1995).

Tanto a TEM-1 como a TEM-2 tem ponto isoelétrico (PI) entre 5,5 e 6,3; mas isoladamente o PI não permite a diferenciação de todas as variantes de TEM. Assim o perfil dos inibidores é fundamental nesta diferenciação (Philippon & Lagrange, 1994; Bradford, 2001).

O fato da TEM-1 ser mediada por plasmídeo e transposons facilita sua disseminação para outras espécies de bactérias. O primeiro grande surto devido a produtores de ESBL, especificamente por produtores de TEM-3 ocorreu em Clermont-Ferrand entre 1985-1987. Outros surtos ocorreram em Chicago, Nova Iorque, São Francisco e Boston em 1990. Tem sido sugerido que as ESBLs do tipo TEM ocorrem naturalmente devido o resultado da pressão seletiva de muitos β -lactamicos dentro das instituições hospitalares (Livermore, 1995; Blasquez *et al.*, 2000).

Embora as β -lactamases do tipo TEM sejam frequentemente encontradas em *E.coli* e *K.pneumoniae*, elas também são encontradas em outras espécies de bactérias gram-negativas, tais como: *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morgannii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, e *Salmonella* spp. Dentre as enzimas desta família a TEM-12 é a mais fraca, pois apresenta suscetibilidade a oximino-aminotiazolil cefalosporinas. Além disso, a TEM-42 foi encontrada em um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* (Morosini *et al.*, 1995; Paltzkill *et al.*, 1995;

Mugnier *et al.*, 1998; Tessier *et al.*, 1998; Bonnet *et al.*, 1999; Marchandin *et al.*, 1999; Perilli *et al.*, 2000; Bradford, 2001; Essack *et al.*, 2001).

1.3.2.2. SHV

A β -lactamase SHV-1 é mais comumente encontrada em *K.pneumoniae* e é responsável por um aumento de 20% na resistência a ampicilina nestas espécies. Em muitos isolados de *K.pneumoniae*, *bla shv-1* ou um gene relatado está integrado dentro do cromossomo da bactéria. Diferentemente das enzimas TEM, existem relativamente poucos derivados da SHV-1. A maioria dos variantes de SHV possuindo um fenótipo de ESBL é caracterizada pela substituição de uma serina por uma glicina na posição 238. Um número de variantes relatados para SHV-5 também tem uma substituição de lisina para glutamato na posição 240 (Huletsky *et al.*, 1993; Livermore, 1995; Tzouveleki & Bonomo, 1999).

A SHV tem ponto isoelétrico entre 7,0 e 8,2 e não hidrolisa as cefamicinas e carbapenems, mas é capaz de hidrolisar as oximinocefalosporinas, e é inibida pelos inibidores de β -lactamases. A família SHV é mais frequentemente encontrada em *K.pneumoniae*, contudo, esta enzima também, já foi relatada em *Citrobacter diversus*, *E.coli* e *P.aeruginosa* (Bradford, 2001).

A SHV-2 é a primeira β -lactamase capaz de hidrolisar os antibióticos β -lactâmicos de amplo espectro. Foi identificada pela primeira vez em uma linhagem de *K.ozonae* isolada na Alemanha. Logo após sua descoberta também houve sua identificação em outros países como a Argentina, Chile, China, Grécia, França e Tunísia (Bradford, 2001).

A SHV-6 tem capacidade de hidrolisar ceftazidima e monobactâmicos, porém não tem atividade contra cefalosporinas de espectro ampliado como a

cefotaxima. Foi inicialmente identificada em *K.pneumoniae* em 1991 na França (Bradford, 2001).

A SHV-38 é o primeiro relato de SHV β -lactamase capaz de hidrolisar imipenem. Esta é também a primeira SHV codificada cromossomalmente em *K.pneumoniae* e a emergência da SHV-38 pode constituir o primeiro passo para a seleção de enterobactérias com alta resistência aos carbapenems (Poirel *et al.*, 2003).

1.3.2.3. CTX-M

Atualmente uma nova família de ESBLs mediada por plasmídeos denominada CTX-M, que preferencialmente hidrolisa cefotaxime tem crescido. Elas têm sido preferencialmente encontradas em isolados de *Salmonella entérica serovar Typhimurium* e *E.coli*, mas têm sido descritas também em outras espécies de *Enterobacteriaceae*. As enzimas CTX-M incluem, CTX-M-1 (formalmente chamada de MEN-1), CTX-M-2 até CTX-M-10, e as enzimas Toho 1 e 2 (Bauernfeind *et al.*, 1990; Barthélémy *et al.*, 1992; Bauernfeind *et al.*, 1992; Bauernfeind *et al.*, 1996; Bonnet *et al.*, 2000; Bradford *et al.*, 1998; Gazouli *et al.*, 1998; Gniadowski *et al.*, 1998, Sabaté *et al.*, 2000; Ishii *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1998).

Um estudo filogenético da família CTX-M das β -lactamases demonstrou os 4 maiores tipos desta enzima: a CTX-M-1, incluindo a CTX-M-1 e CTX-M-3, o tipo CTX-M-2, incluindo CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, e Toho 1; Toho 2 e CTX-M-8, os últimos dois grupos contendo somente um membro até hoje (Bonnet *et al.*, 2000).

Estudos cinéticos têm mostrado que as enzimas CTX-M hidrolisam cefalitina ou cefaloridina melhor que zylpenicillina e elas preferencialmente

hidrolisam cefotaxime acima de ceftazidime. Outra característica desta enzima é que ela é inibida melhor pelos inibidores de β -lactamase, como tazobactam, do que pelo sulbactam e clavulanato (Bradford *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1998; Sabaté *et al.*, 2000; Tzouvelekis *et al.*, 2000).

Amostras expressando β -lactamases do tipo CTX-M têm sido isoladas de muitas partes do mundo, mas tem sido com maior frequência associadas com epidemias focais na Europa Oriental, Sul da América e Japão. Entretanto, recentemente identificou-se 23 isolados de *E.coli* e *Salmonella* isolados na Espanha expressando a CTX-M-9, sugerindo que nesta região pode ter um foco endêmico desta enzima (Bradford *et al.*, 1998; Gazouli *et al.*, 1998; Gniadkowski *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1998; Sabaté *et al.*, 2000).

1.3.2.4. OXA

As enzimas do tipo OXA pertencem à outra crescente família das ESBLs. Essas β -lactamases diferem das enzimas TEM e SHV por pertencerem a classe molecular D e grupo funcional 2d. Estas enzimas conferem resistência a ampicilina e cephalotin e são caracterizadas pela sua alta atividade hidrolítica contra oxacilina e cloxacillin e elas são pobremente inibidas pelo ácido clavulânico (Bush *et al.*, 1995).

Enquanto a maioria das ESBLs tem sido encontrada em *E.coli*, *K.pneumoniae*, e outras *Enterobacteriaceae*, as ESBLs tipo OXA são encontradas principalmente em *P.aeruginosa*. Muitas das ESBLs tipo OXA tem sido derivadas da OXA-10 (OXA-11, -14, -16 e -17) (Hall *et al.*, 1993; Danel *et al.*, 1995; Mugnier *et al.*, 1998; Danel *et al.*, 1999). As enzimas OXA provêm fraca resistência a oxyminocephalosporinas quando clonadas dentro de *E.coli*, mas possui alta

resistência em *P. aeruginosa* transconjugantes. Em contraste a maioria das ESBLs tipo OXA conferem resistência a ceftazidime, a OXA-17 confere resistência a cefotaxime e ceftriaxone mas provê somente proteção marginal contra ceftazidime. Com respeito a inibidores de β -lactâmicos, as enzimas OXA foram caracterizadas por sua falta de inibição pelo ácido clavulânico; entretanto a OXA-18 foi identificada por ser inibida por esta substância (Hall *et al.*, 1993; Philippon *et al.*, 1997; Danel *et al.*, 1999).

Uma enzima OXA adicional tem sido identificada, a OXA-21. Esta enzima foi encontrada em uma amostra de *Acinetobacter baumannii* e foi a primeira incidência desta enzima neste microrganismo. Pelo fato de *Acinetobacter baumannii* também expressar duas outras β -lactamases, não está claro se a enzima OXA-21 é uma ESBL ou uma enzima de espectro original (Vila *et al.*, 1997).

1.3.3. Metallo- β -lactamase (M β L – Classe B)

A produção de metalo-enzima por alguns patógenos é motivo de preocupação mundial, pela sua capacidade de degradar os carbapenems (Oliveira, 2007).

A partir de 1986, esta classe de enzima, produzida pela bactéria *Aeromonas hydrofila* e *Bacterioides fragilis*, foi amplamente estudada permitindo desta forma o conhecimento do seu sítio ativo, os mecanismos de ação, os pontos isoelétricos e meios de transmissão. Em 1987, foi reportada sua estrutura cristal, mas somente após o uso da cristalografia por raios-X que se conseguiu compreender e trabalhar melhor com esta enzima. Em 1991, foi identificada, pela

primeira vez, a sua codificação por genes plasmidiais (Watanabe, 1991; Rasmussen & Bush, 1997).

MBLs foram categorizadas formalmente de serina β -lactamases em 1980 na classificação esquemática proposta por Ambler. Em 1989, Bush classificou as MBLs dentro de um grupo separado, o grupo 3, de acordo com as suas propriedades funcionais. Esse esquema foi primariamente baseado no substrato dos microrganismos (em particular na hidrólise de imipenem), sua sensibilidade ao EDTA, e a falta de inibição pelos inibidores de serina β -lactamases. Em 1997 este esquema foi modificado para acomodar o crescente número de enzimas do grupo 3 que continuamente estavam sendo classificadas. Até o momento, somente dois tipos de MBLs têm sido estudadas, *Bacteróides fragilis* Ccra e IMP-1 da *Pseudomonas aeruginosa* (Ambler, 1980; Bush, 1989; Bush *et al.*, 1995; Rasmussen & Bush, 1997; Walsh *et al.*, 2005).

Todas as MBLs hidrolisam imipenem, mas sua habilidade em realizar esta hidrólise varia consideravelmente e a sua taxa pode ou não ser relacionada com o nível de resistência bacteriana aos carbapenems. Atua sobre todos β -lactâmicos, exceto os monobactâmicos. Em conformidade com a classificação de Ambler e do grupo 3 de Bush, Jacoby e Medeiros, estas enzimas foram divididas em subgrupos 3a, 3b, 3c, separadas por sua capacidade catalítica. As enzimas do subgrupo 3a hidrolisam, mais rapidamente, penicilinas a carbapenems, ou seja, possuem atividade de amplo espectro. As do subgrupo 3b agem especificadamente sobre carbapenems e por fim, as o subgrupo 3c, possuem alta atividade contra cefalosporinas, hidrolisam pobremente carbapenems e são inibidas por EDTA tão bem quanto outros agentes quelantes (Livermore, 1995; Rasmussen & Bush, 1997; Bush, 1998; Pellegrino *et al.*, 2002).

As MBLs são consideradas zinco-dependentes e necessitam deste metal para realizar a sua atividade. Por este motivo estas enzimas são inibidas por quelantes do zinco como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o ácido 2-mercapto-propiónico (2-MPA) (Arakawa *et al*, 2000; Siemann *et al.*, 2002).

A disseminação dos genes de MBL pode ocorrer devido ao consumo regional de cefalosporinas de amplo-espectro e de carbapenems. A maior parte dos genes codifica as MBLs do tipo VIM e IMP tão bem quanto as do tipo GIM-1 e podem ser encontradas como genes cassetes na classe 1 dos integrons, embora genes IMP também possa ser encontrado na classe 3 dos integrons (Arakawa *et al.*, 1995; Senda *et al.*, 1996a; Lauretti *et al.*, 1999; Poirel *et al.*, 2000a; Poirel *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2001; Collis *et al.*, 2002; Lombardi *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Castanheira *et al.*, 2004).

A maioria dos genes de MBLs são encontrados em plasmídeos usualmente entre 120 e 180 Kb, entretanto alguns genes, tais como, *bla VIM-7* dos Estados Unidos são carregados por um plasmídeo conjugativo de 24Kb (Toleman *et al.*, 2004).

A produção desta classe de enzima por diferentes gêneros de microrganismos se constitui de importância clínica e epidemiológica. A sua importância clínica se reveste do fato de tornar cada vez mais limitada as opções de tratamento de pacientes infectados por microrganismos produtores destas enzimas. Do ponto de vista epidemiológico e ambiental o que se observa é o aumento da disseminação do gene responsável pela codificação da MBL e o crescimento da prevalência de cepas resistentes em todo o mundo. No Japão houve um aumento de 19,3% em 1998 para 38% em 2002, de cepas resistentes aos carbapenems, enquanto no Brasil 44,8% de *P.aeruginosa* isoladas, foram

resistentes ao imipenem. Verificou-se também que 43,8% e 39,1% das resistências entre os brasileiros e italianos, respectivamente, se deve a presença da MBL (Walsh *et al.*, 2002; Fritsche *et al.*, 2005).

1.3.3.1. IMP

Esta família é muito comum no sul da Ásia, e foi a primeira indicação de MBLs encontrada em *P.aeruginosa* no Japão em 1988. A resistência foi encontrada em um plasmídeo conjugativo transferível que poderia ter sido mobilizado de outro isolado de *Pseudomonas* (Watanabe *et al.*, 1991; Osano *et al.*, 1994).

Em um estudo realizado no Japão entre 1992 e 1994 verificou-se a presença do gene *bla* IMP-1 em isolados de *P.aeruginosa*. Interessantemente, quando os MICs de imipenem dos isolados MBL positivo foram testados, eles variaram de 2mg/L a 128mg/L, o qual sugeriu que somente a aquisição de MBL não conferia resistência aos carbapenems. Em outro estudo realizado em 18 hospitais do Japão, foram isolados 54 microrganismos resistentes à ceftazidima detectados através de PCR, dentre eles, *K. pneumoniae* (Senda *et al.*, 1996b; Shibata *et al.*, 2003).

Foram identificados no Japão, durante uma pesquisa realizada com isolados de *Shigella flexneri*, *S.marcecens*, *P.aeruginosa*, e *Alcaligenes* spp, três variações da enzima IMP-1: IMP-3, IMP-6, e IMP-10. O gene *bla* IMP-10 foi encontrado em um plasmídeo de um isolado de *P.aeruginosa* e em cromossomo de outros isolados de *P.aeruginosa* e *Acromobacter xylosoxidans* (Yano *et al.*, 2001; lyobe *et al.*, 2000; lyobe *et al.*, 2002).

IMP-1 tem sido encontrado recentemente na Inglaterra em isolados de *A. junnii* e *A. baumannii*. Estudos retrospectivos em isolados resistentes coletados em 1994 em Hong Kong e em 1995 no Canadá determinaram que a resistência ao carbapenem fosse devido ao IMP-7 em *P.aeruginosa* no Canadá e devido ao IMP-4 em *Acinetobacter* spp. em Hong Kong. IMP-4 também tem sido encontrado na Austrália em *E.coli*, *K.pneumoniae*, e *P.aeruginosa*, possivelmente “importado” do sudeste da Ásia (Chu *et al.*, 2001; Gibb *et al.*, 2002; Towner *et al.*, 2002; Tysall *et al.*, 2002; Peleg *et al.*, 2004, Poirel *et al.*, 2004b).

Klebsiella pneumoniae produtora de IMP-1 foi reportada em um hospital localizado em Singapura em 2001. Em outro estudo realizado em 2003, foram detectados MBLs do tipo IMP-1 em 35% dos 130 isolados resistentes a carbapenems e ceftazidime, incluindo duas *P.aeruginosa*. Em 28 hospitais da Coreia localizados em 6 cidades 60% de MBL foram detectados. Resistência ao impenem tem aumentado na Coreia de 6% de todos os isolados em 1996 para 19% em 2001 (Lee *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2003).

A única informação na literatura científica sobre MBLs do tipo IMP na América tem principalmente, vindo do Brasil, onde existe um sério problema com isolados de *A. baumannii* multiresistentes a diversos antimicrobianos. Novos estudos contendo isolados coletados do SENTRY (worldwide antimicrobial surveillance program) tem identificado cinco microrganismos do Brasil contendo IMP-1 e um novo alelo divergente do IMP, *bla*IMP-16. A mais recente MBL do tipo IMP (IMP-18) tem sido encontrada em *P.aeruginosa* em Lãs Cruces, Novo México (Gales *et al.*, 2003a; Hanson *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2004).

1.3.3.2. VIM

O segundo grupo dominante das MBL são as enzimas do tipo VIM (Veronese imipenemase). VIM-1 foi descrito primeiramente em Verona, Itália, de um isolado de *P.aeruginosa*. Este isolado clínico, recuperado em 1997, foi resistente a diversos β -lactâmicos, incluindo piperacilina, ceftazidima, imipenem, e aztreonam (Lauretti *et al.*, 1999).

Esta enzima é típica da classe B, hidrolisando diversos β -lactâmicos exceto, aztreonam. Resistência a aztreonam em um isolado original de *P.aeruginosa* ocorreu devido a mecanismos de resistência tais como, bomba de efluxo e hiperprodução de cefalosporinas. O gene *blaVIM-1* foi integrado como um gene cassete dentro da classe 1 integron. No isolado da *P.aeruginosa* o gene *blaVIM-1* contendo o integron foi provavelmente localizado no cromossomo (Lauretti *et al.*, 1999).

VIM-1 tem sido detectado, também, em *E.coli* e em muitos isolados de *K.pneumoniae* na Grécia e na França. O gene *blaVIM-2* foi primeiramente identificado na França de um isolado de *P.aeruginosa* de uma cultura sanguínea de um paciente em 1996. Este isolado foi resistente a diversos β -lactâmicos, incluindo ceftazidime, cefepime, e imipenem, mas permaneceu susceptível ao aztreonam (Poirel *et al.*, 2000b; Giakkoupi *et al.*, 2003; Scoulica *et al.*, 2004).

Subsequentemente, dois isolados de *P.aeruginosa* tem sido identificados em Paris, França, possuindo o mesmo gene cassete *blaVIM-2*. Ambos isolados possuem resistência similar comparados a *P.aeruginosa* COL-1, com um alto nível de resistência a todos os β -lactâmicos, exceto aztreonam. *P.aeruginosa* contendo VIM-2 foram isoladas de pacientes hospitalizados, em Marseilles

(França), Itália e Grécia no período de 1995 a 1999. (Poirel *et al.*, 2001; Pounaras *et al.*, 2003; Lagatolla *et al.*, 2004).

P.aeruginosa produtora de VIM-2 também pode ser encontrada em outros países como, Japão, Coreia do Sul, Portugal, Espanha, Holanda, Croácia, Chile, Venezuela, Argentina, Bélgica e mais recentemente nos Estados Unidos (Cardoso *et al.*, 2002; Mendes *et al.*, 2004; Prats *et al.*, 2002; Sardelic *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2003; Yatsuyanagi *et al.*, 2004; Yum *et al.*, 2004).

Em 2004, uma epidemia nos Estados Unidos envolveu quatro pacientes da unidade de terapia intensiva contendo *P.aeruginosa* produtora de VIM-2, sendo que estes microrganismos foram sensíveis somente ao aztreonam. *P.aeruginosa* produtora de VIM-2 estiveram frequentemente envolvidas em sérias infecções, tais como septicemia e pneumonia em diferentes pacientes, e eles exibiram um alto nível de resistência ao imipenem. Em adição, VIM-2 tem sido detectado em *Citrobacter freundii* em Taiwan, em *S.marcescens* e *Enterobacter cloacae* na Coreia do Sul (Jeong *et al.*, 2003; Sahud *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2001; Yum *et al.*, 2002).

Recentemente, VIM-2 e uma nova variante das enzimas VEIO, VIM-3, tem sido identificadas em *P.aeruginosa* em Taiwan. VIM-4 foi reportado de uma *P.aeruginosa* em Larissa, Grécia, em 2001. Os isolados foram resistentes a todos os β -lactâmicos, mas manteve alguma atividade antimicrobiana para o aztreonam. Uma *P.aeruginosa* produtora de VIM-4 foi também identificada na Suécia, mas de um paciente que foi transferido da Grécia. Em outro estudo, identificou-se o mesmo gene de MBL em *K.pneumoniae* e *E.cloacae* de um paciente hospitalizado em maio de 2002 em Varese, Itália. Este paciente tinha recebido uma terapia contendo carbapenems que contribuiu para a seleção dos produtores

das enzimas VIM (Giske *et al.*, 2003; Libisch *et al.*, 2004; Luzzaro *et al.*, 2004; Pournaras *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2001).

VIM-5 difere de VIM-1 pela mudança de cinco aminoácidos. Esta enzima tem sido identificada em isolados de *K.pneumoniae* e em *P.aeruginosa* em Ankara, na Turquia. A última β -lactamase do tipo VIM a ser completamente caracterizada é a VIM-7, a qual tem sido caracterizada de uma *P.aeruginosa* resistente a carbapenem isolado em Houston, Texas (Bahar *et al.*, 2004; Toleman *et al.*, 2004).

Estudos indicam que β -lactamases do tipo VIM podem ser identificadas em áreas geográficas distantes, e muitos estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a disseminação de tais enzimas em certas áreas. Embora VIM-1 e VIM-2 tenham sido identificadas em muitas espécies de enterobactérias, *P.aeruginosa* constitui a mais importante reserva destas enzimas. Similarmente pesquisa tem sido feita em uma unidade de terapia intensiva na Coreia desde 1995, e verificou-se que a resistência a imipinem alcançou 16% de todos isolados de *P.aeruginosa*, e 9% dos isolados resistentes foram produtores de β -lactamase VIM-2 (Lee *et al.*, 2003; Lagatolla *et al.*, 2004).

Outro estudo tem sido desenvolvido na Grécia nos quais todos isolados de *P.aeruginosa* resistentes a carbapenems recuperado de pacientes separados durante um ano no Hospital Universitário de Thessaly, Larissa, foram estudados para produção de metalo- β -lactamases. Genes *blaVIM* foram detectados em 47 dos 53 isolados de *P.aeruginosa* resistentes a carbapenems (88,7%), que corresponderam a sete genótipos. Quatro genótipos possuíam *blaVIM-2* e três possuíam *blaVIM-4*. Isso demonstra que uma verdadeira disseminação está

ocorrendo na Europa Oriental e no Sudeste da Ásia (Pournaras *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2005).

1.3.3.3. SPM

Em São Paulo (Brasil) uma cepa de *P.aeruginosa* foi isolada em 1997 e analisada como parte do SENTRY e demonstrou conter um novo gene, designado *bla*SPM-1 (São Paulo MBL). O contexto genético do gene *bla*SPM-1 é único, pois está imediatamente associado com elementos de regiões comuns e não com transposons ou integrons. Esses elementos comuns diferem significativamente em isolados de *P.aeruginosa* coletados de diferentes áreas do Brasil (Toleman *et al.*, 2002; Poirel *et al.*, 2004a).

SPM-1, assim como IMP-1 e VIM-1, não hidrolisam ácido clavulânico ou aztreonam, os quais podem atuar como inibidores competitivos. A enzima demonstra um perfil de hidrólise único, e mantém uma cinética constante na presença de β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases. A variante SPM-1 difere do grupo das IMP e VIM por apresentar um intervalo de hidrólise maior na presença de penicilina e ampicilina e por exibir uma catálise reduzida para carbenicilinas; mas mesmo assim o grupo das SPM possui a capacidade de hidrolisar ticarcilina (Toleman *et al.*, 2002; Gales *et al.*, 2003b; Murphy *et al.*, 2003).

1.3.3.4. GIM e SIM

Em 2002, cinco isolados de *P.aeruginosa* foram recuperados de diferentes pacientes de um centro médico de Dusseldorf, Alemanha, e mostraram possuírem uma nova classe de β -lactamases designada GIM-1 (German imipenemase).

Possui 40% de homologia com IMP-1 e sua seqüência de aminoácidos. Esta enzima possui um potencial de hidrólise igual à IMP-1, atuando preferencialmente sobre a ampicilina e penicilina, quando comparado com sua atividade sobre carbencilina e ticarcilina. A principal diferença ocorre na maior atividade desta enzima na presença dos substratos cefotixina e cefalotina, e de mostrar elevada atividade catalítica em relação ao imipenem e meropenem (Castanheira *et al.*, 2004).

A última e a mais recente MBL descrita, foi a família SIM-1 isolada de uma cepa de *A. baumannii* na Coreia. A proteína tem um ponto isoelétrico de 7.2, classificado como um novo membro da classe B1, com 64 a 69% de homologia com as enzimas da família IMP (Lee *et al.*, 2005).

Os índices de resistências mediadas por *P.aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *S. marcescens* e entre outros bacilos gram-negativos tem aumentado progressivamente desde 2000, de acordo com o SENTRY. Existe uma severa limitação quanto às opções de tratamento na Ásia, Europa e América Latina, devido à grande co-resistência determinada por cepas produtoras de metaloenzima levando a um tratamento com o uso de drogas mais tóxicas como a Polimixina B e a Colistina (Gales *et al.*, 2003a; Fritsche *et al.*, 2005; Shibata *et al.*, 2003).

1.3.4. Classe C (AmpC β -lactamase)

As Amp C β -lactamases são enzimas mediadas por plasmídeos, capazes de hidrolisar β -lactâmicos de amplo espectro e com atividade contra cefamicinas. Estas enzimas são derivadas de genes cromossomais de bactérias gram-negativas e são resistentes a penicilinas de espectro estendido, monobactâmicos

e cefamicinas. São suscetíveis a cefepime, cefpirone e carbapenems. Estas enzimas pertencem ao grupo 1 de Bush ou classe C de Ambler, não são inibidas por inibidores de β -lactamases como o ácido clavulânico e têm modo de expressão cromossômico-induzível. Contudo, em alguns casos a produção de AmpC independe do agente indutor. A importância desta classe se faz por causa da distribuição universal entre a espécie e quando produzida em grandes quantidades, compromete a ação de vários β -lactâmicos (Livermore, 1995; Arakawa *et al.*, 2000; Bagge *et al.*, 2000; Livermore, 2000).

Sua produção natural ou constitutiva foi detectada entre os patógenos gram-negativos, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Providencia* spp., pertencentes ao grupo (CESP) e *P.aeruginosa*, podendo também produzir enzimas através da indução de algumas drogas antimicrobianas, como por exemplo, a cefoxitina e o imipinem e determinando resistência a cefalosporinas de terceira geração. O poder de indução é variável, as cefalosporinas de primeira geração, ampicilina e carbapenems são fortes indutores enquanto que as cefalosporinas de segunda e terceira gerações são indutores fracos. A indução da produção de AmpC ocorre pela exposição do microrganismo a um antibiótico indutor, que uma vez removido fará com que a produção de AmpC retorne aos níveis basais. Outros microrganismos como, *K.pneumoniae*, *E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp., *Morganella morganii* e *Acinetobacter* spp., possuem tal habilidade de produção constitutiva, mas não sofrem indução (Livermore, 1992; Bou *et al.*, 2000; Danes *et al.*, 2002; Rossi & Andreazzi, 2005).

Outro mecanismo responsável pela permanente hiperprodução de AmpC é a perda do gene repressor que atua como regulador. Neste caso a produção de

AmpC independe do agente indutor, mas as cepas mutantes que hiperproduzem AmpC podem ser selecionadas a partir das populações de cepas induzíveis, durante a terapia com drogas indutoras fracas (Limaye *et al.*, 1997; Rossi & Andreazzi, 2005).

1.3.5. Alteração do sítio de ação dos antimicrobianos

Como sítio de ação mais importante dos agentes antimicrobianos, temos a parede celular bacteriana, alvo da principal classe de agentes antimicrobianos: os β -lactâmicos. Os β -lactâmicos agem por meio da inibição de enzimas que desempenham um papel importante na síntese da parede bacteriana. Estas enzimas são as transpeptidases e as carboxipeptidases. Por ser o sítio de ação das penicilinas estas enzimas passaram a ser chamadas de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) e estão envolvidas nas várias etapas da multiplicação celular. Algumas delas atuam como enzimas líticas favorecendo a formação do septo para a divisão celular e outras, nas etapas finais de arranjo e formação da parede bacteriana (Spratt & Cromie, 1988).

A inibição destas enzimas por parte dos antimicrobianos β -lactâmicos produz a morte pela lise bacteriana. Em *Acinetobacter* spp. como em outros microrganismos gram negativos, a resistência aos β -lactâmicos não está comumente associada a alterações nas PBPs, como ocorre nas bactérias gram positivas, mas já foram relatadas alterações na expressão e na afinidade das distintas PBPs aos diferentes β -lactâmicos em mutantes de *A. calcoaceticus* resistentes às cefalosporinas. Em outro estudo envolvendo mutantes de *A. baumannii*, a alteração na expressão das PBPs foi relacionada à resistência ao imipenem. Mais recentemente foi demonstrada redução na expressão de PBP2,

uma proteína de 73 KDa em amostras de *A. baumannii* na Espanha (Gehrlein *et al.*, 1991; Obara & Nakae, 1991; Fernandez-Cuenca *et al.*, 2003).

Apesar de infreqüentes, alterações nas PBPs já foram reportadas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (Godfrey *et al.*, 1981; Gotoh *et al.*, 1990). Em outros estudos a resistência à penicilina em *P. aeruginosa* foi associada à diminuição da quantidade da PBP3 e a carbapenems em *P. aeruginosa* foi associada a alterações na PBP-4 (Gotoh *et al.*, 1990; Bellido *et al.*, 1999).

As mutações na topoisomerase do tipo II e IV associadas à expressão de bombas de efluxo podem levar ao alto grau de resistência a esses antimicrobianos identificados em isolados de *P.aeruginosa*. Outra classe de agentes antimicrobianos cuja resistência em *Acinetobacter* spp. que está associada à alteração no sítio de ação é a classe das quinolonas. Os principais alvos de ação desses antimicrobianos são as topoisomerase II (DNA girase) e topoisomerase IV, enzimas necessárias à replicação do DNA bacteriano. A topoisomerase II e a topoisomerase IV são constituídas de duas subunidades GyrA e GyrB e ParC e ParE respectivamente (Nakajima *et al.*, 2002).

Em várias bactérias, a resistência às quinolonas ocorre de maneira gradual e cumulativa e está relacionada às mutações seqüenciais ocorridas nos genes *gyrA* e *gyrB*, *parC* e *parE* que codificam as subunidades GyrA e GyrB, ParC e ParE das topoisomerases. Embora as bases moleculares da resistência às quinolonas em *Acinetobacter* spp. ainda não estejam totalmente elucidadas, estudos demonstram que a resistência à ciprofloxacina está associada a uma única mutação no gene *gyrA* enquanto que para as novas quinolonas, como moxifloxacina, são necessárias duas mutações, uma no gene *gyrA* e outra adicional no gene *parC* (Hooper, 2000; Vila *et al.*, 2002; Spence & Towner , 2003).

1.3.6. Alteração de permeabilidade de membrana externa

1.3.6.1. Porinas

A parede celular de bactérias gram-negativas difere da parede das bactérias gram-positivas principalmente pela presença de uma membrana externa. A maioria das proteínas desta membrana é chamada de proteínas transmembranas ou porinas, capazes de formar canais constituídos de água no seu interior. Por estes canais, ocorre a difusão de solutos hidrofílicos e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana (Nikaido, 1994). As porinas podem ser encontradas na forma oligomérica (trímeros) ou na forma monomérica. O peso molecular dos monômeros varia de 30 a 50 KDa. A maioria das porinas produz canais relativamente não específicos permeáveis a solutos hidrofílicos de até 600 KDa (Nitzan *et al.*, 2002).

Em algumas espécies, é claramente reconhecida a importância da perda, hiper ou diminuição da expressão de uma porina ou mais relacionada com resistência aos carbapenems. Um exemplo deste fato é a proteína OprD em *P.aeruginosa* porém, em *Acinetobacter* spp., ainda não são definidos quais são as porinas associadas à resistência aos diversos antimicrobianos. Um estudo verificou a perda de uma proteína com peso molecular entre 31-36 KDa somente em amostras de *A. baumannii* resistentes ao imipenem isoladas em um hospital brasileiro (Costa *et al.*, 2000; Livermore *et al.*, 2000).

Mais recentemente, um estudo demonstrou que a perda de uma OMP de 29 KDa foi a responsável pela resistência ao imipenem de um isolado clínico de *A. baumannii*. Em outro estudo foi sugerida uma associação de diferentes mecanismos, incluindo-se a perda de uma porina de 22,5 KDa em algumas

amostras de *A. baumannii* como sendo o mecanismo responsável pela resistência aos carbapenems (Limansky *et al.*, 2002; Fernandez Cuenca *et al.*, 2003).

Dentre as diferentes porinas que se encontram na membrana externa da *P. aeruginosa*, entre elas a OprC, OprD, OprE e OprF, a maior e mais abundante é a porina OprF, um polipeptídeo de 36-kDa. Provavelmente é a mais utilizada pela maioria dos β -lactâmicos para penetrar no interior da bactéria. As porinas OprC e OprE são canais inespecíficos, no entanto, são utilizadas por alguns antimicrobianos (Vila & Marco, 2002).

A função principal da proteína OprD de *P. aeruginosa*, é a captação passiva de aminoácidos e pequenos peptídeos que contêm esses aminoácidos através da membrana externa. No entanto, seus poros são também permeáveis aos carbapenems, mas não a outros β -lactâmicos. A perda desta porina acarreta resistência ao imipenem e uma diminuição da sensibilidade a meropenem sem alteração das concentrações inibitórias mínimas de β -lactâmicos outros que não carbapenems (Huang & Hancock, 1996; Livermore, 2001; Vila & Marco, 2002)

1.3.6.2. Efluxo

Em *Acinetobacter* spp. os estudos que pesquisam a presença desta bombas de efluxo, em sua maioria, se limitam a avaliações fenotípicas, utilizando-se inibidores universais de bombas de efluxo como a reserpina. Estes estudos, às vezes, apresentam resultados discrepantes como é o caso da pesquisa de bombas de efluxo na resistência às quinolonas. Ribera *et al.* (2002), verificaram redução na concentração inibitória mínima (MIC) para o ácido nalidíxico, mas não para ciprofloxacina na presença de inibidor; ao contrário, Vila *et al.* (2002),

verificaram na presença de reserpina, diminuição na MIC de trovafloxacin mas não para ácido nalidíxico (Vila *et al.*, 2002; Ribera *et al.*, 2002).

Em *Acinetobacter* spp., foi sugerido que, a presença de bombas de efluxo não contribui diretamente para a resistência aos β -lactâmicos. Entretanto, para outras classes de antimicrobianos, há dados associando a presença de bombas de efluxo à resistência. Como exemplo, tem-se a detecção do gene *mef* em *A.junii* e também do gene *tetA* responsável pela resistência às tetraciclinas devido à presença de bombas de efluxo em *Acinetobacter* spp. (Danes *et al.*, 2002; Ribera *et al.*, 2003; Quale *et al.*, 2003).

Magnet *et al.* (2001) descreveram em uma amostra de *A. baumannii* multirresistente, uma proteína de membrana (MFP) principalmente envolvida num sistema complexo de efluxo (RND) responsável pela resistência aos aminoglicosídeos de amplo espectro (Magnet *et al.*, 2001).

Recentemente, a falta de opção para o tratamento de infecções graves, causadas por bacilos gram-negativos multirresistentes, foi restaurado o uso parenteral das polimixinas. Das cinco polimixinas reconhecidas (A, B, C, D, E), somente as polimixinas B e E (colistina) são utilizadas clinicamente (Storm *et al.*, 1977; Levin *et al.*, 1999).

A ação detergente sobre as membranas, principalmente em bactérias gram negativas, leva às rápidas mudanças na permeabilidade da membrana citoplasmática e, conseqüentemente, à morte celular. Por este mecanismo de ação sobre as membranas, seus efeitos tóxicos são importantes. Este fato fez com que esta classe de drogas passasse a ter uma utilização mais restrita, deixando até mesmo de existir um critério para interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade após 1976 (Wiese *et al.*,1998; Gales *et al.*, 2001).

Recentemente, Gales *et al.* (2001) propuseram que os critérios de sensibilidade estabelecidos para as polimixinas ainda poderiam ser aplicados na interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade uma vez que esta droga novamente está sendo utilizada clinicamente (Gales *et al.*, 2001; Levin, 2003).

Estudos mais recentes têm demonstrado que a utilização de polimixina B, em casos graves de infecções, mostrou alta efetividade e menor toxicidade do que anteriormente relatada (Levin, 2003; Ouderkirk *et al.*, 2003).

No Brasil, particularmente no Hospital São Paulo /EPM/UNIFESP, já foram detectadas e descritas na literatura amostras de *Acinetobacter* spp. resistentes à polimixina B. Considerando o fato de que esta classe de droga é utilizada em infecções causadas por amostras multirresistentes, o relato de amostras resistentes, causa uma grande preocupação pois não haveria provavelmente outra classe de antimicrobianos disponível para o tratamento destas infecções (Reis *et al.*, 2003).

1.3.6.3. Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos

A resistência aos aminoglicosídeos em *P. aeruginosa* pode ocorrer devido a alterações na expressão de proteínas de membrana externa, efluxo ativo e principalmente produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Essas enzimas são codificadas por genes localizados em plasmídeos, transposons ou integrons. Cerca de 70 enzimas modificadoras de aminoglicosídeos diferentes já foram identificadas. As enzimas mais freqüentes em *P. aeruginosa* são adeniltransferase 2'-I que confere resistência à gentamicina, tobramicina, dibekacina e kanamicina e a acetiltransferase 6'-II que confere resistência à

tobramicina, gentamicina e netilmicina (Giamarellou & Antoniadou, 2001; Wright, 2001).

A resistência intrínseca aos antimicrobianos em *P. aeruginosa* é expressa de maneira variável por todas as amostras, as quais são menos sensíveis que as enterobactérias à maioria dos antimicrobianos. Este comportamento frente aos antimicrobianos foi atribuído à impermeabilidade, no entanto, hoje se sabe que esta resistência deve-se à impermeabilidade associada a sistemas de efluxo dependentes de energia (Livermore, 2001).

Quatro sistemas de efluxo da família RND são descritas em *Pseudomonas aeruginosa*: i) MexAB-OprM, ii) MexCD-OprJ, iii) MexEF-OprN e, iv) MexXY-OprM e são constituídos da seguinte forma: i) bomba de efluxo na membrana interna (ou citoplasmática): Mex B, Mex D, Mex F ou Mex Y, ii) proteína formadora do canal extrusor na membrana externa: OprJ, OprM, OprN e iii) proteína de fusão que liga os outros dois componentes da bomba de efluxo: Mex A, Mex C, Mex E ou Mex X (Livermore, 2002).

Esses sistemas contribuem para a resistência intrínseca e adquirida da *P. aeruginosa* através da extrusão de vários antimicrobianos, como tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol, eritromicina e β -lactâmicos (Li *et al.*, 1994).

Entre os sistemas caracterizados, o sistema MexAB-OprM é o maior sistema constitutivamente expresso e contribui para a extrusão de uma grande variedade de β -lactâmicos principalmente o meropenem (Köhler *et al.*, 1999; Livermore, 2001; Li *et al.*, 2003).

O sistema MexEF-OprN não contribui para o efluxo de β -lactâmicos e é regulado pelo gene *nfxC*, que por sua vez co-regula a porina OprD, originando uma diminuição em sua expressão, e aumentando a resistência à imipenem. Por

outro lado mutantes *nfxB* que expressam MexCD-OprJ tornam-se mais sensíveis a imipenem, biapenem e outros β -lactâmicos (Shiba *et al.*, 1995).

O sistema MexXY-OprM desempenha um papel muito importante na resistência intrínseca da *P. aeruginosa* a aminoglicosídeos, tetracilina e eritromicina (Aires *et al.*, 1999, Masuda *et al.*, 2000).

Embora alguns dos genes responsáveis pela expressão dos sistemas já sejam conhecidos, as condições responsáveis pela indução dos sistemas MexCD-OprJ e MexEF-OprN são desconhecidos e a expressão deles aparentemente só ocorre em mutantes. Alguns estudos mostraram que a expressão dos sistemas MexCD-Oprj e Mex EF-OprN pode ocorrer em resposta a mudanças no sistema MexAB-OprM. Exemplos de perda do sistema MexAB-OprM e ou proteína OprM resultou em aumento da expressão dos outros dois sistemas, mostrando uma relação inversa entre esses sistemas. A expressão de sistemas de efluxo (Mese AB-OprM e Mese EF-OprM) foi demonstrado em isolados clínicos de *P. aeruginosa* fato este, até então somente observado em mutantes de laboratórios, mais notoriamente a proteína MexB (Pumbwe *et al.*, 2000).

2. OBJETIVOS

1. Detectar, isolar e identificar *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* de efluentes de esgotos de 10 hospitais de Goiânia e da Estação de Tratamento de Esgoto de Goiânia (ETE).
2. Caracterizar o perfil de susceptibilidade dos microrganismos isolados.
3. Detectar fenotipicamente a produção de ESBL.

3. METODOLOGIA

3.1. Coleta das amostras de água de esgoto hospitalar

Foram selecionados para o estudo 10 hospitais da cidade de Goiânia, localizados nos setores Universitário, Sul, Bueno, Centro e Parque Ateneu. Destes, sete são privados e três públicos, e entre estes, um é universitário. Também foi obtida uma amostra da água da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), em dois pontos distintos, antes do início do tratamento (afluente) e após o tratamento (efluente), no ponto onde a água é eliminada no Rio Meia Ponte. Para a coleta das amostras foi utilizado um balde de alumínio que foi esterilizado previamente. A coleta das amostras ocorreu entre os meses de maio e junho de 2008, sendo que as amostras foram coletadas no período da tarde.

Após a obtenção das amostras, as mesmas foram armazenadas em recipientes estéreis, e conservadas dentro de uma caixa de isopor com gelo até a estocagem no laboratório onde ocorreu o seu processamento. Foram transferidos 8mL da água de todas as amostras para tubo tipo Falcon utilizando-se uma pipeta estéril. Após esta transferência os tubos foram agitados no vórtex e centrifugados durante 10 minutos/3000rpm para a retirada do sobrenadante. Em seguida foi feita a suspensão do sedimento em 5mL de meio Brain Heart Infusion Broth (BHI). As amostras foram incubadas à 35°C por 4 horas.

Depois deste período este caldo foi homogeneizado e transferido 200µL para placa de Petri contendo ágar sangue. Foi utilizada alça de Drigalski para espalhar o inóculo bacteriano no meio de cultura. As placas foram incubadas à 35°C por 24 horas.

3.2. Identificação bacteriana

A identificação das bactérias foi realizada no Setor de Microbiologia do Laboratório da Área da Saúde da Universidade Católica de Goiás por metodologia semi-automatizada (Bio Merieux). Para a realização da identificação dos isolados inicialmente foi realizada a coloração de Gram e bacterioscopia. Após a verificação da morfologia dos patógenos, repicou-se as colônias em ágar bilesulina, ágar Mac ConKey, ágar manitol e ágar sangue, conforme o resultado obtido pela coloração.

Para a identificação de cocos gram-positivos foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: catalase, teste de bilesulina e API Staph (Bio Merieux). API Staph foi utilizado após verificar que uma bactéria era pertencente à Família Staphylococaceae, ou seja, com o crescimento em agar manitol. Para a realização desta prova é necessário fazer a preparação da câmara úmida, suspensão para inoculação, preparação da galeria, adição de reagentes e posteriormente leitura da galeria API Staph. A leitura para a identificação bacteriana foi realizada pelo programa APILAB PLUS. O teste de bilesulina foi realizado para identificação de *enterococcus*.

Para a identificação de bacilos gram-negativos foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: teste de motilidade (MIO), uréia, oxidase, tríplice açúcar ferro (TAF) e API20E (Bio Merieux). API20E foi utilizado após verificar que uma bactéria era pertencente à Família Enterobacteriaceae, ou seja, com crescimento em ágar Mac Conkey. Para a realização desta prova é necessário fazer a preparação da câmara úmida, suspensão para inoculação, preparação da

galeria, adição de reagentes e posteriormente leitura do API20E. A leitura para a identificação bacteriana também foi realizada pelo programa APILAB PLUS.

Após a identificação, os microrganismos foram enviados para o Laboratório de Microbiologia Clínica e Ambiental (LABMICA) onde foram armazenados em “Trypticase Soy Broth” (TSB) suplementado com 15% de glicerol à -86°C para a realização dos outros estudos microbiológicos.

Os demais estudos microbiológicos foram realizados no LABMICA – Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde da Universidade Católica de Goiás.

3.3. Avaliação da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

As amostras dos bacilos gram-negativos, *K.pneumoniae*, *E.coli*, *P.aeruginosa* e *A. baumannii* foram retiradas do banco de microrganismos do LABMICA – UCG e semeadas em ágar MacConkey (Oxoid, Inglaterra). Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados através do método de antibiograma em placa, ou método da difusão em disco modificado por Kirby-Bauer. As amostras foram classificadas em sensíveis, intermediárias ou resistentes, utilizando-se os limites de sensibilidade estabelecidos pelo NCCLS (2002).

Os antimicrobianos utilizados para as amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* foram: ampicilina, piperacilina, aztreonam, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, imipenem, ciprofloxacina, gentamicina, amicacina e cefepima.

Os antimicrobianos utilizados para as amostras de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* foram: ampicilina-sulbactam, piperacilina,

aztreonam, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepime, ceftriaxona, cefotaxima, gentamicina, ciprofloxacina e imipenem.

3.4. Identificação fenotípica das cepas bacterianas prováveis produtoras de ESBL.

O método de triagem para detecção de cepas produtoras de ESBL baseou-se no perfil de sensibilidade e as prováveis amostras produtoras de ESBL foram identificadas segundo critérios estabelecidos pelo NCCLS (2005), no qual houve resistência a qualquer um dos substratos (aztreonam, ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima e cefpodoxima) e o teste confirmatório realizado através do teste de disco-difusão duplo ou disco de aproximação.

Para cada amostra foi realizada uma suspensão bacteriana utilizando-se solução salina a 0,5% e a turbidez foi ajustada a metade da escala 1 de McFarland. Após a homogeneização da suspensão, essa foi semeada em placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Inglaterra), usando-se um swab. O swab foi umedecido com a solução bacteriana e o excesso retirado comprimindo-se o mesmo contra as paredes do tubo contendo a solução.

A inoculação no ágar foi feita em toda a extensão do meio de cultura girando-se a placa. Após aproximadamente 15 minutos de semeadura, os discos de difusão foram colocados sobre o ágar com o auxílio de uma pinça.

Para a detecção de β -lactamase de espectro ampliado (ESBL) foi usado o método de disco aproximação. Foram utilizados os seguintes substratos: amoxicilina/ácido clavulânico (20 μ g/10 μ g) (Sensifar, Brasil), aztreonam (30 μ g) (Oxoid, Inglaterra), ceftriaxona (30 μ g) (Oxoid, Inglaterra), ceftazidima (30 μ g) (Oxoid, Inglaterra), cefotaxima (30 μ g) (Oxoid, Inglaterra), e cefpodoxima (30

μg) (Oxoid, Inglaterra). Para esta metodologia o disco de amoxicilina/ácido clavulânico (20 μg /10 μg) foi colocado a 20mm centro a centro de cada oximino-betalactâmico testado, conforme a orientação do NCCLS (2005). O diâmetro dos halos de inibição foi lido após a incubação à temperatura de 35°C, por 18 a 24 horas (Figura 1).

Após o período de incubação foi feita a mensuração do halo de inibição para confirmar a produção de ESBL. Halos de inibição > 22mm cefpodoxima, ou > 27mm para cefotaxima, ou > 25mm para ceftriaxona, ou > 22mm para ceftazidima apresentavam um resultado positivo para a produção de ESBL (NCCLS 2005).

4. RESULTADOS

Pela análise microbiológica da água foi possível identificar 73 microrganismos, 67 bacilos gram-negativos e 6 cocos gram-positivos. Dentre os bacilos gram-negativos 10 (14,92%) eram *E.coli*, 10 (14,92%) *K.pneumoniae*, 3 (4,47%) eram *P.aeruginosa* e 1 (1,49%) *A.baumannii*.

A distribuição dos microrganismos gram negativos está apresentada na Tabela 1 e na Tabela 2 a distribuição dos microrganismos gram positivos.

Tabela 1. Distribuição dos microrganismos gram negativos provenientes das amostras de água de esgoto hospitalar de 10 hospitais e da Estação de Tratamento de Esgoto de Goiânia – GO 2008.

Microrganismos	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	ETE eflu.	ETE aflu.
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
<i>Cryseomonas luteola</i>	1(1,49)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	1(1,49)	1(1,49)	1(1,49)	-	-	2(2,98)	2(2,98)	-	1(1,49)	-	2(2,98)	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	2(2,98)	3(4,47)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1(1,49)	3(4,47)	-	-	-	-	1(1,49)	3(4,47)	2(2,98)	-	-	-
<i>Aeromonas hydrofila</i>	1(1,49)	-	-	-	-	2(2,98)	3(4,47)	-	2(2,98)	2(2,98)	-	-
<i>Enterobacter sakazaki</i>	-	1(1,49)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	1(1,49)	-	-	-	-	-	-	1(1,49)	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1(1,49)	-	-	-	-	-	-	-	2(2,98)	-	-
<i>Kluyvera spp</i>	-	1(1,49)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia odorifera</i>	-	1(1,49)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	1(1,49)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	-	-	-	1(1,49)	1(1,49)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus penerii</i>	-	-	-	-	-	-	-	1(1,49)	-	-	-	1(1,49)
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(1,49)	4(5,96)
<i>Flavibacterium oryzihabitans</i>	-	-	-	-	-	1(1,49)	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus spp</i>	-	-	-	-	-	-	1(1,49)	-	-	2(2,98)	-	-
<i>Shewan putrefasciens</i>	-	-	-	-	-	-	2(2,98)	-	-	-	-	-
<i>Vibrio fluviales</i>	-	-	-	-	-	-	2(2,98)	-	-	-	-	-
<i>Bord/Alc/Mor. Spp</i>	-	-	-	-	-	-	2(2,98)	-	1(1,49)	-	-	-
<i>Citrobacter freudii</i>	-	-	-	-	-	-	1(1,49)	-	1(1,49)	-	-	-
Total	6	12	2	1	1	5	14	4	8	6	3	5

Tabela 2. Distribuição dos microrganismos gram positivos provenientes das amostras de água de esgoto hospitalar de 10 hospitais e da Estação de Tratamento de Esgoto de Goiânia – GO 2008.

Microrganismos	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	ETE eflu.	ETE aflu.
	N (%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1(16,66)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1(16,66)	1(16,66)	-	1(16,66)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus spp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2(33,33)	-	-
Total	2	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0

O perfil de sensibilidade da *E.coli*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* e *A.baumannii* está demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Perfil de suscetibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos testados *in vitro* isolados da água de esgoto de dez hospitais participantes e da Estação de Tratamento de Esgoto de Goiânia – 2008.

Antimicrobianos	<i>Escherichia coli</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Acinetobacter baumannii</i>		
	N (%)			N (%)			N (%)			N (%)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
AMP	6(60)	-	4(40)	-	-	-	1(10)	2(20)	7(70)	-	-	-
PIP	5(50)	2(20)	3(30)	3(100)	-	-	3(30)	5(50)	2(20)	1(100)	-	-
ATM	-	-	10(100)	3(100)	-	-	10(100)	-	-	-	1(100)	-
PTZ	-	-	-	3(100)	-	-	-	-	-	1(100)	-	-
CAZ	10(100)	-	-	3(100)	-	-	10(100)	-	-	1(100)	-	-
CTX	10(100)	-	-	-	3(100)	-	10(100)	-	-	1(100)	-	-
CRO	10(100)	-	-	2(66,6)	1(33,3)	-	10(100)	-	-	-	1(100)	-
IMP	10(100)	-	-	3(100)	-	-	9(90)	1(10)	-	1(100)	-	-
CIP	8(80)	-	2(20)	3(100)	-	-	9(90)	1(10)	-	1(100)	-	-
GEN	9(90)	-	1(10)	2(66,6)	1(33,3)	-	10(100)	-	-	1(100)	-	-
AMI	10(100)	-	-	-	-	-	10(100)	-	-	-	-	-
COM	10(100)	-	-	3(100)	-	-	10(100)	-	-	1(100)	-	-
AST	-	-	-	-	-	3 (100%)	-	-	-	1(100)	-	-
CPD	10(100)	-	-	-	-	-	10(100)	-	-	-	-	-
TIC	-	-	-	3(100)	-	-	-	-	-	1(100)	-	-

Abreviaturas: AMP-ampicilina, PIP-piperacilina, ATM-aztreonam, PTZ-piperacilina-tazobactam, CAZ-ceftazidima, CTX-cefotaxima, CRO-ceftriaxona, IMP-imipenem, CIP-ciprofloxacina, GEN-gentamicina, AMI-amicacina, CPM-cefepima, AST-ampicilina/sulbactam, CPD – cefpodoxima, TIC - ticarcilina.

As amostras de *E.coli* apresentaram diferenças no perfil de sensibilidade à algumas classes de drogas. Todas as amostras foram sensíveis à ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, imipenem, amicacina, cefepima e cefpodoxima. Dentre as 10 amostras, 6 (60%) foram sensíveis a ampicilina, 5 (50%) à piperacilina, 8 (80%) à ciprofloxacina e 9 (90%) à gentamicina. A ampicilina, piperacilina, ciprofloxacina e gentamicina não apresentaram atividade contra 4 (40%), 3 (30%), 2 (20%) e 1 (10%) das cepas de *E.coli*, respectivamente. As amostras de *E.coli* apresentaram resistência total ao aztreonam (100%). Apenas 2 (20%) das

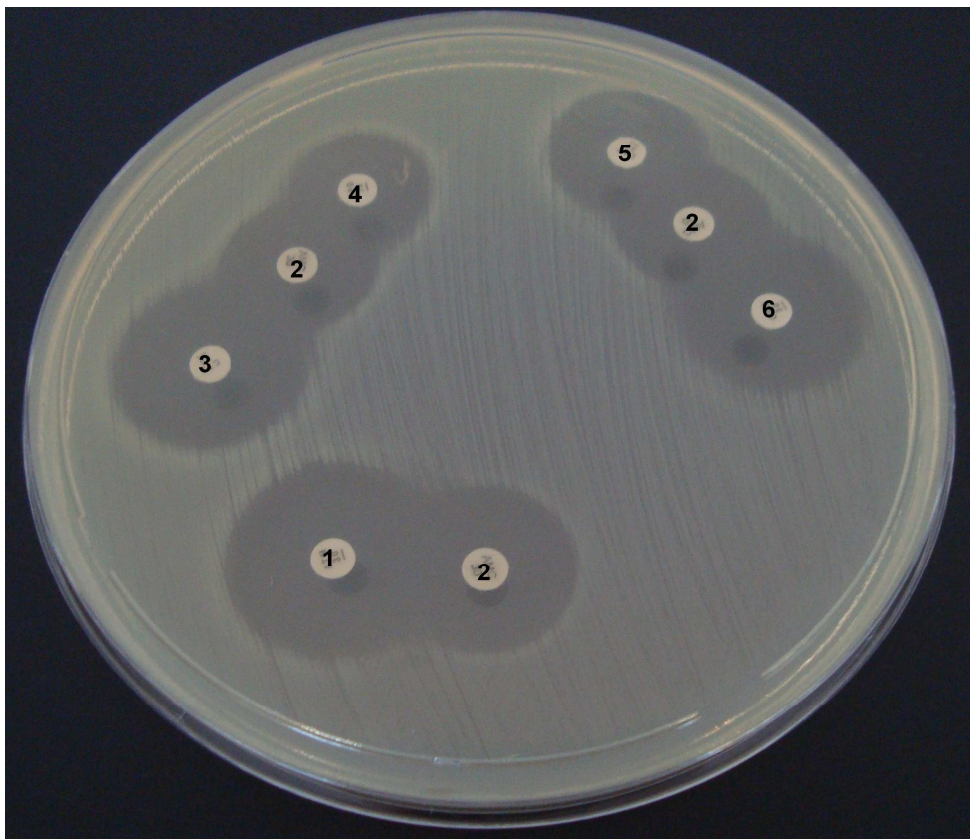
amostras deste microrganismo apresentaram resistência intermediária à piperacilina (Tabela 3).

Em relação às amostras de *P.aeruginosa*, 3 (100%) apresentaram resistência à ampicilina-sulbactam. A resistência intermediária à cefotaxima foi encontrada em 100% dos isolados. O mesmo padrão de sensibilidade foi encontrado em 1 (33,3%) para ceftriaxona e 1 (33,3%) para gentamicina. A piperacilina, aztreonam, piperacilina associada ao tazobactam, ceftazidima, imipenem, ciprofloxacina e cefepima tiveram a maior taxa de sensibilidade dentre os antimicrobianos testados (100%) (Tabela 3).

O perfil de sensibilidade das amostras de *K.pneumoniae* mostrou que 7 (70%) dos isolados apresentaram resistência à ampicilina, 2 (20%) das amostras apresentaram resistência à piperacilina, enquanto que 5 (50%) apresentaram resistência intermediária a este mesmo antimicrobiano. Além da piperacilina, 2 (20%) dos isolados apresentaram resistência intermediária à ampicilina e 1 (10%) apresentou resistência intermediária ao imipenem e à ciprofloxacina. Os antimicrobianos ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, gentamicina, amicacina e cefepima inibiram totalmente o crescimento destas cepas (Tabela 3).

Nenhuma resistência total foi detectada na amostra de *A.baumannii*, apresentando apenas resistência intermediária ao aztreonam e a ceftriaxona. Aos demais antimicrobianos o isolado era sensível (Tabela3).

As amostras de *E.coli* com resistência total ao aztreonam não eram produtoras de β -lactamase de espectro ampliado (Figura 1).



Legenda: 1 ATM (aztreonam), 2 AMC (amoxicilina/ácido clavulânico), 3 CTX-(cefotaxima), 4 CPD (cefpodoxima), 5 CAZ-(ceftazidima), 6 CRO (ceftriaxona).

Figura 1. Teste de disco-difusão duplo ou disco de aproximação.

5. DISCUSSÃO

A utilização indiscriminada de antimicrobiano tem causado grande impacto na saúde pública, por meio da seleção de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos convencionais, causando o aumento das taxas de infecção hospitalar com alto índice de morbidade e mortalidade (Pereira *et al.*, 2004; Depizzol *et al.*, 2005).

A maioria das substâncias utilizadas para tratamento são parcialmente metabolizadas pelos pacientes e descartadas na rede de esgoto do hospital e posteriormente na rede de esgoto pública. A partir deste momento, este efluente hospitalar pode ser liberado no meio ambiente, principalmente nos rios ou nos compartimentos de água. O uso destes compartimentos como receptores para afluentes orgânicos têm aumentado com o crescimento populacional agravando o declínio das condições sanitárias. As deposições de afluentes orgânicos dentro de reservatórios de água permitem a contaminação por diversos patógenos, incluindo bactérias portadoras de genes de resistência a vários antimicrobianos. Esses ambientes podem tornar-se importantes locais de contaminação humana por estes microrganismos. Elementos genéticos tais como plasmídeos podem amplificar o problema contribuindo para o aumento da multi-resistência bacteriana, tendo em vista que estes elementos genéticos móveis podem ser transferidos para outras bactérias de gêneros e espécies não correlacionados (Esteves, 1998; Pereira *et al.*, 2004; Kummerer, 2004).

Neste estudo foram encontrados 73 microrganismos. Dentre estes 6 são cocos gram-positivos e 67 bacilos gram-negativos. Dentre as bactérias gram-

negativas 10 foram *E.coli*, 3 *P.aeruginosa*, 10 *K.pneumoniae* e 1 *A.baumannii* (Tabela 1).

Alguns microrganismos causadores de infecções hospitalares, tais como bacilos gram-negativos (BGN), incluindo *Enterobacter* spp., *P.aeruginosa* podem persistir por longos períodos no meio ambiente. A presença de coliformes fecais (*E.coli*) pode indicar contaminação fecal recente ocasionada por humanos ou animais. Outras enterobactérias em adição ao *Enterococcus* podem manter-se por períodos prolongados no meio ambiente. Estes microrganismos são comuns na microbiota intestinal e em certas situações a diminuição da imunidade pode causar infecções endógenas e exógenas (Mendonça-Hagler & Hagler, 1991; Harihan & Weinstein, 1996).

Em um estudo realizado em rios dos EUA, verificou-se a presença de *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiela* e *Proteus*, sendo que os dois últimos microrganismos foram isolados com menor freqüência do que os outros. Já em outro estudo detectou-se *K.pneumoniae*, *E.coli*, *E.cloacae*, *C.freundii*, *Aeromonas* spp., *S.marcescens*, *Citrobacter* spp., *K.oxytoca* e *A.calcoaceticus* de três lagoas e em um hospital universitário, localizados no Rio de Janeiro, Brasil. Outros microrganismos como *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Proteus*, *Arthrobacter*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Pectobacterium*, *Chromobacterium*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* e *Micrococcus* também foram encontrados em rios e na baía de Tillamook, Oregon em 1976 (Kelch & Lee, 1978; Ortolani *et al.*, 1997; Ash *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2004).

Além da presença de diversos patógenos, estudos conduzidos em vários países detectaram a presença de antibióticos em diferentes compartimentos

ambientais, dentre eles estão os efluentes hospitalares e municipais e a estação de tratamento de esgoto. Os antimicrobianos detectados pertencem a diferentes classes de antibióticos, tais como, macrolídeos, tetraciclinas, sulphonamidas, quinolonas e penicilinas. Verificou-se a presença de 80µg/L de ampicilina e mais de 124,5µg/L de ciprofloxacina na rede de esgoto hospitalar. Pode-se afirmar que a presença destas drogas nos efluentes hospitalares contribui para a seleção de bactérias contendo genes de resistência aos antibióticos no meio ambiente (Richardson & Bowron, 1985; Davison, 1999; Bjorkman *et al.*, 2000; Kolpin *et al.*, 2002; Kummerer, 2003; Kummerer, 2004).

Bactérias gram-negativas resistentes à cefalosporinas de amplo espectro, monobactâmicos, carbapenems e β -lactâmicos associados aos inibidores de β -lactamases tem emergido e possuem uma variedade de mecanismos de resistência como a produção de β -lactamases de espectro ampliado, produção de carbapenemases, alterações nas PBPs e/ou outras alterações na permeabilidade da membrana. Estes mecanismos de resistência podem coexistir em um único patógeno (Wood & Pierson, 1996; Pitout *et al.*, 1997).

No presente estudo *E.coli* foram encontrados isolados de resistência à ampicilina, piperacilina, ciprofloxacina e gentamicina sendo que todos foram resistentes ao aztreonam (Tabela 3). Um estudo realizado em três estações de tratamento de esgoto da Austrália detectou a presença de *E.coli* resistente a muitos antibióticos, tais como ampicilina e piperacilina, cefalotina, cefuroxima, ácido nálidixico, tetraciclinas e sulfamethoxazole/trimetropim. Sendo que a taxa mais alta de resistência foi em relação à tetraciclina (57%). A resistência aos antimicrobianos testados pode estar associada a diferentes mecanismos de resistência como a produção de β -lactamase de espectro ampliado, bomba de

efluxo, mutação nos genes que codificam a DNA girase e a topoisomerase, bem como a perda de porina e alteração da proteína ligadora de penicilina (PBP) (Kummerer, 2004).

As cepas de *E.coli* foram inibidas pelo imipenem (100%), ceftazidima (100%), amicacina (100%) e cefepime (100%). Apenas 2 (20%) amostras de *E.coli* foram resistentes à ciprofloxacina, este mecanismo de resistência está associado às mutações existentes nos genes que codificam a DNA girase e a topoisomerase (Tabela 3). Em outro estudo realizado em 2004 em hospitais brasileiros dentre as amostras de *E.coli* testadas (144), a maior porcentagem de sensibilidade foi observada para os carbapenems (100%), seguido pela ceftazidima e amicacina (91%), piperacilina/tazobactam (84,8%) e cefepime (80%), assemelhando-se as taxas encontradas nesta pesquisa. Houve grande variação nas taxas de sensibilidade entre as cefalosporinas de terceira e quarta gerações. A ceftazidima foi a cefalosporina que exibiu a maior taxa de sensibilidade (91%), seguida pela cefepima (80%). No estudo realizado em 2004 todas as amostras incluídas no estudo foram resistentes à ciprofloxacina (Pereira, 2004).

A elevada prevalência de resistência entre isolados clínicos de *E.coli* encontradas em um estudo de 1999 parece ser um sinal alarmante de que os agentes antimicrobianos necessitam ser utilizados com muito critério, especialmente em infecções do trato urinário ou intra-abdominal (Pena *et al.*, 1995; Wood & Pierson, 1996; Fridkin *et al.*, 1999).

No presente estudo ao analisar a existência de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) nos isolados de *E.coli*, verificamos que todas estas bactérias não são produtoras desta enzima (Figura 1). A partir deste fato, notamos que este

não é o mecanismo de resistência existente nestes isolados que fizeram com que 100% das *E.coli* fossem resistentes ao aztreonam. O mecanismo de resistência mais provável é a alteração da permeabilidade da membrana externa ou alteração da proteína ligadora de penicilina (Nikaido & Vaara, 1985; Nikaido, 1994; Sanders & Sanders, 1992).

Apesar deste estudo não ter detectado a presença de β -lactamase de espectro ampliado, recentes pesquisas realizadas no Canadá, Itália, Espanha, Grécia e Reino Unido tem ilustrado uma tendência alarmante na associação da resistência a outras classes de antibióticos entre os organismos produtores de ESBL isolados na comunidade. Essas pesquisas mostraram que *E.coli* produtora de ESBL, especialmente aquelas produtoras das enzimas CTX-M exibiram co-resistência ao trimethoprim-sulfamethoxazole, tetraciclina, gentamicina e ciprofloxacina, sendo que no Canadá 66% dos isolados foram resistentes à ciprofloxacina (Pitout *et al.*, 2004; Pournaras *et al.*, 2004; Rodriguez-Bano *et al.*, 2004; Brigante *et al.*, 2005).

A produção de ESBL por *K.pneumoniae* e *E.coli* a outras classes de enzimas produzidas, principalmente por microrganismos não fermentadores como as carbapenemases, conferem alto índice de resistência aos oximino- β -lactâmicos. Os microrganismos produtores desta enzima, como *A.baumannii* e *P.aeruginosa* estão se tornando um grave problema de saúde pública, já que a prevalência de infecções hospitalares ocasionadas por estes microrganismos que produzem esta enzima está aumentando gradativamente em diferentes países (Osano *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 1995; Senda *et al.*, 1996a; Hirakata *et al.*, 1998; Poirel *et al.*, 2000b; Riccio *et al.*, 2000; Pournaras *et al.*, 2002; Toleman *et al.*, 2002; Da Silva *et*

al., 2002; Crespo *et al.*, 2004; Castanheira *et al.*, 2004; Koh *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Pasteran *et al.*, 2005).

Uma pesquisa realizada em um hospital da Espanha identificou 34 *E.coli*, dentre as quais, 10 destes isolados mostraram um resultado negativo para a produção de ESBL. Apesar de tudo, mutações nas regiões promotoras e repressoras do gene AmpC foram identificadas juntas em 8 dos isolados que não produziram ESBL. Em um estudo realizado em 17 centros hospitalares do Brasil, detectou alta taxa de *E.coli* produtoras de ESBL, tornando-se um problema preocupante e indicando que este fenótipo de resistência está disseminando em várias regiões geográficas do país (Tolun *et al.*, 2004; Briñas *et al.*, 2005a).

A presença de resistência intermediária à piperacilina por 2 (20%) cepas bacterianas de *E.coli* sugere que moderada seleção tem ocorrido possivelmente originada das atividades hospitalares. Esse tipo de resistência pode ser originado de indivíduos que foram hospitalizados recentemente, ou pode indicar um aumento da pressão seletiva pelo uso dos antibióticos pela comunidade. Uma das hipóteses para a explicação desta resistência é que, de acordo com Vecina-Neto (2000), há uma média de 13,3 hospitalizações por 100 habitantes por ano no Brasil, o qual sugere uma próxima conexão entre o hospital, a comunidade e o meio ambiente. Outra hipótese seria o crescente uso de antibióticos no contexto doméstico que pode exercer pressão seletiva suficiente para permitir o aparecimento de cepas com resistência moderada, confirmando desta forma o aumento do problema da resistência bacteriana na comunidade (Baquero *et al.*, 1997; Vecina-Neto, 2000).

Vários antibióticos possuíram boa atividade contra *P.aeruginosa*. A piperacilina, aztreonam, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, imipenem,

ciprofloxacina, cefepima e ticarcilina tiveram maior atividade contra este microrganismo (100%). A cefotaxima apresentou a maior taxa de resistência intermediária (100%), quando comparada a ceftriaxona e a gentamicina (33,3%). Todas as *P.aeruginosa* apresentaram resistência a ampicilina-sulbactam (Tabela 3).

Todas as amostras de *P.aeruginosa* foram sensíveis ao aztreonam, assemelhando-se a um estudo realizado em 2007, em Goiânia, que avaliou 71 amostras de *P.aeruginosa* isoladas em 3 hospitais e constatou que este antimicrobiano possuía boa atividade contra 70,4% dos isolados e apenas um baixo percentual de resistência (4,2%) (Oliveira, 2007).

Todas as amostras apresentaram resistência intermediária a cefotaxima (100%), assemelhando-se ao estudo de 2007 realizado em Goiânia, onde os isolados apresentaram elevado nível de resistência intermediária (59,2%) e resistência total (40,8%) a esta droga. Apenas 1 (33,3%) microrganismo apresentou resistência intermediária a ceftriaxona (Oliveira, 2007).

Entre as quinolonas, a ciprofloxacina, a piperacilina e a piperacilina-tazobactam foram ativas contra *P.aeruginosa* no presente estudo e em pesquisa realizada em 2007 na cidade de Goiânia. Dentre os carbapenems, o imipenem possui atividade contra estes microrganismos nas respectivas pesquisas. No estudo realizado em 2007, em Goiânia, a ticarcilina teve baixa atividade (39,4%) contra este patógeno permitindo destacar o elevado percentual de resistência intermediária (42,3%) a este antimicrobiano (Oliveira, 2007).

Estudo realizado em rios dos EUA verificou-se que muitos organismos gram-negativos, dentre eles, *P.aeruginosa* possuíam resistência a no mínimo um antibiótico que não fosse à ampicilina, e uma fração substancial foram capazes de

sobreviver a diversos antimicrobianos. Organismos resistentes ao imipenem também foram isolados neste estudo (Ash *et al.*, 2002).

Uma pesquisa realizada em 2002 nos rios dos EUA identificou que mais de 80% dos microrganismos resistentes à cefotaxima e ceftazidime eram *Pseudomonas*. Conseqüente à disseminação deste patógeno no meio ambiente, infecções adquiridas no meio ambiente hospitalar e na comunidade estão usualmente associadas com altas taxas de mortalidade. Em um estudo realizado em 2006 detectou que dos 298 pacientes que apresentaram infecção hospitalar por *P.aeruginosa*, 112(37,6%) foram a óbito. Dentre os 186 pacientes que sobreviveram 44 (51,2%) possuíam infecção por *P.aeruginosa* produtora de metalo- β -lactamase (Ash *et al.*, 2002; Livermore, 2002; Zavascki *et al.*, 2006).

Apesar da descoberta de novos agentes antimicrobianos pode-se verificar que a velocidade da emergência e disseminação de genes de resistência limitam as opções de tratamento. Esta realidade pode ser verificada por meio da existência de diferentes perfis de sensibilidade e a crescente resistência aos antimicrobianos no decorrer do tempo (Sader, 2000; Nishio *et al.*, 2004).

Mesmo que neste estudo não tenhamos verificado alto índice de resistência contra quinolonas, imipenem e cefalosporinas, o National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) demonstrou que nos Estados Unidos da América e no Brasil todas as taxas de resistência a estes antibióticos antipseudomonas aumentaram em 9%, 15% e 20%, respectivamente, para *P.aeruginosa* isoladas em 2003 comparada aos isolados de 1998 a 2002 (Cardo *et al.*, 2004).

Dentre os carbapenems o imipenem apresentou atividade contra 100% dos isolados (Tabela 3). Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo realizado pelo SENTRY após avaliar 1984 isolados de *P.aeruginosa* provenientes

do Brasil e da América Latina. Estudo desenvolvido na Paraíba em 2002, também foi encontrado elevado perfil de sensibilidade para imipenem e em Goiás os mesmos resultados também foram encontrados. Outro estudo regional avaliou o perfil de sensibilidade de 187 isolados de *P.aeruginosa* em diversos estados do Brasil, que demonstrou elevação da resistência ao imipenem. Estas pesquisas mostram uma variação regional do perfil de sensibilidade para *Pseudomonas*. A variação no perfil de sensibilidade entre os patógenos pode ocorrer entre diferentes regiões e até entre hospitais dentro de uma mesma região, portanto é necessário o conhecimento do perfil de sensibilidade de cada instituição antes de se estabelecer terapia empírica. Estudos têm demonstrado a presença de correlação entre o uso de imipenem e o desenvolvimento de resistência durante o tratamento de infecções causadas por *P.aeruginosa* (Troillet *et al.*, 1997; Carmeli *et al.*, 1999; Sader, 2000; Santos *et al.*, 2002; Pelegriño *et al.*, 2002; Reis, 2003; Ferreira, 2005; Kokis *et al.*, 2005).

A taxa de sensibilidade dos isolados de *Pseudomonas* em relação às cefalosporinas de terceira e de quarta gerações permaneceram inalteradas, demonstrando que tanto a ceftazidima quanto a cefepime possuíram boa atividade contra este patógeno (100%) (Tabela 3). Este resultado demonstra que as taxas de sensibilidade a estas drogas, neste estudo, são similares as encontradas em um estudo americano, onde avaliaram 2000 isolados de *P.aeruginosa* de centros médicos norte-americanos, que mostrou taxa de sensibilidade similar para ceftazidima e cefepima. Já um estudo brasileiro revelou taxas crescentes de resistência, muito embora a taxa de sensibilidade entre a ceftazidima e a cefepima tenham sido similares (Oliveira, 2007).

No presente estudo a taxa de resistência intermediária a cefotaxima foi de 100% (Tabela 3), que pode ser devido a alteração na permeabilidade da membrana ou baixa produção de beta-lactamase de espectro ampliado (Hancock & Bellido, 1992; Chen *et al.*, 1995; Livermore, 2002).

Muito embora o aztreonam tenha apresentado boa atividade contra *P.aeruginosa* um estudo brasileiro realizado com amostras de *Pseudomonas* procedentes de diferentes estados, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul e Bahia, apresentaram elevadas taxas de resistência a este antimicrobiano (Pellegrino *et al.*, 2001; Ferreira, 2005).

As amostras de *Pseudomonas* apresentaram taxas de resistência total a ampicilina-sulbactam (Tabela 3). Estudos realizados no Brasil apresentaram elevadas taxas de resistência para os antimicrobianos pertencentes às classes das penicilinas. Alterações em proteínas ligadoras de penicilinas determinam resistência a esta classe de drogas, juntamente com a produção de β -lactamase (Cornaglia *et al.*, 1995; Bellido *et al.*, 1999; Pellegrino *et al.*, 2001; Ferreira, 2005).

Em um estudo realizado pelo SENTRY entre 1997 a 2001, em centros médicos na América latina, verificou-se que as taxas de sensibilidade para os β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas tornaram-se mais baixas durante o período estudado, principalmente entre 2000 e 2001 (Andrade *et al.*, 2003).

As taxas de resistência intermediária à ceftriaxona, cefotaxima e gentamicina detectada no atual estudo poderiam ser explicadas pela expressão de um ou pela associação de dois mecanismos de resistência, tais como, alterações na permeabilidade da membrana, aumento da ação das bombas de efluxo, expressão de enzimas da classe A, B ou D de Ambler (Oliveira, 2007).

Com relação ao perfil de sensibilidade da *K pneumoniae*, este microrganismo apresentou-se com maiores taxas de resistência intermediária e resistência total a alguns antibióticos testados. Este patógeno também é responsável pelo surgimento de infecções hospitalares, principalmente aquelas ocorridas dentro da Unidade de terapia Intensiva (UTI) (Piroth *et al.*, 1998; Kollef *et al.*, 1999; Gales *et al.*, 2000; Lubowski *et al.*, 2001; Murthy, 2001; Alp *et al.*, 2004).

Neste estudo não foram detetadas *K.pneumoniae* produtoras de ESBL, mas a emergência deste patógeno produtor de β -lactamase de espectro ampliado já foi relatado em todo o mundo como importante causa de infecção hospitalar. Nos hospitais americanos e canadenses a taxa de infecção por *K.pneumoniae* produtora de ESBL é inferior a 4%, e na Europa varia entre 15-20% (Gales *et al.*, 1997; Sader *et al.*, 2000; Patterson *et al.*, 2001; Sader *et al.*, 2001a).

Em um estudo realizado em Goiânia a prevalência de linhagens de *K.pneumoniae* produtoras de ESBL foi em média de 38,2%. Este dado não se distancia muito da taxa encontrada nos hospitais brasileiros que é de 42,1% e enfatizam que a prevalência deste microrganismo é muito preocupante no Brasil. Por este motivo são necessárias medidas de controle da emergência das bactérias multi-resistentes e bem como a implantação de medidas de barreiras que devem ser instituídas para evitar a disseminação de patógenos com este mecanismo de resistência nas instituições hospitalares (Gales *et al.*, 1997; Sader, 2000; Sader *et al.*, 2001; Santos, 2008).

As infecções causadas por estes microrganismos são preocupantes, pois podem adquirir resistência a múltiplas drogas. Soma-se a isso o fato de que *K pneumoniae* ser uma importante fonte de transmissão de genes de resistência

entre bactérias da mesma espécie e entre espécies não correlacionadas (Buisson *et al.*, 1987; Hanson *et al.*, 1999; Asensio *et al.*, 2000; Guzmán-Blanco *et al.*, 2000; Bush, 2001; Gniadkowski, 2001; Thomson, 2001; Babic, 2006).

Neste estudo as amostras de *K.pneumoniae* demonstraram ser sensíveis a diferentes antimicrobianos testados, exceto a ampicilina e a piperacilina (Tabela 3). Em um estudo realizado em Goiânia, *K.pneumoniae* demonstrou baixa sensibilidade a todas as classes de antimicrobianos, exceto aos carbapenems (Santos *et al.*, 2008).

Da mesma forma que foi observada em outros estudos, o presente trabalho demonstrou que a cefepima possui boa atividade contra as cepas de *K.pneumoniae*. A boa atividade desta droga é devido a rápida penetração pela membrana externa de bactérias gram-negativas, sua maior afinidade pelas PBPs que outras cefalosporinas e maior resistência a hidrólise (Sader *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2008).

No presente estudo foi identificada uma cepa de *K.pneumoniae* com resistência intermediária ao imipenem contrastando com o estudo realizado em hospitais de Goiânia, que apresentou 100% de atividade nas amostras estudadas, independente da produção de ESBL. Este resultado também foi encontrado em outros estudos realizados no Brasil e em outros países da América Latina, em que mais de 90% das amostras foram sensíveis aos carbapenems (Gales *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2008).

Resistência aos carbapenems são raras em *Enterobacteriaceae* e podem ocorrer por 3 mecanismos: hiperprodução de uma cefalosporina do tipo AmpC combinada com diminuição da permeabilidade da droga através da membrana externa; diminuição da afinidade pelas PBPs; e produção de β -lactamases que

hidrolisam carbapenems. Essas raras carbapenemases podem ser mediadas por plasmídeos produtores de metalo- β -lactamase (IMP e VIM) ou codificadas cromossomalmente. Recentemente, carbapenemases mediadas por plasmídeos e inibidas por clavulanato tem sido reportadas como origem de infecção hospitalar nos hospitais dos EUA (De Champs *et al.*, 1993; Nordmann *et al.*, 1993; Queenan *et al.*, 2000, Poirel *et al.*, 2001; Nordmann & Poirel, 2002; Miriagou *et al.*, 2003).

Um recente estudo descreveu altos níveis de bactérias resistentes a antimicrobianos isolados dos rios dos EUA. Foram identificadas bactérias gram-negativas resistentes ao imipenem (Ash *et al.*, 2002).

Em outro estudo realizado em rios dos EUA permitiu isolar e identificar 30 bactérias (*Aeromonas hydrophila*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter spp*, *Enterobacter asburiae*) dentre as quais 29 eram resistentes ao imipenem. Este fato indica que muitos rios dos EUA podem ser reservas de carbapenemases de amplo espectro (Aubron *et al.*, 2005).

As taxas de resistência às fluoroquinolonas variam de um país para outro e dependem de fatores epidemiológicos locais sendo maiores em países em desenvolvimento devido ao uso de quinolonas menos ativas ou do uso da ciprofloxacina em dosagens baixas que podem selecionar mutantes. No presente estudo foi detectado resistência intermediária à ciprofloxacina, a qual se deve possivelmente a mutações no sítio de ação (DNA-girase bacteriano e/ou topoisomerase IV) ou a dificuldade de acesso da droga ao seu alvo por alteração em porinas ou ainda ser mediada por plasmídeos contendo o gene *qnr* (Martinez-Martinez *et al.*, 1996; Patterson *et al.*, 1997; Martinez-Martinez *et al.*, 1998; Lautenbach *et al.*, 2001; Jacoby *et al.*, 2003).

E.coli apresentou 80% de sensibilidade a ciprofloxacina, enquanto que *K.pneumoniae* apresentou 90% de sensibilidade a este mesmo antimicrobiano, assemelhando-se a um estudo realizado em 1999, mais de 80% dos isolados de *E.coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* e *P. aeruginosa* eram susceptíveis a ciprofloxacina. A amostra de *A.baumannii* apresentou 100% de sensibilidade para a maior parte dos antibióticos testados, apresentando apenas resistência intermediária ao aztreonam e a ceftriaxona. No estudo de 1999, tanto a ceftazidime como a ciprofloxacina tiveram pobre atividade contra *Acinetobacter baumannii*, contradizendo os resultados apontados neste estudo, onde a susceptibilidade deste microrganismo a estes antibióticos foram totais. A taxa de sensibilidade a ciprofloxacina para *A.baumannii* resistente a ceftazidime foi 25%. Somente 15% dos isolados de *A.baumannii* foi sensível a amicacina. A taxa de resistência do *A.baumannii* a ampicilina-sulbactam foi de 66% para isolados resistentes a ceftazidime e de 100% para isolados resistentes ao imipenem. *P.aeruginosa* e *A.baumannii* não apresentaram resistência a ceftazidime, contrastando com o estudo de 1999 (Sato & Nakae, 1991; Livingstone *et al.*, 1995; Bajaksouzian *et al.*, 1997; Pitout *et al.*, 1997; Pfaller & Jones, 2000; Jean *et al.*, 2002).

Nesta mesma pesquisa realizada em 1999, carbapenems tiveram boa atividade contra *Enterobacteriaceae* resistentes a cefotaxima, entretanto apresentaram limitada atividade contra *P.aeruginosa* e *A.baumannii*. Piperacilina-tazobactam também tiveram pouca atividade contra estes isolados, principalmente contra *K.pneumoniae* resistente a cefotaxima e *A.baumannii* resistente a ceftazidime (Jean *et al.*, 2002).

Ainda no estudo de 1999, as taxas de resistência dos isolados de *P.aeruginosa* e *A.baumannii* ao imipenem foram consideradas altas quando comparadas a outros estudos. As taxas de resistência a ciprofloxacina foram altas para os isolados de *E.coli*, *P.aeruginosa* e *A.baumannii*, sendo que todos os isolados deste último microrganismo foram resistentes ao imipenem e a ampicilina-sulbactam. Estes resultados divergem dos resultados encontrados na presente pesquisa, uma vez que, a maioria dos antimicrobianos testados apresentou boa atividade contra *A.baumannii*. Apenas dois isolados de *A.baumannii* apresentaram resistência intermediária ao aztreonam e a ciprofloxacina, e não foi avaliada a relação existente entre uma classe de antibióticos com as outras classes (Tabela 3) (Sato & Nakae, 1991; Livingstone *et al.*, 1995; Bajaksouzian *et al.*, 1997; Pitout *et al.*, 1997; Pfaller & Jones, 2000; Jean *et al.*, 2002).

Era de se esperar que a resistência encontrada nas amostras de *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* e *A.baumannii* no presente estudo fosse maior, considerando-se a presença de bactérias gram-negativas resistentes a múltiplos antibióticos presentes no ambiente hospitalar e disseminados no meio ambiente. Este resultado possivelmente se deve a alguns fatores, tais como, a época do ano e o período em que foram realizadas as coletas, não sendo identificado nenhum surto epidêmico de infecção hospitalar nas instituições no decorrer do estudo (Kelch & Lee, 1978; Mendonça-Hagler & Hagler, 1991; Harihan & Weintein, 1996; Ortolani *et al.*, 1997; Ash *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2004).

A presença destas bactérias resistentes no meio ambiente, principalmente nos rios está sendo disseminada por todo o mundo tornando-se um grande problema para a saúde pública. A seleção destes microrganismos na natureza

pode estar relacionada com a produção de antibióticos presentes no solo, origem animal e de produtos agrícolas. Reservas naturais de genes de resistência podem tornar-se uma origem de características transferíveis para patógenos emergentes. (Davies, 1994; Witte, 1998; Van Elsas *et al.*, 2000; Ash *et al.*, 2002).

No estudo realizado em 2002 nos rios americanos, os isolados mostraram completa resistência à no mínimo um antibiótico que não fosse a ampicilina. O alto nível de resistência dos patógenos encontrados em todos os rios não foi inesperado. Os isolados resistentes à ampicilina foram predominantemente bactérias gram-negativas como: *Acinetobacter*, *Alcaligeneses*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Proteus*. Estes microrganismos também foram detectados na presente pesquisa, evidenciando a enorme disseminação destes patógenos no meio ambiente (Ash *et al.*, 2002).

Organismos resistentes a ceftazidime, cefotaxime e imipenem foram detectados em muitos rios americanos, sendo que destes, 20 a 30% eram bactérias gram-positivas, pertencentes ao gênero *Bacillus*. Todos os isolados resistentes a este antibiótico foram capazes de hidrolisar nitrocefina, indicando a presença de β -lactamase. Muitos isolados resistentes a cefotaxime também foram resistentes à ceftazidime e foram identificados principalmente como *Pseudomonas*. No presente estudo *P.aeruginosa* também apresentou resistência parcial à cefotaxima. Um organismo gram-negativo foi resistente à ciprofloxacina, assemelhando ao resultado encontrado nesta pesquisa onde tivemos tanto *E.coli* como *K.pneumoniae* resistentes a este antibiótico. Muitos dos organismos resistentes a ampicilina e a outros antibióticos possuíam plasmídeos com características de resistência (Ash *et al.*, 2002).

Antibióticos utilizados para o tratamento das infecções hospitalares e tratamento profilático são principalmente liberados não metabolizados dentro do ambiente aquático por meio do esgoto. Ciprofloxacina, por exemplo, foi encontrada em concentrações entre 0,7 e 124,5µg/L no efluente hospitalar assumindo a principal origem de efeitos genotóxicos mensurados pelo hospital no seu efluente. A ampicilina foi encontrada em concentrações entre 20 e 80µg/L no efluente de um grande hospital alemão (Hartmann *et al.*, 1998, Kummerer e Henninger, 2004).

De acordo com a Resolução do CONAMA nº 357/2005 a disposição destes efluentes no solo mesmo tratados, não poderá causar poluição ou contaminação das águas gerando a deterioração da qualidade do ambiente aquático. Esta resolução dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de águas superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes.

A resistência bacteriana pode ser selecionada ou favorecida pelas substâncias dos antibióticos presentes no efluente hospitalar. Com base neste fato é necessário que os efluentes hospitalares sejam tratados em estações de tratamento de esgoto ativas dentro das instituições hospitalares, evitando desta forma o lançamento das bactérias resistentes para a rede de esgoto pública. Em uma pesquisa foi encontrada uma bactéria carregando o gene *vanA* no efluente hospitalar. Genes de resistência a gentamicina foram encontrados em *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae* no esgoto hospitalar (Heuer *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2003; Kummerer & Henninger, 2004).

As concentrações dos antibióticos dependem do ambiente em que estão localizados e da sua viabilidade. Estas concentrações variam na água, esgoto,

solo e sedimentos por causa da restrição fisicoquímica e da mobilidade da bactéria. É conhecido que as concentrações subinibitórias podem ter um impacto nas funções celulares e na mudança de expressão das funções celulares ou na transferência da resistência antimicrobiana (Salyers *et al*, 1995; Ohlsen *et al.*, 1998; Kummerer, 2004).

Por estes e outros motivos se faz necessário uma fiscalização intensa dos órgãos ambientais e gestores de recursos hídricos para manter as instalações de tratamento existentes em operação com condições de funcionamento e demais características para o cumprimento da resolução. O descumprimento desta legislação poderá acarretar aplicação de penalidades administrativas previstas nas legislações específicas, sem prejuízo do sancionamento penal e da responsabilidade civil objetiva do poluidor.

6. CONCLUSÕES

1. Dentre os microrganismos gram-negativos foram identificadas 10 (14,92%) *K.pneumoniae*, 10 (14,92%) *E.coli*, 3 (4,47%) *P.aeruginosa* e 1 (1,49%) *A.baumannii*.
2. As amostras de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*, isoladas nos 10 hospitais e na Estação de Tratamento de Esgoto apresentaram baixas taxas de resistência aos antimicrobianos.
3. Em nenhum dos isolados foi detectada a produção de β -lactamase de espectro ampliado e carbapenemase.

7. RECOMENDAÇÕES GERAIS

Alguns hospitais participantes do estudo possuíam em suas instalações uma estação de tratamento de esgoto hospitalar inativa, não cumprindo com as normas da resolução do CONAMA sobre o lançamento destes efluentes no meio ambiente.

É necessário que o Estado ou órgãos públicos façam o monitoramento contínuo dos efluentes do esgoto dos hospitais juntamente com a adoção de medidas sanitárias com objetivo de impedir a disseminação de genes de resistência bacteriana no meio ambiente, já que este é um problema de saúde pública.

A ativação destes setores de tratamento do efluente hospitalar dentro das instituições deve ser fiscalizada intensamente para que se faça obedecer às condições, padrões e exigências desta resolução impedindo desta forma a contaminação da rede de esgoto municipal e a liberação de patógenos cada vez mais resistentes no meio ambiente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, E. P. & Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 146: 837.
- Aires, J. R.; Kohler, T.; Nikaido, H. & Plesiat, P. (1999). Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 43: 2624-2628.
- Al Khoja, M. S. & Darrell, J. H. (1979). The skin as the source of *Acinetobacter* and *Moraxella* species occurring in blood cultures. *Journal Clinical Pathology* 32:497-499.
- Alder, A. C.; McArdeall, C. S.; Golet, E. M.; Ibric, S.; Molnar, E.; Nipales, N. S. & Giger, W. (2001). Occurrence and fate of fluoroquinolone, macrolide and sulfonamide antibiotics during wastewater treatment and in ambient waters in Switzerland. In: C. G. Daughton & T. L. Jones-Lepp (ed.) *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: scientific and regulatory issues*. (pp. 39-54) .American Chemical Society, Washington, DC.
- Alp, E.; Güven, M.; Yildiz, O.; Aygen, B.; Voss, A. & Doganay, M. (2004). Incidence, risk factors and mortality of nosocomial pneumonia in Intensive Care Units: a prospective study. *Annual Clinical Microbiology Antimicrobial*. 3:17-20.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions Philosophical Transactions*. 289: 321-331.
- Ambler, R. P.; Coulson, A. F. & Frere, J. M. (1991). A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochemical Journal*. 276: 269-70.
- Andrade, S. S.; Jones, R. N.; Gales, A. C. & Sader, H. S. (2003). Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centers: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 140-U7.

- Anonymous. (1999). *Standard methods for examination of water and wastewater*. American Public Health Association and Water Environment Federation, Washington, DC. 20th ed. 1220p.
- Arakawa, Y.; Murakami, M.; Suzuki, K.; Ito, H.; Wacharotayankun, R.; Ohsuka, S.; Kato, N. & Ohta, M. (1995). A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene bla_{IMP}. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 39: 1612-1615.
- Arakawa, Y.; Shibata, N.; Shibayama, K.; Kurokawa, H.; Yagi, T.; Fujiwara, H. & Goto, M. (2000). Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *Journal Clinical Microbiology*. 38: 40-43.
- Asencio, A.; Oliver, A.; Gonzáles, D. P.; Baquero, F.; Pérez-Díaz, J. C. & Ros, P. (2000). Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clinical Infectious Disease*. 30: 55-60.
- Ash, J. R.; Mauck, B. & Morgan, M. (2002). Antibiotic Resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerging Infectious Disease*. 8 (7): 713-716.
- Ator, L. L. & Starzyk, M. J. (1976). Distribution of group D *Streptococci* in rivers and streams. *Microbiology*. 16: 91-104.
- Aubron, C.; Porel, L.; Ash, R. J. & Nordmann, P. (2005). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, United States Rivers. *Emerging Infectious Diseases*. 11: 260-64.
- Babic, M.; Hujer, A. M. & Bomono, R. A. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases. *Elsevier*. 10: 1016-32.
- Bagge, N.; Ciofu, O.; Skovgaard, L. T. & Hoiby, N. (2000). Rapid development in vitro and in vivo of resistance to ceftazidime in biofilm-growing *Pseudomonas aeruginosa* due to chromosomal β -lactamase. *Acta pathologica microbiologica et immunologica scandinavica*. 108: 589-600.

- Bahar, G.; Mazzariol, A.; Koncan, R.; Mert, A.; Fontana, R.; Rossolini, G.M. & Cornaglia, G. (2004). Detection of VIM-5 metallo- β -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 54: 282-283.
- Bajaksouzian, S.; Visalli, M. A.; Jacobs, M. R. & Appelbaum, P. C. (1997). Activities of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, alone and in combination with combination with amikacin, against *Acinetobacters* as determined by checkboard and time-kill studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41: 1073-6.
- Baquero, F. (2004). From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. 2: 510–518.
- Baquero, F.; Negri, M. C.; Morosini, M. I. & Blásquez, J. (1997). The antibiotic selective process: concentration-specific amplification of low-level resistant populations. *Ciba Foundations Symposium*. 207: 93-105.
- Barthélémy, M.; Péduzzi, J. & Labia, R. (1985). Distinction entre les structures primaires des β -lactamases TEM-1 et TEM-2. *Annual Institute Pasteur Microbiology*. 136A: 311–321.
- Barthélémy, M.; Péduzzi, J.; Bernard, H.; Tancrede, C. & Lábía, R. (1992). Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. *Biochim Biophys Acta*. 1122: 15–22.
- Batt, A. L.; Bruce, I. B. & Ag, D. S. (2006). Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. *Environment Pollut.* 142: 295-302.
- Bauernfeind, A.; Casellas, J. M.; Goldberg, M.; Holley, M.; Jungwirth, R.; Mangold, P.; Röhnisch, T.; Schweighart, S. & Wilhelm, R. (1992). A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection*. 20: 158–163.
- Bauernfeind, A.; Grimm, H. & Schweighart, S. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 18: 294-298.

- Bauernfeind, A.; Stemplinger, I.; Jungwirth, R.; Ernst, S. & Casellas, J. M. (1996). Sequences of β -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other β -lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 40: 509–513.
- Baumann, P.; Doudoroff, M. & Stanier, R. Y. (1968). A study of the *Moxarella* spp group II, oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *Journal Bacteriology*. 95: 1520-1541.
- Bellido, F.; Veuthey, C.; Blaser, J.; Bauernfeind, A. & Pechere, J. C. (1999). Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 125: 57-68.
- Berlau, J.; Aucken, H.; Malnick, H. & Pitt, T. (1999). Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease*. 18: 179-183.
- Bernards, A. T.; Van Der, T. J.; Van boven, C. P. & Dijkshoorn, L. (1996). Evaluation of the ability of a commercial system to identify *Acinetobacter* genomic species. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease*. 15: 303-308.
- Bifulco, J. M.; Shirey, J. J. & Bissonette, G. K. (1989). Detection of *Acinetobacter* spp. in rural drinking water supplies. *Applied Environment Microbiology*. 55: 2214-2219.
- Bjorkman, J.; Nagaev, I. & Berg, O. G. (2000). Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science*. 287: 1479-82.
- Blanch, A. R.; Caplin, J. L.; Iversen, A.; Kühn, I.; Manero, A.; Taylor, H. D. & Vilanova, X. (2003). Comparison of *enterococcal* populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *Journal Applied Microbiology*. 94: 994-1002.
- Blazquez, J.; Morosini, M. I.; Negri, M. C. & Baquero, F. (2000). Selection of naturally occurring extended-spectrum TEM β -lactamase variants by fluctuating β -lactam pressure. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 44: 2182–2184.

- Bonnet, R.; Champs, C. D.; Sirot, D.; Chanal, C.; Labia, R. & Sirot, J. (1999). Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 43: 2671–2677.
- Bonnet, R.; Sampaio, J. L. M.; Labia, R.; Champs, C. D.; Sirot, D.; Chanel, C. & Sirot, J. (2000). A novel CTX-M-lactamase (CTX-M-B) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 44: 1936–1942.
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobiol Agents Chemotherapy*. 48: 1-14.
- Boon, P. I. & Cattanach, M. (1999). Antibiotic resistance of native and faecal bacteria isolated from rivers, reservoirs and sewage treatment facilities in Victoria, south-eastern Australia. *Lett Applied Microbiology*. 28: 164–168.
- Bou, G. & Mart, T. (2000). Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 44: 428-432.
- Bradford, P. A.; Yang, Y.; Sahm, D.; Grope, I.; Gardovska, D. & Storch, G. (1998). CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 42: 1980–1894.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance treat. *Clinical Microbiology Reviews*. 14: 933-951.
- Brenner, D. J.; McWorther, A. C.; Kai, A.; Steigerwalt, A. G. & Farmer, J. J. (1986). *Enterobacter asburiae* sp. a new species found in clinical specimes and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Ervinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter nimipressuralis* comb. *Journal Clinical Microbiology*. 23: 1114-20.
- Brigante, G.; Luzzaro, F.; Perilli, M.; Lombardi, G.; Coli, A.; Rossolini, G. M.; Amicosante, G. & Toniolo, A. (2005). Evolution of CTX-M-type β -lactamase in isolate of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int Journal Antimicrobial Agents*. 25: 157-162.

- Briñas, L.; Moreno, M. A. & Teshager, T. (2005a). Monitoring and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in the year 2003. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 49: 1262-1264.
- Briñas, L.; Lantero, M.; Diego, I.; Alvarez, M.; Zarazaga, M & Torres, C. (2005b). Mechanisms of resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* isolates recovered in a Spanish hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56: 1107 – 1110.
- Broda, P. (1979). *Plasmids*. W.H. Oxford: Freeman and Company.
- Brove, K. (1984). Family *Neisseriaceae*. In: N. R. Krieg & J. G. Holt, (Org) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Md: The Williams & Williams. 288-309p.
- Brown, K. D.; Kulis, J.; Thomson, B.; Chapman, T. H. & Mawhinney, D. B. (2006). Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*. 366: 772–783.
- Buisson, C. B.; Philippon, A.; Ansquer, M.; Legrand, P.; Montraveis, F. & Durval, J. (1987). Transferible enzymatic resistance to third generation cephalosporin during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *The Lancet*. 342: 193-8.
- Bush K. (1989). Characterization of β -lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 33: 259-276.
- Bush, K.; Jacoby, G. A. & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 39: 1211-1233.
- Bush, K. (1998). Metallo-beta-lactamases: A Class Apart. *Clinical Infectious Disease*. 27: 48-53.
- Bush, K. (1999). β -lactamases of increasing clinical importance. *Current Pharmaceutical Design*. 5: 839-845.

- Bush, K. (2001). New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clinical Infectious Disease*. 32: 1085-9.
- Cardo, D.; Horan, T.; Andrus, M.; Dembinski, M. & Edwards, J. (2004). National Nosocomial Infectious Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *American Journal Infection Control*. 32: 470-85.
- Cardoso, O.; Leitão, R.; Figueiredo, A.; Sousa, J. C.; Duarte, A. & Peixe, L. V. (2002). Metallo- β -lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microbiology Drug Resistance*. 8: 93-97.
- Carmeli, Y.; Troillet, N.; Karchmer, A.; Samore, M. H. (1999). Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives Internal Medical*. 159: 1127-1132.
- Carmo Filho, J. R. (2003). *Correlação epidemiológica, microbiológica e clínica das infecções hospitalares em Unidades de Terapia Intensiva causadas por Klebsiella pneumoniae*. Tese Doutorado, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.
- Caroff, N.; Espaze, E. & Gautreau, D. (2000). Analysis of the effects of -42 and -32 amp C promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 45: 783-788.
- Castanheira, M.; Toleman, M. A.; Jones, R. N.; Schidt, F. J. & Walsh, T. R. (2004). Molecular characterization of a beta-lactamase gene, bla GIM-1 encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48: 4654-4661.
- Chen, H. Y.; Yan, M. & Livermore, D. M. (1995). Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *Journal Medical Microbiology*. 45: 300-309.
- Choi, S.; Chu, W.; Brown, J.; Becker, S. J.; Harwood, V. J. & Jiang, S. C. (2003). Application of enterococci antibiotic resistance patterns for contamination source identification at Huntington Beach, California. *Marine Polluiont Bulletin*. 46: 748-755.

- Chu, Y. W.; Afzal-Shah, M.; Houang, E. T.; Palepou, M. I.; Lyon, D. J.; Woodford, N. & Livermore, D. M. (2001). IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. Collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 45: 710-714.
- Collis, C. M.; Kim, M. J.; Stokes, H. W. & Hall, R. M. (2002). Integron-encoded *IntI* integrases preferentially recognise the adjacent cognate attI site in recombination with a 59 bp site. *Molecular Microbiology*. 46: 1415-1427.
- Cornaglia, G.; Russel, K.; Satta, G. & Fontana, R. (1995). Relative importances of outer membrane permeability and group 1 β -lactamase as determinants of meropenem and imipenem activities against *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 39: 350-355.
- Costa, S. F.; Woodcock, J.; Gill, M.; Wise, R.; Barone, A. A. & Caiaffa, H. (2000). Outer-membrane proteins pattern and detection of beta-lactamases in clinical isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil. *Int Journal Antimicrobial Agents*. 13: 175-182.
- Crespo, M. P.; Woodford, N.; Sinclair, A.; Kaufmann, M. E. & Turton, J. (2004). Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo- β -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *Journal Clinical Microbiology*. 42: 5094-5101.
- Cristina, A. G. & Costerton, J. W. (1984). Bacteria laden biofilms a hazard to orthopedic prostheses. *Infectious Surgery*. 3: 655-662.
- Da Silva, G. J.; Vital, C.; Ribeiro, G.; Sousa, J. C. & Leitão, R. (2002). Molecular characterization of blaIMP-5, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiology Letters*. 215: 33-39.
- Danel, F.; Hall, L. M. C.; Gur, D. & Livermore, D. M. (1995). Oxa-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 39: 1881-1884.
- Danel, F.; Hall, L. M. C.; Duke, B.; Gur, D. & Livermore, D. M. (1999). OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 43: 1362-1366.

- Danes, C.; Navia, M. M.; Ruiz, J.; Marco, F. & Jurado, A. (2002). Distribution of beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (AmpC inhibitor) on the MICs of different beta-lactam antibiotics. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 50: 261-264.
- Dasgupta, M. K. & Costerton, J. W. (1989). Significance of biofilm adherent bacterial microcolonies on Tenckhoff catheters in CAPD patients. *Blood Purification*. 7: 144-155.
- Davis, B. D. (1973). *Microbiologia. Infecções Bacterianas e Micóticas*. Edart, São Paulo. Vol 3º, Cap. 24 e 26.
- Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*. 264: 375-82.
- Davison, J. (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*. 42: 73-91.
- De Champs, C.; Henquell, C.; Guelon, D.; Sirot, D.; Gazuy N. & Sirot, J. (1993). Clinical and bacteriological study of nosocomial infections due to *Enterobacter aerogenes* resistant to imipenem. *Journal Clinical Microbiology*. 31: 123–127.
- Depizzol, F.; Santos, V. A. C.; Keller, R.; Gonçalves, R. F. & Cassini, S. T. A. (2005). Detecção e isolamento de cepas de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos presentes em efluente hospitalar e doméstico da cidade de Vitória/ES. 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental.
- Dias Miguel, J. (2003). *Poluição águas perigosas*. Visão. 112–114p.
- Dijkshoorn, L.; Harsseelaar, B. V.; Tjernberg, I.; Bouvet, P. J. & Vaneechoutte, M. (1998). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *System Applied Microbiology*. 21(1): 33-9.
- Edge, T. A. & Stephen, H. (2005). Occurrence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from surface waters and fecal pollution sources near Hamilton, Ontario. *Can Journal Microbiology*. 51: 501.

- Ehrenstein, B.; Bernardis, A. T.; Dijkshoorn, L.; Gerner-Smidt, P.; Towner, K. J. & Bouvet, P. J. (1996). *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *Journal Clinical Microbiology*. 34: 2414-2420.
- Enright, M. C.; Carter, P. E.; MacLean, I. A. & McKenzie, H. (1994). Phylogenetic relationship between some members of the genera *Neisseria*, *Acinetobacter*, *Moxarella*, and *Kingella* based on partial 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol*. 44: 387-391.
- Essack, S.; Hall, L. M.; Pillay, D. G.; MCFayen, M. L. & Livermore, D. M. (2001). Complexity and diversity of *K. pneumoniae* strains with ESBL isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*. 1: 88-95.
- Esteves, F. A. (1998). *Ecologia das Lagoas Costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ)*, Rio de Janeiro.
- Farmer, J. J. (2003). *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. In: P. R. Murray; E. J. Baron; J. H. Jorgensen; M. A. Pfaller; & R. H. Tenover (Org.) *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington, ASM Press. 636-653p.
- Fernandez-Astorga, A.; Muela, A.; Cisterna, R.; Iriberry, J. & Barcina, I. (1992). Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Applied Environment Microbiology*. 58: 392-398.
- Fernandez-Cuenca, F.; Martinez-Martinez, L.; Conejo, M. C.; Ayala, J. A.; Perea, E. J. & Pascual, A. (2003). Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 565-574.
- Ferreira, L. L. (2005). *Estrutura clonal e multirresistência em Pseudomonas aeruginosa*. Tese de Doutorado. Programa de pós – graduação em vigilância sanitária Fundação Oswaldo Cruz.
- French, G. L.; Ling, J.; Ling, T. & Hul, Y. W. (1987). Susceptibility of Hong Kong isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to antimicrobial agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 21: 581-588.

- Frere, J. M. (1995). β -lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Molecular Microbiology*. 16: 385-395.
- Friedrich, L. V.; White, R. I. & Bosso, J. A. (1999). Impact of use of multiple antimicrobials on changes in susceptibility of Gram-negative aerobes. *Clinical Infectious Disease*. 28: 1017-1024.
- Fridkin, S. K.; Steward, C. D.; Edwards, J. R.; Pryor, E. R.; McGowan, J. E. Jr.; Archibald, L. K.; Gaynes, R. P. & Tenover, F. C. (1999). Surveillance of antimicrobial use and antimicrobial resistance in United States hospitals: project ICARE phase 2. *Clinical Infectious Diseases*. 29: 245-52.
- Fritsche, R. T.; Sader, H. S.; Toleman, M. A.; Walsh, T. R. & Jones, R. N. (2005). Emerging metallo- β -lactamase mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clinical Infectious Disease*. 41: 276-278.
- Gales, A. C.; Bolmstrom, A.; Sampaio, J.; Jones, R. N. & Sader, H. S. (1997). Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing ESBL isolated in hospitals in Brazil. *Brazilian Journal Infectious Disease*. 1: 196-203.
- Gales, A. C.; Jones, R. N.; Gordon, K. A.; Sader, H. S.; Wilke, W. W. & Beach M. L. (2000). Activity and spectrum of 22 antimicrobial agents against urinary tract infection pathogens in hospitalized patients in Latin America: report from the second year of the SENTRY antimicrobial surveillance program (1998). *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 45: 295-303.
- Gales, A. C.; Reis, A. O. & Jones, R. N. (2001). Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *Journal Clinical Microbiology*. 39: 183-190.
- Gales, A. C.; Tognim, M. C.; Reis, A. O.; Jones, R. N. & Sader, H. S. (2003a). Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in a *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. 45: 77-79.

- Gales, A. C., Menezes, L. C.; Silbert, S. & Sader, H. S. (2003b). Dissemination in distinct Brazilian regions of epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 669-702.
- Gazouli, M.; Tzelepi, E.; Markogiannakis, A.; Legakis, N. J. & Tzouvelekis, L. S. (1998). Two novel plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing β -lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiology Letters*. 165: 289-293.
- Gehrlein, M.; Leying, H.; Cullmann, W.; Wendt, S. & Opferkuch, W. (1991). Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy*. 37: 405-412.
- Giakkoupi, P.; Xanthaki, A.; Kanelopoulou, M.; Vlahaki, A.; Miriagon, V.; Kontou, S.; Papafraggas, E.; Malamou-Lada, H.; Tzouvelekis, L. S.; legakis, N. J. & Vatopoulos, A. C. (2003). Vim-1 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *Journal Clinical Microbiology*. 41: 3893-3896.
- Giamarellou, H. & Antoniadou, A. (2001). Antipseudomonal antibiotics. *Medical Clinical North America*. 85: 19-42.
- Gibb, A. P.; Tribunddharat, C.; Moore, R. A.; Louie, T. J.; Krulicki, W.; Livermore, D. M.; Palepou, M. F. & Woodford, N. (2002). Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new blaIMP allele, blaIMP-7. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46: 255-258.
- Gillardi, G. L. (1980). Medical Microbiology. In: L. D. Sabath. (Org.) *Pseudomonas aeruginosa: The organism, diseases it causes, and their treatment*. Vienna, Hans Huber Publishers. 25-30p.
- Giske, C.G.; Rylander, M. & Kronvall, G. (2003). VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 47: 3034-3035.
- Gniadkowski, M.; Schneider, I.; Palucha, A.; Jungwirth, R.; Mikiewicz, B. & Bauernfeind, A. (1998). Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: Identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing B-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 42: 827-832.

- Gniadkowski, M. (2001). Evolution and epidemiology of extended spectrum β -lactamases producing microorganisms. *Clinical Microbiology Infectious Disease*. 7: 597-608.
- Godfrey, A. J.; Bryan, L. E. & Rabin, H. R. (1981). Beta-Lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin-binding proteins emerging during cystic fibrosis treatment. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 19: 705-711.
- Gotoh, N.; Nunomura, K. & Nishino, T. (1990). Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to cefsulodin: modification of penicillin-binding protein 3 and mapping of its chromosomal gene. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 25: 513-523.
- Guardahassi, L. & Dalsgaard, A. (2004). Occurrence, structure, and mobility of Tn1546-like elements in environmental isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Applied Environment Microbiology*. 70: 984–990.
- Guzmán-Blanco, M.; Casellas, J. M. & Sader, H. S. (2000). Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. The giant is awakening. *Emerging Re-emerg Disease in Latin America*. 14(1): 67-81.
- Hall, L. M. C.; Livermore, D. M.; Gur, D.; Akova, M. & Akalin, H. E. (1993). OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 37: 1637–1644.
- Hamelin, K.; Bruant, G.; El Shaarawi, A.; Hill, S.; Edge, T. A. & Fairbrother, J. (2007). Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas, *Applied Environment Microbiology*. 73: 477–484.
- Hancock, R. E. & Bellido, F. (1992). Factors involved in the enhanced efficacy against gram-negative bacteria of fourth generation cephalosporins. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 29 (Suppl A): 1-6.
- Hanson, N. D.; Thomson, K. S.; Moland, E. S.; Sanders, C. C.; Berthod, G. & Penn, R. G. (1999). Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding extended spectrum β -lactamases and a plasmid-mediated AmpC. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 44(3):377-80.

- Hanson, N. D.; Hossain, A.; Buck, L. L.; Moland, E. S. & Thomson, K. S. (2004). Program and abstracts of the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, D C. C1-291p.
- Hardy, K. G. (1987). *Plasmids: A practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Harihan, R. & Weinstein, R. A. (1996). *Enterobacteriaceae*. In: C. G. Mayhall (Org.) *Hospital epidemiology and infection control*. (pp. 345-366). Williams & Wilkins, Baltimore.
- Hartmann, A.; Alder, A. C. & Koller, T. (1998). Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital water. *Environment Toxicology and Chemistry*. 17: 377-82.
- Harwood, V.; Brownell, M. & Perusek, W. (2001). Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and chicken faeces in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4930–3.
- Henrichfreise, B.; Wiegand, I.; Sherwood, K. J. & Wiedemann, B. (2005). Detection of VIM-2 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Germany. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 49: 1668-1669.
- Heuer, H.; Krogerrecklenfort, E. & Wellington, E. M. H. (2002). Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiology Ecology*. 43: 325-35.
- Hirakata, Y.; Izumikawa, K.; Yamaguchi, T.; Takemura, H. & Tanaka, H. (1998). Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multi-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 42: 2006-2011.
- Hooper, D. C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Disease*. 31: S24-S28.
- Huang, H. & Hancock, R. E. (1996). The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem-specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Bacteriology*. 178: 3085-3090.

- Hugh, R. & Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *Journal Bacteriology*.66: 24.
- Huletsky, A.; Knox, J. R. & Levesque, R. C. (1993). Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of 3rd-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and 3-dimensional modeling. *Journal Biology Chemistry*. 268: 3690–3697.
- Ingham, E. (2000). *Enterobacteriaceae*. Acesso em 20/10/2008. Disponível em [http://: medic.med.uth.tmc.edu](http://medic.med.uth.tmc.edu).
- Ishii, Y.; Ohno, A.; Taguchi, H.; Imajo, S.; Ishiguro, M. & Matsuzawa, H. (1995). Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 39: 2269–2275.
- Ito, H.; Arakawa, Y.; Ohsuda, S.; Wacharotayankum, R.; Kato, N. & Otha, M. (1995). Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 39: 824-829.
- Iversen, A.; Kühn, I.; Franklin, A. & Möllby, R. (2002). High prevalence of vancomycin-resistant *enterococci* in Swedish sewage. *Applied Environmental Microbiology*. 68: 2838–2842.
- Iversen, A.; Kühn, I.; Rahman, M.; Franklin, A.; Burman, L. G.; Olsson-Liljequist, B.; Torell, E. & Möllby, R. (2004). Evidence for transmission between humans and the environment of a nosocomial strain of *Enterococcus faecium*. *Environmental Microbiology*. 6: 55–59.
- Iyobe, S.; Kusadokoro, H.; Ozaki, J.; Matsumura, N.; Minami, S.; Haruta, S.; Sawai, T. & O'Hara, K. (2000). Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo- β -lactamase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 44: 2023-2027.
- Iyobe, S.; Kusadokoro, H.; Takahashi, A.; Yomoda, S.; Okubo, T.; Nakamura, A. & O'Hara, K. (2002). Detection of variant metallo- β -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and na *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46: 2014-2016.

- Jack, G. W. & Richmond, M. H. (1970). A comparative study of eight distinct β -lactamses synthesized by gram-negative bacteria. *Journal Genetic Microbiology*. 61: 43-61.
- Jacoby, G. A.; Chow, N. & Waites, K. B. (2003). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 47: 559-62.
- Jarvis, W. R. (1987). Epidemiology of nosocomial infections in pediatric patients. *Pediatric Infectious*. 6: 344-351.
- Jean, S. S.; Teng, L. J.; Hsueh, P. R.; Ho, S. W. & Luh, K. T. (2002). Antimicrobial susceptibilities among clinical isolates of extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative bacteria in a Taiwanese University Hospital. *Journal Antl Chemotherapy*. 49: 69-79.
- Jeong, S. H.; Lee, K.; Chong, Y.; Yum, J. H.; Lee, S. H.; Choi, H. J.; Kim, J. M.; Park, K. H.; Han, B. H.; Lee, S. W. & Jeong, T. S. (2003). Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- β -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 397-400.
- Jones, R. (2000). Incidência global, tipos e triagem de β -lactamases com espectro ampliado. Resumos do 1º Simpósio ESBL: incidência, importância e soluções. Buenos Aires, Argentina.
- Kanemoto, K.; Ogawa, R.; Kurishima, K.; Ishikawa, H.; Ohtsuka, M. & Sekizawa, K. (2003). Severe community-acquired *Acinetobacter pneumonia*. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 41: 817-821.
- Karlowsky, J. A.; Draghi, D .C.; Jones, M. E.; Thornsberry, C.; Friedland, I. R. & Sahm, D. F. (2003). Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates os *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 47: 1681-1688.
- Kelch, W. J; & Lee, J. S. (1978). Antibiotic Resistance Patterns of Gram-Negative Bacteria Isolated from Environmental Sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 450-456.

- Koh, T. H.; Wang, G. C. Y. & Sng, L. H. (2004). IMP-1 and a novel metallo- β -lactamase, VIM-6, in fluorescent *Pseudomonas* isolated in Singapore. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*.48: 2334-2336.
- Köhler, T.; Michea-Hamzehpour, M.; Epp, S. F. & Pechere, J. C. (1999). Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 43: 424-427.
- Kokis, V. M.; Moreira, B. M.; Pellegrino, F. L. P. C.; Silva, M. G. & Long, J. B. (2005). Identification of a imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone among patients in a hospital in Rio de Janeiro. *Journal Hospital Infectious*. 60: 19-26.
- Kollef, M. H.; Sherman, G.; Ward, S. & Fraser, V. J. (1999). Inadequate antimicrobial treatment of infections a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *American College of Chest Physicians* 115: 462-474.
- Kolpin, D.; Furlong, E. T. & Meyer, M. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organism wastewater contaminants in U.S streams. 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology*. 36: 1202-11.
- Koneman, E. W. (2001). *Enterobacteriaceae*. In: E. W. Koneman; S. D. Allen; W. M. Janda; P. C. Schreckerberger; W. C. Winn (Org.) *Texto e Atlas Colorido*. 5^a ed. 177-250p.
- Kuhn, 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, A. (2005). Occurrence and Relatedness of Vancomycin-Resistant *Enterococci* in Animals, Humans, and the Environment in Different European regions. *Applied and Environmental Microbiology*. 5383-5390
- Kummerer, K. (2003). The significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 5-7.
- Kummerer, K. & Henninger, A. (2004). Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection*. 9: 1203-14.

- Kummerer, K. (2004). *Pharmaceuticals in the environment sources, fate, effects and risks*. 2nd edn. Springer, Berlin.
- Lagatolla, C.; Enrico, A.; Carlo, M. & Lucilla, D. (2004). Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with Acquired metallo- β -lactamase determinants in European hospital. *Emerging Infectious Diseases*.10: 535-538.
- Laurettil, L.; Riccio, M. L.; Mazzariol, A.; Cornaglia, G.; Amicosante, G.; Fontana, R. & Rossolini, G. M. (1999). Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 43: 1584-1590.
- Lautenbach, E.; Strom, B. L.; Bilker, W. B.; Patel, J. B.; Edelstein, P. H. & Fishman, N. O. (2001). Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended spectrum betalactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Infectious Disease*. 33: 1288-94.
- Lee, K.; Lee, W. G., Uh, Y.; Há, G. Y., Cho, J. & Chong, Y. (2003). Vim and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korea hospitals. *Emerging Infectious Disease*. 9: 868-871.
- Lee, K.; Yum, J. H.; Yong, D.; Lee, H. M. & Kim, H. D. (2005). Novel acquired metallo- β -lactamase gene, blaSIM-1 in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 49: 4485-4491.
- Levin, A. S.; Barone, A. A.; Penco, J.; Santos, M. V.; Marinho, I. S. & Arruda E. A. (1999). Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Disease*. 28: 1008-1011.
- Levin, A. S. (2003). Treatment of *Acinetobacter* spp infections. *Expert Opin Pharmacother*. 4: 1289-1296.
- Li, X. Z.; Ma, D.; Livermore, D. M.; Nikaido, H. (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 38: 1742-1752.

- Li, X. Z.; Poole, K. & Nikaido, H. (2003). Contributions of MexAB-OprM and an EmrE Homolog to Intrinsic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides and Dyes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 47: 27-33.
- Libisch, B.; Gacs, M.; Csiszar, K.; Muzslay, M.; Rokusz, L. & Fuzi, M. (2004). Isolation of an integron-borne blaVIM-4 type metallo- β -lactamase gene from a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Hungary. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48: 3576-3578.
- Limansky, A. S.; Mussi, M. A. & Viale, A. M. (2002). Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *Journal Clinical Microbiology*. 40: 4776-4778.
- Limaye, A. P.; Gautam, R. K.; Black, D. & Fritsche, T. R. (1997). Rapid emergence of resistance to cefepime during treatment. *Clinical Infectious Disease*. 25: 339-40.
- Linton, A. H. (1986). Flow of resistance genes in the environment and from animals to man. *Journal. Antimicrobial. Chemotherapy*. 18 [suppl. C.]: 189-97.
- Livermore, D. M. (1992). Interplay of impermeability and chromosomal β -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 36: 557-584.
- Livermore, D. M. (1995). β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Rev.* 8: 557-584.
- Livermore, D. M. & Woodford, N. (2000). Carbapenemases: a problem in waiting? *Current Opinion Microbiology*. 3: 489-495.
- Livermore, D. M. (2001). Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 47: 247-250.
- Livermore, D. M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Disease*. 34: 634-640.

- Livingstone, D.; Gill, M. J. & Wise, R. (1995). Mechanisms of resistance to the carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 35: 1-5.
- Lombardi, G.; Luzzaro, F.; Docquier, J. D.; Riccio, M. L.; Perilli, M.; Coli, A.; Amicosant, G.; Rossolini, G. M. & Toniolo, A. (2002). Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- β -lactamase. *Journal Clinical Microbiology*. 40: 4051-4055.
- Lubowski, T. H.; Woon, J. L.; Hogan, P. Ching-Chang H. (2001). Differences in antimicrobial susceptibility among hospitals in an integrated health system. *Infectious Control Epidemiology*. 22: 379-82.
- Luzzaro, F.; Docquier, J. D.; Colinson, C.; Endimiani, A.; Lombardi, G.; Amicosante, G.; Rossolini, G. M. & Toniolo, A. (2004). Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo- β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48: 648-650.
- Ma, L.; Ishii, Y.; Ishiguro, M.; Matsuzawa, H. & Yamaguchi, K. (1998). Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A β -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 42: 1181–1186.
- Mach, P. A. & Grimes, D. J. (1982). R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant. *Applied Environmental Microbiology*. 44: 1395–1403.
- Madson, B.; Ofek, I.; Clegg, S. & Abraham, S. N. (1994). Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar binding specificities of their fimbriae H adhesions. *Infectious Immunology*. 62: 843-8.
- Magnet, S.; Courvalin, P. & Lambert, T. (2001). Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 45: 3375-3380.
- Maniatis, A. N.; Pournaras, S.; OrKopoulou, S.; Tassios, P. T. & Legakis, N. J. (2003). Multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates in intensive care units in Greece. *Clinical Microbiology Infectious*. 9: 547-553.

- Marchandin, H.; Carriere, C.; Sirot, D.; Jean-Pierre, H. & Darbas, H. (1999). TEM-24 produced by four different species of *Enterobacteriaceae*, including *Providencia rettgeri*, in a single patient. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 43: 2069–2073.
- Marra, A. R. (2002). *Análise dos fatores de risco relacionados à letalidade das infecções da corrente sanguínea hospitalares por Klebsiella pneumoniae*. Dissertação de Mestrado, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.
- Martinez, J.; Martinez, L.; Rosenblueth, M.; Silva J, & Martinez, R. (2004). How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. *Internal Microbiology*. 7: 261-8.
- Martinez-Martínez, L.; Hernández-Allés, S.; Alberti, S.; Tomás, J.; Benedi, V. & Jacoby, G. (1996). In vitro selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 40: 342-348.
- Martínez-Martínez, L.; García, I.; Ballesta, S.; Benedí, V. J.; Hernández-Allé, S. & Pascual, A. (1998). Energy dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone resistant *K. pneumoniae* strains. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 42: 1850-2.
- Martins, S. T. (2002). *Análise de Custos da Internação de Pacientes em Unidades de Terapia Intensiva com Infecções causadas por Pseudomonas aeruginosa e Acinetobacter baumannii multirresistentes* Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Paulo.
- Mary Y. M. A.; Goldstein, E. J. C.; Friedman, M. H.; Anderson, M. S. & Mulligan, M. E. (1983). Resistance of gram-negative bacilli as related to hospital use of antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 347-352.
- Masuda, N.; Sakagawa, E.; Ohya, S.; Gotoh, N.; Tsujimoto, H. & Nishino, T. (2000). Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 44: 3322-3327.
- Mayhall, C. G. (1996). *Hospital epidemiology and infection control*. 3rd. ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

- McArdell, C. S.; Molnar, E.; Suter, M. J. F. & Giger, W. (2003). Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Environmental Science Technology*. 37: 5479–5486.
- Medeiros, A. A. (1997). Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clinical Infectious Disease*. 24(1): S19-S45.
- Mendes, R. E.; Toleman, M. A.; Ribeiro, J.; Sader, H. S.; Jones, R. N. & Walsh, T. R. (2004). Genetic characterization of a novel metallo- β -lactamase gene, blaIMP-16: a highly divergent bla-IMP with a unique genetic context. Report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48: 4654-4661.
- Mendonça-Hagler, L. C. & Hagler, A. N. (1991). Microbiologia aquática. In: Roitman, I. (Org.) *Tratado de Microbiologia vol. II. Microbiologia Ambiental*. Ed. Manole.
- Miao, X. S.; Bishay, F.; Chen, M. & Metcalfe, C. D. (2004). Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environmental Science Technology*. 38: 3533–3541.
- Michael, I. (2002). Understanding metallo β -lactamases – A major role of zinc in these enzymes is to act as a lewis acid rather than providing a nucleophile when hydrolyzing β -lactam antibiotics. *American Society for Microbiology*. 68 (5): 217-221.
- Miriagou, V.; Tzelepi, E.; Giannelil, D.; Tzouvelekis, L.S. (2003). *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo- β -lactamase VIM-1. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 47 (1): 395-397.
- Morosini, M. I.; Canton, R.; Martinez-Beltran, J.; Negri, M. C.; Perez-Diaz, J. C.; Baquero, F. & Blazquez, J. (1995). New extended spectrum TEMtype β -lactamase from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in a nosocomial outbreak. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 39: 458–461.
- Mugnier, P.; Podglajen, I.; Goldstein, F. W. & Collatz, E. (1998). Carbapenems as inhibitors of OXA-13, a novel integron-encoded β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 144: 1021–1031.

- Mugnier, P.; Dubrous, P.; Casin, I.; Arlet, G. & Collatz, E. (1996). A TEM-derived extended-spectrum B-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 40: 2488–2493.
- Mulvey, M. R.; Bryce, E. & Boyd, D. A. (2005). Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 49: 358-365.
- Murphy, T. A.; Simm, A. M.; Toleman, M. A.; Jones, R. N. & Walsh, T. R. (2003). Biomechanical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 47: 582-587.
- Murray, G. E.; Tobin, R. S.; Junkins, B. & Kushner, D. J. (1984). Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewage-related bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 48: 73–77.
- Nakajima, A.; Sugimoto, Y.; Yoneyama, H. & Nakae, T. (2002). High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiology Immunology*. 46: 391-395.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS. (2002). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twelfth Informational Supplement. Wayne, PA, USA. M100-S12.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS. (2005). Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º suplemento informativo. Wayne, PA, USA. Padrão 100 -S15
- Neuhauser, M. M.; Weinstein, R. A.; Rydman, R.; Danziger, L. H.; Karam, G. & Quinn, J. P. (2003). Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units- implications for fluoroquinolone use. *Journal of the American Medical Association*. 289: 885-888.
- Nickel, J. C.; Downey, J. A. & Costerton, J. W. (1989). Ultrastructural study of microbiologic colonization of urinary catheters. *Urology*. 34(5): 284-291.
- Nordmann, P. & Poirela, L. (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology Infectious*. 8: 321-331.

- Nikaido, H. & Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiology Reviews*. 49: 1–32.
- Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*. 264: 382-388.
- Nishio, H.; Komatsu, M.; Shibata, N.; Shimakawa, K.; Sueyoshi, N.; Ura, T.; Satoh, K.; Toyokawa, M.; Nakamura, T.; Wada, Y.; Orita, T.; Kofuku, T.; Yamasaki, K.; Sakamoto, M.; Kinoshita, S.; Aihara, M. & Arakawa, Y. (2004). Metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *Journal Clinical Microbiology*. 42: 5256-5263.
- Nitzan, Y.; Deutsch, E. B. & Pechatnikov, I. (2002). Diffusion of beta-lactam antibiotics through oligomeric or monomeric porin channels of some gram-negative bacteria. *Current Microbiology*. 45: 446-455.
- Nouér, S. A.; Nucci, M.; Oliveira, M. P.; Piffano, F. L.; Pellegrino, C. & Moreira B. M. (2005). Risk Factors for Acquisition of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing SPM Metallo-Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 3663–3667.
- Nordmann, P.; Ronco, E.; Naas, T.; Duport, C.; Michel-Briand, Y. & Labia, R. (1993). Characterization of a novel extended spectrum b-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37: 962–969.
- Novais, C.; Coque, T. M.; Sousa, J. C.; Baquero, F. & Peixe, L. (2004). Local genetic patterns within a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clone isolated in three hospitals in Portugal. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48 (9): 3613-3617.
- Novais, C.; Coque, M. T.; Ferreira, H.; Sousa, J. C. & Peixe, L. (2005). Environmental Contamination with Vancomycin-Resistant *Enterococci* from Hospital Sewage in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 3364-3368.
- Obara, M. & Nakae, T. (1991). Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 28:791-800.

- Oh, E. J.; Lee, S.; Park, Y. J.; Park, K.; Kim, S. I.; Kang, M. W. & Kim, B. K. (2003). Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detection metallo- β -lactamase. *Journal Microbiology Methods*. 54: 411-418.
- Ohlsen, K.; Ziebuhr, W. & Koller, K. (1998). Effects of sub inhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42: 2817–23.
- Oliveira, R. A. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: caracterização fenotípica e tipagem molecular de amostras isoladas de pacientes com infecção adquirida no ambiente hospitalar. Dissertação de Mestrado, Universidade Católica de Goiás.
- Ortolani, M. G. S.; Cardoso, M. R. I. & Ayub, M. A. Z. (1997). Perfil microbiológico de bactérias mesofílicas do efluente do hospital de clínicas de Porto Alegre. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental.
- Osano, E.; Arakawa, Y.; Wacharotayankun, R.; Ohta, M.; Horii, T.; Ito, H.; Yoshimura, F. & Kato, N. (1994). Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 38: 71-78.
- Ouderkirk, J. P.; Nord, J. A.; Turett, G. S. & Kislak, J. W. (2003). Polymyxin B nephrotoxicity and efficacy against nosocomial infections caused by multiresistant gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 47: 2659-2662.
- Paltzkill, T.; Thomson, K. S.; Sanders, C. C.; Moland, E. S.; Huang, W. & Milligan, T. W. (1995). New variant of TEM-10 beta-lactamase gene produced by a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 39: 1199–1200.
- Pangon, B.; Bizet, C.; Buré, A.; Pichon, F.; Philippon, A.; Regnier, B. & Gutmann, L. (1989). In vivo selection of a cephamycin-resistant, porin-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3 β -lactamase. *Journal Infectious Disease*. 159: 1005-1006.

- Parveen, S.; Murphree, R.; Edmiston, L.; Kaspar, C.; Portier, K. & Tamplin, M. (1997). Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. *Applied Environmental Microbiology*. 63: 2607-2612.
- Pasteran, F.; Faccone, D.; Petroni, A.; Rapoport, M. & Galas, M. (2005). Novel variant (blaVIM-11) of the metallo- β -lactamase blaVIM family in a GES-1 extended spectrum β lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 49: 474-475.
- Patterson, J. E.; Rech, M. & Jorgensen, J. H. (1997). Extended spectrum β -lactamases: dilemmas in detection and therapy. *Antimicrobial Infectious Disease Newsletter*. 16: 57-60.
- Patterson, J. E. (2001). Is there an effect on antimicrobial resistance? *American College of Chest Physicians*. 119: 426S-430S.
- Patterson, D. L. & Bonomo, R. (2005). Extended-spectrum β -lactamases (ESBL): a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*. 18 (4): 657-86.
- Peleg, A. Y.; Franklin, C.; Bell, J. & Spelman, D. W. (2004). Emergence of IMP-4 metallo- β -lactamase in a clinical isolate from Australia. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 54: 699-700.
- Pellegrino, L. P.; Moreira, M. B. & Nouer, S. A. (2001). Antimicrobial resistance genotype characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a university affiliated hospital in Rio de Janeiro. Resumo L-14. 101th ASM General Meeting, Orlando.
- Pellegrino, F. L. P. C.; Teixeira, L. M.; Carvalho, G.; Nouer, A. S. & Oliveira, P. M. (2002). Occurrence of a multifrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in diferen hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal Clinical Microbiology*. 40: 2420-2424.
- Pena, C.; Albareda, J. M.; Pallares, R.; Pujol, M.; Tubau, F. & Ariza, J. (1995). Relationship between quinolone use and emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in bloodstream infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39: 520-4.

- Pereira, A. S. (2004). *Avaliação do perfil de sensibilidade, da similaridade genética e da presença do gene qnr em amostras de Escherichia coli resistentes à ciprofloxacina isolados em hospitais brasileiros*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo.
- Perilli, M.; Segatore, B.; Massis, M. R. D.; Riccio, M. L.; Bianchi, C.; Zollo, A.; Rossolini, G. M. & Amicosante, G. (2000). TEM-72, a new extended-spectrum- β -lactamase detected in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* in Italy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 44: 2537–2539.
- Pettersson, B.; Kodjo, A.; Ronaghi, M.; Uhlen, M.; Tonjum, T. (1998). Phylogeny of the family *Moraxellaceae* by 16S rDNA sequence analysis, with special emphasis on differentiation of *Moraxella* species. *Int Journal System Bacteriology*. 48: 75-89.
- Petukhov, V. N.; Fomchenkov, V. M.; Chugunov, V. A. & Kholodenko, V. P. (2000). Plant biotests of soil and water, polluted with petroleum products. *Prikladnaia Biohimiia Mikrobiologiiia*. 36: 652-655.
- Pfaller, M. A. & Jones, R. N. (2000). MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) results from the Americas: resistance implications in the treatment of serious infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46: 39-52.
- Philippon, A.; Arlet, G. & Lagrange, P. H. (1994). Origin and impact of plasmid-mediated extended spectrum β -lactamases. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease*. 13 (1): S17-S29.
- Philippon, A.; Labia, R. & Jacoby, G. A. (1989). Extended spectrum β -lactamases. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*. 33: 1131-6.
- Philippon, L. N.; Naas, T.; Bouthors, A. T.; Barakett, V. & Nordmann, P. (1997). OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 41: 2188–2195.
- Piroth, L.; Auber, H.; Doise, J. M. & Vincet-Martin, M. (1998). Spread of extended spectrum betalactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: are betalactamase inhibitors of therapeutic value? *Clinical Infectious Disease*. 27: 76-80.

- Pitout, J. D. D.; Saanders, C. C. & Sanders, W. E. (1997). Antimicrobial resistance with focus on β -lactam resistance in Gram-negative bacilli. *American Journal of Medicine*. 103: 51-9.
- Pitout, J. D.; Hanson, N. D. & Church, D. L. (2004). Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamses: importance of community isolates with blaCTX-M genes. *Clinical Infectious Disease*. 38: 1736-41.
- Pitout, J. D. D.; Gregson, D. B.; Poirel, L.; McClure, J. A. & Le, P. (2005). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo-Lactamases in a Large Centralized Laboratory. *Journal Clinical Microbiology*. 43: 3129–3135.
- Pitt, T. L. & Barth, A. L. (1997). *Pseudomonas aeruginosa* and other medically important *Pseudomonads*. In: A. M Emerson, P. M. Hawkey, S. H. Gillespie (Org.) *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. First edition. London, Scientific Books. 493-517p.
- Podschun, R.; Penner, P. & Ullman, U. (1992). Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. *Microbial Pathogenesis*. 13: 371-9.
- Podschun, R. & Ullman, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology taxonomy, typing, methods and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(4): 589-603.
- Poirel, L.; Collet, L. & Nordmann, P. (2000a). Carbapenem hydrolyzing metallo- β -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerging Infectious Disease*. 6: 84-85.
- Poirel, L.; Thierry, N. & Delphine, N. (2000b). Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-b-lactamase and its plasmid - and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 44:891-897.
- Poirel, L.; Lambert, T.; Turkoglu, S.; Ronco, E.; Gaillard, J. & Nordmann, P. (2001). Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the bla VIM-2 carbapenem-hydrolysing β -lactamase gene and of two novel aminoglycosideo resistance gene cassettes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 45: 546-552.

- Poirel, L.; Menuteau, O. & Agoli, N. (2003). Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *Journal Clinical Microbiology*. 41: 3542-7.
- Poirel, L.; Magalhaes, M.; Lopes, M. & Nordmann, P. (2004a). Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene blaSPM-1 surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48: 1406-1409.
- Poirel, L.; Phan, J. N.; Cabanne, L.; Gatus, B. J.; Bell, S. M. & Nordmann, P. (2004b). Carbapenem-hydrolysing metallo- β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated in Australia. *Pathology (Philadelphia)*. 36: 366-367.
- Pollack, M. (1995). *Pseudomonas aeruginosa*. In: D. Mandell, J. Benneths, R. Dolin (Org.). *Principles and practice of infections diseases*. (pp.1980–2003). New York, Churchill Livingstone.
- Pollack, M. (2000). *Pseudomonas aeruginosa*. In: G.L. Mandell, J.E. Bennett & R. Dolin (Org.) *Principles and Practice of Infectious Diseases* (pp. 2310–2335). Churchill Livingstone, Philadelphia, PA, USA.
- Pournaras, S.; Tsakris, A.; Maniati, M.; Tzouveleskis, L. S. & Maniatis, A. N. (2002). Novel variant blaVIM-4 of the metallo- β -lactamase gene blaVIM-1 in a clinical strais. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46: 4026-4028.
- Pournaras, S.; Maniati, M.; Petinaki, E.; Tzouvelekis, L. S.; Tsakris, A.; Legakis, N. J. & Maniatis, A. N. (2003). Hospital outbreak of multiple clones of *pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo- β -lactamase gene variants blaVIM-2 and blaVIm-4. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 1409-1414.
- Pournaras, S.; Ikonomidis, A. & Sofianou, D. (2004). CTX-M-type β -lactamases affect community *Escherichia coli* treatment. *Greece Emerging Infectious Disease*. 10: 1163-4.
- Prats, G.; Miro, E.; Mirelis, B.; Poirel, L.; Bellais, S. & Nordmann, P. (2002). First isolation of a carbapenem-hydrolysing β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46: 932-933.

- Pumbwe, L. & Piddock, L. J. (2000). Two efflux systems expressed simultaneously in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 44: 2861-2864.
- Quale, J.; Bratu, S.; Landman, D. & Heddurshetti, R. (2003). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clinical Infectious Disease*. 37: 214-220.
- Queenan, A. M. ; Torres-Viera, C.; Gold, H. S.; Carmeli, Y.; Eliopoulos, G. M.; Moellering Jr., R. C.; Quinn, J. P.; Hindler, J.; Medeiros A. A. & Bush, K. (2000). SME-type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 44: 3035–3039.
- Rasmussen, B. A. & Bush, K. (1997). Carbapenem-hydrolysing β -lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 41: 223-232.
- Reacher, M. H.; Shah, A.; Livemore, D. M.; Wale, M. C.; Graham, C. & Johnson, A. P. (2000). Bacteraemia and antibiotic resistance of its pathogens reported in England and Wales between 1990 and 1998: trend analysis. *British Medical Journal*. 320: 213-216.
- Reinthaler, F. F.; Posch, J.; Feierl, G.; Wust, G.; Haas, D.; Ruckenbauer, G.; Mascher, F. & Marth, E. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*. 37: 1685–1690.
- Reis, A. O. (2003). Análise do perigo de sensibilidade da similaridade genética e da resistência aos carbapenems em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. Tese de Doutorado, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.
- RESOLUÇÃO CONAMA. (2005). *Resolução nº 357/2005*. Publicada no DOU no 53, de 18 de março de 2005, Seção 1, pp 58-63 Acesso em 10/11/2008. Disponível em <http://www.mma.gov.br>
- Ribera, A.; Roca, I.; Ruiz, J.; Gibert, I. & Vila, J. (2003). Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 52:477-480.

- Ribera, A.; Ruiz, J.; Jimenez de Anta, M.T. & Vila, J. (2002). Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 49: 697-698.
- Riccio, M. L.; Franceschini, N.; Boschi, L.; Caravelli, B. & Cornaglia, G. (2000). Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of blaIMP allelic variants carried by gene cassettes of the different phylogeny. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 44: 1229-1235.
- Richardson, M. L. & Browron, J. M. (1985). The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 37: 1-12.
- Richmond, M. H. & Sykes, R. B. (1973). The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Advances in Microbial Physiology*. 9: 31-88.
- Rodriguez-Bano, J.; Navarro, M. D. & Romero, L. (2004). Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *Journal Clinical Microbiology*. 42: 1089-1094.
- Rossi, F. & Andreazzi, D. (2005). *Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma*. Ed. Atheneu. São Paulo.
- Russo, T. A. & Johnson, J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infectious*. 5: 449-456.
- Sabaté, M.; Tarragó, R.; Navarro, F.; Miro, E.; Vergés, C.; Barbé, J. & Prats, G. (2000). Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 44: 1970-1973.
- Sader, H. S.; Sampaio, J. L. M.; Zoccoli, C. & Jones, R. N. (1999). Results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program results in three Brazilian medical centers for 1997. *Brazilian Infectious Disease*. 3: 63-79.

- Sader, H. S. (2000). Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. *Brazilian Journal Infectious Disease*. 4(2): 91-9.
- Sader, H. S.; Jones, R. N.; Gales, A. C.; Zocoli, C.; Sampaio, J.; Mendes, R. E. & Pfaller, M. P. (2001a). Perfil de Sensibilidade a Antimicrobianos Isoladas do Trato Respiratório Baixo de Pacientes com Pneumonia internados em Hospitais Brasileiros. Resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 27: 59-67.
- Sader, H. S.; Gales, A. C.; Pfaller, M. A.; Mendes, R. E.; Zocoli, C. & Barth, A. (2001b). Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Brazilian Journal Infectious Disease*. 5(4): 200-14.
- Sader, H. S.; Reis, A. O.; Silbert, S. & Gales, A. C. (2005). IMPs, VIMs and SPMs the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clinical Microbiology Infectious*. 11: 73-76.
- Sahly, H.; Aucken, H.; Benedi, V. J.; Forestien, C.; Fusing, V. & Hansen, D. S. (2004). Impairment of respiratory burst in polymorphonuclear leukocytes by ESBL strains of *Klebsiella pneumoniae*. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease*. 23: 20–26.
- Sahud, A.; Lolans, K.; Qeenan, M. & Quinn, J. P. (2004). Presented at the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and chemotherapy, Washington, DC.
- Salyers, A. A.; Shoemaker, N. B. & Stevens, A. M. (1995). Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiological Reviews*. 59: 579–90.
- Sanders, C. C. & Sanders, W. E. (1992). β -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clinical Infectious Disease*. 15: 824-839.
- Santos, D. F.; Pimenta, F. C.; Oliveira, R. A.; Montalvão, E. R.; Santos, D. B. & Carmo Filho, J. R. (2008). Extended-spectrum β -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in two hospitals in Goiânia/Brazil: detection, prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing. *Brazilian Journal Microbiology*. 39(4): 608-612.

- Santos, L. F.; Santos, I. B.; Assil, A. M. L. & Xavier, D. E. (2002). Determinação da produção de metalo- β -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. *Jornal Brasileiro de Patologia e medicina Laboratorial*. 38 (4): 291-296.
- Sardelic, S.; Lucia, P.; Volga, P. P. & Gian, M. R. (2003). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying Vim-2 Metallo- β -lactamase determinants, Croatia. *Emerging Infectious Diseases*. 9: 1022-1023.
- Sato, K. & Nakae, T. (1991). Outer membrane permeability of *acinetobacter calcooaceticus* and its implication in antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 28: 35-45.
- Schwartz. T.; Kohnen, T. & Jansen, B. (2003). Detection of antibiotic-resistance bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*. 43: 325-35.
- Scoulica, E. V.; Neonakis, I. K.; Gikas, A. I. & Tselentis, Y. J. (2004). Spread of blaVIM-1-producing *E.coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the blaVIM-1 metallo- β -lactamase gene. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. 48: 167-172.
- Senda, K.; Arakawa, Y.; Nakashima, K.; Ito, H.; Ichiyama, S.; Shimokata, K.; Kato, N. & Ohta, M. (1996a). Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams including carbapenems. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 40: 349-353.
- Senda, K.; Arakawa, Y.; Ichiyama, S.; Nakashima, K.; Ito, H.; Ohsuka, S.; Shimokata, K.; Kato, N. & Ohta, M. (1996b). PCR detection of metallo- β -lactamase gene (bla IMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. *Journal Clinical Microbiology*. 34: 2909-2913.
- Shiba, T.; Ishiguro, K.; Takemoto, N.; Koibuchi, H. & Sugimoto, K. (1995). Purification and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* NfxB protein, the negative regulator of the nfxB gene. *Journal Bacteriology*. 177: 5872-5877.

- Shibata, N.; Doi, Y.; Yamane, K.; Yagi, T.; Kurokawa, H.; Shihayama, K.; kato, H.; Kai, K. & Arakawa, Y. (2003). PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *Journal Clinical Microbiology*. 41: 5407-5413.
- Shigei, J. (1992). Test methods use in identification of commonly isolated aerobic Gram-negative bacteria. In: H. D. Isenberg (Org.) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. (pp 1.19.1 – 1.19.12). American Society for Microbiology, Washington.
- Shlaes, D. M.; Gerding, D. N.; John, J. F.; Craig, W. A.; Bornstein, D. L. & Duncan, R. A. (1997). Society for healthcare epidemiology of America and Infectious Disease Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infections Control Epidemic*. 18: 275-91.
- Siemann, S.; Brewer, D.; Clasrke, A. J.; Dmitrienko, G. L. & Lajoie, G. (2002). IMP-1 metallo- β -lactamase: effect of chelators and assessment of metal requirement by eletrospray mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2: 190-200.
- Silva, C. H. P. M. & Silva, P. M. (1999). Bacteriologia: Um texto ilustrado. Ed. Eventos.
- Silver, L. L. & Bostian, K. A. (1993). Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 37: 377-383.
- Sonea, S. (1988). The global organism. *The Sciences*. 38-45.
- Sougakoff, W.; Goussard, S. & Courvalin, P. (1988). The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiology Letters*. 56: 343–348.
- Spence, R. P. & Towner, K. J. (2003). Frequencies and mechanisms of resistance to moxifloxacin in nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 687-690.

- Spratt, B. G. & Cromie, K. D. (1988). Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Reviews Infectious Disease*. 10: 699-711.
- Storm, D. R.; Rosenthal, K. S. & Swanson, P. E. (1977). Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annual Reviews Biochemichal*. 46: 723-763.
- Tenover, F. C.; Arbeit, R. D. & Goering, R. V. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal Clinical Microbiology*. 33: 2233-9.
- Tessier, F.; Arpin, C.; Allery, A. & Quentin, C. (1998). Molecular characterization of a TEM-21 b-lactamase in a clinical isolate of *Morganella morganii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 42: 2125–2127.
- Thomson, K. S. (2001). Controversies about extended spectrum β -lactamases and Amp C. *Emerging Infectious Disease*. 7 (2): 333–336.
- Tjernberg, I. & Ursing, J. (1993). Numerical classification and identification of *Acinetobacter* genomic species. *Journal of Applied Bacteriology*. 75: 259–268.
- Toleman, M. A.; Simm, A. M.; Murphy, T. A.; Gales, A. C.; Biedenbach, D. J.; Jones, R. N. & Walsh, T. R. (2002). Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in latim America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 50: 673-679.
- Toleman, M. A.; Rolston, K.; Jones, R. N. & Walsh, T. R. (2004). BlaVIM-7, a evolutinary distinct metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48: 329-332.
- Tolun, O.; Kucukbasmaci, D.; Torumkuney-Akbulut, C.; Catal, M.; Ang-Kucuker & Ang, O. (2004). Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clinical Microbiology Infectious*. 10 :72–75.

- Tomita, H.; Pierson, C.; Lim, S. K.; Clewell, D. B. & Ike, Y. (2002). Possible connection between a widely disseminated conjugative gentamicin resistance (pMG1-like) plasmid and the emergence of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Journal Clinical Microbiology*. 40: 3326–3333.
- Torell, E.; Kühn, I.; Olsson-Liljequist, B.; Haeggman, S.; Hoffman, B. M.; Lindahl, C. & Burman, L. G. (2003) Clonality among ampicillin resistant *Enterococcus faecium* isolates in Sweden and relation to ciprofloxacin resistance. *Clinical Microbiology Infectious*. 9: 1011–1019.
- Towner, K. J.; Gee, T. & Boswell, T. (2002). Na unwanted import to the UK: a carbapenem-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* producing metallo- β -lactamase. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 50: 1092-1093.
- Troillet, N.; Samore, M. H. & Carmeli, Y. (1997). imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. *Clinical Infectious Disease*. 25: 1094-1098.
- Trun, N. J. & Marko, J. F. (1998). Architecture of a bacterial chromosome. *American Society of Microbiology News*. 64: 276-283.
- Tsuji, A.; Kobayashi, I.; Oguri, T.; Inoue, M.; Yabuuchi, E. & Goto, S. (2005). An Epidemiological study of the susceptibility and frequency of multiple-drug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated at medical institutes nationwide in Japan. *Journal Infectious Chemotherapy*. 2: 64-70.
- Tysall, L.; Stockdale, M. W.; Chadwick, P. R.; Palepou, M. F.; Towner, K. J.; Livermore, D. M. & Woodford, N. (2002). IMP-1 carbapenemase detected in a *Acinetobacter* clinical isolate from the UK. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 49: 217-218.
- Tzouvelekis, L. S. & Bonomo, R. A. (1999). SHV-type β -lactamases. *Current Pharmaceutical Design*. 5: 847–864.
- Tzouvelekis, L. S.; Tzelepi, E.; Tassios, P. T. & Legakis, N. J. (2000). CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Journal Antimicrobial Agents*. 14: 137–143.

- Umed O. 2008. *Klebsiella* infections. Microbiology Gulbarga Univ. Acesso em 1 de outubro de 2008. Disponível em: <http://medicineinstantaccesstotheminds of medicine>.
- Van Elsas, J. D.; Fry, J.; Hirsch, P. & Molin, S. (2000). Ecology of plasmid transfer and spread. *In*: C. M. Thomas (Org.) *The horizontal gene pool*. (pp175-206). The Netherland: harwood, Amsterdam.
- Vatopoulos, A. C.; Philippon, A.; Tzouvelekis, L. S.; Komninou, Z. & Legakis, N. J. (1990). Prevalence of a transferable SHV-5 type β -lactamase in clinical isolates of *klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Greece. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 26: 635-648.
- Vecina-Neto, G. (2000). Evolução e perspectivas da assistência à saúde no Brasil. *In*: A. T. Fernandes (Org.) *Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde*. (pp 1613-1617). Atheneu, São Paulo.
- Vila, J.; Navia, M.; Ruiz, J. & Casals, C. (1997). Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 41: 2757–2759.
- Vila, J.; Ribera, A.; Marco, F.; Ruiz, J.; Mensa, J. & Chaves, J. (2002). Activity of clinafloxacin, compared with six other quinolones, against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 49: 471-477.
- Vila, J. & Marco, F. (2002). Interpretative reading of the non-fermenting gram-negative bacilliantibiogram. *Enfermage Infectious Microbiology Clinical*. 20: 304-310.
- Vilanova, X.; Manero, A.; Cerda-Cuellar, M. & Blanch, A. R. (2004). The composition and persistence of faecal coliforms and enterococcal populations in sewage treatment plants. *Journal Applied Microbiology*. 96: 279–288.
- Villegas, M. V. & Hartstein, A. I. (2003). *Acinetobacter* Outbreaks, 1977–2000. *Infectious Control Hospital Epidemiology*. 24: 284–295

- Visca, P.; Colotti, G.; Serino, L.; Verzili, D.; Orsi, N. & Chiancone, E. (1992). Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Applied Environment Microbiology*. 58: 2886-2893.
- Walsh, T. R.; Bolmstrom, A.; Qwarnstrom, A. & Gales, A. C. (2002). Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *Journal Clinical Microbiology*. 40: 2755-2759.
- Walsh, T. R.; Toleman, M. A.; Hryniewicz, W. P.; Bennett, M. & Jones, R. N. (2003). Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 116-119.
- Walsh, T. R.; Toleman, M. A.; Poirel, L. & Nordmann, P. (2005). Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical. Microbiology Reviews*. 18: 306-325.
- Watanabe, M.; Iyobe, S.; Inoue, M. & Mitsuhashi, S. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 35: 147-151.
- Watkinson, A. J.; Micalizzi, G. B.; Bates, J. B. & Costanzo, S. D. (2007a). Novel method for rapid assessment of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from environmental waters by use of a modified chromogenic agar. *Applied Environmental Microbiology*. 73: 2224–2229.
- Watkinson, A. J.; Micalizzi, G. B.; Graham, G. M.; Bates, J. B. & Costanzo, S. D. (2007b). Antibiotic- resistant *Escherichia coli* in Wastewaters, Surface Waters, and Oysters from an Urban Riverine System. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 5667-5670.
- Whitman, R. L.; Shively, D. A.; Pawlik, H.; Nevers, M. B. & Byappanahalli, M. N. (2003). Occurrence of *Escherichia coli* and enterococci in *Cladophora* (Chlorophyta) in Nearshore Water and Beach Sand of Lake Michigan. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (8): 4714-4719.
- Wiese, A.; Munstermann, M.; Gutschmann, T.; Lindner, B.; Kawahara, K. & Zahringer, U. (1998). Molecular mechanisms of polymyxin B-membrane interactions: direct correlation between surface charge density and self-promoted transport. *Journal of Membrane Biology*. 162: 127-138.

- Witte, W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*. 279: 996-7.
- Wood, D. W. & Pierson L. S.. (1996). The *phzI* gene of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for the production of a diffusible signal required for phenazine antibiotic production. *Gene*. 168: 49–53.
- Worcel, A. (1974). Studies on the folded chromosome of *Escherichia coli*. In: A. R. Kolber, M. Kohiyama (Org.) *Mechanisms and Regulation of DNA Replication*. (pp. 201-224). 1st ed. New York, Plenum Press.
- Wright, G. D. (2001). Mechanisms of Aminoglycoside Antibiotic Resistance. In: *Bacterial Resistance to Antimicrobials*. (pp 91-121). 1^a ed. New York, NY.
- Yan, J. J.; Hsuesh, P. R.; Ko, W. C.; Luh, K. T. & Tsai, S. H. (2001). Metallo- β -lactamses in Clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*.45: 2224-2228.
- Yano, H.; Kuga, A.; Okamoto, R.; Kitasato, H.; Kobayashi, T. & Inoue, M. (2001). Plasmid-encoded metallo- β -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems especially meropenem. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 45: 1343-1348.
- Young, H. K. (1993). Antimicrobial resistance spread in aquatic environments. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 31: 627-635.
- Yatsuyanagi, J.; Saito, S.; Harata, S.; Suzuki, N.; Ito, Y.; Amano, K. & Enomoto, K. (2004). Class 1 integron containig metallo- β -lactamase gene blaVIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strain isolated in japan. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48: 626-628.
- Yum, J. H.; Yong, D.; Lee, K.; Kim, H. S. & Chong, Y. (2002). A new integron carrying VIM-2 metallo- β -lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. 42: 217-219.

Zavascki, A. P.; Barth, A. L.; Gonçalves, A. L. S.; Moro, A. L. D. & Fernandes, J. F. (2006). The influence of metallo- β -lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58: 387-392.

ANEXO