

Sandra Maria Basílio Quinteira

**Resistências aos antibióticos β -lactâmicos em
Enterobacteriaceae isoladas de águas de consumo**



Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

1999

Sandra Maria Basílio Quinteira

**Resistências aos antibióticos β -lactâmicos em
Enterobacteriaceae isoladas de águas de consumo**



FACULDADE DE FARMÁCIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 01/09/06
Reg. 3508
Cota

FFM
QUI

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

1999

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Controlo de Qualidade
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo Sub-programa Ciência e Tecnologia do 2º Quadro Comunitário de Apoio, através da atribuição de Bolsa de Mestrado PRAXIS XXI BM / 17798 / 98.

“A ciência, na sua definição mais fundamental, é uma forma frutífera de indagação, não uma listagem de conclusões atractivas. As conclusões não são a essência, mas sim a consequência.”

(Stephen Jay Gould)

A meus pais

À memória de minha avó

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof. Doutora Luísa Maria Sobreira Vieira Peixe, quero agradecer a orientação do trabalho realizado e manifestar a minha admiração e reconhecimento pela forma como me ensinou, incentivou e ajudou ao longo da sua execução. A amizade ficará para sempre.

À minha co-orientadora, Prof. Doutora Maria de Nazaré Teixeira da Silva Pestana, agradeço toda a orientação e ajuda prestada ao longo do trabalho, principalmente na parte de Seminário deste Curso de Mestrado. Obrigado pelas palavras meigas de incitamento.

Ao Prof. Doutor João Carlos Figueiredo de Sousa, quero agradecer a oportunidade de realização deste trabalho no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

À Prof. Doutora Lurdes Bastos, coordenadora deste Curso de Mestrado, agradeço a incessante disponibilidade, leitura e crítica do manuscrito.

À Prof. Doutora Maria Isaura Rosa Pinto de Sousa, quero expressar o meu sincero agradecimento pela disponibilidade, apoio amigo e alguns "quilos" de chocolates (!!).

Aos Profs. Doutores Eugénia Pinto, Helena Neto, S. José Nascimento e Miguel Cabral, obrigada pela forma simpática e cordial com que sempre me trataram.

À Dr.^a Olga Cardoso e Dr.^a Maria Gabriela Silva, agradeço a forma como me receberam no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. À Dr.^a Maria Gabriela Silva agradeço ainda a disponibilidade e colaboração nos estudos que versaram o isolamento e caracterização de porinas da membrana exterior de *Serratia marcescens*.

À Carla Alexandra Novais, colega de bancada nas aventuras e desventuras das bactérias, e que me ajudou na execução de algumas provas bioquímicas, antibiogramas e reacções de PCR. Obrigado pela amizade e apoio constante.

Uma palavra de amizade também para a colega Alexandra Figueiredo. Obrigada pelas anedotas e boas risadas no laboratório.

À Eng. Maria José Saavedra, obrigado pelo permanente apoio e encorajamento.

À D. Olga Tentugal, agradeço a cedência de numerosas amostras de água.

A todas as pessoas que trabalham no Laboratório de Microbiologia, agradeço a forma afável como me receberam e toda a ajuda prestada. Um agradecimento especial à D. Deolinda e D. Fernadinha pelo carinho com que me acolheram.

A todos os colegas do Curso de Mestrado, agradeço o apoio constante, a amizade e algumas jantaras.

A todos os meus familiares e amigos, obrigado pelo permanente incentivo.

Ao meu namorado Miguel, vítima de alguns momentos de desesperança, um especial agradecimento pela ajuda na elaboração do presente trabalho, pelo incentivo constante, bem como toda a paciência que demonstrou durante as longas horas de realização do manuscrito.

Aos meus pais, a quem devo o facto de estar, nesta hora, a escrever estas linhas, agradeço todo o carinho, amizade e compreensão que nunca falharam.

A todos aqueles que, de algum modo, contribuíram para a concretização da presente dissertação,

um muito obrigado...

Alguns dos resultados apresentados nesta Dissertação constam das seguintes comunicações:

Quinteira, S.M., Sousa, J.C, Pestana, N. & Peixe, L., 1999. Susceptibilidade de bactérias coliformes, isoladas de águas de consumo, a agentes antimicrobianos. *Foodborne Illness 99*. Porto.

Quinteira, S.M., Sousa, J.C. & Peixe, L., 1999. Susceptibilidade aos antibióticos β -lactâmicos de *Rahnella aquatilis*. Aceite para o Micro'99 - *Congresso Nacional de Microbiologia*. Dezembro 99. Luso.

Quinteira, S.M., Sousa, J.C., Novais, C. & Peixe, L., 1999. Perfil β -lactamásico e genómico (ERIC-PCR) de *Rahnella aquatilis*. Aceite para o Micro'99 - *Congresso Nacional de Microbiologia*. Dezembro. Luso.

Resumo

A crescente utilização de agentes antimicrobianos nas explorações animais, juntamente com a prática corrente de descargas de esgotos sem tratamento prévio, contribuiu para um aumento significativo do número de bactérias resistentes aos antibióticos, presentes em ambiente aquático.

É discutida, no presente trabalho, a importância do ambiente aquático, nomeadamente da água de consumo, constituir não só reservatório, mas também um meio de propagação e evolução de genes de resistência e seus vectores.

Foi estudado o comportamento de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, isoladas de águas não tratadas, face aos antibióticos β -lactâmicos. Os resultados obtidos permitiram verificar que existe uma reduzida frequência de estirpes de *Escherichia coli* resistentes aos antibióticos β -lactâmicos. No entanto, a possível associação da resistência a elementos transferíveis (plasmídeos e transposões) poderá assumir um papel de grande relevância, em ambiente natural. Paralelamente, foi também observada, em cerca de 32 % das estirpes, uma redução da susceptibilidade à amoxicilina, o que lhes poderá conferir importantes vantagens adaptativas.

Verificou-se que apenas 55 % das estirpes de *Enterobacter cloacae* e 37 % das estirpes de *Citrobacter freundii* apresentaram o fenótipo de resistência assumido como fenótipo natural para estas espécies.

Foi efectuada também a caracterização da expressão de porinas de uma estirpe de *Serratia marcescens* com resistência ao imipenemo.

Realizou-se, ainda, um estudo do perfil bioquímico, comportamento aos antibióticos, perfil β -lactamásico e caracterização genómica de cinco estirpes da espécie *Rahnella aquatilis*.

Este trabalho constituiu, assim, uma primeira abordagem ao estudo dos mecanismos de resistência subjacentes aos fenótipos observados em bactérias isoladas da água, dado que os trabalhos até agora publicados os não caracterizam.

Abstract

The increased use of antimicrobials in farming, together with the practice of raw sewage discharge into receiving waters, has resulted in a significant increase in the numbers of antibiotic resistant bacteria present in aquatic environments. In this work, it is discussed the role of the aquatic environment, especially of the drinking water, to act not only as a reservoir of clinical resistance genes, but also as a medium for the spread and evolution of resistance genes as well as their vectors.

The antimicrobial resistance, with focus on β -lactam resistance among strains of the family *Enterobacteriaceae*, isolated from raw water samples, was examined.

The results showed a reduced frequency of β -lactam antibiotics resistant *Escherichia coli* strains among isolates. Nevertheless, the possible resistance association to transferable genetic elements (as plasmids or transposons) might assume a relevant role of antibiotic resistance spreading, in the natural environment. A significant reduction in susceptibility to amoxicillin was also observed within 32 % of *E. coli* strains which might result in an increased adaptive advantage. Only 55 % of *Enterobacter cloacae* strains, and 37 % of *Citrobacter freundii* strains, showed resistance phenotypes to β -lactams, assumed to be the natural phenotypes for these species.

The characterization of porin expression of a imipenem resistant *Serratia marcescens* was undertaken.

The biochemical profile, antibiotic resistance patterns, characterization of β -lactamases, and genomic fingerprinting of five *Rahnella aquatilis* strains were also undertaken.

The present work represents a first approach to the study of antibiotic resistance mechanisms of water isolated bacteria observed phenotypes, since that other published works do not characterize them.

Conteúdo

1	Introdução	1
1.1	Resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bacilos Gram-negativos	3
1.1.1	Antibióticos β -lactâmicos	4
1.1.2	Mecanismos de resistência	5
1.1.2.1	Alteração de PBPs	6
1.1.2.2	Impermeabilidade	6
1.1.2.3	Mecanismos de efluxo	7
1.1.2.4	β -lactamases	7
1.2	Determinantes genéticos da resistência aos agentes antimicrobianos	10
1.2.1	Resistência natural ou intrínseca	11
1.2.2	Resistência adquirida	11
1.2.2.1	Mutações	12
1.2.2.2	Aquisição de plasmídeos e transposões	12
1.3	Reservatórios de resistência	13
1.3.1	Ambiente hospitalar	13
1.3.2	Bactérias comensais	13
1.3.3	Área geográfica	14
1.3.4	Animais	15
1.4	A água como reservatório e fonte de genes de resistência aos agentes antimicrobianos	16
1.4.1	Reservatórios aquáticos de bactérias resistentes	16
1.4.2	Transferência de genes de resistência em ambiente aquático	18
1.4.2.1	Transdução	19
1.4.2.2	Transformação	19
1.4.2.3	Conjugação	20
1.4.2.4	Índice MAR	21

1.5	Caracterização genómica e classificação de estirpes	22
1.5.1	rep-PCR	23
1.5.1.1	ERIC-PCR	24
2	Objectivos	26
3	Material & Métodos	28
3.1	Origem das amostras	28
3.2	Isolamento e identificação das estirpes	28
3.2.1	Provas bioquímicas	30
3.2.2	Sistema automático de identificação de bacilos Gram-negativos (API 32GN)	33
3.3	Avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos	33
3.3.1	Método de diluição em agar com concentração fixa	33
3.3.2	Método de difusão em agar com tiras ("E-test") para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	34
3.3.3	Método de difusão em agar com discos	35
3.4	Caracterização das β -lactamases	36
3.4.1	Preparação dos extractos enzimáticos	36
3.4.2	Determinação do ponto isoeléctrico das β -lactamases	36
3.5	Ensaio de conjugação	37
3.6	Extracção de DNA plasmídico	37
3.6.1	Técnica de Kado & Liu	37
3.6.2	Electroforese em gel de agarose	38
3.7	Caracterização genómica de <i>R. aquatilis</i> utilizando ERIC-PCR	38
3.7.1	Obtenção do DNA cromossómico	39
3.7.2	Quantificação do DNA por determinação espectrofotométrica	39
3.7.3	Reacção de amplificação	39
3.7.4	Caracterização do produto PCR por electroforese	41
3.8	Estudo do mecanismo de resistência ao imipenemo em <i>S. marcescens</i>	41
3.8.1	Bioensaio	41
3.8.2	Estudo da alteração da expressão de porinas associada com o decréscimo da permeabilidade da membrana externa em <i>S. marcescens</i>	42
3.8.2.1	Isolamento das proteínas da membrana externa	42
3.8.2.2	Determinação da quantidade proteica	43

3.8.2.3	Electroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)	43
4	Resultados & Discussão	44
4.1	Origem das amostras	44
4.1.1	Distribuição geográfica das resistências aos agentes antimicrobianos	45
4.2	Estirpes isoladas	46
4.3	Avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos de bactérias coliformes	48
4.3.1	Estudo comparativo entre as percentagens de resistência, aos antibióticos β -lactâmicos, em estirpes de <i>E. coli</i> patogénicas e de ambiente aquático	48
4.3.2	Estudo comparativo entre as percentagens de resistência, aos agentes antimicrobianos, em estirpes de <i>C. freundii</i> patogénicas hospitalares e de ambiente aquático	51
4.3.3	Estudo do comportamento de estirpes de <i>Enterobacter cloacae</i> aos agentes antimicrobianos	53
4.3.4	Estudo do comportamento de estirpes de <i>Klebsiella</i> spp. aos agentes antimicrobianos	55
4.4	Transferência genética da resistência	56
4.4.1	Ensaio de conjugação	56
4.5	Caracterização bioquímica e genómica de <i>R. aquatilis</i>	57
4.5.1	Identificação e caracterização bioquímica	58
4.5.2	Perfil de susceptibilidade face aos agentes antimicrobianos	59
4.5.3	Perfil β -lactamásico	61
4.5.4	"Fingerprinting" genómico de estirpes de <i>R. aquatilis</i> . Utilidade na identificação e diferenciação desta espécie	63
4.6	Caracterização de uma estirpe de <i>S. marcescens</i> resistente ao imipenemo	67
5	Conclusões	69
6	Bibliografia	71

Lista de Figuras

1.1	Estruturas dos antibióticos β -lactâmicos.	4
3.1	Localização dos diferentes pontos de amostragem	29
3.2	Sequência nucleotídica dos primers ERIC	41
4.1	Comparação entre as percentagens de resistência em <i>E. coli</i>	49
4.2	Comparação entre as percentagens de resistência em <i>C. freundii</i>	52
4.3	Percentagens de resistência em <i>E. cloacae</i>	54
4.4	Percentagens de resistência em <i>Klebsiella</i> spp.	56
4.5	Visualização em gel de agarose do plasmídeo transferido por conjugação	57
4.6	Dendograma que ilustra a relação "fenotípica" entre as estirpes de <i>R. aquatilis</i> estudadas	61
4.7	ERIC-PCR 1 em gel de agarose	64
4.8	ERIC-PCR 2 em gel de agarose	65
4.9	Dendograma que ilustra a relação "genotípica" entre as estirpes de <i>R. aquatilis</i> estudadas	66
4.10	SDS-PAGE das porinas de <i>S. marcescens</i>	68

Lista de Tabelas

1.1	Esquema de classificação das β - lactamases	9
3.1	Concentrações de antibióticos para selecção	34
4.1	Origem das várias amostras de água analisadas	44
4.2	Espécies bacterianas isoladas no decorrer do trabalho	47
4.3	Reacções bioquímicas das estirpes de <i>R. aquatilis</i>	59
4.4	Susceptibilidade aos agentes antimicrobianos das estirpes de <i>R. aquatilis</i>	60
4.5	CIMs ($\mu\text{g/ml}$) determinadas para alguns antibióticos β -lactâmicos em <i>R. aquatilis</i>	62

Abreviaturas

bp-	Pares de bases
ddp-	Diferença de potencial
EDTA-	Ácido etilenominotetracético
ERIC-	Enterobacterial repetitive intergenic consensus
P.M.-	Peso molecular
PCR-	Polymerase chain reaction
SDS-	Dodecil sulfato de sódio
SXT-	Trimetoprim + sulfametoxazol
TAE-	Tris Acetato
TE-	Tris EDTA

Capítulo 1

Introdução

A água é um produto natural indispensável à vida do Homem e outros organismos. É importante para o progresso, comodidade e segurança das sociedades humanas, tornando-se necessário um fornecimento de água em quantidade e condições higiénicas apropriadas (Ferreira, 1992; Mendes, 1998).

O tipo mais comum de contaminação aquática, com consequências a nível de saúde pública, é de origem biológica (WHO, 1996a) e, embora os sistemas de abastecimento da rede pública eliminem, através de tratamentos de rotina, a transmissão de bactérias patogénicas (Gale, 1996), muitas pessoas possuem sistemas de abastecimento de água privados que não recebem qualquer tratamento de desinfecção (Geldreich, 1989; Mintz *et al.*, 1995). Nestes casos, a contaminação biológica representa um grande risco para a saúde (Khalil *et al.*, 1994; Reiff *et al.*, 1996). Mas não é só causando infecção que os microrganismos, presentes na água de consumo, afectam a saúde humana (Pitlik *et al.*, 1987). As cianobactérias, por exemplo, produzem toxinas que podem permanecer na água, mesmo após estas terem sido removidas (Vasconcelos, 1993, 1995; Falconer *et al.*, 1994).

Grande parte da população recorre ainda, para suprimento das suas necessidades no uso doméstico ou recreativo, rega ou consumo industrial, a água de variadíssimas origens que não da rede de distribuição pública (Lamka *et al.*, 1980; Hespanhol & Prost, 1994), como a água de poços ou furos. Segundo o relatório sobre o controlo da qualidade da água de abastecimento para consumo humano, relativo ao ano de 1997 (DGA, 1998), cerca de 20 % da população portuguesa dispõe de água cujo controlo de qualidade é manifestamente deficiente e cuja qualidade nem sempre cumpre com os requisitos legais. O referido relatório afirma ainda que, a 2,6 % da população servida, foi distribuída água apresentando sérias deficiências de qualidade ao nível dos parâmetros microbiológicos (DGA,

1998). Uma vez que o perigo de contaminação destas águas é elevado (Geldreich, 1990), devido a infiltrações e escorrências de descargas de esgotos sem tratamento prévio (Geldreich, 1989), é imperiosa uma avaliação das consequências para a saúde pública da sua utilização e uma abrangente campanha de sensibilização das populações para os perigos que o uso deste tipo de abastecimento possa acarretar.

É frequente a disseminação de doenças através da utilização alimentar da água (doenças hídricas) (Young, 1996; Moe, 1997). Sendo a água um dos elementos essenciais para o Homem, torna-se necessário que seja utilizada em boas condições de potabilidade, uma vez que pode veicular microrganismos patogénicos importantes (Ferreira, 1992). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, quase metade da população mundial sofre de doenças associadas com água insuficiente ou contaminada (WHO, 1996b), das quais as doenças diarreicas são as mais mortais (Hazen & Toranzos, 1990; Ewald, 1991; Sim *et al.*, 1994). As doenças diarreicas, incluindo cólera, febre tifóide e disenteria, propagadas principalmente através de água ou alimentos contaminados, causaram em 1995, mais de 3 milhões de mortes. A febre tifóide origina cerca de 16 milhões de casos e mais de 600 mil mortes por ano (WHO, 1996b).

O crescente número de indivíduos imunologicamente comprometidos que enfrentam o risco de infecções por organismos, geralmente considerados não patogénicos, sugere que é necessária uma maior investigação em bactérias, cujo habitat natural é a água (Rusin *et al.*, 1997a,b). Os avanços da medicina resultaram no aumento do número de doentes imunossuprimidos (incluindo doentes submetidos a transplantes de órgãos ou quimioterapia) e com doenças crónicas profundas (Morris & Potter, 1997). Esta população possui um elevado risco de contracção de infecções por microrganismos que de outra forma não seriam reconhecidos ou associados com doenças graves (Morris & Potter, 1997). É o caso de *Rahnella aquatilis*, uma espécie encontrada principalmente na água, que foi já isolada de doentes com o síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Harrell *et al.*, 1989b; Reina & Lopez, 1996), com diabetes (Oh & Tay, 1995) e sujeitos a transplantes renais (Alballaa *et al.*, 1992). A imunossupressão devida a doença ou a medicamentos, combinada com a incapacidade de precauções sanitárias adequadas, possibilita, pois, a emergência de infecções por estirpes habitualmente não patogénicas (Hall, 1997).

A utilização indiscriminada de antibióticos e a capacidade dos microrganismos modificarem a sua informação genética (Pitout *et al.*, 1997b) (através de mutações ou aquisição de genes inseridos em elementos móveis) conduziu ao aumento das resistências a agentes antimicrobianos (Ledeberg, 1997), registadas de uma forma acentuada e dramática na última década (WHO, 1996c). A resistência

das bactérias não é senão o resultado da selecção natural (ver "A origem das espécies" Darwin 1859), devida à pressão exercida pelos produtos antibacterianos, quer sejam antibióticos, anti-sépticos ou desinfectantes. O fenómeno é mundial e está relacionado com todos os microrganismos patogénicos para o Homem, e com todas as classes de antibióticos (Acar & Courvalin, 1998).

Em vários géneros bacterianos, isolados de infecções nosocomiais, a incidência de estirpes com resistência a múltiplos antibióticos compromete com frequência a eficácia da terapêutica instituída (Cohen, 1994; Dudley, 1995). Com menor incidência, bactérias resistentes têm também sido isoladas a partir de ambientes aparentemente não sujeitos a uma pressão selectiva por agentes antimicrobianos, como plantas (Talbot *et al.*, 1980) e água de consumo (Armstrong *et al.*, 1981). A crescente utilização de agentes antimicrobianos nas explorações animais, juntamente com a prática corrente de descargas de esgotos sem tratamento prévio, têm sido relacionadas com o aumento significativo do número de bactérias, em ambiente aquático, resistentes aos agentes antimicrobianos (Young, 1993).

1.1 Resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bacilos Gram-negativos

Com o advento da era dos agentes antimicrobianos, as ciências médicas e veterinárias obtiveram um meio promissor para o tratamento das infecções humanas e de outras espécies animais (Cohen, 1994). De facto, os agentes antimicrobianos representaram um dos maiores progressos do século XX, uma vez que a sua introdução, nos anos 40, veio possibilitar o tratamento de doenças e infecções que anteriormente eram, muitas vezes, fatais (Smith & Lewin, 1993). No entanto, logo de início, as bactérias demonstraram capacidade para resistir aos efeitos bacteriostáticos e bactericidas dos agentes antimicrobianos (Stanier *et al.*, 1976; Mach & Grimes, 1982), desenvolvendo mecanismos de combate a esses compostos (Gold & Moellering, 1996). Actualmente, o problema da resistência aos antibióticos continua a ser um importante factor a comprometer a sua utilização eficaz e consequente controlo das doenças infecciosas (Coleman *et al.*, 1994).

A utilização inapropriada dos antibióticos é muitas vezes identificada como um importante propulsor dos elevados custos dos tratamentos, efeitos secundários, falhas nos tratamentos e resistências antimicrobianas (Finch, 1998).

1.1.1 Antibióticos β -lactâmicos

É um grupo de antibióticos constituído por penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos (Sousa *et al.*, 1998). Todos os elementos deste grupo apresentam em comum um anel β -lactâmico, constituído por três átomos de carbono e um de nitrogénio, com radicais substituintes (Figura 1.1). O anel β -lactâmico encontra-se fundido com um anel tiazolidina nas penicilinas ou com um anel di-hidrotiazina nas cefalosporinas (Dever & Dermody, 1991). Nos antibióticos monobactâmicos mantém-se apenas o anel β -lactâmico e, nos carbapenemos, observa-se a presença de carbono, em substituição de enxofre, no anel tiazolidina (Sousa *et al.*, 1998).

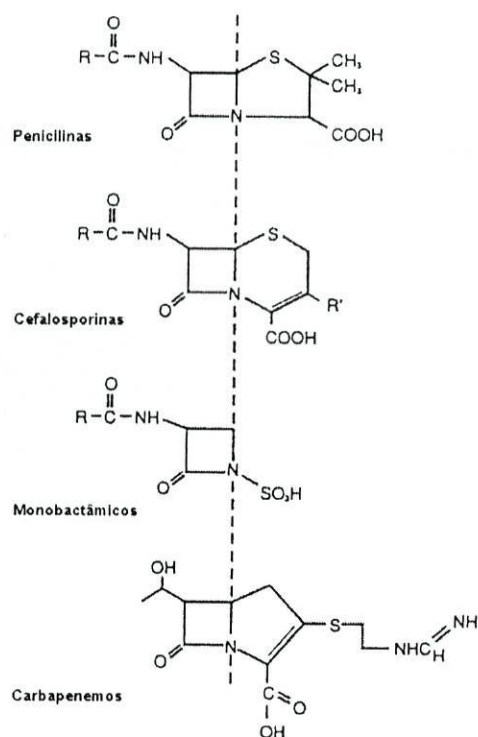


Figura 1.1: Estruturas dos antibióticos β -lactâmicos. Adaptado de Dever & Dermody (1991).

Os antibióticos β -lactâmicos inibem a biossíntese do peptidoglicano na sua fase terminal (Dever & Dermody, 1991). Apenas são activos em bactérias em crescimento e são desprovidos de qualquer actividade contra bactérias sem parede

celular. Funcionam como inativadores de enzimas (transpeptidases, carboxipeptidases) intervenientes na biossíntese do peptidoglicano.

Estas proteínas, localizadas no folheto externo da membrana citoplasmática (Boulton & Orr, 1983), funcionam, portanto, como alvos dos antibióticos β -lactâmicos e, por isso, foram designadas por PBPs (*Penicillin-Binding-Proteins*) (Sousa & Prista, 1988).

Deste modo, os antibióticos β -lactâmicos ligam-se aos PBPs por covalência, e impedem a síntese do peptidoglicano, participando na activação das autolisinas endógenas, com a subsequente lise celular (Maiden, 1998; Rolinson, 1998).

Os antibióticos β -lactâmicos são os mais prescritos em todo o mundo (Sanders & Sanders, 1992). Devido à sua popularidade não é surpreendente que a resistência a estes agentes se tenha tornado um grande problema, especialmente nas últimas duas décadas, após a introdução de cefalosporinas de largo espectro, monobactâmicos, carbapenemos e associações de inibidores de β -lactamases com o agente β -lactâmico.

Os antibióticos β -lactâmicos têm uma utilização terapêutica generalizada dada a sua fraca toxicidade, características farmacocinéticas e actividade antimicrobiana (Sousa & Prista, 1988).

1.1.2 Mecanismos de resistência

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos surge como o resultado de um ou mais dos seguintes mecanismos (Philippon *et al.*, 1986; Sanders, 1987, 1992):

- o organismo poderá produzir uma ou mais β -lactamases que inactivam o antibiótico.
- poderá haver alteração de uma ou mais PBPs, resultando num alvo alterado, com ligação ao antibiótico reduzida ou até sem ligação.
- as porinas da membrana externa poderão sofrer alteração, resultando numa diminuição da difusão do antibiótico através da membrana.
- expulsão do antibiótico por mecanismos de efluxo.

Nas bactérias Gram-negativas, a conjugação de dois ou mais destes mecanismos apresenta um importante papel na determinação da resistência a um dado antibiótico (Pitout *et al.*, 1997b).

1.1.2.1 Alteração de PBPs

A resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos, devida à modificação de PBPs, ocorre quer através de mutações nos genes cromossômicos que codificam para as PBPs, quer através da aquisição de genes estranhos que codificam para novas PBPs (Pitout *et al.*, 1997b).

Este mecanismo de resistência é importante em cocos Gram-positivos, mas é encontrado menos frequentemente em bacilos Gram-negativos.

1.1.2.2 Impermeabilidade

A membrana externa das bactérias Gram-negativas constitui uma barreira de permeabilidade com um papel determinante na resistência aos antibióticos β -lactâmicos (Hancock, 1987).

Os nutrientes e os antibióticos devem passar esta membrana até atingirem o interior da bactéria, o que acontece passivamente por difusão através de canais proteicos designados porinas (Hayes & Wolf, 1990; Nikaido, 1992).

As porinas da membrana exterior organizam-se em canais hidrófilos de difusão transmembranar, os quais são permeáveis, passivamente, a compostos com hidrofília e tamanho compatível com o diâmetro interno destes canais (Hancock, 1987; Parente & Sousa, 1998). As porinas apresentam peso molecular entre 32000-40000 daltons, e o seu diâmetro varia de organismo para organismo (Sousa & Prista, 1988).

Alterações nestas porinas conduzem à diminuição da quantidade de antibióticos β -lactâmicos que poderá entrar na célula (Dever & Dermody, 1991).

Esta forma de resistência conduz geralmente a resistência múltipla aos antibióticos, uma vez que compostos diferentes partilham, frequentemente, a mesma porina. Também poderá conduzir a uma resistência específica, quando apenas um composto utilizar uma porina específica (Pitout *et al.*, 1997b).

Em *Pseudomonas aeruginosa*, a ausência da expressão da porina OprD determina resistência ao imipenemo, constituindo, assim, um exemplo de uma porina com especificidade (Livermore, 1993; Livingstone *et al.*, 1995; Ballesteros *et al.*, 1996).

A impermeabilidade poderá também contribuir para a resistência ao imipenemo em *Enterobacter* spp. e *Serratia* spp., onde as alterações na permeabilidade celular e o aumento da produção de β -lactamases cromossômicas se conjugam para conduzir à resistência a este antibiótico (Yang *et al.*, 1990; Sanders, 1992).

Assim, alterações nas porinas por mutações cromossômicas poderão originar níveis significativos de resistência, especialmente quando ocorrem juntamente com a produção de β -lactamases (Hancock, 1987; Hechler *et al.*, 1989; Minami *et al.*, 1996).

1.1.2.3 Mecanismos de efluxo

Estudos recentes mostraram que bombas de efluxo, algumas com invulgar especificidade, desempenham um importante papel na resistência intrínseca das bactérias Gram-negativas (Nikaido, 1996), nomeadamente no que respeita à resistência intrínseca à carbenicilina em *Pseudomonas aeruginosa* (Nikaido, 1994).

1.1.2.4 β -lactamases

Definição O mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos mais frequente entre os isolados clínicos de bacilos Gram-negativos é a produção de β -lactamases (Medeiros, 1984; Livermore, 1995). Estas enzimas inactivam os antibióticos β -lactâmicos através da hidrólise do anel β -lactâmico do antibiótico (Bush, 1989; Ogawara *et al.*, 1993). Nas bactérias Gram-negativas, as β -lactamases localizam-se no espaço periplasmático, entre as membranas externa e citoplasmática. Devido à sua localização interna relativamente à barreira de permeabilidade exercida pela membrana externa, as β -lactamases das bactérias Gram-negativas são, frequentemente, produzidas a um nível relativamente baixo. O aumento do nível de produção de enzima e/ou a diminuição da entrada do composto por alteração de porinas pode conduzir ao aparecimento de resistência até aos antibióticos fracamente hidrolizáveis.

As β -lactamases das bactérias Gram-negativas são diversas e numerosas. Algumas são caracteristicamente codificadas por genes cromossômicos (Bennett & Chopra, 1993), enquanto que outras o são por genes plasmídicos.

A produção de β -lactamases pode ser constitutiva ou indutível. Em bactérias Gram-negativas, as β -lactamases indutíveis são codificadas somente por genes cromossômicos, enquanto que as β -lactamases constitutivamente expressas poderão ser codificadas quer pelo cromossoma quer por plasmídeos.

E. coli produz, naturalmente, uma cefalosporinase cromossômica num nível baixo e constante (síntese constitutiva) e sem repercussão na resistências aos antibióticos β -lactâmicos. Outras espécies produzem naturalmente uma cefalosporinase cromossômica num nível baixo que, em determinadas circunstâncias, pode

ser induzida atingindo níveis bastante elevados (Rolinson, 1998). É o caso, por exemplo, de *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens* e *Citrobacter freundii*.

A síntese indutível destas enzimas pode ser alterada, na sequência de uma mutação, para uma produção constitutiva num nível elevado (Sykes & Matthew, 1976). Este fenómeno é observado em algumas estirpes e, ao contrário da indução, é irreversível, determinando uma resistência de alto nível às β -lactaminas (Labia *et al.*, 1988).

As β -lactamases plasmídicas são responsáveis pela elevada incidência de estirpes de *E. coli* resistentes às aminopenicilinas e carboxipenicilinas. A capacidade de disseminação dos plasmídeos e dos transposões, em que habitualmente se localizam, explica a sua larga frequência entre os bacilos Gram-negativos (Sousa *et al.*, 1991).

A elevada incidência de β -lactamases plasmídicas, TEM-1, TEM-2 e SHV-1, em especial, determinou a introdução de agentes antibacterianos capazes de lhes resistir.

Moléculas de novos β -lactâmicos (cefalosporinas de 3^a e 4^a geração) ou inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) associados a penicilinas hidrolisáveis (amoxicilina, ampicilina e piperacilina) conseguem escapar à acção hidrolítica das β -lactamases plasmídicas clássicas (TEM1, TEM-2, SHV1). No entanto, a sua utilização promoveu o aparecimento de novas β -lactamases capazes de os hidrolizar, derivadas de TEM-1, TEM-2 e SHV-1, por alteração de um número reduzido de aminoácidos (1 a 4).

Outras enzimas plasmídicas foram isoladas posteriormente com actividade hidrolítica em metoxi- β -lactâmicos (tipo AmpC) (Papanicolau *et al.*, 1990) e carbapenemos (Ito *et al.*, 1995).

Classificação Uma série de esquemas têm sido propostos para a classificação das β -lactamases. Em 1973, Richmond & Sykes propuseram um esquema de classificação das β -lactamases, das bactérias de Gram negativo, com base no perfil de substratos e estudos de inibição. Mais tarde este esquema passou a incluir os pI das β -lactamases.

Ambler, em 1980, propôs um esquema de classificação tendo por base as sequências de aminoácidos dessas enzimas. Este esquema compreende quatro classes: A, B, C e D. As enzimas da classe A contêm no sítio activo o aminoácido serina. As da classe B são metaloenzimas com actividade hidrolítica face a antibióticos estáveis às β -lactamases como o imipenemo. As enzimas da classe C são de origem cromossómica e encontram-se em numerosas espécies de entero-

bactérias. A classe D agrupa as β -lactamases do tipo serina que hidrolisam a oxacilina (OXA-1 a OXA-11 e PSE-2).

O esquema mais recente e completo foi desenvolvido por Bush *et al.* (1995) e tenta combinar elementos de todos os outros esquemas prévios e correlacioná-los com a estrutura molecular da enzima (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Esquema de classificação das β -lactamases de Bush *et al.* (1995)

Grupo	Características
1	Cefalosporinas não inibidas pelo ácido clavulânico
2a	Penicilinas inibidas pelo ácido clavulânico
2b	Enzimas de largo espectro inibidas pelo ácido clavulânico
2be	Enzimas de espectro ampliado inibidas pelo ácido clavulânico
2br	Enzimas de largo espectro com resistência ao ácido clavulânico
2c	Carbencilinas inibidas pelo ácido clavulânico
2d	Oxacilinas inibidas pelo ácido clavulânico
2e	Cefalosporinas inibidas pelo ácido clavulânico
2f	Carbapenemas não-metaloenzimas
3	Metalo- β -lactamases
4	Penicilinas não inibidas pelo ácido clavulânico

Este esquema não utiliza a localização do gene que codifica a β -lactamase como factor principal de classificação, reflectindo, assim, a capacidade de alguns desses genes se movimentarem do cromossoma para plasmídeos e vice-versa.

O grupo 1 inclui as enzimas AmpC que são intrinsecamente resistentes aos inibidores das β -lactamases e se encontram em várias bactérias Gram-negativas. Quando codificadas pelo cromossoma, estas enzimas são indutíveis em *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *Serratia* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*, e são constitutivas em *Escherichia coli* (Livermore, 1995). A selecção de mutantes desreprimidos, de estirpes que exprimem geralmente esta enzima indutivelmente, é responsável pela emergência da resistência múltipla aos antibióticos β -lactâmicos nestas espécies.

O grupo 2 inclui uma variedade de enzimas que são intrinsecamente susceptíveis aos inibidores de β -lactamases. Deste grupo fazem parte as enzimas do grupo 2b que inclui as β -lactamases mediadas pelos plasmídeos mais frequentes, encontradas em *E. coli* e *K. pneumoniae*, responsáveis pela resistência à ampicilina e primeira geração de cefalosporinas. Formas mutantes destas enzimas surgiram em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* e são responsáveis pela resistência às cefalosporinas de largo espectro e ao aztreonam (β -lactamase de espectro ampliado), e pela resistência às associações dos β -lactâmicos com os inibidores de β -

lactamases (IRTs). As não-metalo carbapenemases, recentemente descritas, e que conferem resistência ao imipenemo estão também incluídas no grupo 2.

O grupo 3 compreende as metalo- β -lactamases capazes de hidrolizar os carbapenemos. As β -lactamases pertencentes ao grupo 4 não são comumente encontradas.

Detecção A presença das β -lactamases pode ser, geralmente, detectada pela utilização de cefalosporinas cromogénicas (substrato), como é o caso do nitrocefim (Livermore, 1995). Por hidrólise da ligação amida desta cefalosporina ocorre uma modificação da carga eléctrica da molécula que se traduz por alteração da cor do substrato.

1.2 Determinantes genéticos da resistência aos agentes antimicrobianos

A resistência antimicrobiana confere uma vantagem de sobrevivência ao organismo quando o antibiótico está presente no ambiente. Na presença do antibiótico, as estirpes resistentes sobreviverão e as células susceptíveis são inibidas ou mortas. Assim, é importante para a sobrevivência dos organismos que sejam quer intrinsecamente (naturalmente) resistentes ou que adquiram resistência após a introdução dos antibióticos no ambiente onde se encontram.

Existe uma grande variedade de genes que conferem resistência aos antibióticos e que podem ser adquiridos pela bactéria através de vários mecanismos incluindo conjugação, transformação ou transdução. Uma vez adquiridos, estes genes podem ser incorporados no genoma bacteriano ou serem transportados em elementos extracromossómicos designados plasmídeos.

A resistência que as bactérias apresentam aos antibióticos pode ser natural ou ser adquirida (Hayes & Wolf, 1990; Acar & Courvalin, 1998).

Algumas bactérias são naturalmente resistentes a determinados antibióticos, enquanto que outras são susceptíveis aos mesmos. A resistência natural é mediada pelo cromossoma. Existem diferentes mecanismos que podem explicar a resistência de algumas bactérias a agentes antimicrobianos (Jacoby & Archer, 1991; Smith & Lewin, 1993):

- a bactéria poderá ser capaz de produzir grandes quantidades de uma enzima que inactiva ou modifica a estrutura dos antibióticos. Existe, pois, uma modificação do agente antimicrobiano por forma a que não seja mais activo.

Algumas bactérias, por exemplo, produzem a enzima penicilinase que cinde a ligação amida do anel β -lactâmico das penicilinas.

- impossibilidade de acesso do agente antimicrobiano ao seu local específico de actuação.
- modificação ou hiperprodução do local alvo de actuação do antibiótico. A maioria dos antibióticos exerce a sua acção através da união específica a proteínas intervenientes em processos essenciais à sobrevivência bacteriana. Nos mutantes resistentes, a modificação destas proteínas pode afectar a sua afinidade para o antibiótico sem interferir, contudo, com a sua funcionalidade.
- um outro mecanismo de resistência envolve a redução da acumulação do composto por expulsão do antibiótico. Mecanismos de efluxo permitem à célula bacteriana resistir à tetraciclina e, em *Pseudomonas aeruginosa*, estes permitem aumentar a sobrevivência desta espécie face a vários agentes antimicrobianos (β -lactâmicos, cloranfenicol e fluoroquinolonas).

1.2.1 Resistência natural ou intrínseca

A resistência intrínseca diz respeito à situação em que um organismo, ou célula, possui uma característica, que permite a todas as estirpes de uma mesma espécie, tolerar um determinado antibiótico (Acar & Courvalin, 1998; Trieu-Cuot & Po-yart, 1998). Este fenómeno pode dever-se a determinadas características bioquímicas, como sejam a estrutura da parede celular, a existência de canais de transporte, presença de enzimas que hidrolisam o antibiótico, estrutura do sítio alvo do agente antimicrobiano (Hayes & Wolf, 1990). Pode citar-se, a título de exemplo, a resistência natural das enterobactérias aos macrólidos (Sousa & Prista, 1991) e das bactérias Gram-negativas à vancomicina (Sousa & Prista, 1988).

1.2.2 Resistência adquirida

O termo "resistência adquirida" é utilizado para descrever a situação em que a estirpe resistente emerge de uma população que anteriormente era susceptível (Hayes & Wolf, 1990).

A resistência bacteriana adquirida aos agentes antimicrobianos deve-se quer a mutações no cromossoma bacteriano, que tornam a bactéria insensível ao fármaco

(ou seja, alteração da informação genética endógena), quer à aquisição de informação genética exógena, através de um plasmídeo ou de um transposição (Arthur *et al.*, 1985; Espinasse, 1993).

As mutações cromossômicas só podem ser transmitidas à descendência durante a replicação, sendo, portanto, limitada a rápida propagação da capacidade de resistência cromossômica. Em contrapartida, a resistência mediada principalmente por plasmídeos, pode ser propagada horizontalmente por transferência intraspecífica, interespecífica e mesmo intergenérica (Smith & Lewin, 1993).

1.2.2.1 Mutações

A mutação dá-se aquando da replicação do cromossoma bacteriano e resulta da perda de um ou mais nucleótidos, de uma substituição, ou da inserção de um novo segmento de DNA (Robert-Dernuet, 1995).

As mutações são fenómenos espontâneos e a sua frequência não é influenciada pelo antibiótico, a não ser que ele seja um agente mutagénico. A sua presença permite seleccionar os mutantes resistentes no seio de uma população bacteriana sensível (Trieu-Cuot & Poyart, 1998).

A utilização generalizada de antibióticos origina um ambiente selectivo favorável à emergência e manutenção de estirpes resistentes.

Mutações em genes cromossômicos representam claramente o mecanismo de resistência a agentes antimicrobianos em espécies como *Mycobacterium* spp., das quais não se conhecem transferências de DNA em condições naturais (Courvalin, 1996).

1.2.2.2 Aquisição de plasmídeos e transposões

A maioria dos casos de resistência bacteriana, verificados na clínica, em *Staphylococcus* e *E. coli*, proveem da aquisição de informação genética exógena (Trieu-Cuot & Poyart, 1998). Na maior parte dos casos, os genes que conferem resistência aos antibióticos estão localizados em estruturas genéticas móveis, os plasmídeos e transposões (Jacoby & Archer, 1991). Estes constituem veículos de disseminação dos genes de resistência de uma bactéria para outra (Heffron *et al.*, 1977; Levy, 1998a).

Plasmídeos são pequenas moléculas de DNA, em cadeia dupla, de forma geralmente circular, extracromossômicas, que podem existir independentemente do cromossoma hospedeiro e que estão presentes em muitas bactérias (Arthur *et al.*,

1985). Possuem replicação autônoma e são transmissíveis de uma forma estável ao longo das gerações (Prescott *et al.*, 1993).

Os plasmídeos, que ocorrem naturalmente nos procariotas, apresentam relativamente poucos genes e a sua informação não é, em geral, essencial à vida da bactéria hospedeira (Pereira, 1998). Possuem um papel muito importante na evolução bacteriana, pois permitem uma rápida adaptação da bactéria a diferentes condições ambientais. Permitem ainda a ampliação de genes.

Os transposões são sequências de DNA em cadeia dupla, capazes de promover a sua própria transposição de um local genético para outro (Pato, 1989). Permitem a translocação de genes de resistência de um plasmídeo para outro, de um plasmídeo para o cromossoma bacteriano ou, ainda, do cromossoma para um plasmídeo (Davies, 1993; Robert-Dernuet, 1995; Trieu-Cuot & Poyart, 1998).

Alguns transposões possuem estruturas genéticas designadas integrões. Estes são elementos de DNA móveis com uma estrutura específica, que consiste em dois segmentos conservados que ladeiam uma região central, na qual "cassetes", que codificam funções como a resistência aos antibióticos, podem ser inseridas (Davies, 1994).

1.3 Reservatórios de resistência

1.3.1 Ambiente hospitalar

O ambiente hospitalar representa, provavelmente, o maior reservatório de bactérias resistentes com importância clínica, uma vez que, numa pequena área "contaminada" com agentes antimicrobianos, se concentra um elevado número de organismos patogênicos (Kayser, 1993). Consequentemente, está sempre presente uma forte pressão de seleção e de manutenção de resistência.

A propagação da resistência do ambiente hospitalar para a população em geral pode ocorrer numa variedade de circunstâncias, sendo de destacar a importância dos doentes que saem do hospital e albergam microrganismos resistentes. Neste contexto, a eliminação dos resíduos hospitalares, sólidos e líquidos, constitui também uma preocupação fulcral.

1.3.2 Bactérias comensais

As bactérias comensais podem também constituir um reservatório de genes de resistência a agentes antibacterianos. A grande quantidade de agentes antibacte-

rianos distribuídos pela população exerce um forte impacto na flora "normal" do intestino, da pele e do tracto respiratório. Assim, não é surpreendente que indivíduos saudáveis possam albergar bactérias resistentes aos antibióticos.

A grande utilização de cefalosporinas, por exemplo, conduziu à proliferação da bactéria intestinal *Enterococcus faecalis* que é naturalmente resistente a estes antibióticos. Na maior parte das pessoas, o sistema imunitário é capaz de detectar o crescimento de *E. faecalis* (mesmo que apresentem resistência múltipla), e evitar o aparecimento de doença. No entanto, em doentes imunocomprometidos, este poderá propagar-se às válvulas cardíacas e outros órgãos, e causar infecção sistémica mortal (Levy, 1998a).

Muitos dos doentes que fazem quimioterapia ou recebem agentes imunossuppressores são também tratados com agentes antimicrobianos, o que poderá causar efeitos profundos na flora bacteriana do tracto intestinal (Nord, 1993). Estas perturbações da ecologia microbiana do intestino poderão predispor para a colonização e infecção por outros microrganismos oportunistas (podendo estes apresentar virulência acrescida) (Espinasse, 1993; Morris & Potter, 1997). As bactérias comensais com resistência aos antibióticos não são perigosas em pessoas saudáveis, mas a maioria das bactérias resistentes albergam plasmídeos que poderão ser transferidos para bactérias patogénicas (Corpet, 1993).

1.3.3 Área geográfica

É necessário considerar também o papel que algumas áreas geográficas possam desempenhar na promoção da propagação da resistência e na constituição de reservatórios de organismos resistentes.

A incidência da resistência bacteriana é geralmente superior nos países em vias de desenvolvimento do que em países industrializados (Livermore, 1995). Nos países industrializados, muitos antibióticos estão apenas disponíveis segundo prescrição, mas esta restrição por si só não garante uma utilização adequada. Frequentemente, os doentes não respeitam o período total de tratamento, automedicam-se, e medicam os seus familiares ou amigos, com quantidades subterapêuticas. Em ambas as circunstâncias, a dosagem inapropriada não eliminará o agente infeccioso e conduzirá ao crescimento de estirpes mais resistentes, que poderão, mais tarde, dificultar o tratamento a instituir. Nos países em vias de desenvolvimento, a utilização dos antibióticos é ainda menos controlada. Quando a resistência se torna um problema clínico, estes países, que nem sempre têm acesso a fármacos dispendiosos, poderão não ter substitutos disponíveis (Levy, 1998a).

O crescente número de viagens para os países sub-desenvolvidos, geralmente

importantes destinos turísticos, conduzirá a que o problema das resistências não fique confinado a estas áreas, mas que, pelo contrário, seja inevitavelmente propagado. Estirpes de *Salmonella typhi*, por exemplo, com resistência múltipla aos antibióticos são raramente isoladas no Reino Unido (Rowe *et al.*, 1990). No entanto, ocorrem, com grande frequência, epidemias de febre tifóide causadas por estirpes resistentes ao cloranfenicol, ampicilina e trimetoprim-sufametoxazol, na Índia (Anand *et al.*, 1990; Gupta *et al.*, 1990; Jesudasan & John, 1990), sudeste da Ásia e China (Hill, 1993; White & Parry, 1996). Verificou-se que algumas estirpes com múltiplas resistências aos antibióticos foram isoladas, no Reino Unido, de pacientes que tinham estado na Índia ou em contacto com viajantes que regressavam desse local (Rowe *et al.*, 1990). Assim, os países em vias de desenvolvimento podem constituir um reservatório, potencialmente importante, de organismos resistentes aos agentes antimicrobianos.

1.3.4 Animais

Embora a utilização terapêutica dos antibióticos nos animais seja necessária, esta prática pode conduzir à selecção de estirpes resistentes com consequência para a saúde humana, especialmente se não seguir a mesma aplicação racional empregue na terapia humana (Levy, 1998b). Do mesmo modo, a aplicação subterapêutica dos antibióticos, na alimentação animal, como promotores de crescimento conduz à proliferação de genes de resistência a agentes antimicrobianos, muitos com implicações a nível de saúde humana e animal (Feinman, 1998; Moellering, 1998).

O uso de antibióticos como promotores de crescimento, bem como a sua utilização terapêutica, encorajam fortemente a selecção de estirpes resistentes, especialmente quando estes são fornecidos nos alimentos ou na água (Kayser, 1993). Isto porque, neste caso, as estirpes permanecem activas e sofrem larga dispersão. Uma outra preocupação prende-se com a utilização de antibióticos em aquaculturas, uma vez que os fármacos permanecem no ambiente podendo sair dos tanques e atingir os sistemas aquáticos, tornando-se contaminantes ambientais disseminados (Cassell, 1995).

Existe uma grande utilização de agentes antimicrobianos na agricultura, aquacultura e em vários usos veterinários. Embora não completamente provado, existem indícios de que a utilização veterinária da avoparcina, em certa áreas da Europa, contribuiu para a pressão que conduziu ao aparecimento de enterococos resistentes à vancomicina (Corpet, 1998). Do mesmo modo, a utilização de agentes antimicrobianos na aquacultura parece estar associada à emergência de resistências em vários organismos Gram-negativos.

1.4 A água como reservatório e fonte de genes de resistência aos agentes antimicrobianos

O nível elevado de contaminação fecal detectado em águas naturais e a relativa facilidade de aquisição de resistência a agentes antimicrobianos por bactérias, colocam sérios riscos para a saúde pública (Shaw & Cabelli, 1980) e justificam a necessidade de um melhor conhecimento dos perfis de susceptibilidade e dos mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos em bactérias existentes no meio aquático (Alcaide & Garay, 1984).

1.4.1 Reservatórios aquáticos de bactérias resistentes

O aparecimento de estirpes bacterianas com múltipla resistência aos agentes antimicrobianos constitui um problema de grande actualidade e importância em saúde pública, não só pelo facto de criarem dificuldades ao tratamento efectivo das infecções, mas também pelo facto de microrganismos que não são considerados agentes habituais de doença, poderem constituir reservatórios de genes de resistência.

A possibilidade de bactérias existentes em ambiente aquático constituírem fonte e reservatório de genes de resistência tem merecido particular atenção. Existem vários estudos que demonstram o aumento de prevalência de organismos resistentes aos antibióticos em águas recreativas na Europa, América do Norte, e Ásia (Burton *et al.*, 1982; Niemi *et al.*, 1983; Alcaide & Garay, 1984; Baya *et al.*, 1986; French *et al.*, 1987; Amaro *et al.*, 1988).

Pensa-se que a ingestão ou contacto com organismos resistentes, durante as actividades recreativas, em águas costeiras, lagos ou rios, pode favorecer a aquisição de genes de resistência pelas bactérias comensais do homem. Vários estudos se têm centrado na incidência de coliformes e, em particular, de *E. coli* resistentes aos antibióticos, bactérias que representam populações introduzidas no ambiente aquático natural (Niemi *et al.*, 1983; Alcaide & Garay, 1984; French *et al.*, 1987). A capacidade de algumas estirpes, resistentes a agentes antimicrobianos, presentes em ambientes aquáticos, transmitirem essa resistência a outras bactérias, tem sido o tema de vários estudos sobre transferência de resistência antimicrobiana, principalmente através de plasmídeos R (Mach & Grimes, 1982; Bell *et al.*, 1983; Niemi *et al.*, 1983).

A ocorrência de bactérias indicadoras e bactérias patogénicas com múltiplas resistências aos antibióticos em estações de tratamento de água e água residuais

tem sido documentada (Armstrong *et al.*, 1981, 1982; Alcaide & Garay, 1984; Walter & Vennes, 1985).

Foi demonstrado que aumentos significativos de bactérias com múltiplas resistências aos antibióticos ocorrem em vários sistemas de água de consumo (Armstrong *et al.*, 1981). Em alguns estudos foi verificado um aumento da proporção de bactérias com resistência a múltiplos antibióticos, após a cloração da água (Armstrong *et al.*, 1981; Bell *et al.*, 1981; Calomiris *et al.*, 1984).

Armstrong *et al.* (1981) verificaram, num estudo, que a percentagem de bactérias heterotróficas resistentes aos antibióticos existentes na água não tratada era 18,6 %, enquanto que no sistema de distribuição era de 67,8 %. De forma similar, numa estação de tratamento de água, essa percentagem variou entre 15,8% em água de rio (água não tratada) e 57,1% em água tratada (Armstrong *et al.*, 1982).

Alcaide & Garay (1984) testaram a resistência, face a seis antibióticos, de 865 estirpes de *Salmonella* spp. provenientes de águas residuais e águas naturais contaminadas com esgotos. Verificaram que 12,7 % das estirpes eram resistentes a pelo menos um dos compostos testados e que 30 % transferiram a resistência a uma estirpe *E. coli* receptora.

Num outro estudo, verificou-se que coliformes, apresentando múltipla resistência aos agentes antimicrobianos, eram comuns nos esgotos e que os seus números permaneciam constantes relativamente à população de coliformes totais ao longo do ano (Walter & Vennes, 1985). Estes autores verificaram que a resistência à canamicina, tetraciclina e ampicilina foi transferida com várias frequências e que 75 % dos coliformes era capaz de transferir a resistência. Neste estudo, a população de coliformes com múltipla resistência variou entre 0,35 % e 5 % do total da população de coliformes. Num estudo anterior Bell *et al.* (1981) obtiveram percentagens um pouco superiores, da ordem dos 9 %.

Calomiris *et al.* (1984) verificaram a existência de correlações positivas entre a tolerância a níveis elevados de zinco, cobre e chumbo, e a resistência múltipla a antibióticos em bactérias isoladas da água do sistema de distribuição, mas não entre bactérias de águas naturais. Verificaram ainda um aumento da percentagem de bactérias com múltipla resistência a agentes antimicrobianos de 20,4 % dos isolados da água natural para 36,7 % dos isolados na água do sistema de distribuição. Estes autores sugerem que um fenómeno de selecção simultânea de bactérias resistentes aos metais e aos antibióticos possa ocorrer no sistema de distribuição de água de consumo. Consideram, ainda, que no aumento de incidência de estirpes tolerantes aos metais e com resistências múltiplas aos antibióticos estarão, provavelmente, envolvidos mecanismos de selecção que envolvem alterações cromossómicas e possivelmente elementos genéticos plasmídicos (Calomiris *et al.*,

1984).

Num estudo de Murray *et al.* (1984) foram isoladas bactérias de esgotos não tratados e de esgotos clorados e verificou-se que 84 % dos isolados apresentavam resistência a um ou mais antibióticos testados. Os autores verificaram também que o processo de cloração resultou no aumento da proporção de bactérias resistentes à ampicilina e cefalotina.

Note-se que os valores da incidência de resistências, apresentadas pelos vários estudos referidos, são muito dispare, por se tratarem de estudos pontuais e de áreas muito restritas, denotando a falta de um sistema de monitorização abrangente, no tempo e no espaço, que avalie concretamente a prevalência de estirpes resistentes aos antibióticos em águas de consumo humano.

Genericamente, as bactérias com elevados níveis de resistência aos antibióticos são isoladas a partir de ambientes em que agentes antibacterianos são continuamente empregues, como hospitais, aquaculturas e águas residuais (Mach & Grimes, 1982; McPherson & Gealt, 1986). Contudo, bactérias resistentes foram já isoladas de ambientes aparentemente não selectivos (Mach & Grimes, 1982), tendo sido também demonstrado que a transferência plasmídica ocorre numa variedade de habitats naturais como águas residuais (Mach & Grimes, 1982; Gealt *et al.*, 1985), lagos (O'Morchoe *et al.*, 1988), plantas (Talbot *et al.*, 1980), entre outros.

1.4.2 Transferência de genes de resistência em ambiente aquático

Embora os organismos introduzidos em ambiente aquático representem um potencial perigo para a saúde, é também importante considerar o papel dos organismos indígenas desse ambiente. A possibilidade de estes organismos constituírem reservatórios de genes de resistência com importância clínica implica que sejam capazes de adquirir genes de resistência a partir de organismos comensais ou patogénicos introduzidos no ambiente (Young, 1993).

Vários mecanismos naturais permitem a transferência de genes entre bactérias (Davies, 1993). Estas permutas genéticas podem ocorrer horizontalmente (inter-espécie, intra-espécie e mesmo inter-género) ou de forma vertical (passagem de resistência para a descendência) (Smith & Lewin, 1993; Trieu-Cuot & Poyart, 1998; Miller, 1998).

As bactérias podem possuir três mecanismos naturais de transferência genética: conjugação, transformação e transdução (Arthur *et al.*, 1985; Sousa & Prista,

1988; Kayser, 1993; Prescott *et al.*, 1993). Foi já demonstrada a transferência genética horizontal entre bactérias, nos sistemas aquáticos naturais, por conjugação (O'Morchoe *et al.*, 1988), transdução (Saye *et al.*, 1987; Miller, 1998) e por transformação (Stewart & Sinigalliano, 1990; Paul *et al.*, 1991).

1.4.2.1 Transdução

A transdução é o processo de transferência de DNA bacteriano, de uma célula para outra, através de uma partícula fágica (bacteriófago) (Arthur *et al.*, 1985; Davies, 1993).

No processo da transdução, os bacteriófagos (vírus que infectam bactérias) adquirem material genético de uma célula bacteriana, depositando-o noutra (Jiang & Paul, 1998). Durante o seu ciclo de vida, os bacteriófagos ligam-se à bactéria e injectam-lhe o seu DNA. Este DNA serve como molde para fazer mais cópias do bacteriófago, que irrompem da bactéria infectada e vão infectar outras células. Por vezes, contudo, algumas das novas partículas levam DNA bacteriano em vez de DNA viral e, de facto, os bacteriófagos são capazes de transferir plasmídeos completos e partes de cromossomas entre hospedeiros (Miller, 1998). Este processo pode apenas ocorrer entre bactérias que partilhem receptores apropriados para os fagos transdutores (Davies, 1993). A transdução encontra-se, por isso, geralmente limitada a espécies relacionadas e é relativamente ineficaz na transferência intergéneros.

Embora se pudesse pensar que vírus e bactérias estão presentes em baixas concentrações no ambiente e que, por isso, a transdução não seria um meio importante de troca genética no ambiente, verificou-se recentemente que existem bacteriófagos em elevadas concentrações em água doce e marinha (Miller, 1998). Além disso, isolaram-se bactérias e bacteriófagos de vários lagos, demonstrando-se que as bactérias partilham informação genética por transdução. O estudo de Jiang & Paul (1998) vem também corroborar a importância da transdução na transferência e diversidade genética verificada entre as populações microbianas de ambiente marinho. Os resultados de um estudo efectuado com *Pseudomonas aeruginosa* (Saye *et al.*, 1987) demonstram também a propensão para a ocorrência natural de transdução no meio aquático.

1.4.2.2 Transformação

A transformação genética é o processo pelo qual uma bactéria pode adquirir DNA livre exógeno e incorporá-lo no seu próprio cromossoma por recombinação homó-

loga (Prescott *et al.*, 1993; Baur *et al.*, 1996). Existe, portanto, uma modificação genética hereditária que resulta da penetração de uma molécula "nua" de DNA numa bactéria (Arthur *et al.*, 1985). O processo ocorre naturalmente em algumas espécies, mas necessita ser induzido artificialmente na maioria das espécies bacterianas. Um processo completo de transformação compreende quatro etapas sucessivas, comuns a todas as bactérias, necessárias para a detecção bem sucedida dos transformantes, nomeadamente desenvolvimento do estado de competência (capacidade de adquirir DNA), fixação do DNA, integração do DNA e seu processamento e expressão fenotípica do novo genótipo (Bergmans *et al.*, 1981; Baur *et al.*, 1996).

Até há pouco tempo, assumia-se que a transformação não ocorreria em determinados locais, uma vez que o DNA não seria estável no solo ou na água. Mas foi já demonstrado que o DNA livre pode tornar-se estável por associação com componentes do solo e que este DNA pode ser adquirido por células competentes (Miller, 1998). Alguns estudos mostram que os ambientes aquáticos, marinho e de água doce, contêm concentrações biologicamente importantes de DNA dissolvido (DeFlaun *et al.*, 1986).

A aquisição, através do processo de transformação, de resistência à rifampicina por bactérias marinhas, em laboratório, foi verificada por Stewart & Sinigalliano (1990). Os resultados deste estudo indicam ainda que os sedimentos marinhos facilitam a aquisição e expressão de DNA exógeno e que os sedimentos constituem um nicho mais adequado para o processo de transformação do que a coluna de água em ambiente marinho (Stewart & Sinigalliano, 1990). No entanto, os dados obtidos por Paul *et al.* (1991) sugerem que é mais provável que o processo de transformação natural ocorra na coluna de água do que nos sedimentos marinhos. Estes autores verificaram, pela primeira vez, a ocorrência de transformação natural plasmídica em água marinha (Paul *et al.*, 1991).

1.4.2.3 Conjugação

Um terceiro mecanismo de transferência genética é a conjugação, um equivalente da "sexualidade" nas bactérias (Davies, 1993).

A conjugação envolve estruturas especializadas designadas "pili sexuais" e necessita de um contacto célula-célula ou um contacto pili-célula. Este é geralmente o processo segundo o qual se dá a transmissão de factores R entre as bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Meckes, 1982) e é o mecanismo de transferência genética mais estudado no ambiente aquático (Young, 1993).

Vários autores têm demonstrado, em experiências laboratoriais, a capacidade

de transferência de plasmídeos através da conjugação (Bell *et al.*, 1981; Corliss *et al.*, 1981; Altherr & Kasweck, 1982; Mach & Grimes, 1982; Alcaide & Garay, 1984; Gealt *et al.*, 1985; McPherson & Gealt, 1986; Sandt & Herson, 1991). Altherr & Kasweck (1982) demonstraram, *in situ*, a transferência de resistência a antibióticos entre estirpes de *E. coli* ambientais e estirpes laboratoriais. Outros autores identificaram também recipientes para a transferência de plasmídeos R em águas residuais (Mach & Grimes, 1982; Gealt *et al.*, 1985; McPherson & Gealt, 1986).

A transferência de plasmídeos, por conjugação, de estirpes de *E. coli* para bactérias aquáticas indígenas (Sandt & Herson, 1991), bem como entre bactérias indígenas e introduzidas (Shaw & Cabelli, 1980), foi demonstrada em modelos laboratoriais de habitats de água doce. A transferência plasmídica por conjugação pode ocorrer numa grande variedade de condições de salinidade, pH, temperatura e nutrientes, podendo mesmo efectuar-se em condições adversas como a ausência de nutrientes ou temperaturas baixas (Fernandez-Astorga *et al.*, 1992).

O trabalho de Kruse & Sørnum (1994) foi planeado para estudar a transferência de plasmídeos R entre bactérias patogénicas de diversas origens, em condições naturais simuladas, e para comparar as frequências de transferência com as obtidas em condições laboratoriais estandardizadas. Segundo estes autores, o fenómeno da conjugação, na ausência dos meios tradicionais, é um fenómeno que pertence ao ambiente, que não é restrito às condições laboratoriais e que pode ocorrer entre estirpes bacterianas evolutiva ou ecologicamente não relacionadas (Kruse & Sørnum, 1994). Os resultados obtidos por estes autores estão de acordo com a noção de que as bactérias são capazes de transferir resistência aos antibióticos, mesmo em condições não óptimas (Fernandez-Astorga *et al.*, 1992). Embora a presença de agentes antimicrobianos contribua para o aumento da transferência de plasmídeos R, o estudo de Kruse & Sørnum (1994) demonstra bem a facilidade com que este fenómeno ocorre, mesmo na ausência de tais fármacos. Tem sido também demonstrado que durante a falta de nutrientes, em ambiente aquático, muitas bactérias são capazes de manter e expressar genes plasmídicos (Jain *et al.*, 1987; Caldwell *et al.*, 1989).

1.4.2.4 Índice MAR

Na maioria das águas contaminadas verifica-se a presença de organismos indicadores de poluição fecal, sendo, contudo, desconhecida a sua origem (humana ou animal). A contaminação de águas naturais com material fecal não tratado pode resultar num risco elevado de transmissão de doenças ao homem que utiliza

essas águas. Será, pois, desejável possuir a capacidade para determinar a fonte do material fecal, de modo a avaliar o risco a que as pessoas estão expostas (Wiggins, 1996). Várias tentativas têm sido feitas para desenvolver métodos que determinem as fontes de poluição fecal. Um desenvolvimento recente na avaliação da qualidade da água foi a aplicação do índice MAR ("Multiple Antibiotic Resistant") em *E. coli*, por forma a identificar as fontes de contaminação fecal na água. Krumpferman (1983) verificou que o índice de resistência múltipla aos antibióticos (*MAR index*) em *E. coli* provenientes de animais selvagens era geralmente baixo, enquanto que os isolados de origem humana e de aves apresentavam índices MAR superiores. Do mesmo modo, Kaspar *et al.* (1990) demonstraram que existiam menos estirpes MAR de *E. coli* isoladas de fontes rurais do que de fontes urbanas. Kaspar *et al.* (1990) testaram 202 estirpes de *E. coli*, isoladas a partir de vários locais em áreas urbanas e rurais. O índice MAR para essas áreas foi determinado como o número de antibióticos aos quais todos os isolados eram resistentes dividido pelo número de antibióticos testado vezes o número de isolados. Este índice foi 3,2 vezes superior para as áreas urbanas quando comparado com o das áreas rurais. Os resultados deste estudo sugerem que o índice MAR de *E. coli* pode ser útil na distinção das fontes de contaminação da água e na aplicação desta técnica à análise da qualidade da água de consumo. Mais recentemente, Wiggins (1996) utilizou um método de análise discriminante para determinar a origem da poluição fecal em águas naturais. Classificou os estreptococos fecais de origem humana e animal conhecida, com base nos seus padrões de resistência aos antibióticos e utilizou estes padrões para os comparar com os isolados de origem fecal desconhecida de águas poluídas.

1.5 Caracterização genômica e classificação de estirpes

A identificação e classificação das bactérias apresenta crucial importância na microbiologia clínica, industrial, agrícola e ambiental, bem como na ecologia microbiana.

Vários métodos de tipagem têm sido utilizados para identificar estirpes bacterianas. Os métodos fenotípicos têm incluído serotipagem, tipagem fágica, testes de susceptibilidade aos antibióticos, biotipagem, produção de bacteriocinas, "immunoblotting", perfil de proteínas da membrana exterior, e análise de isoenzimas.

Devido à relativa instabilidade das análises fenotípicas (Domenico *et al.*, 1992),

foram desenvolvidos métodos de tipagem baseados no genótipo microbiano ou nas sequências de DNA, que minimizam problemas de tipabilidade e de reprodutibilidade e, em alguns casos, permitem a construção de grandes bases de dados dos organismos caracterizados (Olive & Bean, 1999).

Diferentes métodos fenotípicos e genotípicos têm sido empregues na identificação e classificação microbiana (Olive & Bean, 1999). Cada um destes métodos permite um determinado nível de classificação filogenética, que pode ir desde o nível do género, espécie, subespécie, até ao nível da estirpe. Além disso, cada método apresenta vantagens e desvantagens, no que respeita à aplicabilidade, reprodutibilidade, equipamento necessário e nível de resolução. De um modo geral, os métodos relacionados com o DNA têm surgido como os mais fidedignos, simples e baratos, para identificar e classificar microrganismos. De facto, a designação género/espécie tem sido baseada em métodos de hibridação DNA-DNA e a filogenia moderna baseia-se cada vez mais na análise de sequência de rRNA 16S (Brenner *et al.*, 1998). Um método que se tem verificado ser extremamente fidedigno, reprodutível, rápido e altamente discriminatório é o chamado "fingerprinting" genómico rep-PCR, que se baseia na amplificação do DNA (Rivera *et al.*, 1995; Rodriguez-Barradas *et al.*, 1995; Sechi *et al.*, 1998; Olive & Bean, 1999).

1.5.1 rep-PCR

O "fingerprinting" rep-PCR utiliza primers complementares a sequências de DNA repetitivo, altamente conservado, e que está presente em múltiplas cópias no genoma da maioria das bactérias Gram-negativas e em algumas Gram-positivas (Lupski & Weinstock, 1992).

Foram identificadas três famílias de sequências repetitivas que incluem a sequência REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) de 38 bp, a sequência ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) de 126 bp, e a sequência BOX de 154 bp. Estas sequências parecem estar localizadas em posições intergénicas distintas ao longo do genoma. Foram originalmente descritas para a família *Enterobacteriaceae*, mas foram posteriormente encontradas em várias bactérias Gram-negativas (Rasmussen & Svenning, 1998). A utilização de primers para as referidas sequências, em conjugação com a tecnologia de PCR, conduz à amplificação de regiões genómicas distintas localizadas entre os elementos REP, ERIC ou BOX. Os respectivos protocolos são designados "fingerprinting" genómico REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, respectivamente, e "fingerprinting" genómico rep-PCR colectivamente.

Os fragmentos ampliados podem ser separados num gel, originando um perfil referido como "fingerprinting" genómico rep-PCR. As diferenças observadas no tamanho das bandas representará, aparentemente, polimorfismo nas distâncias entre as sequências repetitivas dos diferentes genomas. Verificou-se que os produtos do REP e ERIC PCR, obtidos com o DNA cromossómicos de diferentes estirpes bacterianas, geravam perfis muito característicos quando separados em geles de agarose. Por isso, foi proposto que o REP e o ERIC PCR pudessem constituir um método útil para o "fingerprinting" de genomas bacterianos (Bruijn, 1992). Os resultados deste autor, mostram que quer as sequências REP quer as ERIC estão presentes nos genomas de bactérias Gram negativas do solo e que, assim, suportam e até alargam os dados sobre a aparente natureza ubiquitária destes elementos nas bactérias. Também suportam as conclusões de que REP e ERIC PCR podem constituir ferramenta bastante poderosa na análise molecular genética das bactérias e na taxonomia bacteriana, uma vez que permite o "fingerprinting" de géneros, espécies e estirpes e pode ajudar a determinar relações filogenéticas.

Esta técnica tem sido utilizada com sucesso no estudo da diferenciação de estirpes de *Bartonella* (Rodríguez-Barradas *et al.*, 1995), *Rhizobium meliloti* (Bruijn, 1992), *Mycobacterium tuberculosis* (Sechi *et al.*, 1998), *Vibrio cholerae* (Rivera *et al.*, 1995), *Shigella sonnei* (Liu *et al.*, 1995a), *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* (Liu *et al.*, 1995b), entre outras (Olive & Bean, 1999).

O rep-PCR aparece como uma técnica muito útil na identificação de organismos até ao nível da espécie. Comparado com outros métodos convencionais de biologia molecular, o rep-PCR oferece a vantagem de ser fácil de utilizar e da obtenção de resultados em horas, o que faz dele uma técnica que poderá ser facilmente adoptada para uso em laboratórios de microbiologia clínica (Rodríguez-Barradas *et al.*, 1995).

1.5.1.1 ERIC-PCR

As sequências ERIC são elementos com 126 bp que contêm uma repetição invertida central altamente conservada, e estão localizados em regiões extragenómicas do genoma bacteriano (Olive & Bean, 1999). Parecem estar restritos a regiões transcritas do cromossoma, quer em regiões intergénicas de operões policistrónicos, quer em regiões não traduzidas acima e abaixo das "open reading frames" (Sechi *et al.*, 1998). A sua posição no genoma parece ser diferente em diferentes espécies. Os perfis obtidos com ERIC são geralmente menos complexos do que os obtidos com REP, mas ambos fornecem boa discriminação até ao nível da estirpe (Olive & Bean, 1999).

Rivera *et al.* (1995) verificaram que os primers ERIC são altamente específicos e que o procedimento utilizado rapidamente distingue estirpes de *Vibrio cholerae* toxigénicas de estirpes não-toxigénicas. Estes autores argumentam que o método de ERIC-PCR utilizado neste estudo, para *V. cholerae*, se pode aplicar a outras espécies microbianas e a estirpes que se encontrem no estado viável, não-cultivável (VNC) e que a utilização destas técnicas em amostras ambientais poderá contribuir para o conhecimento da ecologia molecular do agente da cólera e de patogénios entéricos relacionados (Rivera *et al.*, 1995).

Capítulo 2

Objectivos

Os objectivos do presente trabalho compreenderam:

- Caracterização do comportamento aos antibióticos β -lactâmicos, de estirpes coliformes provenientes de águas de consumo humano. Foi dada especial atenção a bactérias coliformes, uma vez que estas são consideradas bioindicadores (neste caso, indicadores de poluição fecal).
- Comparação entre os perfis de resistência aos antibióticos β -lactâmicos das bactérias coliformes isoladas do ambiente aquático, obtidos neste trabalho, com os perfis obtidos por outros autores em bactérias de ambiente hospitalar (onde, presumivelmente, existirá maior pressão selectiva).
- Verificar a possibilidade de transferência da resistência, aos antibióticos β -lactâmicos, de estirpes da água para estirpes de laboratório e, assim, inferir quanto à importância deste mecanismo de transferência de resistência em ambiente natural.
- Caracterização do mecanismo de resistência ao imipenemo, numa estirpe de *S. marcescens*, isolada no decurso do presente trabalho.
- Foram isoladas, no decurso do trabalho, algumas estirpes de *R. aquatilis* que suscitaram particular atenção. Sendo uma "espécie relativamente recente", não surpreende que, quer a sua identificação, quer a sua classificação, se apresentem um pouco confusas. O mesmo se verifica quanto à sua caracterização em termos de comportamento aos antibióticos e perfil β -lactamásico.

Assim, um dos objectivos deste trabalho prendeu-se com a tentativa de esclarecimento da identificação e diferenciação das estirpes isoladas, por comparação com a estirpe de referência, tendo-se também utilizado tecnologia de PCR para efectuar a sua caracterização genómica.

Capítulo 3

Material & Métodos

3.1 Origem das amostras

No presente trabalho foram utilizadas 728 amostras de águas não-tratadas provenientes de diversos locais da região norte de Portugal (Figura 3.1). Nas 728 amostras de água, colhidas em vários pontos, pretendeu-se isolar o maior número possível de bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes (indicadores de poluição fecal), tendo-se também estudado outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*, pela sua importância clínica.

3.2 Isolamento e identificação das estirpes

O método de isolamento utilizado para bactérias coliformes, foi o de filtração por membrana (APHA, AWWA & WEF, 1992), de acordo com o Decreto-Lei nº 236/98, que estabelece as normas, critérios e objectivos de qualidade para as águas, em função dos seus principais usos. Cerca de 100 ml de cada amostra de água, depois de homogeneizados mediante movimentos verticais vigorosos, foram filtrados através de uma membrana de nitrocelulose (Millipore) de $0,45\mu\text{m}$ de poro, estéril, com auxílio de sistemas de filtração Millipore. As membranas com o filtrado foram colocadas em placas de Petri contendo o meio de cultura MacConkey agar e colocadas na estufa a incubar, durante 24h, utilizando temperaturas que variaram entre os 30 °C, os 37 °C e os 44,5 °C. A identificação das colónias obtidas foi efectuada por provas bioquímicas clássicas e utilizando o sistema de identificação API 32GN (API/bioMérieux). As estirpes foram guardadas

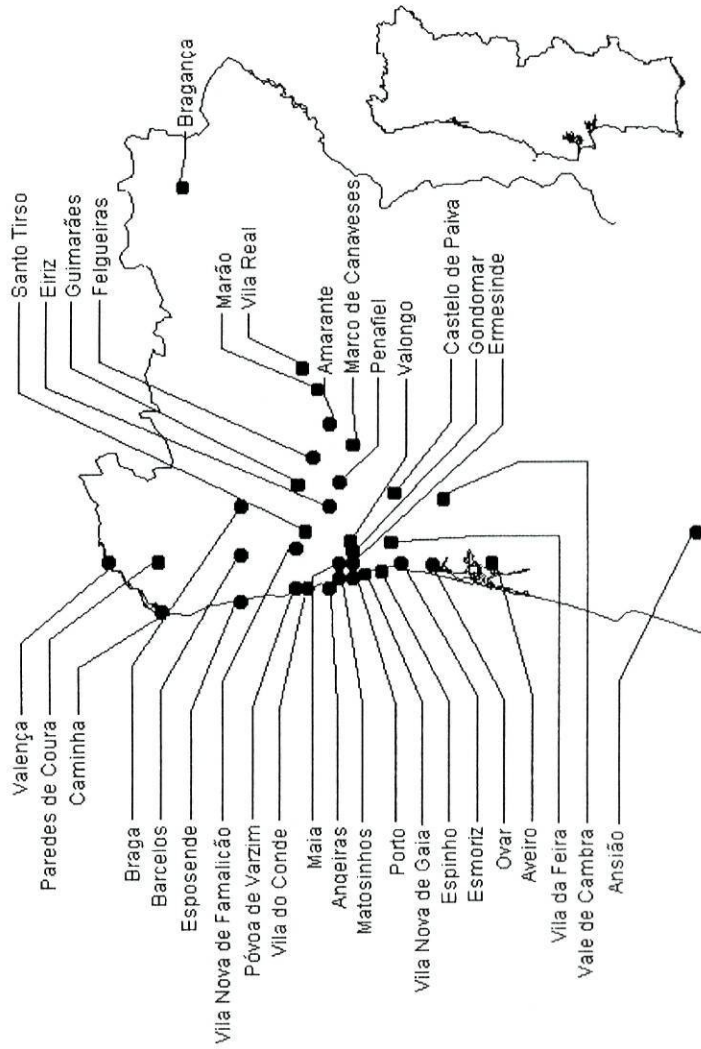


Figura 3.1: Localização dos diferentes pontos de amostragem

em gelose inclinada a 4 °C e alíquotas foram conservadas em TSB (Trypticase Soy Broth) + 15% de glicerol, a -70°C.

3.2.1 Provas bioquímicas

Para se proceder à identificação das estirpes bacterianas isoladas utilizaram-se algumas provas bioquímicas descritas na literatura (Buttiaux *et al.*, 1974; Farmer & Kelly, 1991; Harley & Prescott, 1993; Kelly *et al.*, 1985; Sounis, 1978; Smibert & Krieg, 1994). Os meios de cultura utilizados nas provas bioquímicas foram preparados, distribuídos por tubos de ensaio, e esterilizados. Para identificar a maior parte das colónias isoladas, utilizaram-se vários teste bioquímicos, incluindo:

- Fermentação da glicose e lactose

Utilizando o meio de cultura de Kligler, distribuído em camada alta, no qual se semeou a estirpe, em estria na rampa e em picada profunda. Se a estirpe fermenta a glucose, dá-se uma viragem na cor do meio, no fundo do tubo, para amarelo, visto que há acidificação do vermelho de fenol (indicador do meio). Se há viragem da cor do meio para amarelo (acidificação), na rampa, significa que a bactéria fermenta a lactose.

- Produção de gás por fermentação dos hidratos de carbono

A produção de gás pode ser observada quer em meio de cultura líquido (caldo lactosado), utilizando-se campânulas de Durham, quer em meio de cultura sólido (meio de Kligler). Neste último caso, o aparecimento de bolhas pode, por vezes, provocar a fragmentação do meio.

- Mobilidade

Semeou-se a estirpe em picada central e profunda no meio semi-sólido SIM. Colocou-se a incubar a 37°C, durante 24 horas. O crescimento das bactérias imóveis faz-se ao longo da linha de picada, enquanto que as bactérias móveis se difundem no meio de cultura em várias direcções.

- Produção de indol

Utilizando o meio de cultura SIM, é possível também proceder-se à realização da prova do indol. O teste do indol detecta a capacidade de algumas bactérias produzirem indol a partir do aminoácido triptofano, que se encontra em quase todas as proteínas. As bactérias que contêm a enzima triptofanase são capazes de hidrolizar o triptofano nos seus produtos

metabólicos, nomeadamente, indol, ácido pirúvico, e amónia. As bactérias utilizam o ácido pirúvico e a amónia para satisfazerem as suas necessidades nutricionais. Como o indol não é utilizado, acumula-se no meio. Após o período de incubação, adicionaram-se umas gotas de reagente de Ehrlich. A reacção positiva é verificada pelo aparecimento de um anel vermelho à superfície do meio.

- Produção de sulfureto de hidrogénio

Algumas espécies bacterianas produzem sulfureto de hidrogénio a partir de compostos com enxofre como a cisteína, o tiosulfato de sódio e a peptona. Para detectar a produção de H_2S utilizam-se sais de bismuto, ferro ou chumbo. Os sais são adicionados ao meio de cultura. Na presença de H_2S forma-se sulfureto de bismuto, ferro ou chumbo, que apresenta uma coloração negra, sendo assim detectada a produção de sulfureto de hidrogénio por um enegrecimento do meio. Este enegrecimento pode ser visualizado quer no meio de Kligler, quer no meio de SIM, pois ambos possuem sulfato de amónio ferroso.

- Utilização do citrato

Para verificar se a bactéria utiliza o citrato, utilizou-se o meio de cultura Citrato de Simmons, distribuído em camada alta, no qual se semeou a estirpe por estria. Neste meio a única fonte de carbono e energia é o citrato de sódio e a única fonte de azoto é o hidrogenofosfato de amónio. As bactérias utilizadoras do citrato crescem bem neste meio e esse crescimento é acompanhado de uma alcalinização, detectada pelo azul de bromotimol (indicador de pH do meio). Esta alcalinização pensa-se ser devida ao consumo do ácido cítrico e à excreção de substâncias alcalinas pelas células. O azul de bromotimol apresenta cor amarela a $pH < 6$, uma cor azul a $pH \geq 7,6$, e uma coloração verde para valores intermédios de pH. Se não se constatar nenhuma alteração da cor do meio, considera-se que o citrato não é utilizado; se o meio, que é verde, virar para azul, a bactéria utiliza o citrato, observando-se simultaneamente crescimento à superfície do meio de cultura.

- Produção de urease

Trata-se de uma reacção na qual, o microrganismo, por meio de uma enzima especial, a urease, ataca as ligações de azoto e carbono da ureia, obtendo-se a amónia, CO_2 , e água como produtos finais. A estirpe é semeada no meio contendo ureia e incuba a $37^\circ C$, durante 24 horas. No caso da reacção ser positiva, ou seja, quando a ureia é hidrolisada, a amónia acumula-se no

meio e torna-o alcalino, verificando-se que o aumento de pH provoca uma viragem do indicador (vermelho de fenol), surgindo uma cor violácea ou vermelho-cereja.

- Pesquisa de DNase

As estirpes a estudar são semeadas em estria única na superfície de uma placa de Petri contendo um meio com DNA. Podem ser examinadas várias estirpes por cada placa. As placas são colocadas na estufa a 37°C, durante 24 horas. Após este período de tempo, são inundadas com uma solução de ácido clorídrico 1 N. Se, em presença do HCl, surgir uma zona clara em volta da estria de inóculo, significa que houve destruição do DNA e, portanto, a estirpe é considerada DNase-positiva, ou seja, produz a enzima desoxirribonuclease que decompõe o DNA em nucleotídeos solúveis no HCl. Se, pelo contrário, não surgir nenhuma zona transparente em redor da estria, significa que a estirpe em causa é DNase-negativa, isto é, não possui a capacidade de despolimerizar o DNA (não produz a enzima desoxirribonuclease).

- Prova do Vermelho de Metilo (MR)

As bactérias entéricas, graças ao seu complexo enzimático, catabolizam a glicose para suprir as suas necessidades energéticas, provocando um grau de acidez variável. A adição do indicador de pH de vermelho de metilo permite detectar a queda do pH do meio, isto é, detecta a variação do pH para a zona ácida, como resultado de produtos finais ácidos tais como o ácido láctico, o ácido acético e o ácido fórmico.

- Prova de Voges Proskauer (VP)

Este teste permite identificar bactérias que fermentam a glucose, levando à acumulação de 2,3 - butanediol no meio. A adição de KOH 40 % e solução de α - naftol 5 % em etanol absoluto (reagente de Barrit) permite detectar a acetoína, um precursor na síntese de 2,3 - butanediol, através do aparecimento de uma coloração vermelho cereja.

- Transformação da fenilalanina em ácido fenilpirúvico (APP)

As estirpes são inoculadas num meio de cultura designado gelose APP e depois de incubadas, as culturas são inundadas com o reagente de APP (que contém alúmen de ferro, sulfato de amónia e ácido sulfúrico). O aparecimento rápido de uma coloração verde é característica da transformação da fenilalanina em ácido fenilpirúvico.

- Hidrólise da esculina

As estirpes são semeadas em meio de cultura suplementado com 0,01 % de esculina e 0,05 % de citrato férrico. A acção sobre a esculina traduz-se por um enegrecimento do meio de cultura utilizado, durante a incubação.

- Arginina dihidrolase (ADH), ornitina descarboxilase (ODC) e lisina descarboxilase (LDC)

Após a inoculação das estirpes no caldo de Moeller coloca-se parafina estéril. Uma reacção positiva é indicada pelo aparecimento de uma coloração violeta devido à subida de pH. Uma reacção positiva significa descarboxilação da lisina e da ornitina ou presença de uma dihidrolase para a arginina.

3.2.2 Sistema automático de identificação de bacilos Gram-negativos (API 32GN)

Nos casos em que não foi possível utilizar testes bioquímicos, ou quando existiram dúvidas, a identificação das estirpes foi efectuada pelo método API 32GN (bioMérieux). Uma galeria API 32GN comporta 32 cúpulas, contendo cada uma um substrato carbonado sob forma desidratada. Preparou-se uma suspensão da bactéria a identificar, em soro fisiológico estéril, de turvação comparável a 0,5 MacFarland. Transferiram-se 200 μ l da suspensão para a ampola contendo meio sintético, que é fornecida com o kit. Homogeneizou-se a mistura com auxílio de uma micropipeta e inocularam-se 135 μ l desse meio nas cúpulas da galeria. A galeria foi tapada e colocada a incubar a 37 °C, durante 24-48 horas. Após o período de incubação, procedeu-se à leitura das galerias através de um sistema informatizado que faz a identificação da estirpe em causa e possibilita a impressão dos dados relativos aos vários testes, à percentagem de certeza da identificação, e aos testes complementares que poderão auxiliar a identificação caso exista fraca discriminação.

3.3 Avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos

3.3.1 Método de diluição em agar com concentração fixa

Para a determinação da susceptibilidade pelo método de diluição em agar, prepararam-se placas de Petri contendo meio de cultura Mueller-Hinton adicionado de

determinada concentração do antibiótico a testar. Prepararam-se soluções de antibióticos cujas concentrações se encontram na Tabela 3.1. Depois de preparadas, as soluções foram esterilizadas por filtração, em filtros de $0,45 \mu\text{m}$ de poro (Schleicher & Schuell). Procedeu-se à inoculação, em estria, das estirpes em estudo. Após 18 horas de incubação a 37°C , todas as estirpes que demonstraram crescimento foram consideradas resistentes ao antibiótico testado.

Tabela 3.1: Concentrações de antibióticos para selecção (adaptado de Courvalin *et al.* 1985)

Antibiótico	Solvente	Solução mãe (g/L)	Concentração final (mg/L) <i>E. coli</i>
Ácido Nalidíxico	água	10	50
Amicacina	água	1	10
Ampicilina	água	100	100
Cloranfenicol	etanol 100%	2	20
Gentamicina	água	0,4	2
Kanamicina	água	2	20
Netilmicina	água	2	20
Estreptomomicina	água	2	20 (plasmídeo)
Estreptomomicina	água	20	500 (cromossoma)
Tetraciclina	metanol	2	8-10

3.3.2 Método de difusão em agar com tiras ("E-test") para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação das concentrações mínimas inibitórias (concentração mais baixa de antibiótico capaz de inibir o crescimento da estirpe) foi utilizado o método de difusão em agar com tiras, designado E-test (Epsilon-test).

O E-test (Ab Biodisk) utiliza tiras comerciais de papel de 5×50 mm, impregnadas com um antibiótico em concentração decrescente, desde 256 a $0,016$ mg/l, que são sobrepostas a placas de agar Mueller-Hinton inoculadas com a cultura a estudar. O inóculo bacteriano foi preparado a partir de 3-4 colónias por suspensão em soro fisiológico estéril, de modo que a turvação fosse equivalente a 0,5 da escala de MacFarland. Com uma zaragatoa previamente mergulhada na suspensão bacteriana, foram inoculadas placas de agar Mueller-Hinton, depositando-se posteriormente a tira com o antibiótico sobre a superfície do agar. As placas foram incubadas a 37°C durante 18 horas, considerando-se como valor da CIM (mg/l)

o ponto de intersecção entre o crescimento bacteriano sobre a superfície do agar e a tira do E-test.

3.3.3 Método de difusão em agar com discos

É o processo mais comumente empregue na avaliação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos. A sua simplicidade, rapidez, economia e reprodutibilidade, fazem dele um processo bastante conveniente (Barry & Thornsberry, 1985; Jawetz *et al.*, 1987). Pequenos discos de papel, impregnados com quantidades conhecidas de antibiótico, são colocados na superfície de uma placa, contendo um meio de cultura sólido, previamente inoculado com uma cultura da bactéria a testar. Após um período de incubação, as placas são examinadas, verificando-se as zonas de inibição em redor dos discos (Robert-Dernuet, 1995; Hindler, 1998). Uma zona de inibição significa que o organismo foi inibido pelo fármaco que se difundiu no agar. A ausência de um halo de inibição indica que o organismo é resistente ao antibiótico. O antibiograma interpreta a sensibilidade das bactérias aos antibióticos em termos de eficácia clínica (Quentin, 1985): a bactéria é classificada nas categorias sensível (S), intermédia (I) ou resistente (R), de acordo com a medida do halo de inibição obtida e da sua interpretação com o auxílio de tabelas (Hindler, 1998). O método de difusão em agar foi adaptado pela Food and Drug Administration (FDA) e aconselhado pelo Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Barry & Thornsberry, 1985; Jawetz *et al.*, 1987; Pato, 1989; Pelczar *et al.*, 1993).

Preparou-se uma suspensão bacteriana de cada estirpe em estudo, de turvação comparável a 0,5 MacFarland. Mergulhou-se uma zaragatoa na suspensão e semearam-se placas de agar Mueller-Hinton. Posteriormente, colocaram-se os discos contendo os antibióticos a testar sobre a superfície do meio inoculado e incubaram-se as placas a 37 °C, durante cerca de 18 horas. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com uma craveira e, recorrendo às tabelas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1995) e do *Comité de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CA-SFM, 1996), foi possível classificar a estirpe, de acordo com a inibição observada, nas categorias sensível, intermédia ou resistente.

Foram utilizados os seguintes discos de antibióticos: amoxicilina (25µg), carbenicilina (100µg), amoxicilina + ácido clavulânico (20µg+10µg), mecilinamo (10µg), cefalotina (30µg), cefamandole (30µg), cefoxitina (30µg), cefuroxima (30µg), cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg), ceftriaxona (30µg), aztreonamo (30µg), imipenemo (10µg), gentamicina (10µg), canamicina (30µg), netilmicina

(30 μ g), neomicina (30 μ g), amicacina (30 μ g), tobramicina (10 μ g), estreptomina (25 μ g), ácido nalidíxico (30 μ g), norfloxacina (10 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), tetraciclina (30 μ g), cloranfenicol (30 μ g), trimetoprim/sulfametoxazol (1,25 μ g + 23,75 μ g), fosfomicina (50 μ g), piperacilina (100 μ g), piperacilina + tazobactam (75 μ g + 10 μ g).

3.4 Caracterização das β -lactamases

3.4.1 Preparação dos extractos enzimáticos

Os extractos brutos das estirpes foram obtidos seguindo a mesma metodologia utilizada por Peixe (1996) e por Arstila *et al.* (1993). As estirpes foram cultivadas, *over-night*, em TSB a 37 °C. Posteriormente, foi transferido cerca de 1ml destas culturas para 50 ml de TSB e incubados a 37 °C com agitação, durante cerca de 3h. As culturas assim obtidas foram, então, centrifugadas a 4000 g, durante 15 min, a 4 °C. Os sedimentos foram lavados com soro fisiológico, novamente centrifugados e ressuspensos em 1ml de água destilada. As suspensões obtidas foram sonicadas em banho de gelo, durante 2 min., com intervalos de 30s com um sonicador Labsonic 2000, a 300Mhz. Os sonicados foram centrifugados em tubos Eppendorf a 12000 rpm, durante 15 min., a 4 °C e os sobrenadantes foram congelados a -20 °C.

3.4.2 Determinação do ponto isoeléctrico das β -lactamases

O ponto isoeléctrico das β -lactamases em estudo foi determinado por focagem isoeléctrica que se efectuou no sistema Phast System (Pharmacia), de acordo com as recomendações estabelecidas pelo fabricante. Foram utilizados geles comerciais de poliacrilamida com anfólitos de gradiente de pH de 3 a 9 e de 5 a 8 (PhastGel 3-9, PhastGel 5-8, Pharmacia). Utilizaram-se vários padrões (extractos de estirpes produtoras de β -lactamases de pI conhecido), nomeadamente, TEM 1 (5,4), TEM 4 (5,9), TEM 6 (5,87), CAZ 2 (6,0), CAZ 6 (6,5), OXA 1 (7,4), SHV 1 (7,6), SHV 5 (8,2) e (6,6) (Bush *et al.*, 1995). A revelação das bandas correspondentes às β -lactamases presentes no gel foi efectuada por adição de cerca de 100 μ l de uma solução de nitrocefina (100 μ M).

3.5 Ensaios de conjugação

Para as estirpes que apresentaram um comportamento aos antibióticos típico de presença de β - lactamases plasmídicas, efectuaram-se ensaios de transferência genética, nomeadamente conjugação. Foi utilizada a *E. coli* K802N (desprovida de plasmídeo), como estirpe dadora. As estirpes dadoras e a receptora foram cultivadas, *over-night*, em TSB a 37 °C. Posteriormente, transferiu-se cerca de 1ml destas culturas para 50 ml de TSB e incubou-se a 37 °C com agitação, até se atingir a fase exponencial (5×10^8 bact/ml). Posteriormente colocaram-se 100 μ l da cultura da estirpe dadora sobre 100 μ l da cultura da estirpe receptora em placas de Mueller-Hinton, incubando-se a 37 °C/18h. Os transconjugantes foram seleccionados em placas de M-H contendo ácido nalidíxico (50 μ g/ml) e ampicilina (100 μ g/ml), por sementeira directa desta cultura e de diluições da mesma em soro fisiológico.

3.6 Extracção de DNA plasmídico

O protocolo utilizado no presente trabalho para a detecção de DNA plasmídico foi o de Kado & Liu (1981). O método utiliza as características moleculares do DNA que é desprendido das células, utilizando dodecilsulfato de sódio, sob condições que desnaturam o DNA cromossómico. As proteínas são removidas por extracção com fenol-clorofórmio. Nestas condições o DNA cromossómico é reduzido ou eliminado. O extracto clarificado é utilizado directamente para a análise electroforética.

3.6.1 Técnica de Kado & Liu

De uma cultura em fase exponencial das estirpes em estudo, procedeu-se à centrifugação de cerca de 600 μ l, durante 5 minutos, a 6000 rpm, em tubos de Eppendorf. De modo a obter um pellet suficiente. Este procedimento foi repetido duas vezes. Posteriormente, o sedimento foi lavado com soro fisiológico estéril e centrifugado a 6000 rpm, durante 5 min. O sobrenadante obtido foi rejeitado e as células foram ressuspensas em 100 μ l de TAE (Tris-base 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético glacial, pH 8). Adicionaram-se 100 μ l de SDS/Tris (SDS 4 % + Tris 100 mM) e 100 μ l de NaOH 0,2 N e inverteu-se suavemente cada tubo. Adicionaram-se 600 μ l de fenol - clorofórmio (v/v) seguindo-se uma agitação suave e centrifugação a 14000 rpm, durante 5 min. A fase aquosa obtida

foi recuperada para um outro tubo, ao qual se adicionou 2 volumes de fenol - clorofórmio. Agitou-se suavemente e voltou-se a centrifugar a 14000 rpm, durante 5 min. À fase aquosa obtida adicionou-se 1/10 do volume de NaOH 3 M (pH 4,8) e 2,5 volumes de etanol. Posteriormente, e por forma a favorecer a precipitação do DNA, a mistura foi colocada a -20°C, durante 20 min. Depois, procedeu-se à sua centrifugação a 14000 rpm, durante 5 min, rejeitando-se o sobrenadante. Após evaporação do etanol, o pellet foi ressuspenso em 10 μ l de água e 10 μ l de corante. A amostra, assim obtida, foi analisada por electroforese em gel de agarose.

3.6.2 Electroforese em gel de agarose

A corrida electroforética foi efectuada em geles de agarose (Pharmacia) a 0,7 %, em tampão TAE (Tris- base 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético glacial, pH 8). A cerca de 10 μ l de DNA extraído, pela técnica anteriormente descrita, adicionaram-se 10 μ l de uma solução de azul de bromofenol 0,1 %, glicerol 50 %, H₂O, depositando-se, com uma micropipeta, nos poços do gel de agarose. O padrão utilizado foi o DNA de *E. coli* V517. A migração no gel ocorreu sob uma ddp de 75 V. No fim da corrida electroforética, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/ml) durante cerca de 30 minutos, e observado com auxílio de um transiluminador de luz UV (W-Transiluminator, UVP, Inc.). Foi possível ainda fotografar as bandas de DNA obtidas (Polaroid MP-4 Land Camera).

3.7 Caracterização genômica de *R. aquatilis* utilizando ERIC-PCR

Para as 5 estirpes da espécie *R. aquatilis* isoladas, para além da caracterização bioquímica, estudo do perfil de susceptibilidade aos antibióticos e pesquisa de β -lactamases, foi também realizado um estudo do seu perfil genómico. Para o efeito foi utilizada tecnologia de PCR com primers específicos para as sequências ERIC ("Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus").

A estirpe *R. aquatilis* ATCC 33071, gentilmente cedida por Caroline O'Hara do CDC (Centers for Disease Control), foi utilizada como referência, uma vez que é considerada a estirpe-tipo da espécie *R. aquatilis* (Brenner *et al.*, 1998; Caroff *et al.*, 1998).

3.7.1 Obtenção do DNA cromossómico

O DNA cromossómico das estirpes em estudo foi obtido utilizando o método de Seifert *et al.* (1995). De cada uma das estirpes cultivadas em meio sólido, durante 24 h, retirou-se uma porção com uma ansa e suspendeu-se em 20 μ l de solução NaOH-SDS (0,05M NaOH; 0,25 % SDS). Posteriormente, colocou-se a 95 °C durante 15 min. e diluiu-se até 200 μ l de volume final com TE (10mM Tris; 1mM EDTA, pH 8), agitando cuidadosamente. Centrifugou-se a 13000 g, durante 3 min. e os sobrenadantes, contendo o DNA, foram utilizados nas reacções de PCR.

3.7.2 Quantificação do DNA por determinação espectrofotométrica

A concentração do DNA foi avaliada por medição da absorvância a 260nm no espectrofotómetro (Shimazu UV - 265), considerando que uma unidade de densidade óptica a 260nm, corresponde a aproximadamente 50 μ g de DNA em cadeia dupla/ml.

3.7.3 Reacção de amplificação

Foi utilizado um método de "fingerprinting" do genoma bacteriano, analisando padrões específicos das estirpes, obtidos por amplificação com PCR, de elementos de DNA repetitivos existentes no genoma bacteriano (ERIC) (Olive & Bean, 1999).

Para a realização da reacção de amplificação, foi utilizada *ReadyMix RedTaq* (Sigma), uma mistura que contém já a *Taq* DNA Polimerase (60 unidades/ml), os dNTPs (0,4 mM), estabilizadores, Cloreto de Magnésio (3mM), Tris-HCl (20mM, pH 8,3), KCl (100mM) e gelatina (0,002 %). A esta mistura, já corada, é só necessário adicionar os Primers, o DNA cromossómico e a água ultra pura estéril para perfazer o volume final.

A mistura reaccional, utilizando *ReadyMix RedTaq*, continha a seguinte composição (num volume total de 50 μ l):

- DNA cromossómico - 50 ng
- Primer IR - 50 pmol
- Primer C2 - 50 pmol

- ReadyMix RedTaq - 25 μ l
- Água ultra pura estéril - x μ l

Para além da *ReadyMix RedTaq* (Sigma), foram avaliadas as condições (tampões e adjuvantes) que permitiam obter um perfil com maior poder discriminatório. Estes ensaios foram efectuados com o *PCR Optimization Kit II* (Sigma), tendo-se escolhido para além do tampão universal (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 nM EDTA), o tampão PCR nº4 (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 35 mM MgCl₂, 750 mM KCl) e o glicerol (15 %), como adjuvante, por terem sido os que melhores resultados forneceram.

Todos os diferentes tampões, bem como todos os adjuvantes, foram testados com a estirpe-tipo *R. aquatilis* ATCC 33071.

A mistura reaccional, continha a seguinte composição (num volume total de 50 μ l):

- DNA cromossómico - 50 ng
- Primer IR - 50 pmol
- Primer C2 - 50 pmol
- Tampão PCR - 5 μ l
- Tampão Universal - 1 μ l
- Adjuvante (glicerol) - 7,5 μ l
- Mix dNTP - 1 μ l
- *Taq* DNA polimerase - 0,3 μ l
- Água ultra pura estéril - x μ l

Os primers, ERIC IR e ERIC C2, utilizados foram sintetizados pela MWG Biotech.

A sequência nucleotídica dos dois primers ERIC (ERIC IR e ERIC C2) (Ienska Pobell *et al.*, 1995) utilizados na reacção de amplificação encontra-se representada na Figura 3.2

A amplificação foi efectuada num termociclador (Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 2400), seguindo as seguintes condições (Bruijn, 1992): um ciclo inicial a 94 °C durante 7 min., 35 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 1 min., "annealing" a 52 °C durante 1 min., e extensão a 65 °C durante 8 min., com uma incubação final a 65 °C durante 15 min.

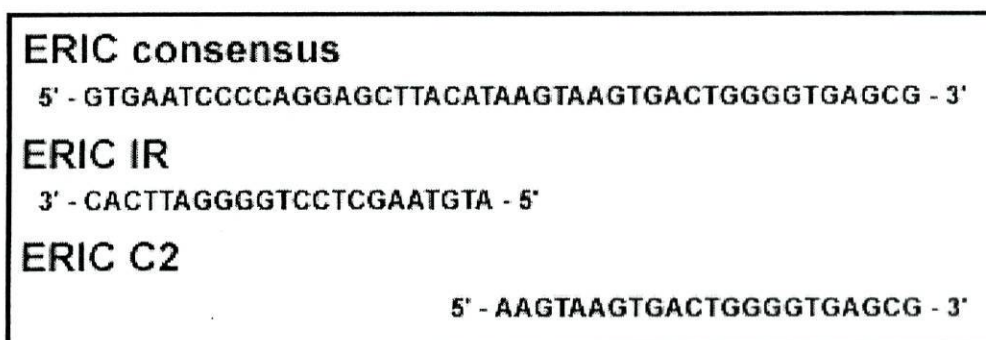


Figura 3.2: Sequência nucleotídica dos primers ERIC.

3.7.4 Caracterização do produto PCR por electroforese

Os produtos das reacções de PCR foram analisados electroforeticamente em geles de agarose (Pharmacia) a 2 %. O marcador de peso molecular utilizado foi o pGEM (Promega). Foi utilizado o corante "Blue/Orange Loading Dye, 6x (G188A)" (Promega) para colocar as amostras de DNA, bem como o marcador, nos poços do gel de electroforese e seguir a sua migração durante a corrida electroforética. Os geles foram corados com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g/ml}$) e fotografados com uma Polaroid MP-4 Land Camera.

3.8 Estudo do mecanismo de resistência ao imipenemo em *S. marcescens*

3.8.1 Bioensaio

No presente estudo, foi isolada uma estirpe da espécie *S. marcescens* C171(17) que apresentava resistência ao imipenemo. Na tentativa de se esclarecer o mecanismo dessa resistência, realizou-se um ensaio, por forma a verificar se a estirpe possuía alguma enzima que inibisse a acção do imipenemo, e se seria ou não uma metalo- β -lactamase. Numa placa contendo Mueller-Hinton agar, fizeram-se, com a ajuda de uma pipeta Pasteur, 9 poços. Semeou-se com uma zaragatoa, previamente mergulhada numa suspensão 0,5 MacFarland, uma estirpe *E. coli* ATCC e colocou-se em cada poço 50 μl das seguintes misturas:

- extracto C171(17) + imipenemo (10 μg)

- extracto C171(17) + imipenemo (20 μ g)
- extracto C171(17) + imipenemo (10 μ g) +EDTA (2mM)
- extracto C171(17) + imipenemo (20 μ g) +EDTA (2mM)
- imipenemo (10 μ g)
- imipenemo (20 μ g)
- extracto *S. marcescens* IMP sensível + imipenemo (10 μ g)
- extracto *Pseudomonas* IMP⁺ + imipenemo (10 μ g)
- extracto *Pseudomonas* IMP⁺ + imipenemo (10 μ g) +EDTA (2mM)

Os extractos brutos, de cada estirpe usada no ensaio, foram obtidos pelo método já anteriormente descrito (secção 3.4.1, página 36). O EDTA foi usado para verificar se a enzima, caso existisse, seria ou não por ele inibida (e, desta forma, inferir se seria ou não uma metalo- β -lactamase). A estirpe da espécie *Pseudomonas* foi utilizada, como comparação, por possuir uma metalo- β -lactamase. Foi também usada uma estirpe de *S. marcescens* sensível ao imipenemo como controlo.

3.8.2 Estudo da alteração da expressão de porinas associada com o decréscimo da permeabilidade da membrana externa em *S. marcescens*

3.8.2.1 Isolamento das proteínas da membrana externa

Para a realização do estudo da alteração da expressão de porinas foi necessário isolar as proteínas da membrana externa da estirpe *S. marcescens* C171(17). Para tal, foi utilizado o protocolo de Lynch *et al.* (1987).

As estirpes foram incubadas "over-night" a 37 °C em caldo nutritivo TSB. Posteriormente foram inoculadas em meio de cultura fresco, com agitação a 37 °C até atingirem a fase exponencial. Após centrifugação a 10000 rpm durante cerca de 10 min., a 4 °C, as células foram lavadas com tampão PBS (pH 7,2) e novamente centrifugadas. Os pellets obtidos foram suspensos em 5 ml de tampão fosfato - PB (10 mM, pH 7,0) contendo 2-mercaptoetanol (140 mM). Esta suspensão foi, então, sonicada, em banho de gelo. As células intactas foram removidas por

centrifugação (10000 rpm, 10 min, 4 °C) e os sobrenadantes que contêm as membranas foram ultracentrifugados (50000 rpm, 60 min., 4 °C). Os pellets, assim obtidos, foram lavados com tampão fosfato (10 mM, pH 7,0) e centrifugados novamente (50000 rpm, 60 min., 4 °C). Os sedimentos foram suspensos em 5 ml de tampão fosfato e incubados com 1 % (p/v) de Sarkosyl à temperatura ambiente, durante 20 min. Depois, foram ultracentrifugados (50000 rpm, 30 min, temp. ambiente) e lavados com 1 % (p/v) de Sarkosyl em PBS pH 7,2. Após nova ultracentrifugação (50000 rpm, 30 min, temp. ambiente), os pellets foram suspensos em 150 μ l de água destilada, dos quais 50 μ l foram utilizados na determinação da proteína e os restantes 100 μ l na execução das electroforeses.

3.8.2.2 Determinação da quantidade proteica

A determinação da quantidade proteica foi efectuada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Neste método, prepararam-se vários padrões com os quais se construiu uma curva de calibração que permitiu, por interpolação das absorvâncias, determinar a quantidade de proteína de cada amostra. A desnaturação das amostras ocorreu a 100 °C durante 2 min.

3.8.2.3 Electroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

A determinação da massa molecular das proteínas da membrana externa foi realizada por electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, utilizando um gel de separação a 14% e um gel de concentração a 5% . O padrão de pesos moleculares de proteínas utilizado foi o MW-SDS-70L Kit (Sigma), próprio para pesos moleculares que variam entre 14 e 70 KDa. Após a electroforese, o gel foi corado com solução de azul de Coomassie (Sigma).

Capítulo 4

Resultados & Discussão

4.1 Origem das amostras

No presente trabalho, foi utilizado um total de 728 amostras de água não-tratada, provenientes de várias localidades do norte de Portugal, colhidas em diversos pontos. Verifica-se que a maioria das amostras de água proveio de poços (278 amostras), furos (135 amostras) e fontes (120 amostras) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Origem das várias amostras de água analisadas

Origem das amostras	Nº de amostras
Poço	278
Furo	135
Fonte	120
Mina	61
Rede Pública	44
Nascente	7
Depósito	5
Rio	4
Origem Desconhecida	74
Total	728

O elevado número de amostras de água colhidas em poços, furos e fontes, sugere que se recorre ainda à utilização desse tipo de abastecimento para o suprimento das necessidades em água para uso doméstico ou recreativo, rega ou consumo industrial.

Uma vez que o perigo de contaminação desta água é elevado, devido a infiltrações e escorrências de descargas de esgotos sem tratamento prévio (Khalil *et al.*, 1994; Reiff *et al.*, 1996), torna-se importante uma avaliação cuidada das consequências da sua utilização para a saúde pública e uma abrangente campanha de sensibilização das populações para o uso indiscriminado deste tipo de abastecimento.

De facto, cerca de 1 milhão de portugueses não possui água canalizada. Além disso, e de acordo com informações do relatório do Ministério do Ambiente "Controlo da qualidade da água de abastecimento para consumo humano em 1997" (DGA, 1998), verifica-se que um número significativo de entidades distribuidoras não efectuam ainda todas as colheitas e análises a que a lei as obriga e que o grande problema da qualidade da água de abastecimento reside na inexistência ou na ineficácia da desinfecção. O relatório indica ainda que, a 2,6 % da população portuguesa servida, foi distribuída água apresentando sérias deficiências de qualidade ao nível dos parâmetros microbiológicos.

4.1.1 Distribuição geográfica das resistências aos agentes antimicrobianos

Verifica-se que a maioria das amostras, utilizadas no presente trabalho, procede de poços, furos e fontes, uma vez que a rede pública de distribuição de água não cobre ainda a totalidade do território português, vendo-se as populações obrigadas a recorrer a esse tipo de abastecimento para suprir as suas necessidades básicas de água potável. A localização destes abastecimentos junto a ineficientes sistemas de saneamento básico, águas de escorrência contaminadas, vizinhança de efluentes industriais, torna-os potenciais focos de transmissão e reservatório de agentes patogénicos. As bactérias indicadoras de contaminação fecal, *E. coli*, *C. freundii*, *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp., foram isoladas predominantemente a partir de amostras de poço. Uma vez que muitas pessoas recorrem a este tipo de abastecimento, tão sensível a contaminação por escorrências, geralmente não controlado do ponto de vista microbiológico, tornam-se necessários estudos, quer das características bacteriológicas que este tipo de águas apresenta, quer das consequências a nível de saúde pública que decorrem da sua utilização.

Com os valores das resistências aos agentes antimicrobianos, das diferentes estirpes isoladas ao longo de todo o período de amostragem, tentou-se verificar a existência de um qualquer padrão relativo aos locais de proveniência das amostras analisadas. Foram efectuadas várias aproximações, não se tendo, contudo, obti-

do nenhum resultado concreto que permitisse a emergência de um padrão de distribuição geográfica. As estirpes que apresentam resistência aos antibióticos aparecem distribuídas por todos os locais amostrados no norte de Portugal, sem obedecer a nenhum padrão facilmente interpretável.

Estas dificuldades advêm de:

- um pequeno número de locais de amostragem. Para um qualquer estudo de distribuição geográfica seria necessário estender a amostragem pelo máximo número de localidades, de modo a consolidar os possíveis resultados. As diferentes amostras deveriam também ser equitativamente distribuídas por toda a área amostrada, evitando, sempre que possível, a sobreamostragem em locais de elevada densidade populacional.
- reduzido número de amostras por local de amostragem. Seria imprescindível um suficiente e equilibrado número de amostras, de forma a evitar possíveis enviesamentos devidos a um pequeno esforço de amostragem.
- seria ainda necessária uma detalhada caracterização da área envolvente aos locais de amostragem seleccionados, nomeadamente, se são áreas rurais ou urbanas, qual a sua densidade populacional, grau de industrialização e principais actividades dessa mesma indústria, existência de efluentes industriais, explorações pecuárias e/ou de aquaculturas, águas de escorrência perto dos pontos de abastecimento, existência de uma eficaz rede de tratamento de esgotos, presença de instalações hospitalares, etc.
- um reduzido tempo de amostragem que teria que ser bastante mais alargado no espaço e no tempo, por forma a poder ser efectuada uma ampla monitorização. Assim, seria possível ver emergir padrões de distribuição geográficos e suas alterações ao longo de uma série cronológica (ver Clarke 1993).

Seria importante a criação de uma rede de monitorização que avalie a evolução do aparecimento de estirpes bacterianas de ambiente aquático, e seus perfis de resistência a agentes antibacterianos, de modo a, num futuro próximo, melhor actuar e legislar.

4.2 Estirpes isoladas

Das 728 amostras de água não-tratada, utilizadas no presente estudo, foi possível isolar 442 estirpes bacterianas pertencentes, na sua maioria, à família *Enterobac-*

teriaceae (Tabela 4.2), verificando-se um predomínio para as espécies *E. coli* (109 estirpes) e *C. freundii* (97 estirpes).

Tabela 4.2: Espécies bacterianas isoladas no decorrer do trabalho.

Espécie isolada	Nº
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	1
<i>Buttiauxella agrestis</i>	1
<i>C. freundii</i>	97
<i>Enterobacter</i> sp.	10
<i>Pantoea agglomerans</i> (<i>Enterobacter agglomerans</i>)	1
<i>Enterobacter amnigenus</i>	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	10
<i>E. coli</i>	109
<i>Klebsiella</i> sp.	25
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	4
<i>Moraxella lacunata</i>	1
<i>R. aquatilis</i>	5
<i>Serratia fonticola</i>	8
<i>Serratia liquefaciens</i>	4
<i>S. marcescens</i>	10
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1
Estirpes não identificadas (fermentadoras da lactose)	50
Outras estirpes (não fermentadoras da lactose)	83
Total	442

O facto de se terem isolado estirpes pertencentes na sua maioria a espécies coliformes (indicadores de contaminação fecal), demonstra que, efectivamente, este tipo de abastecimento de água, geralmente não controlado do ponto de vista microbiológico, constitui potencial risco para a saúde dos seus utilizadores. Para além do grupo das bactérias coliformes encontraram-se, ao longo do estudo, outras bactérias com carácter patogénico. É o caso de *Yersinia enterocolitica*, um patogéneo humano associado com gastroenterites agudas e crónicas (Gönül & Karapinar, 1991) e que pode ser veiculado através da água (Eden *et al.*, 1977), e da espécie *S. marcescens*, uma bactéria patogénica oportunista importante (Hutsul *et al.*, 1993), associada a infecções nosocomiais (Hashizume *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1997).

4.3 Avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos de bactérias coliformes

Existem, em Portugal, vários estudos sobre a incidência e caracterização dos mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos, de estirpes pertencentes ao grupo coliforme, de origem hospitalar e ambulatoria (Sousa *et al.*, 1989a,b, 1991; Neto *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 1992, 1994; Silva *et al.*, 1993; Carneiro *et al.*, 1993; Peixe, 1996; Peixe *et al.*, 1997). No entanto, o mesmo já não se verifica para estirpes isoladas de ambiente, nomeadamente de águas de consumo humano. Assim, no presente estudo, avaliou-se o comportamento que as estirpes, pertencentes ao grupo coliforme (*E. coli*, *C. freundii*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp.), apresentaram face aos agentes antimicrobianos e procedeu-se a uma análise comparativa entre estes resultados e os obtidos, em outros estudos, para estirpes patogénicas hospitalares.

4.3.1 Estudo comparativo entre as percentagens de resistência, aos antibióticos β -lactâmicos, em estirpes de *E. coli* patogénicas e de ambiente aquático

A Figura 4.1 representa a comparação entre os perfis de resistência verificados em estirpes de *E. coli* de origem hospitalar e de meio ambiente. A percentagem de resistência de estirpes patogénicas de *E. coli*, aos antibióticos β -lactâmicos, obtidas por Sousa *et al.* (1989b) está representada com a letra (A). Em (B) representa-se a percentagem de resistência em estirpes de *E. coli*, isoladas no presente trabalho, face aos antibióticos β -lactâmicos (linha contínua) e a outros grupos de antibióticos (linha a tracejado). Para além da percentagem de estirpes resistentes (colunas a preto), está ainda representado, em (B), a percentagem de estirpes intermédias (colunas a cinzento).

Para as estirpes patogénicas, os autores observaram uma elevada resistência às aminopenicilinas (cerca de 54 %), carboxipenicilinas (51,4 %) e ureidopenicilinas, ao contrário do que acontece para os outros grupos de antibióticos β -lactâmicos, principalmente cefalosporinas de 3ª geração, amoxicilina + ácido clavulânico, monobactâmicos e imipenemo (Sousa *et al.*, 1989b).

Pela análise da Figura 4.1, verifica-se que, no presente trabalho, cerca de 9 % das estirpes de *E. coli* apresentam resistência à amoxicilina e 32 % apresentam um nível intermédio. A resistência à carbenicilina é de 6 % e cerca de 1 % das estirpes apresentam um valor intermédio. No caso da cefalotina, verifica-se que 9

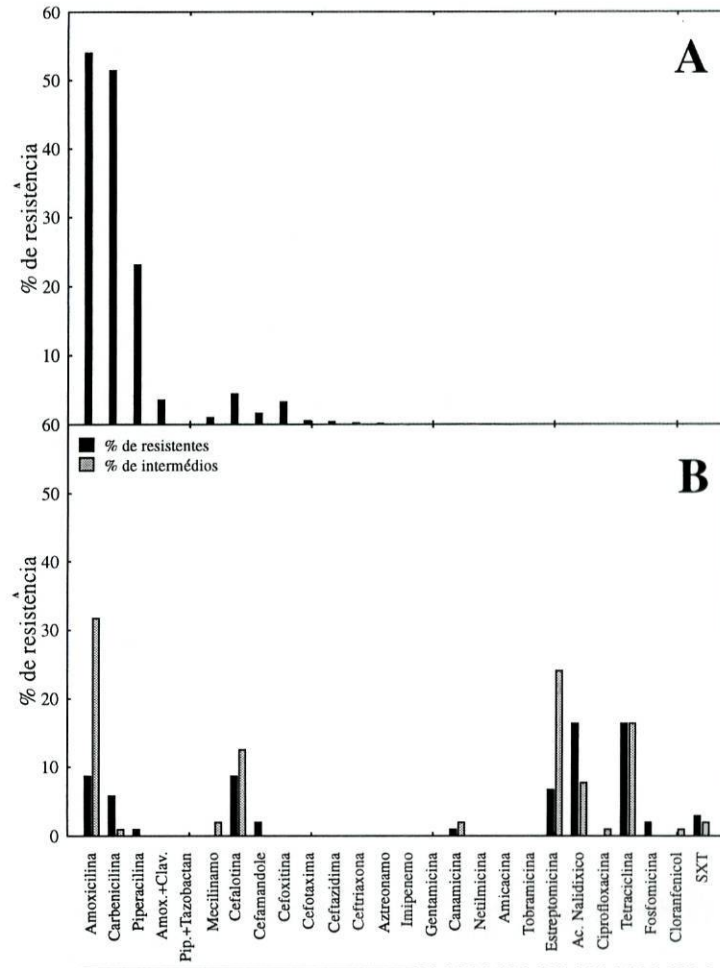


Figura 4.1: Comparação entre as percentagens de resistência de *E. coli* aos antibióticos obtidas no presente trabalho (B) e as obtidas por Sousa *et al.* (1989b) (A). A linha contínua agrupa os antibióticos β -lactâmicos e a linha a tracejado indica os não β -lactâmicos

% das estirpes são resistentes e 13 % são intermédias.

A presença de um elevado número de estirpes com valor intermédio para a amoxicilina poderá relacionar-se com a baixa expressão de um mecanismo de resistência. Seria necessário confirmar estes valores com a determinação das CIMS e verificar se está a ocorrer baixa expressão de β -lactamases ou se, porventura, estará envolvido um outro mecanismo de resistência.

A provável ausência ou reduzido contacto destas estirpes com agentes β -lactâmicos, poderá justificar o comportamento observado conferindo, contudo, capacidade de sobrevivência aquando do aumento da pressão selectiva.

E. coli é naturalmente susceptível aos β -lactâmicos, embora produza constitutivamente, em baixo nível, uma β -lactamase cromossómica.

Sousa *et al.* (1989a, 1991) verificaram, por focagem isoeléctrica, que as β -lactamases TEM1, logo seguidas das SHV1, predominam nas estirpes patogénicas de *E. coli* de origem hospitalar, concluindo, assim, que a produção de β -lactamases plasmídicas constitui o principal mecanismo de resistência, dessas estirpes, aos antibióticos β -lactâmicos. Verificaram ainda que este tipo de comportamento está predominantemente associado aos fenótipos RRSS e RRIS (Sousa *et al.*, 1989a, 1991). Estes fenótipos foram determinados com base no comportamento das estirpes, *in vitro*, face à amoxicilina, carbenicilina, cefalotina e cefotaxima, respectivamente.

Quanto às estirpes resistentes verifica-se, no presente estudo, uma predominância do fenótipo RRIS (n=4) e, em duas outras estirpes observou-se RRSS. Salienta-se também que estas estirpes apresentavam susceptibilidade à associação amoxicilina + ácido clavulânico. Em duas destas estirpes (C248(82) e C306(52)), verificou-se, por focagem isoeléctrica, o aparecimento de uma β -lactamase com pI de 5,4 (idêntico a TEM-1). Ensaio de conjugação permitiram inclusive observar para estas duas estirpes a transferência da resistência.

Estes resultados indicam que, à semelhança do verificado nas estirpes do estudo de Sousa *et al.* (1989b), as β -lactamases plasmídicas constituem o principal determinante da resistência.

Os resultados obtidos indicam que, no geral, as estirpes isoladas de águas de consumo apresentam maior susceptibilidade aos agentes antimicrobianos do que as estirpes patogénicas hospitalares e ambulatorias, facto explicado pela menor pressão selectiva existente em ambiente natural.

Embora não se apresentem dados relativos a outros grupos de antibióticos para as estirpes de origem hospitalar, por forma a poder comparar com os obtidos para as estirpes isoladas neste estudo, verifica-se uma significativa percentagem de estirpes resistentes à estreptomicina, ao ácido nalidíxico e à tetraciclina.

4.3.2 Estudo comparativo entre as percentagens de resistência, aos agentes antimicrobianos, em estirpes de *C. freundii* patogénicas hospitalares e de ambiente aquático

A Figura 4.2 representa a comparação entre os perfis de resistência verificados em estirpes de *C. freundii* de origem hospitalar e do meio ambiente. A percentagem de resistência de estirpes patogénicas de *C. freundii*, aos antibióticos β -lactâmicos, obtidas por Silva *et al.* (1993) está representada com a letra (A). Em (B) representa-se a percentagem de resistência em estirpes de *C. freundii*, isoladas no presente trabalho, face aos antibióticos β -lactâmicos (linha contínua) e a outros grupos de antibióticos (linha a tracejado). Para além da percentagem de estirpes resistentes (colunas a preto), está ainda representado, em (B), a percentagem de estirpes intermédias (colunas a cinzento).

Para as estirpes patogénicas, os autores observaram uma elevada resistência à amoxicilina (97,4 %), amoxicilina + ácido clavulânico (97,4 %), cefalotina (100 %) e cefoxitina (97,4 %), que relacionaram com a actividade indutora destes antibióticos (Silva *et al.*, 1993). Observaram resistência variável aos outros β -lactâmicos, à excepção do imipenemo, para o qual as estirpes são totalmente susceptíveis.

Pela análise da Figura 4.2, verifica-se que, no presente trabalho, cerca de 61 % das estirpes de *C. freundii* apresentam resistência à amoxicilina e 25 % se incluem num nível intermédio. A resistência à carbenicilina é de cerca de 22 % e 13 % das estirpes apresentam valores intermédios. No caso da cefalotina, verifica-se que 42 % das estirpes são resistentes e 6 % são intermédias. Para a cefoxitina, verifica-se que 37 % das estirpes são resistentes e que 11 % são intermédias.

Silva *et al.* (1993) observaram a presença de β -lactamases com comportamento típico de cefalosporinas da classe 1 de Bush e verificaram que algumas das estirpes estudadas exibiam adicionalmente uma banda electroforética idêntica a TEM-1.

É de salientar que não foi observada, no presente trabalho, nenhuma estirpe com fenótipo compatível com a hiperprodução constitutiva de β -lactamase cromossómica, um comportamento que tem sido associado à utilização terapêutica de cefalosporinas de 3ª geração, observado, contudo, no trabalho de Silva *et al.* (1993).

O fenótipo selvagem de *C. freundii* aos antibióticos β -lactâmicos é determinado pela produção natural, e em baixo nível, de β -lactamases cromossómicas indutíveis, que conferem resistência às aminopenicilinas, às cefalosporinas de 1ª



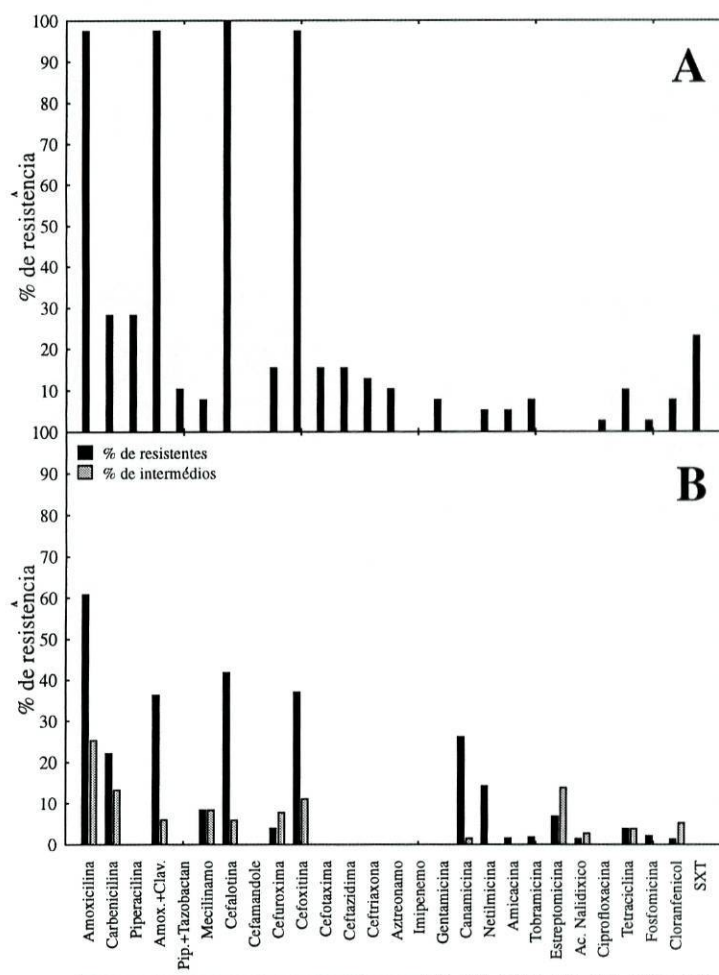


Figura 4.2: Comparação entre as percentagens de resistência de *C. freundii* aos antibióticos obtidas no presente trabalho (B) e as obtidas por Silva *et al.* (1993) (A). A linha contínua agrupa os antibióticos β -lactâmicos e a linha a tracejado indica os não β -lactâmicos.

geração e à cefoxitina, mas susceptibilidade às carboxipenicilinas. Esta espécie é sensível às ureidopenicilinas e às cefalosporinas de 3ª geração que, como as carboxipenicilinas, são pouco inativadas pelas cefalosporinases.

Em doze estirpes observou-se resistência à amoxicilina, carbenicilina e susceptibilidade à associação amoxicilina + ácido clavulânico. Este comportamento está relacionado com a produção de β -lactamases plasmídicas. Com efeito, nestas estirpes observou-se, por focagem isoelétrica, uma única banda de pI 5,87, 5,9, 7,0 ou 7,6, com a exceção da estirpe C209(53) que apresentou duas bandas β -lactamásicas de pI 5,9 e 7,0.

A determinação do pI não foi suficiente para identificar as β -lactamases observadas nestas estirpes, dada a variedade das enzimas, que se conhecem, com actividade hidrolítica sobre os substratos afectados, nomeadamente sobre a carbenicilina (Philippon *et al.*, 1983; Livermore *et al.*, 1984).

Ensaio de conjugação não permitiram associar a sua localização a plasmídeos conjugativos.

Verifica-se um elevado número de estirpes com resistência à canamicina e netilmicina, o que estará provavelmente relacionado com enzimas inactivadoras de aminoglicosídeos.

Existem, nas estirpes estudadas, níveis de resistência aos antibióticos significativamente inferiores aos observados na clínica, possivelmente por uma reduzida expressão da β -lactamase cromossómica, como o indica o comportamento à cefoxitina.

Com efeito, a cefoxitina é lábil e um bom indutor das cefalosporinases, pelo que *C. freundii* é habitualmente considerado como naturalmente resistente a este antibiótico.

4.3.3 Estudo do comportamento de estirpes de *Enterobacter cloacae* aos agentes antimicrobianos

Na Figura 4.3 estão representados os valores das percentagens de resistência de estirpes de *Enterobacter cloacae*, isoladas no presente trabalho, face aos antibióticos β -lactâmicos (linha contínua) e a outros grupos de antibióticos (linha a tracejado). Para além da percentagem de estirpes resistentes (colunas a preto), está ainda representada, a percentagem de estirpes intermédias (colunas a cinzento).

Verifica-se que cerca de 77 % das estirpes de *E. cloacae* apresentam resistência à amoxicilina, 38 % à carbenicilina, 55 % à associação amoxicilina + ácido cla-

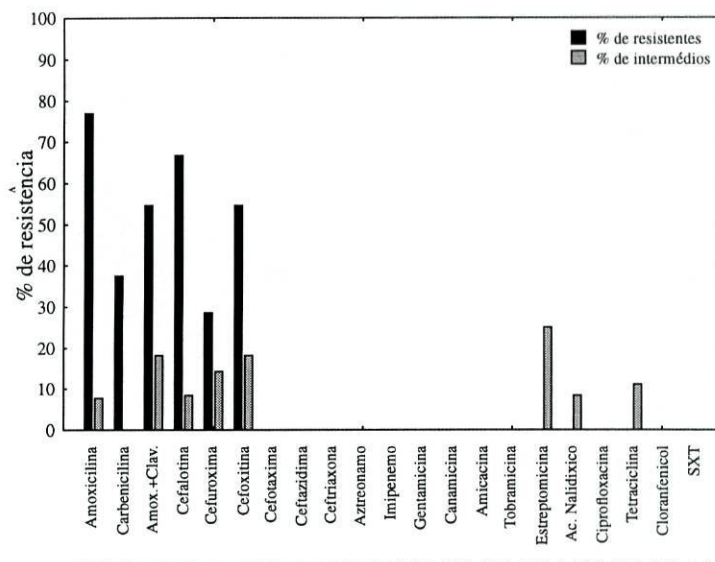


Figura 4.3: Percentagens de resistência aos antibióticos de *E. cloacae*.

vulânico e cerca de 67 % das estirpes são resistentes à cefalotina. Uma elevada percentagem de resistência verifica-se também para a cefoxitina (55 %).

Um comportamento variável aos agentes β -lactâmicos foi descrito nas diversas espécies do género *Enterobacter* isoladas da clínica (Muytjens & Repe, 1986; Pitout *et al.*, 1997a), tendo sido também verificado, na maioria das estirpes, a produção de uma β -lactamase cromossómica. *E. cloacae*, a espécie mais frequentemente isolada na clínica humana, produz uma β -lactamase cromossómica (do grupo 1 da classificação de Bush) que está sob o controlo de um repressor, podendo o aumento da sua expressão ocorrer pelo efeito indutor de algumas penicilinas e cefalosporinas, pelo que o fenótipo selvagem tem sido associado à resistência à ampicilina, cefoxitina e cefalosporinas de 1ª geração (Muytjens & Repe, 1986; Carneiro *et al.*, 1993; Pitout *et al.*, 1997a).

Mutantes de *E. cloacae*, desreprimidos na produção de cefalosporinases, ocorrem espontaneamente podendo ser seleccionadas, *in vitro* e *in vivo*, por β -lactâmicos de espectro alargado (Gootz *et al.*, 1982; Sanders, 1987). Estes mutantes caracterizam-se por apresentarem também resistência às carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, e cefalosporinas de 2ª e 3ª geração (Courvalin *et al.*, 1985; Sanders, 1987; Carneiro *et al.*, 1993).

Observou-se, em várias estirpes, susceptibilidade à amoxicilina e/ou cefoxitina. Tal como observado para *C. freundii*, a expressão da β -lactamase cromossômica nas estirpes de *E. cloacae* isoladas da água, parece ocorrer num nível reduzido. A boa actividade das cefalosporinas de 3ª geração indica a ausência de estirpes desreprimidas na produção de β -lactamase cromossômica.

O comportamento natural, habitualmente descrito, nas espécies de *C. freundii* e *E. cloacae*, parece ser apenas aplicável a bactérias isoladas de infecções no homem, visto que nas estirpes isoladas do ambiente se verifica um nível muito inferior de β -lactamases cromossômicas.

4.3.4 Estudo do comportamento de estirpes de *Klebsiella* spp. aos agentes antimicrobianos

Na Figura 4.4 estão representados os valores das percentagens de resistência de estirpes de *Klebsiella* spp., isoladas no presente trabalho, face aos antibióticos β -lactâmicos (linha contínua) e a outros grupos de antibióticos (linha a tracejado). Para além da percentagem de estirpes resistentes (colunas a preto), está ainda representada, a percentagem de estirpes intermédias (colunas a cinzento).

Cerca de 95 % das estirpes de *Klebsiella* são resistentes à amoxicilina e 87 % são resistentes à carbenicilina. A resistência à cefalotina, tal como a verificada para a associação amoxicilina + ácido clavulânico, é de cerca de 9 %.

O comportamento natural destas espécies inclui resistência às aminopenicilinas e às carboxipenicilinas, mas susceptibilidade aos outros grupos β -lactâmicos. Este fenótipo é determinado pela produção natural, constitutiva e em baixo nível de uma β -lactamase cromossômica de largo espectro, SHV-1 (em *K. pneumoniae*) e K-1 (em *K. oxytoca*).

Uma baixa expressão desta enzima, nos isolados provenientes da água e, eventualmente, em alguns isolados, a sua ausência, justificam a menor resistência à ampicilina e carbenicilina.

A resistência observada em algumas estirpes à cefoxitina, poder-se-á atribuir a deficiência em porinas ou outro mecanismo, o que implica um estudo mais aprofundado.

As dificuldades em obter um número superior de estirpes prendeu-se com a necessidade de obtenção de colónias perfeitamente isoladas, com interferência da temperatura de incubação, com o reduzido volume de amostra que, por vezes, se

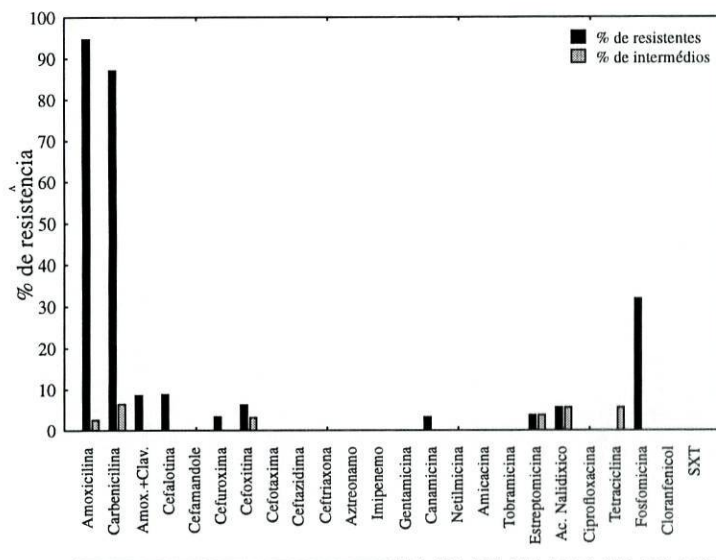


Figura 4.4: Percentagens de resistência aos antibióticos de *Klebsiella* spp.

utilizava, e com o facto de se ter evitado, sempre que possível, retirar mais de seis colónias de cada amostra, no intuito de se afastarem possíveis "clones".

4.4 Transferência genética da resistência

4.4.1 Ensaio de conjugação

Em estirpes de *E. coli* (n=6) e de *C. freundii* (n=10) com perfil sugestivo da presença de β -lactamase plasmídica, realizaram-se ensaios de conjugação com a estirpe receptora *E. coli* K802N e, em paralelo, efectuou-se a pesquisa de β -lactamases por focagem isoelectrica.

De todas as estirpes testadas só se obtiveram transconjugantes para duas (*E. coli* C248(82) e *E. coli* C306(52)). Posteriormente, efectuou-se a extracção plasmídica das células dessas estirpes e dos respectivos transconjugantes, realizando-se uma electroforese em gel de agarose (0,7 %), cujo resultado se ilustra na Figura 4.5.

Na figura apenas se representa a estirpe C306(52), uma vez que a extracção

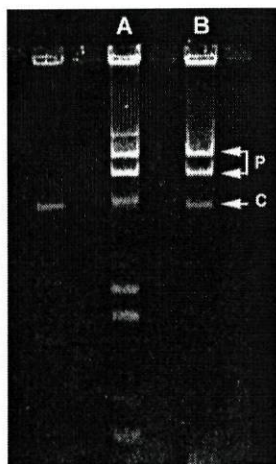


Figura 4.5: Visualização em gel de agarose do plasmídeo transferido por conjugação. A - *E. coli* C306(52); B - transconjugante.

plasmídica relativa à estirpe C248(82) não permitiu a visualização de quaisquer plasmídeos (devido, provavelmente a uma deficiente extracção). Na estirpe C306 (52), é possível verificar que, no respectivo transconjugante (B), se observam duas bandas que poderão corresponder a dois plasmídeos ou, então, a um só plasmídeo que se apresente em duas formas distintas, com peso molecular superior ao apresentado pela banda relativa ao DNA cromossómico (C).

O facto de se ter conseguido obter conjugação (com transferência genética de um plasmídeo que confere resistência à amoxicilina) parece ser de relevante importância uma vez que se tratam de estirpes do meio ambiente (água de consumo humano). Estes resultados vêm corroborar o argumentado por vários autores, que demonstraram já a possibilidade de existir transferência de informação genética entre bactérias, em ambiente aquático (Shaw & Cabelli, 1980; Sandt & Herson, 1991; Fernandez-Astorga *et al.*, 1992).

4.5 Caracterização bioquímica e genómica de *R. aquatilis*

R. aquatilis é um bacilo Gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. O seu habitat natural é a água, de onde várias estirpes foram já isoladas (Farmer

et al., 1985). Encontra-se amplamente distribuída no ambiente (Berge *et al.*, 1991; Heron *et al.*, 1993), foi já observada elevada incidência em peixe, leite pasteurizado e carne picada (Lindberg *et al.*, 1998) e tem sido, ocasionalmente, associada a infecções humanas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Harrell *et al.*, 1989a; Alballaa *et al.*, 1992; Hoppe *et al.*, 1993; Maraki *et al.*, 1994). Por esta razão alguns autores consideram-na como um patógeno oportunista (Caroff *et al.*, 1998).

Em 1976, Gavini *et al.* (1976), utilizando características fenotípicas e taxonomia numérica, identificaram um novo grupo na família *Enterobacteriaceae* que designaram H₂. Em 1979, através de técnicas de hibridação DNA-DNA, verificou-se que as estirpes do grupo H₂ possuíam uma relação genética muito próxima entre elas, mas que não se relacionavam com outros membros da família *Enterobacteriaceae* (Izard *et al.*, 1979).

Assim, foi proposta a introdução de um novo género, *Rahnella*, para incluir a espécie *R. aquatilis*. O nome *Rahnella* foi atribuído em honra do microbiólogo Otto Rahn e o epíteto específico *aquatilis* exprime a origem aquática destas estirpes.

A caracterização do comportamento desta espécie aos agentes antimicrobianos, bem como a própria identificação das estirpes, tem sido insuficiente e confusa (Harrell *et al.*, 1989a; Alballaa *et al.*, 1992). É difícil de distinguir de outras enterobactérias e, dada a sua proximidade ao complexo *Enterobacter agglomerans-Erwinia herbicola*, algumas estirpes poderão ser confundidas com esta espécie (Farmer *et al.*, 1985).

4.5.1 Identificação e caracterização bioquímica

No presente trabalho foram isoladas, de amostras de água provenientes de poços da localidade de Eiriz (Paços de Ferreira), cinco estirpes (C109(17), C110(20), C125(43), C141(89) e C142(89)) pertencentes à espécie *R. aquatilis*. As estirpes foram inicialmente identificadas pelo Api 32GN (API/bioMérieux) que as identificou com 99 %, 83,5 %, 98,6 %, 83,5 % e 99,5 % de certeza, respectivamente.

A identificação foi confirmada pela utilização de testes bioquímicos convencionais, cujas reacções exibidas por cada uma das estirpes, incluindo a estirpe de referência *R. aquatilis* ATCC 33071, se ilustram na Tabela 4.3.

Os resultados obtidos para as reacções bioquímicas estão de acordo com o descrito por Farmer *et al.* (1985) para a espécie *R. aquatilis*.

Tabela 4.3: Reacções bioquímicas das estirpes de *R. aquatilis* isoladas neste estudo comparadas com as da estirpe-tipo.

Reacções bioquímicas	C109(17)	C110(20)	C125(43)	C141(89)	C142(89)	ATCC 33071
Gli	+	+	+	+	+	+
Lac	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Gás/48h	+	+	+	+	+	+
Mob 37°C	-	-	-	-	-	-
Mob 22°C	+	+	+	+	+	+
Ind	-	-	-	-	-	-
Ureia	-	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+	+
App	fraca/+	fraca/+	fraca/+	fraca/+	fraca/+	fraca/+
MR	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+

4.5.2 Perfil de susceptibilidade face aos agentes antimicrobianos

Os resultados da avaliação da susceptibilidade aos antibióticos, apresentada pelas estirpes, efectuada pelo método de difusão em agar com discos (NCCLS, 1995), encontram-se representados na Tabela 4.4.

Em todas as estirpes verificou-se resistência à amoxicilina, carbenicilina, cefalotina e cefuroxima e susceptibilidade à associação amoxicilina + ácido clavulânico, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima e aztreonamo.

Os valores das CIMs para alguns antibióticos β -lactâmicos, determinados de acordo com o método do E-test, estão representados na Tabela 4.5.

Com base nestes valores foi construído um dendograma de modo a determinar similaridades entre as diferentes estirpes de *R. aquatilis* (Figura 4.6). Para tal foi utilizado o *PRIMER* (um conjunto de programas desenvolvido no Laboratório Marítimo de Plymouth). As técnicas analíticas utilizadas estão descritas em Clarke & Warwick (1994). O resultado desta análise permite visualizar a existência de dois grupos ligeiramente distintos (cerca de 80 % de similaridade). Estes resultados são corroborados quer pela "percentagem de certeza na identi-

Tabela 4.4: Susceptibilidade aos agentes antimicrobianos das estirpes de *R. aquatilis* estudadas no presente trabalho.

Antibiótico	ATCC 33071	Estirpe				
		C109(17)	C110(20)	C125(43)	C141(89)	C142(89)
Amoxicilina	R(0)	R(11)	R(12)	R(0)	R(12)	R(0)
Carbenicilina	R(0)	R(0)	R(9)	R(0)	R(14)	R
Amoxicilina+Ác.Clavulânico	S(33)	S(30)	S(28)	S(26)	S(28)	S
Cefalotina	R(0)	R(13)	R	R(0)	R	R(0)
Cefamandol	S(18)	S(21)	S(24)	R	S(24)	MS(15)
Cefuroxima	R(12)	R(9)	R(10)	R(0)	R(10)	R(0)
Cefoxitina	S(20)	S(27)	S(25)	S(24)	S(27)	S(22)
Cefotaxima	S(26)	S	S	S	S	S
Ceftazidima	S(35)	S	S(32)	S(30)	S(34)	S(30)
Aztreonamo	S(45)	S(34)	S(34)	S(32)	S(36)	S(30)
Imipenemo	S(36)	S(38)	S(36)	S(36)	S(34)	S(32)
Canamicina	S(40)				S	S(29)
Netilmicina		S(28)	S(26)	S(28)	S(28)	S(26)
Neomicina	S(26)	S(24)	S(22)	S(24)	S(24)	S(24)
Amicacina	S(30)	S(32)	S(28)	S(30)	S(30)	S(24)
Tobramicina	S(29)	S(28)	S(26)	S	S(28)	S(24)
Estreptomicina	S(?)		S	S	S	S(21)
Ác.Nalidíxico	S(27)	S(26)	S(20)	S(28)	S(24)	S(23)
Norfloxacina		S(34)	S(28)	S(30)	S(32)	S(30)
Ciprofloxacina	MS(18)	S(38)	S(28)	S(31)	S(32)	S(30)
Tetraciclina	I(17)	S	S		S	S(22)
Cloranfenicol	S(19)	R(0)	S(20)	R(14)	S(22)	S(18)
Sxt	MS(14)	S(34)	S(28)	S(32)	S(28)	S(28)

ficção”indicada na leitura do API 32GN, quer pelos valores de susceptibilidade aos diferentes antibióticos (ver Tabela 4.4).

A estirpe C142(89) foi a que apresentou uma maior similaridade com a estirpe tipo ATCC 33071.

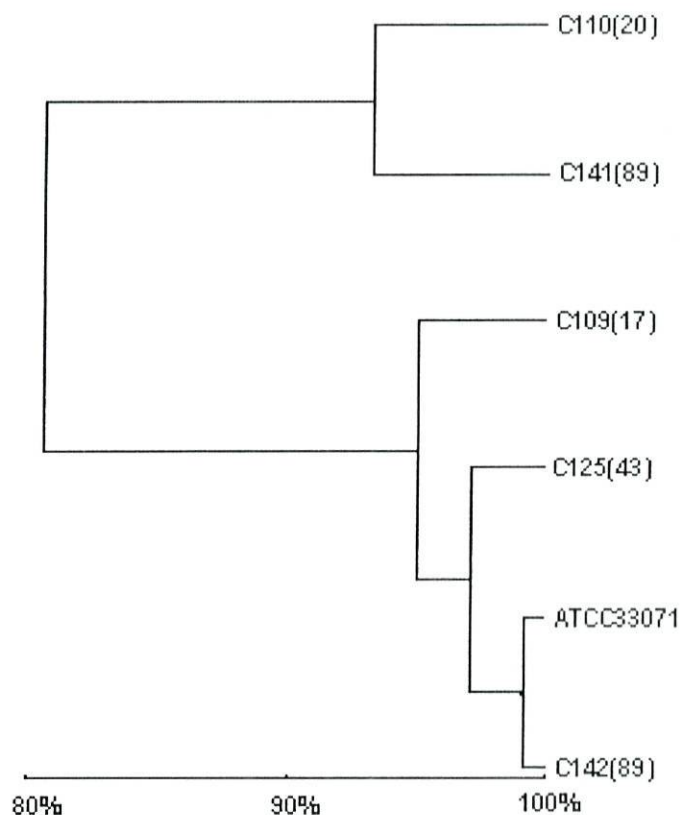


Figura 4.6: Dendrograma que ilustra a relação entre as estirpes de *R. aquatilis* estudadas, construído com base nos valores das CIMs.

4.5.3 Perfil β -lactamásico

Para além da caracterização do comportamento destas estirpes aos agentes antimicrobianos, foi efectuado também um ensaio de indução, utilizando-se, para o efeito, discos de cefoxitina e de cefuroxima. No entanto, não se verificou que a cefoxitina fosse capaz de induzir a produção de β -lactamases, ao contrário do

Tabela 4.5: CIMs ($\mu\text{g/ml}$) determinadas para alguns antibióticos β -lactâmicos em *R. aquatilis*

Antibiótico	ATCC 33071	C109(17)	Estirpe			
			C110(20)	C125(43)	C141(89)	C142(89)
Amoxicilina	>256	>256	>256	>256	>256	>256
Amoxicilina + Ac. Clavulânico	2	1	1	2	1	1
Cefalotina	>256	>256	96	>256	128	>256
Cefotaxima	3	2	2	8	6	6
Cefoxitina	4	2	2	4	3	4
Ceftazidima	0,5	0,25	0,38	0,75	0,5	0,5
Ceftriaxona	6	3	4	12	3	8
Mecilinamo	2	0,38	0,5	0,75	0,5	0,5
Piperacilina	24	12	16	32	16	24
Piperacilina + Tazobactam	4	1,5	2	3	3	2

verificado num estudo com isolados clínicos de feridas cirúrgicas (Maraki *et al.*, 1994). Neste estudo, os autores verificaram que a cefoxitina induzia a produção de β -lactamases, antagonizando a actividade da cefotaxima.

No que respeita à pesquisa de β -lactamases, realizada por focagem isoelectrica, em duas das estirpes testadas (C110(20) e a estirpe de referência *R. aquatilis* ATCC 33071) não se verificou actividade β -lactamásica, mesmo após ensaios de indução. Nas restantes estirpes foi possível visualizar uma única banda cujo pI variou entre 7,2 (para a estirpe C125(43)), 7,3 (para a estirpe C142(89)) e 7,8 (nas estirpes C109(17) e C141(89)).

Os resultados obtidos nos ensaios de conjugação, realizados entre estas estirpes e a estirpe receptora *E. coli* K802N, bem como a extração de DNA plasmídico, não permitiram associar o comportamento de resistência das estirpes a elementos genéticos extra-cromossómicos.

O comportamento observado, sugestivo da presença de uma β -lactamase do grupo 2 da classificação de Bush (Bush *et al.*, 1995), partilhado por todas as estirpes de *R. aquatilis* estudadas, é distinto do descrito anteriormente (perfil AmpC) em vários trabalhos publicados (Maraki *et al.*, 1994). Contudo, estudos mais aprofundados de cinética enzimática com vários substratos e inibidores de β -lactamases são necessários para avaliar a presença, em enterobactérias, de uma nova enzima com actividade cefuroximásica e concretizar a sua classificação definitiva. Produção de cefuroximase também inibida pelo ácido clavulânico, mas com reduzida actividade hidrolítica sobre a carbenicilina foi descrita em *Proteus*

vulgaris e *Citrobacter diversus*.

Assim, pode assumir-se que *R. aquatilis* será naturalmente resistente à amoxicilina, carbenicilina, cefalotina e cefuroxima, por produção de β -lactamase cromossómica e que este fenótipo comum a todas as estirpes estudadas, poderá constituir um critério a ser utilizado na identificação desta espécie.

4.5.4 "Fingerprinting" genómico de estirpes de *R. aquatilis*. Utilidade na identificação e diferenciação desta espécie

O perfil genómico das estirpes isoladas e da estirpe de referência, obtido por ERIC-PCR com utilização de *ReadyMix RedTaq* encontra-se representado na Figura 4.7.

Verifica-se que existe uma grande heterogeneidade nas bandas electroforéticas das várias estirpes testadas.

A heterogeneidade genómica observada poderá relacionar-se com:

- inadequação das condições experimentais utilizadas. Contudo, o método foi utilizado por outros autores que obtiveram excelentes resultados, com os primers ERIC, quer em estirpes de *R. aquatilis* do solo (Ienska Pobell *et al.*, 1995), quer em outras espécies como *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* (Liu *et al.*, 1995b), *Shigella sonnei* (Liu *et al.*, 1995a), *Bartonella* (Rodríguez-Barradas *et al.*, 1995), *Vibrio cholerae* (Rivera *et al.*, 1995), *Mycobacterium tuberculosis* (Sechi *et al.*, 1998) e mesmo em cianobactérias (Rasmussen & Svenning, 1998).
- a diversidade genómica inerente às estirpes estudadas, o que deverá implicar uma melhor caracterização das estirpes classificadas como *R. aquatilis*. Estas observações são corroboradas por um trabalho recente, em que Brenner *et al.* (1998) sugerem a existência de genomoespécies dentro do género *Rahnella*.

Efectuaram-se várias aproximações ao "fingerprinting" genómico destas estirpes, utilizando vários tampões e adjuvantes para optimização da técnica.

O ERIC-PCR, com tampão PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 35 mM MgCl₂, 750 mM KCl) e o glicerol (15 %), como adjuvante, foi utilizado no estudo genómico das estirpes de *R. aquatilis* isoladas (Figura 4.8).

O "fingerprinting", obtido com estas condições técnicas, parece permitir um maior poder discriminatório relativamente ao obtido com a *ReadyMix RedTaq* (Sigma).

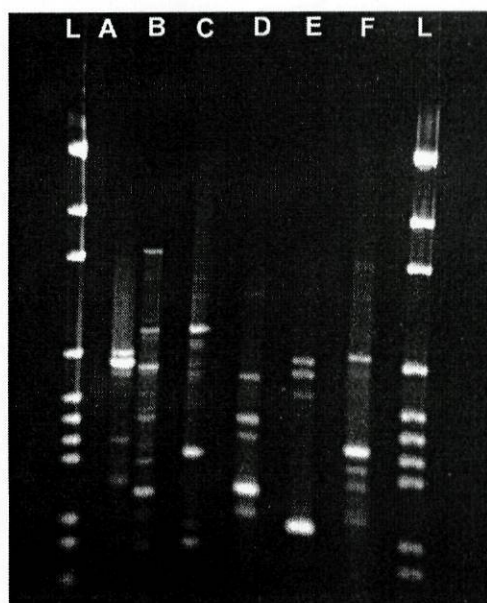


Figura 4.7: Visualização em gel de agarose do resultado do ERIC - PCR, utilizando *ReadyMix RedTaq*. *L* - PGem; *A* - ATCC33071; *B* - C109(17); *C* - C110(20); *D* - C125(43); *E* - C141(89); *F* - C142(89).

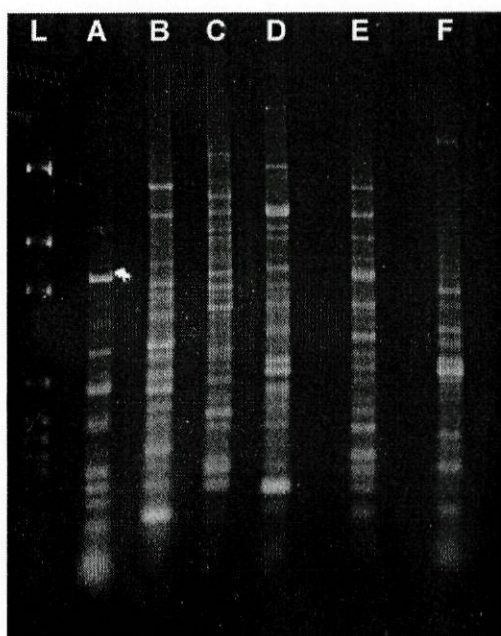


Figura 4.8: Visualização em gel de agarose do resultado do ERIC - PCR, utilizando tampão PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 35 mM MgCl₂, 750 mM KCl) e glicerol (15 %). *L* - PGem; *A* - C109(17); *B* - C110(20); *C* - C125(43); *D* - C141(89); *E* - C142(89); *F* - ATCC33071.

Com base no perfil de bandas obtido por ERIC-PCR (utilizando tampão PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 35 mM MgCl₂, 750 mM KCl) e glicerol (15 %)), construiu-se uma matriz binária de presença-ausência (1 para a presença de banda de determinado peso molecular e 0 para a sua ausência). Com estes dados foi possível obter um dendograma filogenético (por UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Averages*) utilizando o programa de análise bioestatística NTSYS-PC (Applied Biostatistics, Inc.) (Figura 4.9).

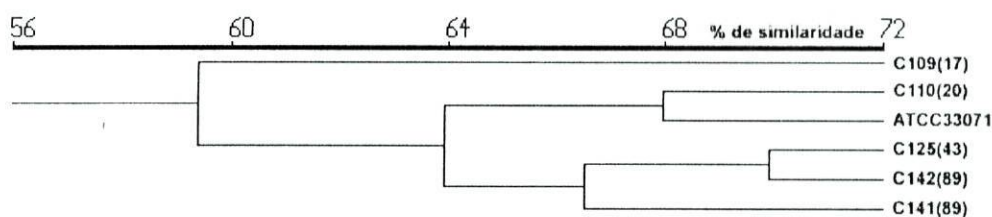


Figura 4.9: Dendograma que ilustra a relação entre as estirpes estudadas, construído com base no seu perfil genómico (ERIC-PCR)

A heterogeneidade das estirpes, traduzida pela percentagem de similaridade, não permitiu o estabelecimento de um padrão característico para a espécie. No entanto, observou-se uma maior afinidade entre as estirpes C125(43) e C142(89) e entre a C110(20) e a ATCC 33071. Estes dados parecem estar de acordo com o perfil β -lactamásico obtido.

A aplicação de ERIC-PCR tinha sido descrita por lenska Pobell *et al.* (1995) em *R. aquatilis*, nomeadamente na estirpe-tipo *R. aquatilis* ATCC 33071. Todavia, estes autores apenas utilizaram o primer ERIC C2, pelo que o perfil genómico obtido para a mesma estirpe, neste trabalho, não poderá ser comparado.

Os resultados de PCR obtidos, denotam boa reprodutibilidade, não se podendo assumir, no entanto, quaisquer valores, uma vez que não se realizou um estudo aprofundado de reprodutibilidade do método.

A reprodutibilidade do rep-PCR deve-se ao facto de utilizar primers complementares a sequências particulares que se encontram dispersas em "clusters" nos genomas bacterianos, o que permite a utilização de condições restritas e específicas para o PCR.

4.6 Caracterização de uma estirpe de *S. marcescens* resistente ao imipenemo

No presente estudo, foi isolada numa água proveniente de um poço de Valongo, uma estirpe da espécie *S. marcescens* C171(17) que, por apresentar resistência ao imipenemo, suscitou interesse em se esclarecer o mecanismo dessa resistência. O antibiograma desta estirpe revelou o aparecimento de pequenas colónias no halo de inibição relativo ao disco de imipenemo. O sistema API 32GN identificou a estirpe como *S. marcescens* com 95,9 % de certeza. As CIMs obtidas, para alguns antibióticos β -lactâmicos, foram as seguintes: Amox ($>256 \mu\text{g/ml}$), AMC ($>256 \mu\text{g/ml}$), CF ($>256 \mu\text{g/ml}$), CXM ($>256 \mu\text{g/ml}$), etc. Quanto ao imipenemo, às 24h, o valor da CIM era de $1 \mu\text{g/ml}$, mas já se visualizavam algumas colónias que, às 48h, se verificou serem resistentes com uma CIM $> 32 \mu\text{g/ml}$.

Efectuou-se, então, um bioensaio em que se pretendeu verificar a presença de actividade β -lactamásica. O facto de não se ter verificado degradação do imipenemo, nem mesmo quando se usou uma grande quantidade de extracto ($200 \mu\text{l}$), permitiu inferir a não existência de uma enzima com actividade sobre o imipenemo e que, provavelmente, um outro mecanismo de resistência estivesse envolvido, como a diminuição da expressão de determinadas porinas da membrana externa.

O isolamento das proteínas da membrana externa da estirpe em estudo e a separação por electroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS, permitiu a obtenção dos perfis representados na Figura 4.10.

P é o padrão de pesos moleculares (MW-SDS-70L Kit da Sigma); com a letra *A* está representado o perfil de bandas da estirpe C171 (17) que cresceu na ausência do imipenemo; *B* refere-se à mesma estirpe que se revelou resistente ao imipenemo no antibiograma, mas cujo crescimento exponencial, para obtenção da membrana externa, foi feito na ausência de imipenemo; a letra *C* diz respeito à mesma estirpe de *B*, mas cujo crescimento exponencial foi obtido na presença de uma concentração sub-inibitória de imipenemo; com a letra *D* representa-se o perfil de bandas de uma estirpe de *S. marcescens* sensível ao imipenemo, utilizada como controlo.

Da análise, um pouco mais detalhada, da Figura 4.10 é possível constatar que a estirpe que cresceu na total ausência de imipenemo (*A*) apresenta um perfil de bandas semelhante ao da estirpe sensível ao imipenemo, usada como controlo (*D*). Denota-se uma ligeira diminuição numa das bandas (com cerca de 40 KDa) da estirpe cujo crescimento exponencial foi realizado na ausência de imipenemo, mas que tinha sido seleccionada em meio com imipenemo (*B*). Em *C* nota-se

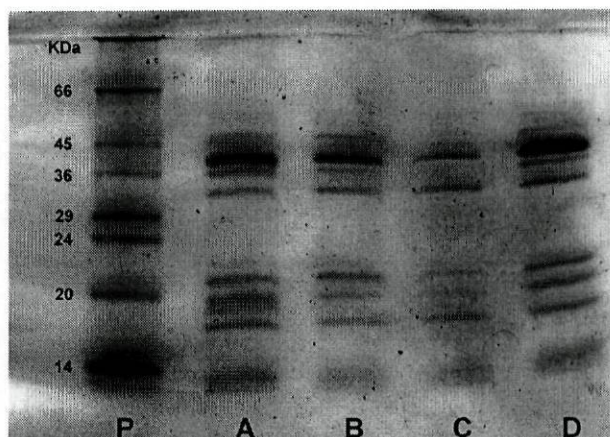


Figura 4.10: Separação electroforética em SDS-PAGE das proteínas da membrana externa de *S. marcescens*.

claramente uma diminuição dessa mesma banda e, para além dessa diminuição, verifica-se também a ausência de outras duas (37 e 41 KDa).

Estes resultados, em conjunto com o facto de se ter verificado a não existência de uma β -lactamase com actividade sobre carbapenemos, leva a concluir que o mecanismo de resistência ao imipenemo verificado na estirpe em estudo, poderá estar relacionado com a diminuição da expressão de porinas na sua membrana externa. Contudo, não se pode excluir a possibilidade da contribuição de outros mecanismos, como a produção de β -lactamase cromossómica, para o comportamento observado (Hechler *et al.*, 1989).

Um aspecto também curioso foi o facto de se ter verificado que, em presença de imipenemo, a estirpe manifestava um aumento de pigmentação, o que por analogia com a expressão de pioverdina em *Pseudomonas aeruginosa* submetida a concentrações sub-terapêuticas de ciprofloxacina, sugere o envolvimento de bombas de efluxo (*Obs. pess.*). Estudos posteriores poderão esclarecer a contribuição de sistemas de efluxo para a resistência observada.

O perfil apresentado pelas estirpes C171(17), nas diferentes condições testadas, parece demonstrar a mutação adaptativa que confere resistência aos antibióticos defendida por Baquero *et al.* (1998). Segundo estes autores, na presença de um antibiótico que diminui o número de bactérias mas, ao mesmo tempo, produz variação genética, esta poderá permitir, aos sobreviventes, adaptação ao contacto, de novo, com o antibiótico.

Capítulo 5

Conclusões

Tendo em conta a menor concentração de agentes antimicrobianos na matriz em estudo (água), prever-se-ia uma menor incidência de estirpes resistentes, relativamente às isoladas de infecções humanas, o que foi verificado.

Verificou-se, na maioria das estirpes de *E. coli*, um comportamento aos antibióticos β -lactâmicos testados, compatível com a sua classificação como estirpes sensíveis, do ponto de vista farmacológico. Contudo, a expressão, em baixo nível, de resistência, em cerca de 32 % das estirpes, poderá conferir-lhes vantagens adaptativas aquando do contacto com estes antibióticos.

Apenas 55 % das estirpes de *E. cloacae* e 37 % das estirpes de *C. freundii* apresentaram o fenótipo de resistência assumido como fenótipo natural para estas espécies. Um alargamento do estudo efectuado permitirá rever e esclarecer o fenótipo selvagem atribuído às espécies *E. cloacae* e *C. freundii*.

O facto de se ter observado, em plasmídeos conjugativos, genes de resistência, e tendo em conta a transferência genética, por conjugação, no meio aquático, poder-se-á perspectivar a possibilidade destas bactérias serem fonte e reservatório de genes de resistência.

É de relevância o isolamento de uma estirpe de *S. marcescens*, uma bactéria frequentemente associada a infecções nosocomiais, com reduzida susceptibilidade ao imipenemo. Os estudos efectuados, nesta bactéria, permitiram observar a diminuição da expressão de porinas envolvidas na entrada dos antibióticos β -lactâmicos.

Foi possível observar-se um fenótipo de resistência típico (amoxicilina, carbenicilina, cefalotina e cefuroxima) em todas as estirpes de *R. aquatilis* isoladas, pelo que este poderá constituir um auxílio à sua identificação.

A provável associação a uma β -lactamase cromossómica, do fenótipo de re-

sistência observado, justifica a sua posterior caracterização.

Verificou-se uma grande variabilidade genômica, por ERIC-PCR, entre as estirpes estudadas, que poderá ficar a dever-se a problemas técnicos inerentes ao método utilizado, ou que traduzirá a diversidade genômica nestas estirpes, que poderão ser consideradas genomoespécies.

A diversidade genômica observada justifica um estudo mais aprofundado, com aplicação de outras técnicas de "fingerprinting" e sequenciação do rRNA 16S, que permitam esclarecer o real significado desta observação.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, e avaliando a crescente importância desta problemática, e seu impacto na saúde pública, julgo indispensável, a curto prazo, a criação de uma rede de monitorização. Rede essa que, ao longo de um determinado período de tempo e, abrangendo uma vasta área geográfica, permitisse avaliar a evolução do aparecimento de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos, em águas de consumo, seus padrões de distribuição e grau de resistência, evidenciando, assim, a importância da água como reservatório e fonte de genes de resistência.

Bibliografia

- ACAR, J. & COURVALIN, P., 1998. La fin de l'âge d'or des antibiotiques. *La Recherche* **314**: 50–52.
- ALBALLAA, S. R., QADRI, S. M., AL FURAYH, O. & AL QATARY, K., 1992. Urinary tract infection due to *Rahnella aquatilis* in a renal transplant patient. *J. Clin. Microbiol.* **30(11)**: 2948–2950.
- ALCAIDE, E. & GARAY, E., 1984. R-plasmid transfer in *Salmonella* spp. isolated from wastewater and sewage-contaminated surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **48(2)**: 435–438.
- ALTHERR, M. R. & KASWECK, K. L., 1982. In situ studies with membrane diffusion chambers of antibiotic resistance transfer in *Escherichia col.* *Appl. Environ. Microbiol.* **44(4)**: 838–843.
- AMARO, C., AZNAR, R., GARAY, E. & ALCAIDE, E., 1988. R plasmids in environmental *Vibrio cholerae* non-O1 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **54(11)**: 2771–2776.
- ANAND, A. C., KATARIA, V. K., SINGH, W. & CHATTERJEE, S. K., 1990. Epidemic multiresistant enteric fever in Eastern India. *Lancet* **335**: 352.
- APHA, AWWA & WEF, 1992. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, Washington D. C., 18th edn.
- ARMSTRONG, J. L., CALOMIRIS, J. J. & SEIDLER, R. J., 1982. Selection of antibiotic-resistant standard plate count bacteria during water treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* **44(2)**: 308–316.

- ARMSTRONG, J. L., SHIGENO, D. S., CALOMIRIS, J. J. & SEIDLER, R. J., 1981. Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **42(2)**: 277–283.
- ARSTILA, T., JACOBY, G. A. & HUOVINEN, P., 1993. Evaluation of five different methods to prepare bacterial extracts for the identification of β -lactamases by isoelectric focusing. *J. Antimicrob. Chemother.* **32**: 809–816.
- ARTHUR, M., BRISSON, A., CARLIER, C., COURVALIN, P., DERLOT, E., GERBAUD, G., LECLERCQ, R., MARTIN, P., OUNISSI, H. & TRIEU-CUOT, P., 1985. Technique d'étude du support génétique de la résistance aux antibiotiques. In *L'Antibiogramme* (Eds. P. Courvalin, F. Goldstein, A. Philippon & J. Sirrot). MPC-Vidéom.
- BALLESTERO, S., FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A., VILLAVARDE, R., ESCOBAR, H., PÉREZ-DÍAZ, J. C. & BAQUERO, F., 1996. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**: 39–45.
- BAQUERO, F., NEGRI, M. C., MOROSINI, M. I. & BLÁZQUEZ, J., 1998. Antibiotic-selective environments. *Clin. Infect. Dis.* **27(Supp 1)**: S5–S11.
- BARRY, A. L. & THORNSBERRY, C., 1985. Susceptibility tests: diffusion test procedures. In *Manual of clinical microbiology* (Eds. E. H. Lennette, A. Belows, W. J. Hausler & H. J. Shadomy), pp. 978–987, Washington D. C. American Society For Microbiology.
- BAUR, B., HANSELMANN, K., SCHLIMME, W. & JENNI, B., 1996. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(10)**: 3673–3678.
- BAYA, A. M., BRAYTON, P. R., BROWN, V. L., GRIMES, D. J., RUSSEK-COHEN, E. & COLWELL, R. R., 1986. Coincident plasmids and antimicrobial resistance in marine bacteria isolated from polluted and unpolluted Atlantic Ocean samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **51(6)**: 1285–1292.
- BELL, J. B., ELLIOTT, G. E. & SMITH, D. W., 1983. Influence of sewage treatment and urbanization on selection of multiple resistance in fecal coliform populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **46(1)**: 227–232.

- BELL, J. B., MACRAE, W. R. & ELLIOTT, G. E., 1981. R factors in coliform-fecal coliform sewage flora of the prairies and northwest territories of Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**(2): 204–210.
- BENNETT, P. M. & CHOPRA, I., 1993. Molecular basis of β -lactamase induction in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**(2): 153–158.
- BERGE, O., HEULIN, T., ACHOUAK, W., RICHARD, C., BALLY, R. & BALAN-DREAU, J., 1991. *Rahnella aquatilis*, a nitrogen-fixing bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize. *Can. J. Microbiol.* **37**: 195–203.
- BERGMANS, H. E. N., DIE, I. M. V. & HOEKSTRA, W. P. M., 1981. Transformation in *Escherichia coli*: stages in the process. *J. Bacteriol.* **146**(2): 564–570.
- BOULTON, M. G. & ORR, D. C., 1983. Detection of bacterial penicillin-binding proteins and their role in the interpretation of the mode of action of β -lactam antibiotics. In *Antibiotics*, pp. 161–181. American Society for Applied Bacteriology.
- BRENNER, D. J., MÜLLER, H. E., STEIGERWALT, A. G., WHITNEY, A. M., O'HARA, C. M. & KÄMPFER, P., 1998. Two new *Rahnella* genomospecies that cannot be phenotypically differentiated from *Rahnella aquatilis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 141–149.
- BRUIJN, F. J. D., 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(7): 2180–2187.
- BURTON, N. F., MARTIN, J. D. & BULL, A. T., 1982. Distribution of bacterial plasmids in clean and polluted sites in a south Wales river. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**(5): 1026–1029.
- BUSH, K., 1989. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 259–263.
- BUSH, K., JACOBY, G. A. & MEDEIROS, A. A., 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**(6): 1211–1233.

- BUTTIAUX, R., BEERENS, H. & TACQUET, A., 1974. *Manuel de techniques bactériologique*. Flammarion Médecine-Sciences, 4th edn.
- CA-SFM, 1996. Communiqué. *Path. Biol.* **44(8)**: I–VIII.
- CALDWELL, B. A., YE, C., GRIFFITHS, R. P., MOYER, C. L. & MORITA, R. Y., 1989. Plasmid expression and maintenance during long-term starvation-survival of bacteria in well water. *Appl. Environ. Microbiol.* **55(8)**: 1860–1864.
- CALOMIRIS, J. J., ARMSTRONG, J. L. & SEIDLER, R. J., 1984. Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **47(6)**: 1238–1242.
- CARNEIRO, G., SOUSA, J. C., QUEIRÓS, M. L., GUIMARÃES, C., PEIXE, L. & FERREIRA, M. H., 1993. Comportamento, *in vitro*, de estirpes patogénicas hospitalares de *Enterobacter cloacae* face aos antibióticos β -lactâmicos. *Rev. Port. D. Infecç.* **16(2)**: 119–123.
- CAROFF, N., CHAMOUX, C., GALLOU, F. L., ESPAZE, E., GAVINI, F., GAUTREAU, D., RICHET, H. & REYNAUD, A., 1998. Two epidemiologically related cases of *Rahnella aquatilis* bacteremia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**: 349–352.
- CASSELL, G. H., 1995. ASM task force urges broad program on antimicrobial resistance. *ASM News* **61(3)**: 116–120.
- CLARKE, K. R., 1993. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* **18**: 117–143.
- CLARKE, K. R. & WARWICK, R. M., 1994. *Change in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation*. Plymouth Marine Laboratory, Plymouth.
- COHEN, M. L., 1994. Antimicrobial resistance: prognosis for public health. *Trends Microbiol.* **2**: 422–425.
- COLEMAN, K., ATHALYE, M., CLANCEY, A., DAVISON, M., PAYNE, D. J., PERRY, C. R. & CHOPRA, I., 1994. Bacterial resistance mechanisms as therapeutic targets. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**: 1091–1116.

- CORLISS, T. L., COHEN, P. S. & CABELLI, V. L., 1981. R-Plasmid transfer to and from *Escherichia coli* strains isolated from human fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **41(4)**: 959–966.
- CORPET, D., 1998. Viande: après les hormones, les antibiotiques? *La Recherche* **314**: 59–61.
- CORPET, D. E., 1993. An evaluation of methods to assess the effect of antimicrobial residues on the human gut flora. *Vet. Microbiol.* **35**: 199–212.
- COURVALIN, P., 1996. Evasion of antibiotic action by bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**: 855–869.
- COURVALIN, P., GOLDSTEIN, F., PHILIPPON, A. & SIRROT, J., 1985. *L'Antibiogramme*. MPC-Vidéom, 1st edn.
- DARWIN, C., 1859. *On the origin of species*. John Murray, Londres.
- DAVIES, J., 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**: 375–382.
- DAVIES, J. E., 1993. Grandeur et décadence des antibiotiques. *La Recherche* **24**: 1354–1361.
- DEFLAUN, M. F., PAUL, J. H. & DAVIS, D., 1986. Simplified method for dissolved DNA determination in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **52(4)**: 554–659.
- DEVER, L. A. & DERMODY, T. S., 1991. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch. Intern. Med.* **151**: 886–895.
- DGA, 1998. *Controlo da qualidade da água de abastecimento para consumo humano em 1997*. Ministério do Ambiente - Direcção Geral do Ambiente.
- DOMENICO, P., MARX, J. L., SCHOCH, P. E. & CUNHA, B. A., 1992. Rapid plasmid DNA isolation from mucoid Gram-negative bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **30(11)**: 2859–2863.
- DUDLEY, M., 1995. Bacterial resistance mechanisms to β -lactam antibiotics: assessment of management strategies. *Pharmacotherapy* **15**: 9S–14S.

- EDEN, K. V., ROSENBERG, M. L., STOOPLER, M., WOOD, B. T., HIGHSMITH, A. K., SKALIY, P., WELLS, J. G. & FEELEY, J. C., 1977. Waterborne gastrointestinal illness at a ski resort - isolation of *Yersinia enterocolitica* from drinking water. *Public Health Rep.* **92(3)**: 245-250.
- ESPINASSE, J., 1993. Responsible use of antimicrobials in veterinary medicine: perspectives in France. *Vet. Microbiol.* **35**: 289-301.
- EWALD, P. W., 1991. Waterborne transmission and the evolution of virulence among gastrointestinal bacteria. *Epidemiol. Infect.* **106**: 83-119.
- FALCONER, I. R., BURCH, M. D., STEFFENSEN, D. A., CHOICE, M. & COVERDALE, O. R., 1994. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **9**: 131-139.
- FARMER, J. J., DAVIS, B. R., HICKMAN-BRENNER, F. W., MCWHORTER, A., HUNTLEY-CARTER, G. P., ASBURY, M. A., RIDDLE, C., WATHEN-GRADY, H. G., ELIAS, C., FANNING, G. R., STEIGERWALT, A. G., O'HARA, C. M., MORRIS, G. K., SMITH, P. B. & BRENNER, D. J., 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **21(1)**: 46-76.
- FARMER, J. J. & KELLY, M. T., 1991. *Enterobacteriaceae*. In *Manual of clinical microbiology* (Eds. A. Balows, W. J. Hausler, K. L. Herrman, H. D. Isenberg & H. J. Shadomy), pp. 360-383, Washington D. C. American Society For Microbiology.
- FEINMAN, S. E., 1998. Antibiotics in animal feed - drug resistance revisited. *ASM News* **64(1)**: 24-30.
- FERNANDEZ-ASTORGA, A., MUELA, A., CISTERNA, R., IRIBERRI, J. & BARCINA, I., 1992. Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **58(1)**: 392-398.
- FERREIRA, F. A. G., 1992. *Moderna saúde pública*. Fundação Calouste Gulbenkian, 6th edn.
- FERREIRA, H. N., MILLER, G. H., VAZ, M., QUEIRÓS, M., PEIXE, L. V., SILVA, M. G., CARDOSO, O., LEITÃO, R. & SOUSA, J. C., 1994.

- Caracterização molecular da resistência bacteriana aos antibióticos aminoglicosídeos-aminociclitois em isolados clínicos hospitalares. *Arq. Med.* **8(3)**: 137–139.
- FERREIRA, H. N., SOUSA, J. C. & PEIXE, L. V., 1992. Caracterização das β -lactamases responsáveis pela resistência de estirpes hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* aos antibióticos β -lactâmicos. *Rev. Port. D. Infecç.* **15(3)**: 207–209.
- FINCH, R. G., 1998. Antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**: 125–128.
- FRENCH, G. L., LING, J., CHOW, K. L. & MARK, K. K., 1987. Occurrence of multiple antibiotic resistance and R-plasmids in gram-negative bacteria isolated from faecally contaminated fresh-water streams in Hong Kong. *Epidemiol. Infect.* **98**: 285–299.
- GALE, P., 1996. Developments in microbiological risk assessment models for drinking water - a short review. *J. Appl. Bacteriol.* **81**: 403–410.
- GAVINI, F., FERRAGUT, C., LEFEBVRE, B. & LECLERC, H., 1976. Étude taxonomique d'enterobacteries appartenant ou apparentées au genre *Enterobacter*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **127B**: 317–335.
- GEALT, M. A., CHAI, M. D., ALPERT, K. B. & BOYER, J. C., 1985. Transfer of plasmids pBR322 and pBR325 in wastewater from laboratory strains of *Escherichia coli* to bacteria indigenous to the waste disposal system. *Appl. Environ. Microbiol.* **49(4)**: 836–841.
- GELDREICH, E. E., 1989. Drinking water microbiology - new directions toward water quality enhancement. *Int. J. Food Microbiol.* **9**: 295–312.
- GELDREICH, E. E., 1990. Microbiological quality of source waters for water supply. In *Drinking water microbiology* (Ed. G. A. Mcfeters), pp. 3–31, New York. Springer-Verlag.
- GÖNÜL, S. A. & KARAPINAR, M., 1991. The microbiological quality of drinking water supplies of Izmir city: the incidence of *Yersinia enterocolitica*. *Int. J. Food Microbiol.* **13**: 69–74.

- GOLD, H. S. & MOELLERING, R. C., 1996. Antimicrobial drug resistance. *N. Engl. J. Med.* **335**(19): 1445–1453.
- GOOTZ, T. D., SANDERS, C. C. & GOERING, R. V., 1982. Resistance to cefamandole: derepression of β -lactamases by ceftioxin and mutation in *Enterobacter cloacae*. *J. Infect. Dis.* **146**: 34–42.
- GUPTA, B. L., BHUJWALA, R. A. & SHRINIWAS, 1990. Multiresistant *Salmonella typhi* in India. *Lancet* **336**: 252.
- HALL, R. L., 1997. Foodborne illness: implications for the future. *Emerg. Infect. Dis.* **3**: 555–559.
- HANCOCK, R. E. W., 1987. Role of porins in outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* **169**(3): 929–933.
- HARLEY, J. P. & PRESCOTT, L. M., 1993. *Laboratory exercises in microbiology*. Wm. C. Brown Publishers, 2nd edn.
- HARRELL, L. J., CAMERON, M. L. & O'HARA, C. M., 1989a. *Rahnella aquatilis*, an unusual gram-negative rod isolated from the bronchial washing of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **27**(7): 1671–1672.
- HARRELL, L. J., CAMERON, M. L. & O'HARA, C. M., 1989b. *Rahnella aquatilis*, an unusual Gram-negative rod isolated from the bronchial washing of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **27**(7): 1671–1672.
- HASHIZUME, T., SANADA, M., NAKAGAWA, S. & TANAKA, N., 1993. Alteration in expression of *Serratia marcescens* porins associated with decreased outer membrane permeability. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**: 21–28.
- HAYES, J. D. & WOLF, C. R., 1990. Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem. J.* **272**: 281–295.
- HAZEN, T. C. & TORANZOS, G. A., 1990. Tropical source water. In *Drinking water microbiology* (Ed. G. A. Mcfeters), pp. 32–54, New York. Springer-Verlag.

- HECHLER, U., WEGHE, M., MARTIN, H. & FRÈRE, J.-M., 1989. Overproduced β -lactamase and the outer membrane barrier as resistance factors in *Serratia marcescens* highly resistant to β -lactamase-stable β -lactam antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1275–1290.
- HEFFRON, F., RUBENS, C. & FALKOW, S., 1977. Transposition of a plasmid deoxyribonucleic acid sequence that mediates ampicillin resistance: identity of laboratory constructed plasmids and clinical isolates. *J. Bacteriol.* **129**(1): 530–533.
- HERON, S. J. E., WILKINSON, J. F. & DUFFUS, C. M., 1993. Enterobacteria associated with grass and silages. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 13–17.
- HESPANHOL, I. & PROST, A. M. E., 1994. WHO guidelines and national standards for reuse and water quality. *Wat. Res.* **28**(1): 119–124.
- HILL, D. R., 1993. Salmonellosis and typhoid fever. *Curr. Opinion Infect. Dis.* **6**: 54–62.
- HINDLER, J., 1998. Antimicrobial susceptibility testing. In *Essential procedures for clinical microbiology* (Ed. H. D. Isenberg), pp. 205–254, Washington D. C. American Society For Microbiology.
- HOPPE, J. E., HERTER, M., ALEKSIC, S., KLINGEBIEL, T. & NIETHAMMER, D., 1993. Catheter-related *Rahnella aquatilis* bacteremia in a pediatric bone marrow transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* **31**(7): 1911–1912.
- HUTSUL, J., WOROBEC, E., PARR, T. R. & BECKER, G. W., 1993. Comparative analysis of *Serratia* spp outer membrane porin proteins. *Can. J. Microbiol.* **39**: 442–447.
- ITO, H., ARAKAWA, Y., OSUKA, S., WACHROTAYANKUN, R., KATO, N. & OHTA, M., 1995. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla* IMP among clinical isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 824–829.
- IZARD, D., GAVINI, F., TRINEL, P. A. & LECLERC, H., 1979. *Rahnella aquatilis*, nouveau membre de la famille des *Enterobacteriaceae*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **130A**: 163–177.

- JACOBY, G. A. & ARCHER, G. L., 1991. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N. Engl. J. Med.* **324**(9): 601–612.
- JAIN, R. K., SAYLER, G. S., WILSON, J. T., HOUSTON, L. & PACIA, D., 1987. Maintenance and stability of introduced genotypes in groundwater aquifer material. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(5): 996–1002.
- JAWETZ, E., MELNICK, J. L. & ADELBERG, E. A., 1987. *Review of medical microbiology*. Appleton & Lange, California, 17th edn.
- JESUDASAN, M. V. & JOHN, T. J., 1990. Multiresistant *Salmonella typhi* in India. *Lancet* **336**: 252.
- JIANG, S. C. & PAUL, J. H., 1998. Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(8): 2780–2787.
- KADO, C. I. & LIU, S. T., 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**(3): 1365–1373.
- KASPAR, C. W., BURGESS, J. L., KNIGHT, I. T. & COLWELL, R. R., 1990. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* to identify sources of fecal contamination in water. *Can. J. Microbiol.* **36**: 891–894.
- KAYSER, F. H., 1993. Evolution of resistance in microorganisms of human origin. *Vet. Microbiol.* **35**: 257–267.
- KELLY, M. T., BRENNER, D. J. & FARMER, J. J., 1985. *Enterobacteriaceae*. In *Manual of clinical microbiology* (Eds. E. Lennette, A. Belows, W. J. H. JR & H. J. Shadomy), pp. 263–277, Washington D. C. American Society for Microbiology.
- KHALIL, K., LINDBLOM, G. B., MAZHAR, K. & KAIJSER, B., 1994. Flies and water as reservoirs for bacterial enteropathogens in urban and rural areas in and around Lahore, Pakistan. *Epidemiol. Infect.* **113**: 435–444.
- KRUMPERMAN, P. H., 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**(1): 165–170.
- KRUSE, H. & SØRUM, H., 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(11): 4015–4021.

- LABIA, R., MORAND, A., TIWARI, K., SIROT, J., SIROT, D. & PETIT, A., 1988. Interactions of new plasmid-mediated β -lactamases with third-generation cephalosporins. *Rev. Infect. Dis.* **10**: 885–891.
- LAMKA, K. G., LECHEVALLIER, M. W. & SEIDLER, R. J., 1980. Bacterial contamination of drinking water supplies in a modern rural neighborhood. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 734–738.
- LEDEBERG, J., 1997. Infectious diseases as an evolutionary paradigm. *Emerg. Infect. Dis.* **3**: 417–423.
- LEVY, S. B., 1998a. The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American* **278**(3): 32–39.
- LEVY, S. B., 1998b. Multidrug resistance - a sign of the times. *N. Engl. J. Med.* **338**(19): 1376–1378.
- LINDBERG, A. M., LJUNGH, A., AHRNÉ, S., LÖFDAHL, S. & MOLIN, G., 1998. *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *Int. J. Food Microbiol.* **39**: 11–17.
- LIU, P. Y.-F., LAU, Y.-J., HU, B.-S., SHYR, J.-M., SHI, Z.-Y., TSAI, W.-S., LIN, Y.-H. & TSENG, C.-Y., 1995a. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *J. Clin. Microbiol.* **33**(7): 1779–1783.
- LIU, P. Y.-F., SHI, Z.-Y., LAU, Y.-J., HU, B.-S., SHYR, J.-M., TSAI, W.-S., LIN, Y.-H. & TSENG, C.-Y., 1995b. Comparison of different PCR approaches for characterization of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **33**(12): 3304–3307.
- LIVERMORE, D. M., 1993. Carbapenemases: the next generation of β -lactamases? *ASM News* **59**(3): 129–135.
- LIVERMORE, D. M., 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**(4): 557–584.
- LIVERMORE, D. M., MASKELL, J. O. & WILLIAMS, J. D., 1984. Detection of PSE-2 β -lactamase in enterobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**(2): 268–272.

- LIVINGSTONE, D., GILL, M. J. & WISE, R., 1995. Mechanisms of resistance to the carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**: 1–5.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
- LUPSKI, J. R. & WEINSTOCK, G. M., 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* **174(14)**: 4525–4529.
- LYNCH, M. J., DRUSANO, G. L. & MOBLEY, H. L. T., 1987. Emergence of resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31(12)**: 1892–1896.
- MACH, P. A. & GRIMES, D. J., 1982. R-Plasmid transfer in a wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **44(6)**: 1395–1403.
- MAIDEN, M. C. J., 1998. Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clin. Infect. Dis.* **27(Supp 1)**: S12–S20.
- MARAKI, S., SAMONIS, G., MARNELAKIS, E. & TSELENTIS, Y., 1994. Surgical wound infection caused by *Rahnella aquatilis*. *J. Clin. Microbiol.* **32(11)**: 2706–2708.
- MCPHERSON, P. & GEALT, M. A., 1986. Isolation of indigenous wastewater bacterial strains capable of mobilizing plasmid pBR325. *Appl. Environ. Microbiol.* **51(5)**: 904–909.
- MECKES, M. C., 1982. Effect of UV light disinfection on antibiotic-resistant coliforms in wastewater effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* **43(2)**: 371–377.
- MEDEIROS, A. A., 1984. β -lactamases. *Br. Med. Bull.* **40(1)**: 18–27.
- MENDES, B., 1998. Microbiologia da água. In *Microbiologia* (Eds. W. F. C. Ferreira & J. C. Sousa), vol. 1, pp. 285–296, Lisboa. Lidel.
- MILLER, R. V., 1998. Bacterial genes swapping in nature. *Scientific American* **278(1)**: 47–51.
- MINAMI, S., AKAMA, M., WATANABE, Y., NARITA, H., IYOBE, S. & MITSUHASHI, S., 1996. Imipenem and cephem resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying plasmids coding for class B β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**: 433–444.

- MINTZ, E. D., REIFF, M. & TAUXE, R. V., 1995. Safe water treatment and storage in the home. *JAMA* **273**(12): 948–953.
- MOE, C. L., 1997. Waterborne transmission of infectious agents. In *Manual of Environmental Microbiology*. (Eds. C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach & M. V. Walter), pp. 136–152, Washington D. C. American Society for Microbiology.
- MOELLERING, R. C., 1998. Antibiotic resistance: lessons for the future. *Clin. Infect. Dis.* **27**(Supp 1): S135–S140.
- MORRIS, J. G. & POTTER, M., 1997. Emergence of new pathogens as a function of changes in host susceptibility. *Emerg. Infect. Dis.* **3**: 435–441.
- MURRAY, G. E., TOBIN, R. S., JUNKINS, B. & KUSHNER, D. J., 1984. Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewage-related bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**(1): 73–77.
- MUYTJENS, H. L. & REPE, J., 1986. Comparative in vitro susceptibilities of eight *Enterobacter* species, with special reference to *Enterobacter sakazakii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**(2): 367–370.
- NCCLS, 1995. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. M2-A5*. Villanova, Pa, 5th edn.
- NETO, M. H., SOUSA, J. C., QUEIRÓS, M. L., AGUIAR, A. & GUIMARÃES, C., 1992. Comportamento, *in vitro*, de estirpes patogénicas de *Klebsiella pneumoniae* face aos antibióticos β -lactâmicos. *Rev. Port. D. Infecç.* **15**(2): 121–124.
- NIEMI, M., SIBAKOV, M. & NIEMELA, S., 1983. Antibiotic resistance among different species of fecal coliforms isolated from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(1): 79–83.
- NIKAIDO, H., 1992. Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microbiol.* **6**(4): 435–442.
- NIKAIDO, H., 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**: 382–388.
- NIKAIDO, H., 1996. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**(20): 5853–5859.

- NORD, C. E., 1993. The effect of antimicrobial agents on the ecology of the human intestinal microflora. *Vet. Microbiol.* **35**: 193–197.
- OGAWARA, H., KUMA, K. & MIYATA, T., 1993. Gene transfer of a part of a β -lactamase gene. *Microbiol. Immunol.* **37(5)**: 399–403.
- OH, H. M. & TAY, L., 1995. Bacteraemia caused by *Rahnella aquatilis*: report of two cases and review. *Scand. J. Infect. Dis.* **27(1)**: 79–80.
- OLIVE, D. M. & BEAN, P., 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* **37(6)**: 1661–1669.
- O'MORCHOE, S. B., OGUNSEITAN, O., SAYLER, G. S. & MILLER, R. V., 1988. Conjugal transfer of R68.45 and FP5 between *Pseudomonas aeruginosa* strains in a freshwater environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **54(8)**: 1923–1929.
- PAPANICOLAOU, G. A., MEDEIROS, A. A. & JACOBY, G. A., 1990. Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino and alfa-methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 2200–2209.
- PARENTE, A. M. & SOUSA, J. C., 1998. Características morfológicas e ultra-estruturais dos microrganismos procaríotas. In *Microbiologia* (Eds. W. F. C. Ferreira & J. C. Sousa), vol. 1, pp. 19–51, Lisboa. Lidel.
- PATO, M. V. V., 1989. *Susceptibilidade aos Antibióticos - Manual de laboratório*. bioMérieux Portuguesa e INSA.
- PAUL, J. H., FRISCHER, M. E. & THURMOND, J. M., 1991. Gene transfer in marine water column and sediment microcosms by natural plasmid transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1509–1515.
- PEIXE, L. M., 1996. Caracterização de β -lactamases plasmídicas de espectro ampliado em *E. coli*. Tese de Doutoramento.
- PEIXE, L. V., SOUSA, J. C., PEREZ-DIAZ, J. C. & BAQUERO, F., 1997. A *bla* TEM-1b derived TEM-6 β -lactamase: a case of convergent evolution. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41(5)**: 1206.

- PELCZAR, M. J., CHAN, E. C. S. & KRIEG, N. R., 1993. *Microbiology. Concepts and applications*. McGraw-Hill, Inc.
- PEREIRA, J. M., 1998. Genética microbiana. In *Microbiologia* (Eds. W. F. C. Ferreira & J. C. Sousa), vol. 1, pp. 125–139, Lisboa. Lidel.
- PHILIPPON, A., PAUL, G. & JACOBY, G., 1983. Properties of PSE-2 β -lactamase and genetic basis for its production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**(3): 362–369.
- PHILIPPON, A., PAUL, G. & NEVOT, P., 1986. Mécanisme de résistance aux bêta-lactamines. *Presse Méd.* **15**(46): 2290–2296.
- PITLIK, S., BERGER, S. A. & HUMINER, D., 1987. Nonenteric infections acquired through contact with water. *Rev. Infect. Dis.* **9**(1): 54–63.
- PITOUT, J. D. D., MOLAND, E. S., SANDERS, C. C., THOMSON, K. S. & FITZSIMMONS, S. R., 1997a. β -lactamases and detection of β -lactam resistance in *Enterobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**(1): 35–39.
- PITOUT, J. D. D., SANDERS, C. C. & SANDERS, E., 1997b. Antimicrobial resistance with focus on β -lactam resistance in Gram-negative bacilli. *Am. J. Med.* **103**(1): 51–59.
- LENSKA POBELL, S. S., EVGUENIEVA-HACKENBERG, E. & SCHWICKERATH, O., 1995. Random and repetitive primer amplified polymorphic DNA analysis of five soil and two clinical isolates of *Rahnella aquatilis*. *System. Appl. Microbiol.* **18**: 425–438.
- PRESCOTT, L. M., HARLEY, J. P. & KLEIN, D. A., 1993. *Microbiology*. Wm. C. Brown Publishers, 2nd edn.
- QUENTIN, C., 1985. L'Antibiogramme en urgence. In *L'Antibiogramme* (Eds. P. Courvalin, F. Goldstein, A. Philippon & J. Sirrot), pp. 145–154. MPC-Vidéom.
- RASMUSSEN, U. & SVENNING, M. M., 1998. Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(1): 265–272.

- REIFF, F. M., ROSES, M., VENCZEL, L., QUICK, R. & WITT, V. M., 1996. Low-cost safe water for the world: a practical interim solution. *J. Public Health Policy*. **17**: 389–408.
- REINA, J. & LOPEZ, A., 1996. Clinical and microbiological characteristics of *Rahnella aquatilis* strains isolated from children. *J. Infect.* **33**: 135–137.
- RIVERA, I. G., CHOWDHURY, M. A. R., HUQ, A., JACOBS, D., MARTINS, M. T. & COLWELL, R. R., 1995. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(8): 2898–2904.
- ROBERT-DERNUET, S., 1995. *Antibiotiques et antibiogrammes*. Décarie Vigot, Paris.
- RODRIGUEZ-BARRADAS, M. C., HAMILL, R. J., HOUSTON, E. D., GEORGHIOU, P. R., CLARRIDGE, J. E., REGNERY, R. L. & KOEHLER, J. E., 1995. Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. *J. Clin. Microbiol.* **33**(5): 1089–1093.
- ROLINSON, G. N., 1998. Forty years of β -lactam research. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**: 589–603.
- ROWE, B., WARD, L. R. & THRELFALL, E. J., 1990. Spread of multiresistant *Salmonella typhi*. *Lancet* **336**: 1065.
- RUSIN, P. A., ROSE, J. B. & GERBA, C. P., 1997a. Health significance of pigmented bacteria in drinking water. *Wat. Sci. Tech.* **35**: 21–27.
- RUSIN, P. A., ROSE, J. B., HAAS, C. N. & GERBA, C. P., 1997b. Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **152**: 57–83.
- SANDERS, C. C., 1987. Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer β -lactam antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 573–593.
- SANDERS, C. C., 1992. β -lactamases of Gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. *Clin. Infect. Dis.* **14**: 1089–1099.

- SANDERS, C. C. & SANDERS, W. E., 1992. β -lactam resistance in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* **15**: 824–839.
- SANDT, C. H. & HERSON, D. S., 1991. Mobilization of the genetically engineered plasmid pHSV106 from *Escherichia coli* HB101 (pHSV106) to *Enterobacter cloacae* in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(1): 194–200.
- SAYE, D. J., OGUNSEITAN, O., SAYLER, G. S. & MILLER, R. V., 1987. Potential for transduction of plasmids in a natural freshwater environment: effect of plasmid donor concentration and a natural microbial community on transduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(5): 987–995.
- SECHI, L. A., ZANETTI, S., DUPRÉ, I., DELOGU, G. & FADDA, G., 1998. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **36**(1): 128–132.
- SEIFERT, H., DIJKSHOORN, L., GERNER-SMIDT, P., PELZER, N., TJERNBERG, I. & VANEECHOUTTE, M., 1995. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: Comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* **35**(11): 2819–2825.
- SHAW, D. R. & CABELLI, V. J., 1980. R-plasmid frequencies from environmental isolates of *Escherichia coli* to laboratory and fecal strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**(4): 756–764.
- SHI, Z.-Y., LIU, P. Y.-F., LAU, Y.-J., LIU, Y.-H. & HU, B.-S., 1997. Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate an outbreak of *Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.* **35**(1): 325–327.
- SILVA, M. G., SOUSA, J. C., PEIXE, L. V., FERREIRA, H., QUEIRÓS, M., GUIMARÃES, C. & LEITÃO, R., 1993. Comportamento, *in vitro*, de estirpes patogénicas hospitalares de *Citrobacter freundii* face aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos. *Rev. Port. D. Infecç.* **16**(2): 125–128.
- SIM, M., FAIRLEY, C. & MCNEIL, J., 1994. Drinking water quality: new challenges for an old problem. *Occupational Environ. Med.* **106**: 83–119.
- SMIBERT, R. M. & KRIEG, N. R., 1994. Phenotypic characterization. In *Methods for general and molecular bacteriology* (Eds. P. Gerhardt, R. G. E. Murray,

- W. A. Wood & N. R. Krieg), pp. 607–654, Washington D. C. American Society for Microbiology.
- SMITH, J. T. & LEWIN, C. S., 1993. Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology. *Vet. Microbiol.* **35**: 233–242.
- SOUNIS, E. L. M., 1978. *Curso prático de microbiologia*. McGraw-Hill, Brasil.
- SOUSA, J. C., CARNEIRO, G., PEIXE, M. L., QUEIRÓS, M. L. & REBELO, I., 1989a. Caracterização das β -lactamases responsáveis pela resistência de estirpes patogénicas de *E. coli* aos antibióticos β -lactâmicos. *Rev. Port. D. Infecç.* **12(4)**: 245–249.
- SOUSA, J. C., CARNEIRO, G., PEIXE, M. L., QUEIRÓS, M. L. & REBELO, I., 1991. Characterization of β -lactamases encoded by pathogenic strains of *Escherichia coli* from Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**: 437–440.
- SOUSA, J. C., PEIXE, L. V., FERREIRA, H., PINTO, M. E., NASCIMENTO, M. S. J., SOUSA, M. I. & CABRAL, M., 1998. Antimicrobianos. In *Microbiologia* (Eds. W. F. C. Ferreira & J. C. Sousa), vol. 1, pp. 239–269, Lisboa. Lidel.
- SOUSA, J. C., PEIXE, M. L., QUEIRÓS, M. L., CARNEIRO, G., PINTO, M. A., VIDAL, A. M., LUZ, H., MARQUES, M. M., LOURINHA, M. & GUIMARÃES, C., 1989b. Comportamento, *in vitro*, de estirpes patogénicas de *E. coli* face aos diversos antibióticos β -lactâmicos. *Rev. Port. D. Infecç.* **12(4)**: 239–243.
- SOUSA, J. C. F. & PRISTA, L. V. N., 1988. *Antibióticos inibidores da biossíntese do peptidoglicano*. Ordem dos Farmacêuticos.
- SOUSA, J. C. F. & PRISTA, L. V. N., 1991. *Antibióticos inibidores da síntese proteica*, vol. 2. Ordem dos Farmacêuticos.
- STANIER, R. Y., ADALBERG, E. A. & INGRATTAM, J. L., 1976. *The microbial world*. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 4th edn.
- STEWART, G. J. & SINIGALLIANO, C. D., 1990. Detection of horizontal gene transfer by natural transformation in native and introduced species of bacteria in marine and synthetic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56(6)**: 1818–1824.

- SYKES, R. B. & MATTHEW, M., 1976. The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactama antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **2**: 115–157.
- TALBOT, H. W., YAMAMOTO, D. K., SMITH, M. W. & SEIDLER, R. J., 1980. Antibiotic resistance and its transfer among clinical and nonclinical *Klebsiella* strains in botanical environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**(1): 97–104.
- TRIEU-CUOT, P. & POYART, C., 1998. Visite guidée au coeur de l'arsenal bactérien. *La Recherche* **314**: 62–66.
- VASCONCELOS, V. M., 1993. Toxicity of cyanobacteria in lakes of North and Central Portugal. Ecological implications. *Verh. Int. Verein. Limnol.* **25**: 694–697.
- VASCONCELOS, V. M., 1995. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin - LR in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* **32**: 227–237.
- WALTER, M. V. & VENNES, J. W., 1985. Occurrence of multiple-antibiotic-resistant enteric bacteria in domestic sewage and oxidation lagoons. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**(4): 930–933.
- WHITE, N. J. & PARRY, C. M., 1996. The treatment of typhoid fever. *Curr. Opinion Infect. Dis.* **9**: 298–302.
- WHO, 1996a. *Guidelines for drinking-water quality. Health criteria and other supporting information*, vol. 2. World Health Organization, Geneva, 2nd edn.
- WHO, 1996b. *The world health report 1996. Fighting disease. Fostering development. Executive summary*. World Health Organization, Geneva.
- WHO, 1996c. *The world health report 1996. Fighting disease. Fostering development. Media information*. World Health Organization, Geneva.
- WIGGINS, B., 1996. Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(11): 3997–4002.
- YANG, Y., WU, P. & LIVERMORE, D. M., 1990. Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**(5): 755–758.

YOUNG, H. K., 1993. Antimicrobial resistance spread in aquatic environments. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**: 627–635.

YOUNG, P., 1996. Safe drinking water: a call for global action. *ASM News* **62(7)**: 349–352.

