

Alexandra Sofia Morgado Figueiredo

**β -lactamases de espectro alargado em
Escherichia coli e *Klebsiella pneumoniae*
isoladas de águas marinhas**

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

2001

Alexandra Sofia Morgado Figueiredo

**β -lactamases de espectro alargado em
Escherichia coli e *Klebsiella pneumoniae*
isoladas de águas marinhas**

FACULDADE DE FARMÁCIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 01/08/11
Reg. 1515-
Cota

FFM
FIG

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

2001

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

Orientadora: Prof.^a Doutora Helena Neto Ferreira

Co-orientadora: Prof.^a Doutora Luísa Vieira Peixe

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/21061/99)

*“O organismo modal na Terra, é agora, sempre tem sido,
e provavelmente será, uma célula procariótica”*

(Stephen J. Gould)

A meus Pais

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.^a Doutora Helena Neto Ferreira, e à minha co-orientadora, Prof.^a Doutora Luísa Vieira Peixe, quero expressar a minha gratidão pela orientação do trabalho realizado e manifestar a minha admiração e reconhecimento pela forma como me ensinaram, incentivaram e ajudaram ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Doutor João Carlos Figueiredo de Sousa agradeço a possibilidade da realização deste trabalho no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Aos Profs. Doutores Eugénia Pinto, Isaura Pinto de Sousa, Miguel Cabral, Nazaré Pestana, e S. José Nascimento, quero agradecer o apoio e a forma simpática com que sempre me trataram.

Aos Serviços Municipalizados de Águas e Saneamento, em particular à Dr.^a Isabel Hespanhol, a cedência de amostras de águas.

À Prof.^a Doutora Leonor Teles Grilo do Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e à Prof.^a Doutora Anabela Cordeiro da Silva do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto agradeço a possibilidade da realização de estudos de hibridação no Departamento de Biologia Molecular. À Eng.^a Carla Oliveira gostaria de agradecer a forma simpática como me recebeu, todo o incentivo e colaboração durante os estudos de hibridação.

À Carla Novais, Lucília Saraiva, Patrícia Antunes e Sandra Quinteira, companheiras destas “tarefas” de investigação, agradeço todo o apoio amigo, disponibilidade, encorajamento, e o bom ambiente de trabalho que sempre me proporcionaram durante a realização deste estudo.

À Dr.^a Cristina Réu, obrigado pela amizade e apoio constante.

À D. Deolinda, D. Fernanda e D. Filomena agradeço a forma simpática como me trataram e toda a disponibilidade demonstrada.

Aos meus amigos e familiares, e a todos os que, de certo modo, contribuíram para a realização desta dissertação, agradeço o apoio.

Aos meus pais e irmã, agradeço todo o carinho, o incentivo constante, a compreensão e paciência que, apesar de sempre presentes, foram infinitos nos piores momentos.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Sobrevivência de bactérias coliformes em águas marinhas.....	4
1.2. Antibióticos β -lactâmicos.....	6
1.3. Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos.....	7
1.3.1. Modificação de PBPs.....	7
1.3.2. Impermeabilização da parede celular.....	7
1.3.3. Sistemas de efluxo.....	8
1.3.4. Inativação do antibiótico por enzimas.....	8
1.4. β -lactamases.....	9
1.4.1. Classificação geral das β -lactamases.....	9
1.4.2. Detecção e caracterização de β -lactamases.....	11
1.4.3. Classificação de β -lactamases de espectro alargado.....	13
1.4.4. Detecção de estirpes produtoras de β -lactamases de espectro alargado.....	18
1.5. Determinantes genéticos da resistência a antibióticos.....	20
1.5.1. Resistência intrínseca e resistência natural.....	21
1.5.2. Resistência adquirida.....	22
1.5.2.1. Mutação.....	22
1.5.2.2. Aquisição de plasmídeos, transposões e integrões.....	23
1.6. Transferência de genes em ambiente marinho.....	25
1.6.1. Transformação.....	25
1.6.2. Transdução.....	26
1.6.3. Conjugação.....	27
1.7. Resistência a antibióticos em ambiente marinho.....	28
2. Objectivos	32
3. Material e métodos	33
3.1. Origem das amostras.....	33
3.2. Isolamento e identificação das estirpes.....	33
3.3. Avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos.....	34
3.3.1. Método de difusão em agar.....	34
3.3.2. Determinação da concentração mínima inibitória.....	35

3.4. Detecção de isolados de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de β -lactamases de espectro alargado.....	35
3.4.1. Teste de sinergismo.....	36
3.4.2. Método do “Epsilon-test”.....	37
3.5. Caracterização de β -lactamases.....	36
3.5.1. Preparação dos extractos enzimáticos.....	36
3.5.2. Determinação do ponto isoeléctrico das β -lactamases.....	37
3.6. Transferência do determinante genético das β -lactamases.....	38
3.6.1. Conjugação.....	38
3.6.2. Transformação.....	38
3.6.2.1. Preparação das células competentes.....	39
3.7. Extracção do DNA plasmídico.....	39
3.7.1. Técnica de Kado & Liu.....	39
3.7.2. Electroforese em gel de agarose.....	40
3.8. Hibridação de sondas de DNA.....	41
3.8.1. Preparação da sonda TEM.....	41
3.8.1.1. Extracção do DNA total.....	42
3.8.1.2. Quantificação do DNA por determinação espectrofotométrica.....	41
3.8.1.3. Reacção de amplificação.....	41
3.8.1.4. Caracterização do produto de PCR por electroforese.....	42
3.8.1.5. Purificação do produto de PCR.....	42
3.8.1.6. Digestão com enzimas de restrição.....	42
3.8.2. Marcação da sonda.....	43
3.8.3. Formatos de hibridação.....	43
3.8.3.1. <i>Southern blot</i>	43
3.8.3.2. <i>Dot blot</i>	44
3.8.4. Hibridação e lavagens de restringência.....	44
3.8.5. Geração do sinal e detecção.....	45
3.9. Tipagem de isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM.....	45
3.9.1. Reacção de amplificação.....	45
3.9.2. Caracterização do produto de PCR por electroforese.....	46
4. Resultados.....	47
4.1. Estirpes isoladas.....	47
4.2. Susceptibilidade a agentes antimicrobianos de isolados de <i>Escherichia coli</i>	48
4.2.1. Susceptibilidade a agentes antimicrobianos de isolados de <i>Escherichia coli</i> sensíveis à ampicilina.....	48
4.2.1. Susceptibilidade a agentes antimicrobianos de isolados de <i>Escherichia coli</i> resistentes à ampicilina.....	48
4.3. Isolados de <i>Escherichia coli</i> e produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM.....	51
4.3.1. Perfil de susceptibilidade.....	51
4.3.2. Confirmação da detecção de β -lactamases de espectro alargado pelo método do “Epsilon-test”.....	52
4.3.3. Perfil β -lactamásico.....	53
4.3.4. Avaliação da capacidade de transferência de genes responsáveis pela resistência aos oximino- β -lactâmicos.....	53

4.4. Tipagem de isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM, obtida por ERIC-PCR.....	57
4.5. Isolados de <i>Escherichia coli</i> e produtores de β -lactamases de espectro alargado do tipo AmpC.....	58
4.5.1. Perfil de susceptibilidade.....	58
4.5.2. Confirmação da detecção de β -lactamases de espectro alargado pelo método do "Epsilon-test".....	59
4.5.3. Perfil β -lactamásico.....	59
4.5.4. Avaliação da capacidade de transferência de genes responsáveis pela resistência às cefamicinas.....	60
4.6. Susceptibilidade a agentes antimicrobianos de isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	61
4.7. Isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM e SHV.....	62
4.7.1. Perfil de susceptibilidade.....	62
4.7.2. Confirmação da detecção de β -lactamases de espectro alargado pelo método do "Epsilon-test".....	64
4.7.3. Perfil β -lactamásico.....	65
4.7.4. Avaliação da capacidade de transferência de genes responsáveis pela resistência aos oximino- β -lactâmicos.....	66
4.8. Distribuição temporal de isolados de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores de β -lactamase de espectro alargado.....	67
4.9. Hibridação com sonda TEM.....	68
5. Discussão.....	71
5.1. Resistência a agentes antimicrobianos de isolados de <i>Escherichia coli</i> de águas marinhas.....	72
5.2. Resistência a agentes antimicrobianos de isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> de águas marinhas.....	74
5.3. <i>Escherichia coli</i> produtoras de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM em águas marinhas.....	75
5.4. <i>Escherichia coli</i> produtoras de β -lactamases de espectro alargado do tipo AmpC em águas marinhas.....	79
5.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de β -lactamases de espectro alargado derivadas de SHV em águas marinhas.....	81
6. Conclusões.....	84
7. Bibliografia.....	86

Declaração

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam das seguintes comunicações e publicações:

Figueiredo, A., Sousa, J. C., Peixe, L. & Ferreira, H. N., 2000. β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* de águas marinhas. V Congresso Nacional de Doenças Infecciosas. Porto.

Figueiredo, A., Sousa, J. C., Peixe, L. & Ferreira, H. N., 2000. Occurrence of *Escherichia coli* with extended spectrum β -lactamases in marine waters. *Food Safety*. Porto.

Figueiredo, A., Sousa, J. C., Peixe, L. & Ferreira, H. N., 2000. β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* de águas marinhas. *Arquivos de Medicina*. 14(Supl.3): 64.

Figueiredo, A., Sousa, J. C., Peixe, L. & Ferreira, H. N., 2001. Extended spectrum beta-lactamases from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from coastal marine waters of Northern Portugal. 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Istanbul.

Figueiredo, A., Sousa, J. C., Peixe, L. & Ferreira, H. N., 2001. Extended spectrum beta-lactamases from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from coastal marine waters of Northern Portugal. *Clinical Microbiology and Infection*. 7(Suppl. 1): 282.

Resumo

A presença em águas marinhas de espécies com importância clínica e resistentes a antibióticos tem sido raramente avaliada desconhecendo-se, em Portugal, a existência de qualquer estudo anterior sobre este tema.

O objectivo deste trabalho consistiu na detecção de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro alargado em três praias da zona urbana do Porto: Molhe, Gondarém e Matosinhos. Foi também objectivo a avaliação da capacidade de transferência de genes responsáveis pela resistência a oximino- β -lactâmicos, através de ensaios de conjugação.

Foram obtidos 58 isolados de *E. coli* e 5 de *K. pneumoniae* produtores de β -lactamase de espectro alargado, pelo método de sinergismo. Os isolados de *E. coli* demonstraram por focagem isoeléctrica duas bandas de pI 5,4 e 5,9. A β -lactamase de 5,9 está associada a um plasmídeo conjugativo de 30 Md. Apenas um isolado de *K. pneumoniae* apresentou uma banda electroforética, de pI 7,0, nos restantes isolados foi possível observar duas bandas, de pI 5,4 e 7,6 num isolado e de 7,6 e 8,2 noutra, os outros dois isolados apresentaram o mesmo perfil, duas bandas de pI 7,0 e 8,2. Apenas no isolado que possui as β -lactamases de pI 7,6 e 8,2 foi possível a transferência, por transformação, do plasmídeo que codifica a β -lactamase responsável pela resistência aos oximino- β -lactâmicos de pI 8,2.

Foram também encontrados dois isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases do tipo AmpC, que apresentaram duas bandas electroforéticas de pI 5,4 e >8,2. Num isolado foi possível associar a resistência ao ácido clavulânico e cefoxitina à β -lactamase de pI >8,2. O gene responsável por esta resistência situa-se num plasmídeo conjugativo de 91 Md.

Abstract

The presence of strains clinically important and antibiotic resistant has been rarely evaluated, and is unknown the existence of a previous study about this theme in Portugal.

The goal of this work was screening of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamases in three Oporto beaches: Molhe, Gondarém and Matosinhos. The ability of transfer of oximino- β -lactam resistance genes, by conjugation, was also evaluated.

58 *E. coli* and 5 *K. pneumoniae* isolates producing extended spectrum β -lactamases were detected by synergism test. Characterization by isoelectric focusing in isolates of *E. coli* showed two bands of pI 5,4 and 5,9. β -lactamase of pI 5,9 was associated to a conjugative plasmid of 30 Md. One *K. pneumoniae* showed a single band (pI 7,0), the others showed two bands. One *K. pneumoniae* isolate showed bands of pI 5,4 and 7,6, and another, bands of pI 7,6 and 8,2, the other two isolates showed the same profile, two bands of pI 7,0 and 8,2. In the *K. pneumoniae* isolate with β -lactamases of pI 7,6 and 8,2, we were able to transfer, by transformation, the plasmid which mediates β -lactamase (pI 8,2) that confers oximino- β -lactam resistance.

Two *E. coli* isolates producing β -lactamases of AmpC type, showed two electroforetic bands of pI 5,4 and >8,2. In one strain was possible to associate clavulanic acid and ceftiofime resistance with β -lactamase of pI >8,2. The resistance gene was localized in a conjugative plasmid of 91 Md.

Abreviaturas

bp – Pares de bases

BLEA - β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM e SHV

CMI – Concentração mínima inibitória

ddp – Diferença de potencial

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ERIC – “Enterobacterial repetitive intergenic consensus”

MOPS – Ácido morfolino propano sulfónico

PBP – “Penicillin binding protein”

PCR – “Polimerase chain reaction”

pI – ponto isoelectrico

P. M. - Peso molecular

SDS – Dodecilsulfato de sódio

SXT – Trimetropim/sulfametoxazol

TAE – Tris Acetato EDTA

TE – Tris EDTA

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano

Lista de Figuras

I.	Resistências associadas em <i>E. coli</i> resistentes a ampicilina.....	49
II.	Perfil plasmídico de estirpes de <i>E. coli</i> produtoras de β -lactamases de espectro alargado, transformantes e transconjugantes.....	55
III.	Gel de agarose do resultado de ERIC-PCR.....	57
IV.	Percentagens de resistência a agentes antimicrobianos em <i>K. pneumoniae</i> ..	62
V.	Hibridação em formato <i>Dot-blot</i>	68
VI.	Gel de agarose para hibridação com sonda TEM.....	69
VII.	Hibridação em formato <i>Southern-blot</i>	69

Lista de Quadros

I.	Classificação das β -lactamases.....	9
II.	β -lactamases de espectro alargado derivadas de SHV.....	14
III.	β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM.....	15
IV.	β -lactamases de espectro alargado do tipo AmpC.....	17
V.	Concentrações de antibióticos usadas para selecção.....	34
VI.	Estirpes de referência para focagem isoeléctrica.....	37
VII.	Sequência dos “primers” para reacções de amplificação do gene TEM.....	42
VIII.	Sequência dos “primers” usados nas reacções de ERIC-PCR.....	46
IX.	Espécies bacterianas isoladas.....	47
X.	Perfil de susceptibilidade e ponto isoeléctrico dos isolados de <i>E. coli</i> produtores de TEM-1.....	50
XI.	Perfil de susceptibilidade e ponto isoeléctrico dos isolados de <i>E. coli</i> produtores de β -lactamase de espectro alargado derivadas de TEM.....	51
XII.	“E-test” para a detecção de β -lactamases de espectro alargado em <i>E. coli</i>	53
XIII.	“E-test” para a detecção de β -lactamases de espectro alargado em transformantes, transconjugantes de isolados de <i>E. coli</i> produtores de β -lactamase de espectro alargado derivadas de TEM	54
XIV.	Perfil de susceptibilidade e ponto isoeléctrico dos isolados de <i>E. coli</i> produtores de β -lactamase derivadas de TEM, transformantes e tranconjugantes.....	56
XV.	Perfil de susceptibilidade e ponto isoeléctrico das β -lactamases dos isolados de <i>E. coli</i> com β -lactamases de espectro alargado do tipo AmpC.....	58

XVI.	“E-test” para a detecção de β -lactamases de espectro alargado em transformantes e transconjugantes de isolados de <i>E. coli</i> com β -lactamases de espectro alargado do tipo AmpC.....	59
XVII.	Perfil de susceptibilidade e ponto isoelétrico das β -lactamases dos isolados de <i>E. coli</i> produtoras de β -lactamases de espectro alargado do tipo AmpC, transformantes e transconjugantes.....	60
XVIII.	Perfil de susceptibilidade e ponto isoelétrico das β -lactamases dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de SHV.....	63
XIX.	“E-test” para a detecção de β -lactamases de espectro alargado em isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de SHV.....	64
XX.	“E-test” para a detecção de β -lactamases de espectro alargado em transformantes de <i>K. pneumoniae</i> com β -lactamases de espectro alargado derivadas de SHV.....	65
XXI.	Perfil de susceptibilidade e ponto isoelétrico das β -lactamases em isolado de <i>K. pneumoniae</i> produtor de β -lactamases de espectro alargado derivadas de SHV e transformante.....	66
XXII.	Distribuição temporal dos isolados de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> produtores de β -lactamases de espectro alargado pelas praias ao longo do trabalho.....	68

1. Introdução

A água é um elemento indispensável à vida, tanto na cobertura das necessidades hídricas do Homem, como noutras actividades, além disso, tem profundos efeitos no equilíbrio ambiental, sendo já considerado um recurso altamente valorizado (CE report, 1998; Mendes, 1998).

Em muitos países, as populações estão concentradas perto de águas costeiras, pois estas proporcionam alimento, emprego, actividades recreativas e são esteticamente agradáveis (Fujioka, 1997).

As águas marinhas costeiras, sob certas condições, podem ser adversamente afectadas por poluição fecal de uma variedade de fontes, tais como esgotos municipais, esgotos de instalações de tratamento, sistemas de fossas sépticas privados e escoamento de águas (Budnick *et al.*, 1996; Gouveia, 1996; Wiggins *et al.*, 1999). É sabido que, esta contaminação das águas costeiras por descargas de águas residuais é uma constante fonte de patogénicos humanos, nos quais se incluem, bactérias, vírus, protozoários e diversos outros organismos multicelulares que podem provocar doenças (Helmer *et al.*, 1991). Não só estes organismos “introduzidos” são causa de patologias infecciosas, como também não deixa de ser relevante, apesar de menos divulgado, a aquisição de doenças infecciosas, durante o uso recreativo de águas marinhas, ocasionadas por bactérias autóctones marinhas da família *Vibrionaceae* (Mira-Gutiérrez & García-Martos, 1997).

As águas balneares podem constituir uma potencial fonte de transmissão de doenças de origem hídrica, nomeadamente a nível dos aparelhos digestivo e respiratório, dos ouvidos e mesmo a nível dermatológico (Gouveia, 1996) sendo, contudo predominantes as doenças gastrointestinais que resultam da contaminação de águas marinhas balneares costeiras por esgotos (Helmer *et al.*, 1991). A

documentação de doenças associadas ao uso recreativo da água é bastante difícil, pois infecções com patógenos são eventos que não são facilmente determinados, uma vez que a percentagem de pessoas infectadas que desenvolvem vários graus de sintomas clinicamente observáveis varia com a idade e estado de saúde de cada indivíduo, com a concentração do patógeno na água, o seu estado fisiológico e a sua virulência (Fujioka, 1997; Gouveia, 1996). No entanto, o controlo de surtos de doenças transmitidas pela água tem sido conseguido pela diminuição do lançamento directo de águas residuais em águas naturais, aperfeiçoamento de tratamento de esgotos e monitorização da qualidade da água (Niemi *et al.*, 1997).

A assunção que descargas de restos fecais humanos e animais em águas usadas primariamente com fins recreativos são fonte de potenciais perigos para a saúde pública determinou a procura de indicadores microbiológicos capazes de caracterizar o risco envolvido no uso recreativo da água (Helmer *et al.*, 1991). Correntemente, em águas marinhas são utilizados como indicadores, os coliformes totais e fecais, enterococos e *Salmonella* (Decreto-Lei 236/98).

Com o advento da era dos agentes antimicrobianos, as ciências médicas e veterinárias ganharam um meio muito promissor para o tratamento de infecções, quer humanas quer animais (Mach & Grimes, 1982), e, conseqüentemente, ocorreu a diminuição de casos mortais devido a uma variedade de doenças infecciosas (Cohen, 1994). Contudo, desde o aparecimento dos antibióticos, as bactérias demonstraram a capacidade de resistirem aos efeitos bactericidas e bacteriostáticos destes agentes (Mach & Grimes, 1982). Esta facilidade com que as bactérias se tornam resistentes aos agentes antimicrobianos correntemente usados, tem sido, e continua a ser, uma preocupação para médicos, técnicos de saúde pública e investigadores (Young, 1993).

A resistência bacteriana aos antibióticos não é mais que um aspecto particular da sua evolução natural (Acar & Courvalin, 1998). Entre os factores que contribuem para a acumulação de resistência podemos incluir: espécies intrinsecamente resistentes; a selecção de mutantes resistentes; a disseminação, por transferência entre estirpes bacterianas, de genes de resistência; e, a disseminação de estirpes resistentes entre pacientes, hospitais e mesmo entre países (Levy, 1997; Livermore & Dudley, 2000).

A presença de bactérias resistentes a antibióticos em ambiente aquático tem poder ser consequência do aumento, e muitas vezes indiscriminado, uso de antibióticos em práticas médicas, veterinárias e agrícolas (Baya *et al.*, 1986), e da

descargas de esgotos sem tratamento em águas receptoras (Goñi-Urriza *et al.*, 2000; Young, 1993). Outro factor que favorece o aumento de bactérias resistentes a antibióticos é a poluição química da água com metais pesados, fenómeno este de grande preocupação, uma vez que cada vez mais existem locais quimicamente poluídos (McArthur & Tuckfield, 2000).

Vários trabalhos têm demonstrado a existência de organismos resistentes a antibióticos em águas recreativas na Europa, América do Norte e Ásia (Alcaide & Garay, 1984; Baya *et al.* 1986; Burton *et al.*, 1982; French *et al.*, 1987; Niemi *et al.*, 1983). É ainda sugerido que, a ingestão ou contacto com organismos resistentes, durante actividades recreativas em zonas costeiras, lagos ou rios, pode promover a aquisição de genes de resistência por bactérias comensais do hospedeiro humano (Young, 1993). Sendo assim, a máxima remoção de bactérias, que apresentam multiresistência a antibióticos, de esgotos, antes da descarga no ambiente e a prevenção da contaminação de água de consumo, são processos altamente indispensáveis (Murray *et al.*, 1984).

Embora os organismos introduzidos em ambiente aquático apresentem um perigo potencial para a saúde é também importante considerar o papel dos organismos nativos, pois se estes tiverem a capacidade de adquirir genes de resistência de organismos comensais ou patogénicos introduzidos no ambiente, poderão funcionar como um importante reservatório de genes e, subsequentemente, estarem aptos a actuar como dadores de informação genética, e reintroduzirem estes genes em bactérias humanas (Young, 1993). Esta troca de informação genética poderá criar um novo, e não caracterizado, reservatório de genes de resistência a antibióticos em ambiente marinho.

O aumento do nível de contaminação fecal detectado em muitas águas naturais superficiais e a facilidade com que as bactérias se tornam resistentes aos agentes antimicrobianos correntemente usados, além de constituir um sério problema de saúde pública, aumenta a necessidade de investigação desta resistência em ambiente aquático (Alcaide & Garay, 1984).

1.1. Sobrevivência de bactérias coliformes em águas marinhas

A sobrevivência e permanência de bactérias indicadoras de poluição fecal, em águas marinhas, é influenciada por uma variedade de factores ambientais, nos quais se incluem: temperatura, radiação solar, salinidade, pluviosidade, predação, parasitismo, disponibilidade de nutrientes, sedimentos, pH, marés e poluentes ambientais (Bogosian *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 1995; Fish & Pettibone, 1995; Fujioka *et al.*, 1981; Goyal *et al.*, 1977; Sinton *et al.*, 1994; 1999; Solo-Gabrielle *et al.*, 2000). Dada a complexidade dos sistemas ambientais, a influência de cada factor na regulação do crescimento e sobrevivência de bactérias é difícil de prever, assim como o tempo de permanência dos microrganismos em ambientes marinhos.

Uma das características principais da água do mar é o seu alto conteúdo salino. A concentração de sais dissolvidos (cloretos, sulfatos, carbonatos de sódio, de potássio, cálcio e de magnésio) encontra-se entre 33 e 37 g/Kg de água, sendo normalmente menor nas regiões menos profundas das praias e em estuários (Pelczar *et al.*, 1981). A concentração salina está inversamente correlacionada com a sobrevivência dos coliformes fecais (Goyal *et al.*, 1977).

Observou-se que as concentrações de *E. coli* em ambiente aquático estavam correlacionadas com os ciclos tidais, sendo a maior concentração observada durante a maré alta, pois o aumento de água permite que a coluna de água entre em contacto com solos previamente secos (Solo-Gabrielle *et al.*, 2000).

Alguns autores defendem, que entre os factores que condicionam a sobrevivência de bactérias indicadoras em águas marinhas, a radiação solar aparenta ser o mais importante (Sinton *et al.*, 1994; 1999). A banda UV-B (280 a 320 nm) é a porção mais bactericida do espectro solar, causando danos directos no DNA bacteriano (mecanismos fotobiológicos). Em comprimentos de onda superiores a 320 nm o espectro de acção afasta-se do padrão do espectro da absorvância do DNA, pelo que, deixam de existir mecanismos de danificação de DNA, passando a actuar os mecanismos fotoquímicos. Os mecanismos fotoquímicos ocorrem quando a luz solar é absorvida por um agente sensibilizador, provocando danos nas membranas celulares. Estas reacções tendem a ser mais injuriosas na presença do oxigénio (Sinton *et al.*, 1994; 1999).

Outros estudos demonstraram que a inativação de bactérias indicadoras, provocada pela exposição à luz solar, diminui com o aumento da profundidade das águas (Davies-Colley *et al.*, 1994; Sinton *et al.*, 1994).

A identificação da luz solar como o maior agente bactericida permite algumas especulações acerca da sobrevivência de bactérias introduzidas pelo lançamento de esgotos em águas marinhas. Por exemplo, se a contaminação fecal do ambiente marinho ocorrer durante a noite, prevê-se que as bactérias entéricas não sejam inativadas e a disseminação de bactérias viáveis poderá ocorrer até à radiação solar seguinte. Por outro lado, se a contaminação fecal ocorrer durante o dia e especialmente com luz solar intensa, a inativação das bactérias será rápida, e a sua disseminação será drasticamente reduzida. Deve, contudo, ser reconhecido que a turvação, ondulação ou composição química da água pode interferir com a capacidade bactericida da luz solar (Fujioka *et al.*, 1981).

Na ausência de predadores, os coliformes fecais podem crescer em ambientes aquáticos marinhos (Davies *et al.*, 1995). Os sedimentos podem actuar como reservatórios de bactérias entéricas, uma vez que as protegem de certos factores associados com o ambiente aquático, como a radiação UV, alta salinidade, toxicidade por metais pesados, ataques de bacteriófagos e predadores, e, além disso, podem actuar como dadores de nutrientes suportando o crescimento bacteriano (Davies *et al.*, 1995; Fish & Pettibone, 1995). Estas bactérias podem ser ressuspendidas em resposta a diversos factores ambientais assim como em resultado de actividades recreativas (Goyal *et al.*, 1977).

Alguns autores defendem que como estratégia de sobrevivência, as bactérias entéricas, nomeadamente *Escherichia coli* (Bogosian *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 1995; Fish & Pettibone, 1995; Munro *et al.*, 1995; Pommepuy *et al.*, 1996), em condições adversas, como em ambiente marinho, entram num estado de dormência, referido como "viável não cultivável". Bactérias neste estado podem sobreviver durante um longo período de tempo em ambiente aquático, tornando-se num sério problema de saúde pública, uma vez que aquando da avaliação da qualidade da águas estas bactérias poderão originar resultados falso-positivos (Moe, 1997).

1.2. Antibióticos β -lactâmicos

A utilização terapêutica dos antibióticos β -lactâmicos é generalizada dada as suas características farmacocinéticas, fraca toxicidade e actividade antibacteriana (Sirot *et al.*, 1987). São os antibióticos mais prescritos em todo o Mundo, pelo que é fácil depreender que a resistência a este importante grupo de agentes antimicrobianos seja um grave problema de saúde pública (Pitout *et al.*, 1997).

O grupo dos antibióticos β -lactâmicos é constituído por penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos (Dever, 1991; Governado & Hontangas, 1997; 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. Nas penicilinas o anel β -lactâmico encontra-se unido com um anel de tiazolidina e nas cefalosporinas a um anel de di-hidrotiazina (Dever, 1991; Sousa & Prista, 1988). Nos antibióticos monobactâmicos apenas se mantém o anel β -lactâmico e nos carbapenemos verifica-se a presença de carbono em substituição de enxofre no anel de tiazolidina (Sousa *et al.*, 1998).

Os antibióticos β -lactâmicos são inibidores da biossíntese do peptidoglicano, na sua fase terminal (Sousa *et al.*, 1998; Sousa & Prista, 1988). O peptidoglicano é constituído por cadeias lineares de dois açúcares aminados, N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico (Parente & Sousa, 1998), um peptídeo de cinco aminoácidos liga-se ao aminoácido N-acetilmurâmico, este peptídeo termina em D-alanil-D-alanina (Katzung, 1998). Os PBPs (*Penicillin-binding-proteins*) catalizam a reacção de transpeptidação, removendo a alanina terminal e estabelecendo pontes interpeptídicas com peptídeos vizinhos. Os β -lactâmicos são análogos estruturais do substrato D-Ala-D-Ala e ligam-se covalentemente aos PBPs, após um β -lactâmico se ligar ao PBP a reacção de transpeptidação é inibida, a síntese de peptidoglicano é bloqueada e a célula morre (Katzung, 1998).

Este grupo de antibióticos tem efeito bactericida apenas em células com parede celular em crescimento activo (Katzung, 1998; Sousa *et al.*, 1998; Sousa & Prista, 1988).

1.3. Mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos

As bactérias podem sobreviver ao efeito bacteriolítico dos antibióticos β -lactâmicos através de diversos mecanismos, tais como, a modificação de PBPs, impermeabilização da membrana exterior (nas bactérias Gram negativo), sistemas de efluxo ou hidrólise enzimática do anel β -lactâmico.

1.3.1. Modificação de PBPs

Os PBPs são os alvos de actuação dos β -lactâmicos, pelo que, alterações na estrutura de um ou de todos os PBPs podem promover resistência a este grupo de antibióticos em diversas espécies (Sousa & Prista, 1988). As modificações dos PBPs podem ser resultado de mutações nos genes cromossómicos, ou da aquisição de genes suplementares que codificam para novos PBPs (Georgopapadakou, 1993).

Apesar deste mecanismo ser mais frequente em cocos Gram positivo, tais como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, é também possível ser encontrado em bactérias Gram negativo (Pitout *et al.*, 1997), como em algumas espécies de *Neisseria*, e, raramente, em *Haemophilus influenzae* (Spratt, 1994).

1.3.2. Impermeabilização da parede celular

A membrana exterior da parede celular das bactérias Gram negativo possui um papel primordial numa variedade de funções. Além de interactuar com o ambiente bacteriano, serve também como uma barreira à difusão de solutos extracelulares (Doménech-Sánchez *et al.*, 1999). No entanto, compostos hidrofílicos e com P. M. inferior a 600-650 daltons, tais como nutrientes, produtos de metabolismo e antibióticos, podem atravessar esta membrana através de canais de difusão hidrófilos formados pelas porinas (Hayes & Wolf, 1990; Parente & Sousa, 1998).

A perda de porinas como mecanismo de resistência a agentes antimicrobianos tem sido descrita em diversa espécies. Esta estratégia de resistência foi demonstrada em *Klebsiella pneumoniae* (Doménech-Sánchez *et al.*, 1999; Martínez-Martínez *et al.*, 1996; 1999). Nestes estudos foram isoladas estirpes clínicas resistentes a antibióticos

β -lactâmicos com uma característica em comum: a perda simultânea de expressão das porinas OmpK 35 e OmpK 36.

A impermeabilidade pode também contribuir para a resistência ao imipenemo e meropenemo em *Enterobacter* spp., onde alterações na permeabilidade celular e o aumento da produção de β -lactamases cromossômicas se combinam para causar resistência a estes agentes antimicrobianos (Cornaglia *et al.*, 1995; Sanders, 1992).

1.3.3. Sistemas de Efluxo

Processos de efluxo activo têm sido descritos como causa de resistência a antibióticos em bactérias Gram negativo (Nikaido, 1996), como por exemplo, em *Pseudomonas aeruginosa* o sistema Mex AB-OprM que contribui para a resistência a antibióticos β -lactâmicos (Li *et al.*, 1998; Masuda *et al.*, 1999; Nakae *et al.*, 1999).

1.3.4. Inactivação do antibiótico por enzimas

A causa mais comum de resistência a antibióticos β -lactâmicos é a inactivação deste grupo de antibióticos mediada por diversas enzimas (Dever & Dermody, 1991; Gold & Moellering, 1996). Três classes de enzimas podem hidrolizar esta classe de antibióticos: β -lactamases, acilases e esterases (Sousa & Prista, 1988). Contudo, a produção de β -lactamases constitui o principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em enterobactérias (Livermore, 1995). Estas enzimas hidrolizam o anel β -lactâmico produzindo um derivado ácido sem propriedades antibacterianas (Medeiros, 1984; Pitout *et al.*, 1997).

As β -lactamases pertencem ao grupo das proteases, que estruturalmente são semelhantes aos PBPs. Estas enzimas podem ser produzidas por microrganismos Gram negativo ou Gram positivo, podendo a localização dos genes que as codificam ser cromossômica ou extracromossômica (Governado & Hontangas, 1997).

Os níveis de resistência expressos por uma bactéria produtora de β -lactamases podem ser afectados por diversos factores, incluindo a quantidade de enzima produzida, a concentração do antibiótico, a afinidade do antibiótico para estas enzimas, a estabilidade do agente antimicrobiano às β -lactamases (Governado &

Hontangas, 1997; Medeiros, 1984) e, ainda, pela facilidade com que o antibiótico consegue ter acesso ao espaço periplasmático (Rice *et al.*, 2000).

1.4. β -lactamases

1.4.1. Classificação geral das β -lactamases

Quadro I. Classificação de Bush (Adaptado de Pitout *et al.*, 1997)

Grupo	Características	Exemplos de enzimas representativas
1	Cefalosporinas não inibidas pelo ácido clavulânico	AmpC
2a	Penicilinas inibidas pelo ácido clavulânico	PC1 (<i>S. aureus</i>)
2b	Enzimas de largo espectro inibidas pelo ácido clavulânico	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	Enzimas de espectro alargado inibidas pelo ácido clavulânico	TEM-3 a 28, SHV-2 a 6
2br	Enzimas de espectro alargado resistentes ao ácido clavulânico	TEM-30 a 36, TRC-1
2c	Carbenicilinas inibidas pelo ácido clavulânico	PSE-1, CARB-3
2d	Oxacilinas inibidas pelo ácido clavulânico	OXA-1, PSE-2
2e	Cefalosporinas inibidas pelo ácido clavulânico	<i>P. vulgaris</i>
2f	Carbapenemas não-metaloenzimas	IMI-1, NMC-a, Sme-1
3	Metallo- β -lactamases	IMP, VIM, L1 (<i>S. malthophilia</i>)
4	Penicilinas não inibidas pelo ácido clavulânico	<i>B. cepacia</i>

Existem diferentes classificações propostas para as β -lactamases, sendo actualmente a mais aceite a classificação de Bush *et al.* (1995) (Quadro I), na qual se distinguem quatro grupos (dentro dos quais, o grupo 2 inclui 8 subgrupos), em função do perfil do substrato, do perfil de inibição, do ponto isoeléctrico e (quando disponível) da sequência do gene correspondente (Perea & Martínez-Martínez, 1997).

O grupo 1 inclui enzimas que são intrinsecamente resistentes a inibidores de β -lactamases, as enzimas AmpC. Estas enzimas são produzidas naturalmente por uma variedade de espécies da família *Enterobacteriaceae*, de codificação cromossómica e, mais raramente, por genes localizados em plasmídeos (Bush *et al.*, 1995; Perea & Martínez-Martínez, 1997; Pitout *et al.*, 1997).

Entre as várias espécies de *enterobactérias* que produzem AmpC encontra-se *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, etc.). Nestas espécies AmpC pode ser induzida quando exposta a fortes indutores, tais como cefoxitina, cefalosporinas de terceira geração e imipenemo (Dudley, 1995; Governado & Hontangas, 1997).

A grande maioria das estirpes de *Escherichia coli*, produzem quantidades mínimas da β -lactamase cromossômica AmpC (Livermore, 1995). A enzima não é indutível e do ponto de vista clínico é irrelevante, pois não constitui um mecanismo eficaz de resistência aos β -lactâmicos (Perea & Martínez-Martínez, 1997). Contudo, têm sido isoladas estirpes clínicas resistentes à ampicilina e cefalosporinas que produzem grandes quantidades de enzima cromossômica, devido a uma alteração no promotor de AmpC, permitindo assim uma expressão mais eficiente (Jacoby & Archer, 1991).

O grupo 2 inclui várias enzimas que são intrinsecamente susceptíveis aos inibidores de β -lactamases. Neste grupo encontram-se as enzimas do grupo 2b, no qual estão incluídas as β -lactamases mediadas por plasmídeos mais frequentemente isoladas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Sanders & Sanders, 1992), que são do tipo TEM (TEM-1, TEM-2) ou SHV-1 (Dudley, 1995). Estas enzimas conferem resistência a ampicilina, piperacilina e ticarcilina, mas não a cefalosporinas de largo espectro, carbapenemos e monobactâmicos (Jacoby & Archer, 1991). Com exceção de *Klebsiella pneumoniae* (Ferreira *et al.*, 1992; Reig *et al.*, 1993), em que a enzima predominante é SHV-1, nas outras *enterobactérias* a enzima predominante é a TEM-1 (Sousa *et al.*, 1989 a, b; Jacoby, 1994). No grupo 2b encontram-se enzimas que possuem um espectro de actividade alargado e que são resultado de mutações pontuais nos genes que codificam para as enzimas do grupo 2b. Também as enzimas do grupo 2br, enzimas com afinidade reduzida para inibidores de β -lactamases, são estruturalmente derivadas do grupo 2b (Bush *et al.*, 1995).

O grupo 3 inclui as metalo- β -lactamases, enzimas inibidas pelo EDTA. Este grupo inclui enzimas produzidas por *Stenotrophomonas maltophilia*, por espécies de *Aeromonas*, em algumas estirpes de *Bacteroides*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*.

O grupo 4, as penicilinasas não inibidas pelo ácido clavulânico, não é frequentemente encontrado (Pitout *et al.*, 1997).

1.4.2. Detecção e caracterização de β -lactamases

A primeira indicação da presença de β -lactamases decorre geralmente da observação da redução de susceptibilidade nos testes rotineiros de avaliação de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. Esta observação pode ser confirmada por métodos simples de avaliação da produção de β -lactamases, por recurso a reacções cromogénicas, que se podem dividir em reacções em que a hidrólise do β -lactâmico produz uma mudança de cor, como é o caso do nitrocefim, ou em reacções em que esta mudança depende de uma cadeia de reacções (Livermore, 1995).

Nas décadas anteriores, a focagem isoeléctrica teve um papel primordial na identificação e caracterização de β -lactamases (Payne & Farmer, 1998). Contudo, o aumento exponencial do número de β -lactamases, começa a tornar este método insuficiente para permitir uma identificação fiável. De facto, correntemente, 47 β -lactamases focam de pl 5 a pl 6 e 36 enzimas entre 8 e 9. Adicionalmente diversas β -lactamases da família TEM têm o mesmo pl e são, por isso, indistinguíveis por focagem isoeléctrica (Mabilat & Courvalin, 1990; Payne & Farmer, 1998; Payne & Thomson, 1998). Sendo assim outros métodos, tais como técnicas de hibridação de DNA (Arlet & Philippon, 1991; Mastrantonio *et al.*, 1996), oligotipagem (Mabilat & Courvalin, 1990), PCR-SSCP (M'Zali *et al.*, 1996; Speldooren *et al.*, 1998), LCR (Kim & Lee, 2000) têm sido propostos para a identificação de diferentes β -lactamases (Payne & Thomson, 1998). No entanto, em alguns casos, esta caracterização ainda continua a ser combinada com estudos cinéticos e focagem isoeléctrica.

A utilização de sondas para a detecção de genes codificadores de β -lactamases tem sido muito utilizada (Payne & Thomson, 1998). Embora ainda não tenham sido descritas sondas para todos os determinantes, a maioria destes genes de resistência são derivados dos genes que codificam para β -lactamases do tipo TEM, SHV, CARB, PSE, OXA (Tenover & Unger, 1993), IMP e VIM. A maioria destas sondas são fragmentos de restrição de DNA obtidos de plasmídeos recombinantes que codificam as enzimas (Arlett & Philippon, 1991).

As sondas intragénicas são rapidamente produzidas quando a sua sequência está determinada. A utilização de sondas é um método muito útil na classificação de β -lactamases, e tem como vantagem a possibilidade de determinar, quando associada

ao formato *Southern blot*, se o gene da β -lactamase em estudo se localiza num plasmídeo ou no cromosoma (Arlett & Philippon, 1991).

No entanto, a caracterização detalhada de variantes de enzimas apresenta diversas dificuldades. Por exemplo, uma sonda TEM intragénica poderá identificar uma β -lactamase de espectro alargado de tipo TEM, mas poderá não a distinguir da enzima TEM-1 e, por outro lado, o mesmo isolado poderá produzir mais que uma enzima da família TEM (Mabilat & Courvalin, 1990).

Para discriminar variantes de bla_{TEM} Malibat & Courvalin (1990) desenvolveram o método de oligotipagem. Este método, consiste na detecção, através de hibridação com sondas oligonucleótidas, de mutações pontuais nos genes que codificam as β -lactamases. A oligotipagem além de ser um método rápido e sensível tem também como vantagem a capacidade de detecção de genes que codificam enzimas mesmo quando estas estão fenotipicamente disfarçadas pela presença de outras β -lactamases. Contudo, a confirmação e caracterização definitiva de cada enzima necessita da confirmação da sequência nucleotídica do gene que a codifica.

“Polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism” (PCR-SSCP) é um método que tem sido adaptado e aplicado na diferenciação de genes que codificam as β -lactamases. Este método foi aplicado com sucesso na caracterização de β -lactamases do tipo SHV (M`Zali *et al.*, 1996) e na diferenciação de genes derivados de TEM que codificam β -lactamases resistentes a inibidores de β -lactâmicos (Speldooren *et al.*, 1998). PCR-SSCP, ao contrário de outros métodos usados para a caracterização de β -lactamases, tem as vantagens de ser reprodutível, menos trabalhoso e mais rápido (M`Zali *et al.*, 1996; Speldooren *et al.*, 1998).

Recentemente foi aplicada a técnica LCR (“Ligase chain reaction”) à identificação de β -lactamases. Esta técnica utiliza uma ligase termostável e permite a discriminação de sequências de DNA que apenas diferem em um par de bases. Com base nesta técnica, Kim & Lee (2000), desenvolveram um método genotípico para caracterizar mutações pontuais nos genes que codificam as β -lactamases do tipo SHV. Com base nos resultados obtidos, os autores concluem que esta técnica permite uma caracterização detalhada das β -lactamase, mais fácil e rápida que a sequenciação. Ainda concluem que o uso desta técnica poderá ser aplicado à caracterização de

mutações em β -lactamase de espectro alargado de tipo TEM ou outros genes de resistência que apenas defiram numa mutação pontual.

1.4.3. Classificação de β -lactamases de espectro alargado

Diversos esquemas têm sido propostos para a classificação de β -lactamases de espectro alargado (Bush *et al.*, 1995; Jacoby, 1994; Livermore, 1999; Sirot, 1995). Estas enzimas podem ser agrupadas nos seguintes grupos: β -lactamases derivadas de TEM ou SHV, não derivadas de TEM ou SHV (neste grupo são incluídas as β -lactamases cromossómicas de *Klebsiella oxytoca*), cefamicinases e carbapenemases (Livermore, 1999).

O primeiro grupo de β -lactamases de espectro alargado a ser descoberto, e clinicamente mais importante, englobava as enzimas resultantes de mutações nas estruturas dos genes estruturais que codificam as enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 (Bush & Miller, 1998; Jacoby, 1994). Estas mutações alteram a configuração da enzima, perto do seu local activo, provocando um aumento da afinidade e capacidade hidrolítica das β -lactamases para antibióticos β -lactâmicos com grupos oximino (Jacoby & Han, 1996). Além de hidrolizarem cefalosporinas de primeira geração e penicilinas, estas enzimas também causam resistência a oximino- β -lactâmicos (por exemplo, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona e aztreonamo) (Bush *et al.*, 1995; Dudley, 1995) e são sensíveis a inibidores de β -lactamases, tais como ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam.

As β -lactamases derivadas de TEM ou SHV variam consideravelmente no nível de resistência que conferem à cefotaxima, ceftazidima e aztreonamo, considerados os antibióticos principais na diferenciação de fenótipos TEM ou SHV (Sirot, 1995). Os pontos isoeléctricos destas enzimas derivadas de TEM variam de 5,25 a 6,5 enquanto que, as β -lactamases de espectro alargado derivadas de SHV, possuem um ponto isoeléctrico mais alcalino (Sanders, 1992).

Nos quadros II e III estão representadas as β -lactamases de espectro alargado derivadas de SHV e TEM.

Apesar de ser um fenómeno pouco frequente, os genes que codificam as β -lactamases de espectro alargado podem estar localizados no cromossoma, como é o

caso de *Klebsiella oxytoca*. Este microrganismo produz vários tipos de β -lactamases, incluindo uma que confere um baixo nível de resistência à cefotaxima, elevado nível de resistência ao aztreonamo e que apresenta 40% de homologia com a sequência aminoacídica de TEM-1 (Arakawa *et al.*, 1989).

Quadro II: β -lactamases de espectro alargado derivadas de SHV (Adaptado de Jacoby & Bush, 2001)

β -lactamases	pI	Referência
SHV-2	7,6	Kliebe <i>et al.</i> , 1985
SHV-2a	7,6	Podbielski <i>et al.</i> , 1991
SHV-3	7,0	Nicolas <i>et al.</i> , 1993
SVH-4	7,8	Peduzzi <i>et al.</i> , 1989
SHV-5	8,2	Billot-Klein <i>et al.</i> , 1990
SHV-6	7,6	Arlet <i>et al.</i> , 1997
SHV-7	7,6	Bradford <i>et al.</i> , 1995
SHV-8	7,6	Rasheed <i>et al.</i> , 1997
SHV-9 (SHV-5a)	8,2	Prinarakis <i>et al.</i> , 1996; 1997
SHV-12 (SHV-5-2a)	8,2	Nuesch-Inderbinen <i>et al.</i> , 1997
SHV-13	7,6	Yuan <i>et al.</i> , 2000
SHV-14		Yuan <i>et al.</i> , 2001
SHV-15		Chanawong <i>et al.</i> , 2000
SHV-18		Rasheed <i>et al.</i> , 2000
SHV-19		Essack <i>et al.</i> , 2001
SHV-20		Essack <i>et al.</i> , 2001
SHV-21		Essack <i>et al.</i> , 2001
SHV-22		Essack <i>et al.</i> , 2001
SHV-24		Kurokawa <i>et al.</i> , 2000
SHV-25		
SHV -26		
SHV-27	8,2	Corkill <i>et al.</i> , 2001

Quadro III: β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM (Adaptado de Jacoby & Bush 2001)

β -lactamase	pl	Referência	β -lactamase	pl	Referência
TEM-3 (CTX-1) (TEM-14)	6,3	Sirot <i>et al.</i> , 1987 Sougakoff, <i>et al.</i> , 1988	TEM-26 (YOU-1)	5,6	Naumovski <i>et al.</i> , 1992
TEM-4	5,9	Paul <i>et al.</i> , 1989 Sougakoff, <i>et al.</i> , 1989	TEM-27	5,9	Morosini <i>et al.</i> , 1995
TEM-5 (CAZ-1)	5,5	Sougakoff, <i>et al.</i> , 1989 Petit <i>et al.</i> , 1988	TEM-28	6,1	Bradford <i>et al.</i> , 1996
TEM-6	5,9	Bauernfeind & Hörll, 1987	TEM-29	5,42	Arlet <i>et al.</i> , 1995
TEM-7	5,4	Gutmann <i>et al.</i> , 1988	TEM-42	5,8	Chanal <i>et al.</i> , 1997
TEM-8 (CAZ-2)	5,9	Chanal <i>et al.</i> , 1989 Chanal <i>et al.</i> , 1992 Goussard & Courvalin 1999,	TEM-43	6,1	Yang <i>et al.</i> , 1998
TEM-9 (RHH-1)	5,5	Spencer <i>et al.</i> , 1987	TEM-46 (CAZ-9)	6,5	Chanal <i>et al.</i> , 1997
TEM-10 (MGH-1) (TEM-E3) (TEM-23)	5,6	Quinn <i>et al.</i> , 1989 Rice <i>et al.</i> , 1993 Vuye <i>et al.</i> , 1989	TEM-47	6,0	Gniadkowski <i>et al.</i> , 1998
TEM-11 (CAZ-Io)	5,6	Vuye <i>et al.</i> , 1989 Mabilat & Courvalin, 1990 Goussard & Courvalin, 1999	TEM-48	6,0	Gniadkowski <i>et al.</i> , 1998
TEM-12 (YOU-2) (CAZ-3) (TEM-23)	5,25	Goussard & Courvalin, 1999 Webber <i>et al.</i> , 1990 Chanal <i>et al.</i> , 1994	TEM-49	6,0	Gniadkowski <i>et al.</i> , 1998
TEM-13	5,6	Mabilat & Courvalin, 1990 Goussard & Courvalin, 1999	TEM-50 (CMT-1)	5,6	Sirot <i>et al.</i> , 1997
TEM-15	6,0	Mabilat & Courvalin, 1990 Goussard & Courvalin, 1999	TEM-52	6,0	Poyart <i>et al.</i> , 1998
TEM-16 (CAZ-7)	6,3	Gutmann <i>et al.</i> , 1988 Chanal <i>et al.</i> , 1992	TEM-53		Goussard & Courvalin, 1999
TEM-17	5,9	Mabilat & Courvalin, 1990 Rosenau <i>et al.</i> , 2000	TEM-54		Goussard & Courvalin, 1999
TEM-18	6,3	Mabilat & Courvalin, 1990	TEM-55	5,2	Labia <i>et al.</i> , 1997
TEM-19	5,4	Mabilat & Courvalin, 1990	TEM-56	6,4	Neuwirth <i>et al.</i> , 2000
TEM-20	5,4	Ben <i>et al.</i> , 1990 Arlet <i>et al.</i> , 1995 ; 1999	TEM-57	5,2	Bonnet <i>et al.</i> , 1999
TEM-24 (CAZ-6)	6,5	Chanal <i>et al.</i> , 1989 ; 1992 Goussard & Courvalin 1999,	TEM-58	5,2	Speldooren <i>et al.</i> , 1998
TEM-25 (CTX-2)	5,3	Poupart, <i>et al.</i> , 1991 Chanal <i>et al.</i> , 1994	TEM-60	6,4	Franceschini <i>et al.</i> , 1998

Quadro III: β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM (Adaptado de Jacoby & Bush, 2001) (continuação)

β -lactamase	pI	Referência	β -lactamase	pI	Referência
TEM-61 (CAZ-hi)	6,5	Vuye <i>et al.</i> , 1989	TEM-80		
TEM-62		Essack <i>et al.</i> , 1998	TEM-81		
TEM-63 (TEM-64)	5,6	Essack <i>et al.</i> , 1998	TEM-82		
TEM-66	6,0	Bonnet <i>et al.</i> , 1999	TEM-83		
TEM-67			TEM-84		
TEM-68	5,7	Fiett <i>et al.</i> 2000	TEM-85		
TEM-69			TEM-86		
TEM-70	5,2		TEM-87		
TEM-71			TEM-88		
TEM-72		Perilli <i>et al.</i> , 2000	TEM-89		
TEM-75	5,2	Bonnet <i>et al.</i> , 1999	TEM-90	5,55	

Outro tipo de β -lactamases de espectro alargado são as enzimas que conferem resistência a α -metoxicefalosporinas, tais como cefoxitina, cefotetan, assim como a oximino- β -lactâmicos (Bush *et al.*, 1995; Jacoby & Han, 1996; Livermore, 1995). Estas enzimas não são inibidas pelo ácido clavulânico nem por outro inibidor de β -lactamases (Tenover *et al.*, 1999). No quadro IV estão representadas as β -lactamases de espectro alargado do tipo AmpC conhecidas até à data, o seu ponto isoeléctrico, os microrganismos onde foram descritas pela primeira vez e o seu país de origem.

A partir de 1990 têm aumentado as referências de β -lactamases de tipo AmpC mediadas por plasmídeos, havendo já descrição de alguns surtos causados por espécies da família *Enterobacteriaceae* que produtoras destas enzimas (Bradford *et al.*, 1997; Gazouli *et al.*, 1996; Nadjar *et al.*, 2000; Papanicolau *et al.*, 1990).

A elevada homologia encontrada entre β -lactamases plasmídicas do tipo AmpC e o gene *ampC* localizado no cromossoma de diversas espécies sugere uma possível origem cromossómica. Como exemplos, as enzimas CMY-2 (Bauernfeind *et al.*, 1996), BIL-1 (Payne *et al.*, 1992), LAT-2 (Gazouli *et al.*, 1996), CMY-4 (Verdet *et al.*, 1998), LAT-3 e LAT-4 (Gazouli *et al.*, 1996) estão altamente relacionadas com a cefalosporinase cromossómica de *Citrobacter freundii*, as enzimas MIR-1 (Papanicolau *et al.*, 1990) e ACT-1 (Bradford *et al.*, 1997) com a cefalosporinase cromossómica de

Enterobacter cloacae. Por outro lado as enzimas CMY-1 (Bauernfeind *et al.*, 1989), MOX-1 (Horii *et al.*, 1993) e FOX-1 (Leiza *et al.*, 1994) demonstram elevada homologia com a enzima cromossômica de *Pseudomonas aeruginosa*, as enzimas DHA-1 (Barnaud *et al.*, 1998) e DHA-2 (Fortineau *et al.*, 2001) com o gene *ampC* de *Morganella morganii*, e a enzima ACC-1 aparenta derivar da enzima AmpC cromossômica de *Hafnia alvei* (Rouveau *et al.*, 2000).

Quadro IV: β -lactamases de espectro alargado do tipo AmpC.

β -lactamase	Microrganismo	País de origem	pl	Referência
CMY-1	<i>K. pneumoniae</i>	Coreia do sul	8,0	Bauernfeind <i>et al.</i> , 1989
CMY-2	<i>K. pneumoniae</i>	Grécia	8,1	Bauernfeind <i>et al.</i> , 1990
CMY-3	<i>P. mirabilis</i>	França	9,0	Bret <i>et al.</i> , 1998
CMY-4	<i>P. mirabilis</i>	Tunísia	9,2	Verdet <i>et al.</i> , 1998
CMY-5	<i>K. oxytoca</i>	Suécia		Wu <i>et al.</i> , 1999
CMY-8	<i>K. pneumoniae</i>	Taiwan	8,25	Yan <i>et al.</i> , 2000
MIR-1	<i>K. pneumoniae</i>	EUA	8,4	Papaniculaou <i>et al.</i> , 1990
BIL-1	<i>E. coli</i>	Paquistão	8,8	Payne <i>et al.</i> , 1992
MOX-1	<i>K. pneumoniae</i>	Japão	8,9	Horii <i>et al.</i> , 1993
LAT-1	<i>K. pneumoniae</i>	Grécia	9,4	Tzouvelekis <i>et al.</i> , 1993
LAT-2	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i>	Grécia	9,1	Gazouli <i>et al.</i> , 1996
LAT-3	<i>E. coli</i>	Grécia	8,4	Gazouli <i>et al.</i> , 1998
LAT-4	<i>E. coli</i>	Grécia	9,4	Gazouli <i>et al.</i> , 1998
FOX-1	<i>K. pneumoniae</i>	Argentina	6,8-7,2	Leiza <i>et al.</i> , 1994
FOX-2	<i>E. coli</i>	Alemanha	6,7	Bauernfeind <i>et al.</i> , 1997
FOX-3	<i>K. oxytoca</i>	Itália	7,25	Marchese <i>et al.</i> , 1998
FOX-4	<i>E. coli</i>	Espanha	6,4	Bou <i>et al.</i> , 2000
DHA-1	<i>S. enteritidis</i>	Arábia Saudita	7,8	Gaillet <i>et al.</i> , 1997
DHA-2	<i>K. pneumoniae</i>	França		Fortineau <i>et al.</i> , 2001
ACT-1	<i>K. pneumoniae</i>	EUA	9,0	Bradford <i>et al.</i> , 1997
ACC-1	<i>K. pneumoniae</i>	Alemanha	7,7	Bauernfeind <i>et al.</i> , 1999

A enzima CMY-3 descrita em *Proteus mirabilis* tem localização cromossômica. É sugerido que o gene *ampC* tipo *bla*_{CMY-2} migrou do cromossoma de *C. freundii* para um plasmídeo através de um transposição. Este plasmídeo após ter sido transferido para

P.mirabilis, foi transposto do plasmídeo para o cromossoma (Bret *et al.*, 1998), como sugerido anteriormente para ACT-1 (Bradford *et al.*, 1997).

Com exceção de DHA-1 e DHA-2, nenhuma das enzimas descritas apresenta o gene regulador amp^R. A enzima DHA-2 tem também a particularidade de ser a primeira cefalosporinase plasmídica indutível descrita em *Klebsiella pneumoniae* (Fortineau *et al.*, 2001).

É de salientar que a enzima CMY-2, apesar de ser descrita pela primeira vez em *Klebsiella pneumoniae*, foi já encontrada numa estirpe de *Salmonella* spp. isolada de animais e humanos (Winokur *et al.*, 2000). Este facto representa um problema terapêutico tanto na saúde humana, assim como animal. Além disso, levanta questões adicionais acerca da associação entre a resistência a agentes antimicrobianos, o uso de antibióticos nos animais e a transferência de *Salmonella* spp. com múltipla resistência entre homens e animais.

As carbapenemases constituem outro grupo de β -lactamases de espectro alargado. As carbapenemases da classe molecular A são raras e existem apenas alguns exemplos, NMC-A Sme-1 e IMI-1 em *Enterobacter* spp. e *Serratia* spp. As carbapenemases de classe B foram conhecidas durante algum tempo como enzimas mediadas pelo cromossoma, no entanto, começam já a aparecer genes transferíveis que codificam estas enzimas. Estas enzimas foram já encontradas em *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp, *Klebsiella pneumoniae* e ainda em *Acinetobacter* spp. (Livermore, 1999).

1.4.4. Detecção de estirpes produtoras de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM e SHV

A prevalência de estirpes produtoras de β -lactamases de espectro alargado, é, provavelmente, maior do que o que é geralmente descrito, pois existem algumas dificuldades na sua detecção laboratorial (Coudron *et al.*, 1997; Katsanis *et al.*, 1994; Vercauteren *et al.*, 1997). Algumas β -lactamases de espectro alargado conferem elevado nível de resistência a todos os oximino- β -lactâmicos, enquanto que, outras apenas conferem uma diminuição de susceptibilidade ou resistência a um determinado β -lactâmico, o que pode provocar um problema para o laboratório clínico, uma vez que os organismos que produzem β -lactamases de espectro alargado menos activas

poderão escapar à detecção laboratorial e estarem na origem de insucessos terapêuticos (Jacoby & Han, 1996; Katsanis, *et al.*, 1994). Existem já descritos alguns casos de insucesso terapêutico com cefalosporinas de espectro alargado, usadas para tratamento de infecção causadas por enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro alargado (Bush *et al.*, 1995; Thomson *et al.*, 1999).

O desenvolvimento de vários testes para a detecção de β -lactamases de espectro alargado denota a grande necessidade da sua utilização. Até os testes se tornarem válidos, os hospitais correm o risco da disseminação de estirpes resistentes que escaparem à detecção. Mais importante, os pacientes, continuarão a correr o risco de serem infectados com estirpes que não responderão à terapia aparentemente apropriada (Sanders *et al.*, 1996).

Diversos métodos para a detecção de estirpes produtoras de β -lactamases foram já descritos: método do sinergismo entre discos (Jarlier *et al.*, 1988), teste tri-dimensional (Thomson & Sanders, 1992), painéis de microdiluição (Moland *et al.*, 1998; Thomson *et al.*, 1999), teste "Vitek" (Sanders *et al.*, 1996) e tiras "E-test" para a detecção de β -lactamases de espectro alargado (Cormican *et al.*, 1996; Vercauteren *et al.*, 1997). Além destes métodos, foi recentemente descrito o teste "Mast Double Disc" (M'Zali *et al.*, 2000). No entanto, continua a haver a necessidade de um método fácil, rápido e reprodutível para a detecção de estirpes produtoras de β -lactamases de espectro alargado, e que possa ser convenientemente usado em ensaios de diagnóstico rotineiros em laboratórios clínicos (M'Zali *et al.*, 2000).

O teste de sinergismo de disco duplo, descrito por Jarlier *et al.* (1988), é baseado no sinergismo entre inibidores de β -lactamases e cefotaxima, ceftazidima e aztreonam. Este método consiste na colocação de discos de cefalosporinas de terceira geração na proximidade, de 20 a 30 mm, de discos contendo ácido clavulânico, numa placa inoculada com o organismo a testar. O aumento da zona de inibição entre o disco de cefalosporina e o disco com ácido clavulânico é indicação da presença de uma enzima 2be do grupo de Bush (Jarlier *et al.*, 1988; Thomson & Sanders, 1992). Este método demonstrou ser um método simples, sendo usado como método de referência para a detecção de estirpes produtoras de β -lactamases de espectro alargado (Katsanis *et al.*, 1994; Sanders *et al.*, 1996; Thomson & Sanders, 1992). Este método permite testar mais que um agente antimicrobiano, permitindo

assim uma maior sensibilidade na detecção de β -lactamases de espectro alargado (Coudron *et al.*, 1997). No entanto, a colocação precisa e o correcto armazenamento dos discos, e a criação de testes apropriados de controlo são factores críticos na sensibilidade deste método (Cormican *et al.*, 1996).

Dois produtos disponíveis comercialmente, o teste "Vitek" (BioMerieux Vitek, Hazelwood, Mo) (Sanders *et al.*, 1996; Tzouvelekis *et al.*, 1999) e as tiras de "E-test" (AB Biodisk, Solna, Sweden) (Cormican *et al.*, 1996; Vercauteren *et al.*, 1997) são também usados na detecção de estirpes produtoras de β -lactamases. Estes testes demonstraram uma percentagem de sensibilidade superior a 90% (Tenover *et al.*, 1999). Ambos os testes são baseados na avaliação da concentração mínima inibitória para a ceftazidima na presença de uma concentração fixa de ácido clavulânico. A ceftazidima é, geralmente, o antibiótico escolhido para estes testes, pois é um excelente substrato para a maioria das β -lactamases de espectro alargado descritas (Katsanis *et al.*, 1994).

No método "Mast Double Disc" é colocado um disco contendo uma cefalosporina de terceira geração e um disco complementar contendo essa cefalosporina e ácido clavulânico numa placa inoculada com a estirpe a testar. Quando a razão entre o halo de inibição do disco de cefalosporina com o ácido clavulânico e o halo de inibição do disco da cefalosporina é igual ou superior a 1,5, indica a presença de uma estirpe produtora de β -lactamases de espectro alargado. De acordo com os autores, este teste tem a vantagem de, comparativamente ao método de disco duplo e tiras "E-test", ser menos dispendioso (M`Zali *et al.*, 2000).

1.5. Determinantes genéticos da resistência a antibióticos

A resistência bacteriana a antibióticos pode ser classificada como intrínseca, natural ou adquirida (Courvalin, 1996; Hayes & Wolf, 1990; Trieu-Cuot & Poyart, 1998). Estudos genéticos e bioquímicos revelam que a resistência adquirida é conduzida por dois processos genéticos na bactéria: mutação e selecção (frequentemente denominada evolução vertical) e troca de genes entre estirpes, espécies e/ou mesmo entre géneros (evolução horizontal) (Smith & Lewin, 1993).

Existem diversos mecanismos que podem contribuir para a resistência bacteriana aos agentes antibacterianos (Nikaido, 1998; Pelczar, 1993; Smith & Lewin, 1993; Trieu-Cuot & Poyart, 1998), estes podem ser sumariados do seguinte modo:

- síntese de enzimas em quantidade suficiente que destroem ou modificam a estrutura do antibiótico, tornando-o inactivo. Exemplos deste tipo de mecanismo são a hidrólise de penicilinas formando ácido penicilóico ou a inactivação do cloranfenicol mediada por acetiltransferases (CATs).

- impossibilidade de acesso do antibiótico ao seu local específico de actuação, como por exemplo, a resistência de algumas estirpes de Gram negativo ao cloranfenicol, β -lactâmicos, tetraciclina e quinolonas, que pode ser devida à impermeabilização da membrana exterior.

- modificação do receptor alvo do antibiótico. É o caso da resistência aos macrólidos (exemplo, a eritromicina) nas bactérias Gram negativo. Estes antibióticos têm afinidade para o RNA 23S, pelo que a sua metilação, em bactérias produtoras de metilases, determinam a perda de afinidade do antibiótico para o seu receptor modificado.

- redução da acumulação do agente antimicrobiano, esta diminuição pode ser devida a uma bomba de efluxo membranar, sintetizada pela bactéria, que expulsa o antibiótico (por exemplo, a tetraciclina) para o exterior da bactéria.

1.5.1. Resistência intrínseca e resistência natural

A resistência intrínseca refere-se ao comportamento de algumas espécies bacterianas, que apresentam sempre uma concentração mínima inibitória para um antibiótico superior ao que inibe normalmente outras bactérias de características semelhantes. Este facto pode dever-se a características particulares do agente antimicrobiano ou da espécie bacteriana, que impedem o acesso normal do fármaco ao seu local específico de actuação. Também ocorre quando há modificações naturais no local alvo e quando toda a população bacteriana apresenta de um modo natural um mecanismo de resistência. A resistência das enterobactérias à vancomicina e eritromicina, assim como a resistência de *Staphylococcus aureus* ao ácido nalidíxico e o género *Enterococcus* às cefalosporinas, são exemplos de resistência intrínseca (Moreno, 1997).

A resistência natural implica a insensibilidade da bactéria ao antibiótico por carecer da estrutura alvo do antibiótico. Como exemplos deste tipo de resistência, pode-se referir a resistência das bactérias Gram positivo à polimixina. Este antibiótico actua sobre a membrana externa dos microrganismos Gram negativo, estrutura inexistente nas bactérias Gram positivo (Moreno, 1997).

1.5.2. Resistência adquirida

A expressão “resistência adquirida” é usada para descrever a situação em que uma estirpe resistente emerge de uma população previamente sensível a um determinado agente antimicrobiano (Hayes & Wolf, 1990).

A resistência bacteriana adquirida pode ser o resultado final de uma mutação no cromossoma, ou num plasmídeo da célula hospedeira, da aquisição de nova informação genética (Courvalin, 1996), através de um plasmídeo, transposição ou integração (Roy, 1999; Trieu-Cuot & Poyart, 1998), ou ainda, devida a mutações no material genético adquirido (Moreno, 1997)

1.5.2.1. Mutação

As mutações são alterações na sequência nucleotídica de um gene que ocorrem espontaneamente durante o processo de replicação do DNA (Pereira, 1998). No caso da resistência bacteriana a antibióticos, a taxa de mutação é frequentemente definida como a frequência *in vitro* com que mutantes detectáveis emergem na população bacteriana na presença de uma determinada concentração de antibiótico (Martinez & Baquero, 2000). O processo de mutação na população bacteriana não é um evento estático e diversos factores podem influenciar a frequência e tipo de mutantes que podem ser seleccionados sob uma determinada pressão antibiótica selectiva. Por exemplo, a frequência de mutação pode mudar fortemente de acordo com a concentração de um determinado antibiótico (Kohler *et al.*, 1997). Outro factor que pode regular a frequência de mutação são as condições fisiológicas, tal como a disponibilidade de uma determinada fonte de carbono (Hughes & Andersson, 1997).

Existem três importantes tipos de genes intrínsecos (que preexistem no genoma das populações susceptíveis) que são relevantes para a emergência de mutantes resistentes a antibióticos (Martinez & Baquero, 2000): genes envolvidos na síntese e

posição do receptor alvo do antibiótico (incluindo aqueles que são requeridos para a activação do antibiótico inicialmente inactivo); genes envolvidos no acesso do antibiótico ao receptor; e genes envolvidos na protecção do local de acção do antibiótico, incluindo destoxicação pelas enzimas que modificam o antibiótico ou efluxo de compostos antibacterianos.

As mutações cromossómicas apenas podem ser transmitidas à descendência durante a replicação, sendo assim, a capacidade de alastramento deste tipo de resistência é limitada (Smith & Lewin, 1993).

1.5.2.2. Aquisição de plasmídeos, transposões e integrões

Os genes que conferem resistência podem ser transferidos de uma bactéria resistente para uma bactéria sensível através de mecanismos de transferência de genes: conjugação, transformação ou transdução. A resistência transmissível é mediada via plasmídeos, transposões ou integrões (Davies, 1993; Roy, 1999; Smith & Lewin, 1993).

A transferência de genes, via plasmídeos, tem um papel primordial na disseminação de resistência (Davies, 1993). Os plasmídeos são elementos genéticos extracromossómicos, transmissíveis de forma estável a novas gerações, e que, têm um sistema de replicação próprio e autónomo (Pelczar *et al.*, 1993; Pereira, 1998; Sousa & Prista, 1988). Este DNA extracromossómico ocorre naturalmente em bactérias, no núcleo de leveduras e em algumas células eucarióticas (Lodish *et al.*, 1996), o seu tamanho pode variar de 3 kb a 400 Kb (Pereira, 1998).

Os plasmídeos não são essenciais para a célula bacteriana, no entanto, se existirem podem conferir à célula novas funções que poderão ser vantajosas. Por exemplo, alguns plasmídeos bacterianos codificam enzimas que inactivam antibióticos, sendo assim, uma célula bacteriana que contenha este plasmídeo é resistente ao antibiótico, e pode-se replicar num ambiente que contenha este agente antibacteriano, enquanto que o mesmo tipo de bactéria que não possua este plasmídeo morrerá neste ambiente (Lodish *et al.*, 1996). Uma bactéria pode albergar mais do que um plasmídeo. É frequente que um plasmídeo possua vários genes de resistência, pelo que, um só plasmídeo pode determinar resistência a cerca cinco a seis famílias de antibióticos (Trieu-Cuot & Poyart, 1998).

Os plasmídeos podem ser conjugativos, se transportarem os genes que codificam as funções para a sua transferência, incluindo o genes que codificam a síntese de pili sexual, elemento essencial à reunião entre duas células. No entanto, existem inúmeros exemplos de plasmídeos, particularmente plasmídeos de resistência, que não possuem as funções de transferência. Contudo, estes plasmídeos podem ser mobilizados pelos plasmídeos conjugativos e, desta forma, passarem para outras estirpes bacterianas (Pereira, 1998).

Estudos ambientais sugerem que a resistência a antibióticos mediada por plasmídeos é comum em microrganismos de ambiente marinho, estuários e rios (Baya *et al.*, 1986; Burton *et al.*, 1982; Dahlberg *et al.*, 1997; Goodman *et al.*, 1993; Hada & Sizemore, 1981; Hermasson *et al.*, 1987), mesmo na ausência de uma pressão antibiótica selectiva (French *et al.*, 1987).

Os transposões são segmentos de DNA móveis que se podem inserir em vários locais do cromossoma bacteriano, assim como mover-se entre plasmídeos (Gold & Moellering, 1996), permitindo a translocação de genes de resistência do cromossoma bacteriano para um plasmídeo, ou de um plasmídeo para outro, originando assim a construção de inúmeros plasmídeos diferentes (Trieu-Cuot & Poyart, 1998).

Os transposões não possuem funções auto-replicativas e para se perpetuarem necessitam dos replicões (segmentos de DNA de cadeia dupla servidos por uma única origem de replicação e que transportam os genes necessários à sua replicação) (Pereira, 1998).

A maior parte da disseminação da resistência a antibióticos em bactérias Gram negativo é devida aos integrões (Roy, 1999). Os integrões podem ser divididos em quatro classes, tendo por base a natureza do gene da integrase e o tamanho da estrutura (Poirel *et al.*, 2000). Os integrões mais frequentemente encontrados em isolados clínicos resistentes a antibióticos de membros da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* pertencem à classe 1 (Poirel *et al.*, 1999). Um integrão da classe 1, pode ser definido como um elemento genético móvel que possui dois segmentos conservativos, localizados em cada lado do local de inserção da cassete de genes. O segmento 5' inclui um gene, *int1*, que codifica a integrase; *attI*, local de integração da cassete; e o promotor, *Pant*, que é responsável pela expressão da cassete de genes (Bennet, 1999; Hall, 1997; Lévesque *et al.*, 1995; Poirel *et al.*, 1999). O segmento

3'incluí duas "open reading frames" (ORFs) e o determinante de resistência à sulfamida (Recchia & Hall, 1995).

Os integrões podem ser encontrados no cromossoma, em transposões da família Tn21, ou ainda, em plasmídeos de diversos grupos de hospedeiros (Lévesque *et al.*, 1995; Olsen, 1999).

Recentemente, em França, foi descrito um integrão, denominado In52, pertencente à classe 1, com genes que codificam β -lactamases de espectro alargado numa estirpe de *Klebsiella pneumoniae* (Poirel *et al.*, 2000).

1.6. Transferência de genes em ambiente marinho

A transmissão horizontal de genes tem grande impacto na adaptabilidade, evolução e diversidade genética bacteriana (Dahlberg *et al.*, 1997; Saye *et al.*, 1990). As bactérias podem transferir a sua informação genética através de três mecanismos: transformação, transdução e conjugação. Existem trabalhos que demonstram que estes mecanismos podem ocorrer em ambiente marinho (Gauthier & Breitmayer, 1990; Jiang & Paul, 1998; Paul *et al.*, 1991; Stewart & Sinigalliano, 1990).

1.6.1. Transformação

A transformação genética consiste na captação de DNA extracelular (plasmídico e/ou cromossómico) e incorporação desta informação genética hereditária no interior da célula. Este mecanismo depende do funcionamento de diversos genes localizados no cromossoma bacteriano (Lorenz & Wackernagel, 1994).

Um processo completo de transformação engloba quatro etapas sucessivas: desenvolvimento do estado de competência (capacidade de adquirir DNA), ligação de DNA, integração e processamento do DNA, e expressão fenotípica do novo genotipo. Esta sequência é comum a todas as bactérias e necessária para uma detecção bem sucedida de transformantes (Baur *et al.*, 1996).

Nem todas as células da população bacteriana estão preparadas para receber o DNA exógeno. Somente as células que se encontram num estado fisiológico particular, em estado de competência, poderão ser transformadas (Bergmans *et al.*, 1981; Pereira, 1998). A competência natural tem sido geralmente diferenciada da

competência artificial, esta última resulta de tratamentos físico-químicos que forçam à captação de DNA exógeno (Baur *et al.*, 1996). São conhecidas diversas estirpes, pertencentes a géneros de bactérias Gram negativo ou positivo, que desenvolvem competência natural (Pereira, 1998). A dificuldade em estudos de desenvolvimento de competência natural é descobrir quais os parâmetros ambientais relevantes que regulam esta indução (Baur *et al.*, 1996). Lorenz & Wackernagel (1994) reviram alguns destes parâmetros, notando, nomeadamente, que as bactérias têm de estar metabolicamente activas e que a limitação de nutrientes pode regular o desenvolvimento de competência em bactérias Gram negativo.

Alguns estudos realizados com o intuito de investigar a prevalência e a natureza de DNA livre em ambientes aquáticos, demonstraram que, em ambiente marinho existe uma concentração de DNA dissolvido, biologicamente significativa (DeFlaun *et al.*, 1986). Sendo assim, este ambiente oferece uma localização potencial para a transformação natural (Stewart & Sinigalliano, 1990).

Várias experiências de transformação têm sido realizadas em ambiente marinho. Stewart & Sinigalliano (1990) demonstraram a aquisição de DNA cromossómico, que confere resistência à rifampicina, através de transformação de uma bactéria marinha (*Pseudomonas stutzeri* ZoBell) em microcosmos laboratoriais contendo sedimentos estéreis e não estéreis. Além disso, observaram que não foi captado DNA na ausência de partículas de sedimentos o que leva a concluir que os sedimentos marinhos facilitam o processo de transformação em ambiente marinho. Paul *et al.* (1991) investigaram a transformação de uma estirpe de *Vibrio* em água marinha e em sedimentos. Estes autores verificaram que a transformação desta estirpe pode ocorrer em ambiente marinho, mas a probabilidade de ocorrer na coluna de água é maior que nos sedimentos. Os resultados dos estudos de transformação em sedimentos marinhos são contraditórios, talvez este facto reflecta a impossibilidade de generalizar os resultados obtidos com o ecotipo de espécies bacterianas e o seu ambiente (Lorenz & Wackernagel, 1994).

1.6.2. Transdução

A transdução é um processo que envolve a transferência de material genético de uma célula, e sua incorporação por recombinação, noutra célula através de um vector

viral (Lima, 1998). Estes vectores ligam-se a bactérias e injectam-lhe o seu DNA. Este DNA serve como molde para a produção de várias cópias do vírus, que irrompem da bactéria infectada e vão infectar outras células. Sendo assim, estes vectores virais têm a capacidade de transferir plasmídeos inteiros ou fragmentos de cromossomas entre bactérias (Miller, 1998).

A descoberta de existência de bacteriófagos, em elevado número, em ambiente aquático, incluindo o marinho (Ichige *et al.*, 1989; Miller, 1998; Wichels *et al.*, 1998), permitiu especular sobre o envolvimento de vírus na transferência de genes, em ambiente aquático.

Os ecossistemas aquáticos contêm uma diversidade de factores ambientais, alguns dos quais com bastante influência no processo da transdução. Segundo Ripp & Miller (1995), a matéria particulada, quer presente como material suspenso quer como sedimentos, é potencialmente o mais importante destes factores. Estes autores sugerem que as agregações de bacteriófagos e células bacterianas são estimuladas pela presença destas partículas suspensas. A agregação aumenta a probabilidade de descendência fágica e de partículas transdutoras encontrarem e infectarem novas células.

A capacidade de ocorrência de transdução em ambiente aquático foi confirmada por estudos de Saye *et al.* (1987, 1990) que demonstraram que a transdução de genes existentes em plasmídeos ou em cromossomas, entre estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*, pode ocorrer em habitats de água doce. Mais recentemente, Jiang & Paul (1998) verificaram que um fago marinho consegue transferir um plasmídeo que confere resistência a antibióticos entre estirpes bacterianas. Estes autores sugerem ainda que a transdução pode ser um importante mecanismo para a transferência genética, em ambiente marinho, contribuindo assim, para a diversidade genética de populações microbianas marinhas.

1.6.3. Conjugação

A conjugação é um processo de transferência de DNA de uma célula dadora para uma célula receptora (Pelczar *et al.*, 1993; Trieu-Cuot & Poyart, 1998). Este processo é considerado o mecanismo de transferência de genes mais estudado em ambiente aquático (Young, 1993) e o que possui mais requisitos: a célula dadora tem de conter

um elemento conjugativo (plasmídeo ou transposição) e as células intervenientes têm de estabelecer um contacto físico estável para permitir a transferência de DNA (Lorenz & Wackernagel, 1994).

Estudos de conjugação de plasmídeos têm sido realizados em vários ambientes, incluindo o marinho, ou em modelos que tentam reproduzir as condições marinhas. Alguns destes estudos sugerem que a conjugação em ambiente marinho pode ocorrer em diversas condições de stress salino, pH, temperatura e limitação de nutrientes (Dahlberg *et al.*, 1998; Fernandez-Astorga *et al.*, 1992; Gauthier & Breittmayer, 1990; Goodman *et al.*, 1993).

Em ambiente marinho, as áreas preferenciais para a ocorrência da conjugação aparentam ser os sedimentos, devido à alta densidade de células bacterianas e, possivelmente, à acumulação de osmólitos orgânicos (Gauthier & Breittmayer, 1990).

A troca de genes, por conjugação, pode ocorrer de três modos diferentes, dependendo da origem das células dadoras e receptoras: transferência entre bactérias terrestres, entre bactérias marinhas de populações autóctones, e entre estas duas populações. Neste último caso, a transferência pode ocorrer em ambas as direcções, desde que os plasmídeos estejam presentes nas bactérias terrestres ou marinhas (Gauthier & Breittmayer, 1990).

A conjugação, e consequentemente transferência de plasmídeos que possuem determinantes com resistência a múltiplos antibióticos, é um fenómeno ambiental, que pode ocorrer, mesmo na ausência de antibióticos, entre estirpes humanas, de mamíferos e de peixes, que não estão relacionadas nem evolutivamente nem ecologicamente (Kruse & Sørnum, 1994).

1.7. Resistência a antibióticos em ambiente marinho

Os microrganismos que apresentam maiores níveis de resistência a agentes antibacterianos são normalmente isolados de ambientes com grande potencial para contaminação por antibióticos, tais como hospitais, efluentes de esgotos hospitalares, de indústria de pesca e matadouros (Acar & Courvalin, 1998; Gauthier & Breittmayer, 1990; Mach & Grimes, 1982; Kruse & Sørnum, 1994; Smith & Lewin, 1993). No entanto, começam já a ser isoladas bactérias resistentes a antibióticos de ambientes

aparentemente não selectivos, tais como: ambiente marinho (Baya *et al.*, 1986; Belliveau *et al.*, 1991; Capone & Bauer, 1992; De Vicente *et al.*, 1990; Goyal & Adams, 1984; Hermasson *et al.*, 1987; Herwing *et al.*, 1997; Niemi *et al.*, 1983), águas de consumo (Armstrong *et al.*, 1981, 1982; Calomiris *et al.*, 1984; Quinteira, 1999), em esgotos antes e após tratamento (Altherr & Kasweck, 1982; Bell, 1978; Bell *et al.*, 1983; Murray *et al.*, 1984; Niemi *et al.*, 1983), estuários (Pettibone *et al.*, 1987, Shaw & Cabelli, 1980) e ainda em rios (Baur *et al.*, 1996; Boon & Cattanach, 1999; Burton *et al.*, 1982; French *et al.*, 1987; Kaspar *et al.*, 1990). Este aumento significativo do número de bactérias, que apresentam resistência a antibióticos, nestes ambientes, poderá ser resultado do uso abusivo e inapropriado de antimicrobianos na agricultura, criação de animais, assim como da prática de lançamento de esgotos sem tratamento em águas receptoras (Baya *et al.*, 1986; Kruse & Sørum, 1994; Young, 1993). Além disso, o lançamento de esgotos, em ambientes marinhos, permite que bactérias intestinais terrestres e que possuem elementos de resistência móveis possam transferir estes genes a microrganismos nativos marinhos, podendo estes funcionar como hospedeiros de genes de resistência clinicamente importantes, e simultaneamente estarem aptos para reintroduzir estes genes em bactérias humanas (Young, 1993).

Em ambiente marinho, é possível encontrar bactérias resistentes a antibióticos, tanto na interface ar-água, como em sedimentos. Hermasson *et al.* (1987) observaram que em águas marinhas costeiras, a frequência de estirpes bacterianas pigmentadas, resistentes a antibióticos e tolerantes ao mercúrio é maior na interface ar-água que na coluna de água. Estes autores defendem que este facto poderá ser consequência da pressão selectiva existente na interface, que poderá favorecer a sobrevivência e proliferação de uma população especializada e, por outro lado, a troca de informação genética entre as células na interface pode ser um aspecto da evolução desta população. O aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos em sedimentos poderá ser resultado do desenvolvimento de indústrias de Aquacultura em zonas costeiras (Capone & Bauer, 1992). Nestas indústrias, os antibióticos são geralmente administrados na alimentação dos peixes, tanto com fim terapêutico, como, em menor extensão, no tratamento profilático de stocks de peixes (Grave *et al.*, 1990). Devido aos restos alimentares e baixa eficiência digestiva de alguns antibióticos (por exemplo, a oxitetraciclina) (Cravedi *et al.*, 1987), uma fracção substancial do antibiótico pode ser

lançado no ambiente aquático, depositando-se predominantemente nos sedimentos. Alguns estudos, indicam que, em condições ideais, a oxitetraciclina é degradada em poucas semanas, contudo, em condições de alta sedimentação e rápido soterramento, como acontece em alguns viveiros, pode persistir muito mais tempo (Jacobsen & Berglind, 1988). Entre os vários resultados possíveis do uso de antibióticos e a sua acumulação nos sedimentos, os mais relevantes são a inibição e ruptura da microbiota natural, assim como o desenvolvimento de resistência a antibióticos em populações de sedimentos (Capone & Bauer, 1992). Os sedimentos, devido à sua matriz protectora e à baixa temperatura em que se encontram, aparentam sustentarem a viabilidade de bactérias, actuando assim como um reservatório a longo prazo de bactérias resistentes que podem ser reintroduzidas no ambiente pela pesca por arrasto, barcos em movimento ou outras actividades (Goyal & Adams, 1984).

A frequência e tamanho dos plasmídeos de bactérias de estuários ou águas marinhas variam de zonas limpas para zonas poluídas. As estirpes que existem em zonas marinhas poluídas possuem maior número de plasmídeos, e com maior tamanho, que estirpes isoladas de zonas sem poluição (Gauthier & Breittmayer, 1990). A exemplificar esta observação estão os trabalhos realizados por Hada & Sizemore (1981) e por Baya *et al.* (1986). Os primeiros autores examinaram 440 estirpes de vibrios marinhos planctónicos, isolados de um campo petrolífero e de uma área controlo no Golfo do México. Verificaram que em local poluído 31% das estirpes possuem, em média, 2,5 plasmídeos, enquanto que em zonas não poluídas apenas 23% das estirpes possuem plasmídeos (em média 1,5 plasmídeos/estirpe). Baya *et al.* (1986) também observaram que bactérias isoladas de desperdícios com químicos tóxicos contêm mais frequentemente plasmídeos e revelam uma maior incidência de resistência a antibióticos do que bactérias isoladas de amostras de esgoto doméstico; estes autores concluem que a poluição química de áreas oceânicas poderá aumentar a tolerância das bactérias a estes agentes químicos.

2. Objectivos

Na década de 90 foram realizados estudos sobre a incidência e caracterização dos mecanismos de resistência a antibióticos β -lactâmicos em coliformes de origem hospitalar e ambulatória na região urbana do Porto (Carneiro *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1992; Neto *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1993; Sousa *et al.*, 1989 a, b), incluindo *Escherichia coli* (Peixe, 1996; Sousa *et al.*, 1991) e *Klebsiella pneumoniae* (Ferreira, 1997) resistentes a β -lactâmicos de espectro alargado. Contudo, relativamente ao seu aparecimento em águas marinhas não existe informação.

Foi objectivo deste estudo a detecção de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro alargado em águas marinhas costeiras da zona urbana do Porto e avaliação da capacidade de transferência dos genes codificadores. Para o efeito procedeu-se a:

Isolamento e identificação de coliformes em águas marinhas de três praias da zona urbana do Porto

Avaliação do perfil de susceptibilidade de *E. coli* e de *K. pneumoniae* a antibacterianos de várias famílias: β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas e cloranfenicol.

Pesquisa de β -lactamases do tipo TEM e avaliação da sua associação a plasmídeos através da detecção do gene TEM nos isolados e em extractos plasmídicos por hibridação de DNA com sonda específica.

Detecção e caracterização de β -lactamases de espectro alargado em *E. coli* e *K. pneumoniae* através da interpretação dos perfis de resistência avaliados, determinação de CMI's por "E-test" e focagem isoeléctrica.

Avaliação da capacidade de transferência dos genes codificadores das β -lactamases de espectro alargado recorrendo a ensaios de conjugação.

3. Material e métodos

3.1. Origem das amostras

Neste trabalho foram utilizadas 36 amostras de águas provenientes de três praias da zona urbana do Porto (Gondarém, Molhe e Matosinhos). As amostras foram colhidas em todas as praias referidas em Maio, Julho, de Setembro a Novembro de 1999, e de Janeiro a Julho de 2000.

3.2. Isolamento e identificação das estirpes

O método utilizado para isolamento de bactérias coliformes foi o da filtração por membrana (APHA, AWWA & WEF, 1992).

As amostras de água homogeneizadas com movimentos verticais vigorosos, foram filtradas através de membranas estéreis de nitrocelulose (Millipore) de 0,45 µm de poro, com o auxílio de sistemas de filtração Millipore. Os valores de volumes filtrados foram estabelecidos de acordo com o antibiótico usado, tendo como objectivo obter um número contável de colónias por placa.

Após filtração, as membranas foram colocadas em placas de Petri contendo o meio de cultura MacConkey agar e em placas de Petri com meio de cultura MacConkey agar com antibióticos (Quadro V). As placas foram colocadas a incubar a 37 °C e a 44,5 °C, durante 24 horas.

Colónias típicas de coliformes foram identificadas através de provas bioquímicas tais como fermentação da glicose e lactose, produção de gás por fermentação dos hidratos de carbono, produção de sulfureto de hidrogénio, mobilidade, produção de

indol, utilização do citrato, produção de urease e de oxidase. Nos casos em que existiram dúvidas quanto à identificação das estirpes foi utilizado o sistema de identificação API 32GN (API/BioMérieux).

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

Quadro V. Concentrações de antibióticos usadas para selecção

Antibiótico	Concentração de selecção (µg/ml)
Ampicilina	100
Ceftazidima	5
Cefotaxima	2
Ácido nalidíxico	50

3.3. Avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos

3.3.1. Método de difusão em agar

Para a avaliação da susceptibilidade aos gentes antimicrobianos, utilizando o método de difusão em agar (NCCLS, 1999) preparou-se, a partir de uma colónia de cada isolado a estudar, uma suspensão bacteriana de turvação equivalente a 0,5 MacFarland. Mergulhou-se uma zaragatoa nesta suspensão e semearam-se placas de agar Mueller-Hinton. Sobre a superfície deste meio inoculado foram colocados discos impregnados com o antibiótico a testar. As placas incubaram a 37 °C, durante 18 horas. Após a incubação, mediram-se os halos de inibição de crescimento, com o auxílio das tabelas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1999) classificando-se a estirpe como sensível, intermédia ou resistente aos antibióticos testados.

Neste trabalho foram utilizados os seguintes discos de antibióticos: amoxicilina (10µg), carbenicilina (100µg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg), cefalotina (30µg), cefoxitina (30µg), cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg), ceftriaxona (30µg), aztreonamo (30 µg), imipenemo (10µg), netilmicina (10µg), ácido nalidíxico (30µg),

norfloxacina (10 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), tetraciclina (30 μ g), cloranfenicol (30 μ g) e trimetropim/sulfametoxazol (1,25 μ g/23,75 μ g), fornecidos por BioMérieux ou Oxoid.

3.3.2. Determinação da concentração mínima inibitória

Para a determinação da concentração mínima inibitória (concentração mais baixa que inibe o crescimento da estirpe), utilizou-se o método de difusão em agar com tiras "E-test" ("Epsilon-test"). Este método utiliza tiras comerciais de papel de 5x50 mm, impregnadas com um antibiótico em concentração decrescente, de 256 a 0,016 mg/l. Estas tiras são sobrepostas em placas de agar Mueller-Hinton inoculadas com a cultura a testar.

A metodologia usada para a produção de inóculo e inoculação das placas é idêntica à usada para a avaliação de susceptibilidade pelo método de difusão em agar com discos. Sobre a placa inoculada é depositada a tira com o antibiótico e as placas incubam durante 18 horas a 37 °C.

Considera-se como valor da concentração mínima inibitória (mg/l) o ponto de intersecção entre o limite da zona de crescimento bacteriano sobre a superfície do agar e a tira de "E-test".

3.4. Detecção de isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtores de β -lactamases de espectro alargado

3.4.1. Teste de sinergismo

A identificação inicial dos isolados produtores de β -lactamases de espectro alargado foi feita pela detecção de sinergismo entre discos de cefalosporinas de terceira geração e a associação amoxicilina/ácido clavulânico (teste de sinergismo) (Jarlier *et al.*, 1988).

As placas foram preparadas de acordo com a técnica de difusão em agar. Nestas colocaram-se discos de cefotaxima (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g) e dispostos a uma distância de, aproximadamente, 25 mm de discos de amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 μ g). A possível presença de β -lactamases de

espectro alargado é indicada pelo alargamento do halo de inibição de crescimento na zona intermédia entre o disco de amoxicilina/ácido clavulânico e a cefalosporina de terceira geração.

3.4.2. Método do “Epsilon-test”

A utilização de tiras de “E-test” (AB Biodisk, Solna, Sweden) preparadas com a associação ceftazidima/ácido clavulânico permitiu verificar a redução da concentração mínima inibitória em isolados produtores de β -lactamases de espectro alargado em presença de ácido clavulânico.

As tiras de “E-test” para a detecção de β -lactamases de espectro alargado (AB Biodisk, Solna, Sweden) consistem numa tira de plástico impregnada de antibiótico. De um lado da tira cria-se um gradiente de concentração para a ceftazidima e do lado oposto cria-se um gradiente de ceftazidima, com uma concentração fixa de ácido clavulânico. A razão, entre a concentração mínima inibitória da ceftazidima e a concentração mínima inibitória da associação ceftazidima/ácido clavulânico, superior ou igual a 8 indica a presença de uma estirpe produtora de β -lactamases de espectro alargado.

Também a presença de uma zona inibitória nas concentrações mais baixas de ceftazidima ou a deformação da elipse de inibição de ceftazidima, são situações indicadoras da presença de estirpes produtoras de β -lactamases de espectro alargado.

3.5. Caracterização das β -lactamases

A caracterização das β -lactamases foi realizada em isolados que apresentavam antibiograma característico da presença destas enzimas.

3.5.1. Preparação dos extractos enzimáticos

As estirpes foram cultivadas, *over-night*, em TSB a 37 °C. As culturas obtidas foram sedimentadas por centrifugação a 3 000 rpm, durante 15 minutos a 4 °C. Os sedimentos foram lavados com soro fisiológico, novamente centrifugados e

ressuspensos em água destilada estéril. As suspensões foram congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e submetidas, várias vezes, a choques térmicos. Após vários choques térmicos, este extracto, em tubos eppendorf, foi centrifugado a 10 000 rpm durante 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante, ao qual se fez um teste prévio quanto à presença de β -lactamases, por incubação com solução de nitrocefim 0,5 mg/ml, e até à sua utilização foi congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.2. Determinação do ponto isoeléctrico das β -lactamases

O ponto isoeléctrico das β -lactamases foi determinado por focagem isoeléctrica, no sistema Phast System (Pharmacia), de acordo com as condições estabelecidas pelo fabricante. Utilizaram-se geles comerciais de poliacrilamida com anfólitos de gradiente de pH de 3 a 9 (PhastGel 3-9, Pharmacia). Como padrões (extractos de estirpes que produzem β -lactamases de pl conhecido) foram utilizados TEM-1 (5,4), CAZ-1 (5,6), TEM-4 (5,9), OHIO-1 (7,0), SHV 1 (7,6) e SHV 5 (8,2) (Quadro VI). As bandas correspondentes às β -lactamases presentes no gel foram reveladas pela adição de 500 μl de uma solução de nitrocefim (500 μM).

Quadro VI. Estirpes produtoras de β -lactamases usadas como referência para focagem isoeléctrica

Estirpe <i>E. coli</i>	plasmídeo	β -lactamase	pl
UCB1	pBR322	TEM-1	5,4
C600	pCFF 14	CAZ-1	5,6
K12 J53	pUD16	TEM-4	5,9
K12 J53	pK504	OHIO-1	7,0
K12 J53	p453	SHV-1	7,6
TG1	pMM1	SHV-5	8,2

3.6. Transferência do determinante genético das β -lactamases

3.6.1. Conjugação

Efectuaram-se ensaios de conjugação nos isolados que apresentavam um comportamento aos antibióticos típico da existência de β -lactamases plasmídicas e com sensibilidade ao ácido nalidíxico. Como estirpe receptora, foi usada a *E. coli* K802N, que é desprovida de plasmídeos, resistente ao ácido nalidíxico e não fermentadora da lactose.

Os isolados dadores e a estirpe receptora foram cultivados em TSB a 37 °C, *overnight*. Posteriormente, retirou-se 1 ml destas culturas para 10 ml de TSB e incubou-se a 37 °C com agitação durante cerca de 3 horas. Seguidamente colocaram-se, em placa de Mueller-Hinton, 100 μ l de cultura da estirpe receptora e sobre esta 100 μ l da cultura da estirpe dadora, incubando-se a 37 °C durante 18 horas. O crescimento obtido foi, na sua totalidade, suspenso em 1 ml de soro fisiológico e desta suspensão foram retirados 100 μ l, que foram plaqueados em placas de MacConkey contendo ácido nalidíxico (100 μ g/ml) e ceftazidima (5 μ g/ml), ou cefoxitina (20 μ g/ml) ou cefotaxima (2 μ g/ml) incubando-se a 37 °C durante 24 horas. As colónias obtidas foram novamente inoculadas em meio selectivo, após o que, se verificou a transferência de resistência por antibiograma, e confirmação da presença de β -lactamases por focagem isoeléctrica.

3.6.2. Transformação

Os ensaios de transformação foram usados em isolados com resistência múltipla, onde não havia possibilidade de usar um marcador de resistência adequado à contra-selecção.

Na transformação, adicionaram-se 20 μ l de DNA plasmídico (extraído pela técnica de Kado & Liu, 1981) a 200 μ l de células competentes, mantendo-se cerca de 1 hora em gelo. Posteriormente, esta mistura foi incubada a 42 °C durante 1 minuto. Adicionou-se 1 ml de TSB, previamente aquecido, e incubou-se a 37 °C durante 3 horas. As células foram sedimentadas por centrifugação e o pellet ressuspenso no

TSB que restou no tubo eppendorf. Esta suspensão foi inoculado em meio selectivo contendo ceftazidima (5 µg/ml) ou ceftotaxima (2µg/ml) ou cefoxitina (20 µg/ml).

A metodologia usada para confirmação de existência de transformação foi idêntica à usada para confirmação de transconjugantes.

Como controlo de transformação usou-se o plasmídeo PBR322, sendo os transformantes seleccionados em placas de meio selectivo com 100 µg/ml de ampicilina.

3.6.2.1. Preparação das células competentes

As células competentes foram preparadas a partir da estirpe *E. coli* TG1 de acordo com a técnica de Sambrook *et al.* (1989).

Inocularam-se 100 colónias de *E. coli* TG1 em 5 ml de SOB+Mg²⁺ (Bactotripton 2%, Extracto de levedura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM; pH 6,8-7; MgCl₂ 1M) e incubou-se a 37 °C 18 horas. Inoculou-se 1 ml desta cultura em 100 ml de SOB+Mg²⁺ até uma densidade óptica de 0,48 a 660nm. Arrefeceu-se em gelo e centrifugou-se, durante 5 minutos, a 4 000 rpm. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi intensa e extensamente ressuspensão em 30 ml de TfBI (RbCl₂ 100 mM, MnCl₂, 50 mM, KacO 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15%, pH 5,8). Centrifugou-se e retirou-se o sobrenadante. O pellet foi ressuspensão em 4 ml de TfBII (MOPS 10 mM pH 7, RbCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15%). Esta suspensão foi repartida em alíquotas de 200 µl e congelada a -70°C.

3.7. Extracção de DNA plasmídico

A extracção do DNA plasmídico foi efectuada pelo método de Kado & Liu (1981). Este método foi utilizado tanto nos isolados obtidos, como nos transconjugantes e transformantes, assim como na extracção de DNA plasmídico para a transformação.

3.7.1. Técnica de Kado & Liu

Os isolados em estudo foram cultivados em TSB a 37°C durante 18 horas. Posteriormente, retirou-se 1 ml destas culturas para 10 ml de TSB e incubou-se

durante 3 horas a 37 °C com agitação. Retirou-se desta cultura cerca de 600 µl para tubos eppendorf, seguindo-se a sua centrifugação, a 6 000 rpm, durante 5 minutos. Este procedimento foi repetido uma a duas vezes, de modo a obter uma quantidade de pellet suficiente. Lavou-se o sedimento com soro fisiológico estéril e centrifugou-se durante 5 minutos a 6 000 rpm. Rejeitou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 100 µl de TAE (Tris-base 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético glacial, pH 8), aos quais se adicionou 100 µl de SDS/Tris (SDS 4% + Tris 100 mM) e 100 µl de NaOH 0,2 N. O tubo foi invertido suavemente e colocado num banho-maria a 55 °C durante 1 hora. Depois, adicionaram-se 600 µl de fenol/clorofórmio (v/v), seguindo-se uma agitação suave e centrifugação a 14 000 rpm durante 5 minutos. Recuperou-se, para outro tubo, a fase aquosa, à qual foi adicionado 2 volumes de fenol/clorofórmio. Agitou-se suavemente e centrifugou-se a 14 000 rpm, durante 5 minutos. Recuperou-se a fase aquosa, para outro tubo, adicionou-se 1/10 do volume de Acetato de sódio 3M (pH 4,8) e 2,5 volumes de etanol. De modo a favorecer a precipitação do DNA, a mistura foi colocada a -20 °C, *over-night*. Posteriormente, procedeu-se à sua centrifugação a 14 000 rpm, durante 5 minutos, e rejeitou-se o sobrenadante. Evaporou-se o etanol em estufa a 37 °C, após esta fase, o pellet foi ressuspenso em 10 µl água destilada estéril.

3.7.2. Electroforese em gel de agarose

A electroforese do DNA foi realizada em geles de agarose (Pharmacia) a 0,7%, em tampão TAE (Tris-base 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético glacial, pH 8). Utilizou-se como amostra o DNA obtido pela técnica anterior, ao qual se adicionou 10 µl de corante (solução de azul de bromofenol 0,1%, glicerol 50%, H₂O), depositando-se nos poços do gel de agarose. A migração do gel efectuou-se a uma ddp de 70 V, durante cerca de 70 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) durante 30 minutos e observado com o auxílio do transiluminador de luz UV (W-Transiluminador, UVP, Inc.). Posteriormente procedeu-se à aquisição da imagem do gel (KodaK Digital Science 1D). Os tamanhos aproximados dos plasmídeos foram determinados por comparação com estirpes que apresentam plasmídeos de peso molecular conhecidos:

E. coli VR1 – 95 Md; 41 Md; 32 Md.

E. coli V517 – 35 Md; 7,2 Md; 3,7 Md; 3,4 Md; 2,6 Md; 2,0 Md; 1,8 Md; 1,33 Md.

3.8. Hibridação de sondas de DNA

3.8.1. Preparação da sonda TEM

3.8.1.1. Extracção do DNA total

Retirou-se uma porção, com uma ansa, de uma cultura em meio sólido, com 24 horas, da estirpe *E. coli* UCB1 (pBR322) e suspendeu-se em 20 µl de solução NaOH-SDS (NaOH 0,05 M; SDS 0,25 %). Esta suspensão foi colocada a 95 °C durante 15 minutos diluindo-se posteriormente até um volume final de 200 µl com TE 1X (Tris 100 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Após agitação cuidadosa, centrifugou-se a 13 000 g, durante 3 minutos, recolheu-se o sobrenadante para outro tubo eppendorf, que posteriormente foi usado na reacção de PCR.

3.8.1.2. Quantificação do DNA por determinação espectrofotométrica

A concentração do DNA obtido na reacção anterior foi avaliada por medição de absorvância, de uma alíquota, a 260 nm no espectrofotómetro.

3.8.1.3. Reacção de amplificação

Composição da mistura reaccional

DNA total – 40 ng/µl
Primer PBR 3 – 50 pmol (1,04 µl)
Primer PBR 4L – 50 pmol (0,94 µl)
dNTPs – 200 µM de cada um dos desoxinucleótidos trifosfatados (1 µl)
Taq Polimerase – 1 U (0,4 µl)
Tampão – 1/10 vol. final (5 µl)
Magnésio – 1,5 mM (3 µl)
Água ultra pura estéril – x µl (até perfazer um volume final de 50 µl).

Condições da amplificação

A amplificação ocorreu no termociclador (Perkin-Elmer, Gene Amp PCR system 2400) durante 35 ciclos, com as seguintes condições: fase de desnaturação, 95 °C durante 1 minuto e 30 segundos, fase de “annealing” a 48 °C durante 1 minuto e 30 segundos, e fase de extensão 2 minutos a 72 °C.

Quadro VII. Sequência dos “primers” usados nas reacções de amplificação do gene TEM.

Primers	Sequência	Posição
PBR - 3	5'- AGTGTCG ACTTACCAATGCTTAATCAGT -3'	1069
PBR - 4 L	5'- AAAGA ATTCTAAATACATTCAAATATG - 3'	128

Os números correspondem às posições da primeira base em 5', pela numeração de Sutcliffe (1978). Os nucleótidos a carregado correspondem aos locais de corte, no “primer” PBR-3 para a enzima *SaI* e no “primer” PBR-4L para enzima *EcoRI*.

Os primers foram sintetizados pela Sigma-Genosys, Lda.

3.8.1.4. Caracterização do produto de PCR por electroforese

A análise, dos produtos de PCR, realizou-se electroforeticamente, em gel de agarose (Pharmacia) a 1% em paralelo com um marcador de peso molecular, 100bp DNA Ladder (Promega). A migração do gel ocorreu sob uma ddp de 70 V, durante 50 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml). Tal como era esperado obteve-se uma banda de 942 bp.

3.8.1.5. Purificação do produto de PCR

O fragmento de DNA amplificado foi purificado com o Kit “Wizard DNA Clean-Up System” (Promega).

3.8.1.6. Digestão com enzimas de restrição

Após purificação do fragmento obtido, este foi submetido a digestão com as enzimas de restrição *SaI* e *EcoRI*, durante 2 horas a 37 °C. Esta reacção foi inactivada a 65 °C durante 20 minutos.

O fragmento obtido foi posteriormente purificado e novamente observado em gel de agarose.

3.8.2. Marcação da sonda (RPN 3680-AlkPhos Direct - amershampharmacia biotech)

A marcação da sonda foi efectuada através de um método de marcação directa com a enzima fosfatase alcalina.

Diluiu-se o DNA a uma concentração 10 ng/ μ l. Desnaturou-se, colocando-se em água fervente durante 5 minutos, e posteriormente arrefeceu-se em gelo durante 5 minutos. A 10 μ l de DNA desnaturado adicionaram-se 10 μ l de "reaction buffer" (RPN 3680), 2 μ l de "labelling reagent" (RPN 3680) e 10 μ l (diluído 5X) de solução "cross-linker" (RPN 3680). A reacção foi incubada durante 30 minutos a 37 °C. A sonda foi mantida em gelo até à sua utilização.

3.8.3. Formatos de hibridação

3.8.3.1. Southern blot

Às amostras de DNA plasmídico, extraídas pela técnica Kado & Liu (1981), foi adicionado o corante "Blue/Orange Loading Dye 6X (G188A)" (Promega) e aplicadas no gel. A corrida electroforética foi efectuada em gel de agarose (Pharmacia) a 1% em tampão TAE (Tris-base 40 mM, EDTA 1 mM, ácido glacial, pH8), a uma ddp de 70 V durante 120 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/ml) e procedeu-se à aquisição da imagem.

Desnaturou-se o DNA, lavando o gel em 200 ml de solução de desnaturação (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M), com agitação suave durante 25 minutos à temperatura ambiente. Após a desnaturação, o gel foi neutralizado em 200 ml de solução de neutralização (NaCl 1,5M; TrisHCl 0,5M, pH 7,5) durante 30 minutos à temperatura ambiente, com agitação suave. Entre estas duas fases, o gel foi lavado com água destilada.

O sistema de transferência por capilaridade do DNA para a membrana foi efectuada de acordo com Sambroock *et al.* (1989). Resumidamente, sobre um recipiente contendo 10X SSC (20X SSC contém citrato de sódio 0,3 M e NaCl 3M) foi colocada uma placa de vidro, sobre a qual se colocou uma tira de papel 3MM, previamente mergulhada numa solução de 10X SSC. Esta tira tem a largura do gel e um comprimento que permita que as extremidades fiquem mergulhadas na solução do

recipiente. O gel foi colocado sobre esta tira e sobre este a membrana, Hybond N+ (amershampharmacia biotech), de dimensões idênticas ao gel. Sobrepueram-se ainda a esta membrana 3 folhas de papel 3 MM e folhas de guardanapos de papel cortadas do tamanho do gel, até uma altura de 10 cm. Colocou-se um peso sobre este sistema e deixou-se a transferir *over-night*.

No dia seguinte, retiraram-se os papéis e o papel 3MM, e marcou-se a membrana adequadamente, sendo posteriormente mergulhada numa solução de 10X SSC à temperatura ambiente, durante 5 minutos.

Fixou-se o DNA, colocando a membrana em estufa a 80 °C durante 2 horas.

3.8.3.2. Dot blot

O DNA total das amostras, foi obtido de acordo com a técnica descrita anteriormente (3.8.1.1.). O DNA foi desnaturado, colocando-se as amostras em água fervente durante 5 minutos, e arrefecendo posteriormente em gelo. Centrifugou-se rapidamente e usou-se o sobrenadante como amostra.

Mergulhou-se a membrana Hybond N+ em solução 10X SSC, e deixou-se secar à temperatura ambiente, antes da aplicação das amostras.

Aplicaram-se 3 µl de DNA na membrana, evitando tocar com a ponta da pipeta na membrana. É aconselhável um intervalo de 0,5 cm, entre as amostras, por cada 1 µl de amostra aplicado.

Colocou-se a membrana em estufa a 80 °C durante 2 horas para fixação do DNA.

3.8.4. Hibridação e lavagens de restrição

As membranas, preparadas anteriormente, foram colocadas numa solução de pré-hibridação (0,25 ml/cm² de membrana)(NaCl 0,5 M, reagente de "blocking" 4 % (p/v) (RPN 3680)) a 55 °C, com agitação constante, durante, pelo menos, 15 minutos. Adicionou-se a sonda marcada à solução de pré-hibridação e deixou-se *over-night* a 55 °C, com agitação constante.

Lavaram-se, duas vezes, as membranas durante 10 minutos numa solução pré-aquecida a 55 °C do primeiro tampão de lavagem (Ureia 2 M, SDS 0,15 % (p/v), 100

ml da solução: Fosfato de sódio 0,5 M pH 7,0, NaCl 150 mM, MgCl 1 mM, e reagente "blocking" 0,2% (RPN 3680)).

As membranas foram lavadas, duas vezes, no segundo tampão de lavagem (20X contém Tris base 1 M, NaCl 2 M, pH 10, usar uma diluição 1:20 e adicionar 2ml/l MgCl₂ 1 M) durante 5 minutos, à temperatura ambiente, com agitação constante.

3.8.5. Geração do sinal e detecção (RPN 3682-CDP-*Star* chemiluminescent detection - amershampharmacia biotech)

Retirou-se o excesso de solução de lavagem, tocando com as membranas no canto dos recipientes. A seguir colocaram-se as membranas (amostras voltadas para cima) sobre uma folha de película aderente e colocou-se o reagente de detecção (RPN 3682) sobre as membranas (30-40 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$), durante 2-5 minutos.

As membranas foram envolvidas em película aderente, deixando-se uma margem de cerca de 1 cm. Colocaram-se estas membranas numa cassete e num local sem luz, colocou-se um filme, Hyperfilm-ECL (amershampharmacia biotech) na cassete.

Após exposição (aproximadamente 40 minutos) removeu-se o filme e revelou-se.

3.9. Tipagem de isolados de *Escherichia coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM utilizando ERIC-PCR

Em alguns isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado foi realizado um estudo do seu perfil genómico com o objectivo de verificar a clonalidade das isolados.

3.9.1. Reacção de amplificação

O DNA total das amostras foi extraído de acordo com a técnica descrita anteriormente (3.8.1.1.)

A reacção e condições de amplificação foram realizadas de acordo com o descrito por Quinteira (1999).

Composição da mistura reaccional

DNA total – 50 ng/μl
Primer IR 3 – 50 pmol
Primer C2 – 50 pmol
Mix dNTPs – 1 μl
Taq Polimerase (Bioline) – 0,3 μl
Tampão PCR n.º 4 (Sigma) – 5 μl
Tampão Universal – 1 μl
Glicerol – 7,5 μl
Água ultra pura estéril – x μl (até perfazer um volume final de 25μl).

Condições de amplificação

A amplificação ocorreu num termociclador (Perkin-Elmer, Gene Amp PCR system 2400) com as seguintes condições: um ciclo inicial a 94 °C durante 7 minutos, 35 ciclos de desnaturação, 94 °C durante 1 minuto, “annealing”, 52 °C durante 1 minuto, e extensão durante 8 minutos a 65 °C, seguido de uma incubação final 65 °C durante 15 minutos.

Quadro VIII. Sequência dos “primers” usados nas reacções de ERIC-PCR

Primers	Sequência
ERIC-IR	3'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA – 5'
ERIC-C2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG – 3'

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

3.9.2. Caracterização do produto de PCR por electroforese

Os produtos da reacção ERIC-PCR, foram analisados electroforeticamente, em gel de agarose (Pharmacia) a 2% em paralelo com um marcador de peso molecular, 100bp DNA Ladder (Promega). A migração do gel ocorreu sob uma ddp de 70 V durante 60 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 μg/ml).

4. Resultados

4.1. Estirpes isoladas

No presente estudo foram utilizadas 36 amostras de águas provenientes de três praias (Molhe, Gondarém e Matosinhos) da zona urbana do Porto. Nestas amostras foi possível isolar as seguintes espécies bacterianas:

Quadro IX. Espécies bacterianas isoladas a partir de 36 amostras de águas marinhas

Estirpes isoladas	Número
<i>Citrobacter freundii</i>	8
<i>Enterobacter aerogenes</i>	17
<i>Enterobacter cloacae</i>	3
<i>Escherichia coli</i>	131
<i>Klebsiella oxytoca</i>	20
<i>Klebsiella ozaenae</i>	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
<i>Pantoea agglomerans</i>	3
Fermentadoras de lactose, oxidase negativa	20
Fermentadoras de lactose, oxidase positiva	55
Total	280

Sendo objectivo do trabalho avaliar a presença de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro alargado, foram seleccionados para identificação 280 isolados bacterianos fermentadores de lactose. No quadro IX estão representadas as estirpes bacterianas identificadas no presente estudo a partir de 36 amostras de águas marinhas, provenientes da zona urbana do Porto.

No grupo dos coliformes, verificou-se um predomínio de *Escherichia coli* (n=131), tendo sido identificados 18 isolados de *Klebsiella pneumoniae*. Além de isolados pertencentes ao grupo dos coliformes, também foram isoladas (n=55) bactérias fermentadoras de lactose e oxidase positiva.

4.2. Susceptibilidade a agentes antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli*

Determinou-se o comportamento dos isolados de *Escherichia coli* face a diversos agentes antimicrobianos determinado pelo método de difusão em agar, sendo posteriormente classificados em sensíveis, intermédias ou resistentes de acordo com as normas preconizadas pelo NCCLS (1999).

4.2.1. Susceptibilidade a agentes antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* sensíveis à ampicilina

Dos cento e trinta e um isolados de *E. coli* obtidos, dezassete não apresentam resistência à ampicilina. Nove destes isolados foram seleccionados com ácido nalidíxico (50 μ g/ml) e os restantes em meio de MacConkey sem antibiótico. Dez isolados demonstraram resistência ao ácido nalidíxico, sete à tetraciclina, e dois à norfloxacina, cloranfenicol e SXT.

4.2.2. Susceptibilidade a outros agentes antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* resistentes à ampicilina

Cento e catorze isolados de *E. coli* demonstraram resistência à ampicilina. O seu comportamento face a outros agentes antimicrobianos está representado na figura I. Destes isolados trinta e um foram seleccionados com ampicilina (100 μ g/ml); vinte

seleccionados com cefotaxima (2 μ g/ml); vinte e nove seleccionados com ceftazidima (5 μ g/ml), trinta seleccionados com ácido nalidíxico (50 μ g/ml) e quatro seleccionados sem antibiótico.

Os resultados mostram que estes isolados exibem uma elevada frequência de resistência à carbenicilina (100%), cefalotina (54,4%), reduzida incidência de resistência à associação amoxicilina/ácido clavulânico (1,76%) e cefoxitina (1,76%) e uma total susceptibilidade ao imipenemo. Relativamente a cefalosporinas de terceira geração, verifica-se que 48,3% e 45,7% dos isolados estudados, apresentam, respectivamente, uma resistência intermédia à cefotaxima e ceftriaxona.

Verifica-se também que, estes isolados não só exibem elevada resistência a determinados antibióticos pertencentes ao grupo dos β -lactâmicos, como também, a outros antibióticos, nomeadamente ácido nalidíxico (72%), norfloxacina (66,7%) e tetraciclina (81,7%).

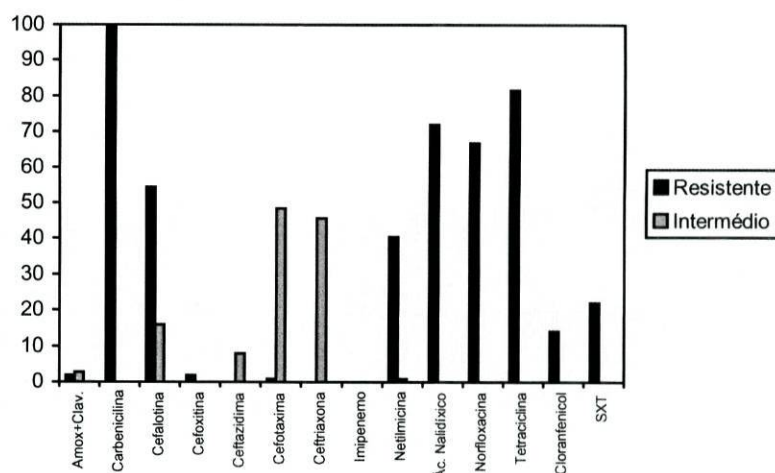


Figura I. Resistências associadas em isolados de *E. coli* resistentes a ampicilina (n=114).

Dos cento e catorze isolados de *E. coli* resistentes à ampicilina, cinquenta e quatro não são produtores de β -lactamases de espectro alargado. Os valores limite dos diâmetros dos halos de inibição obtidos para estes isolados estão representados no Quadro X. Estes isolados demonstraram resistência à amoxicilina, carbenicilina, e

sensibilidade a cefalosporinas de segunda e terceira geração. Realizou-se a caracterização de β -lactamases, por focagem isoelétrica, em vinte e sete destes isolados de *E. coli*. Todas estes isolados apresentaram somente uma banda electroforética de pI 5,4 (Quadro X). De acordo com a sua susceptibilidade à amoxicilina, carbenicilina, cefalotina e cefotaxima agruparam-se em fenótipo de resistência RRSS, RRIS e RRRS (Sousa *et al.*, 1989; 1991). Quinze estirpes apresentaram o fenótipo RRSS, nove o fenótipo RRIS e apenas duas apresentaram o fenótipo RRRS.

Quadro X. Perfil de susceptibilidade e ponto isoelétrico das β -lactamases dos isolados de *E. coli* produtores de TEM-1 (n=54)

Isolados de <i>E. coli</i>	
pI	5,4
Antibiótico	Diâmetro do halo de inibição (mm)
Amoxicilina	6
Carbenicilina	6-10
Amox. + Clav.	17-28
Cefalotina	13-24
Cefoxitina	21-32
Ceftazidima	28-36
Cefotaxima	28-36
Ceftriaxona	26-36
Imipenemo	24-36
Netilmicina	11-34
Ác. Nalidíxico	6-28
Norfloxacina	6-34
Tetraciclina	6-25
Cloranfenicol	6-30
SXT	6-31

4.3. Isolados de *Escherichia coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM

4.3.1. Perfil de susceptibilidade

O perfil de resistência dos isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado de tipo TEM (BLEA) (n=58), provenientes de praias da zona urbana do Porto, durante o período em análise (Quadro XXII) estão representados no quadro XI.

Quadro XI. Perfil de susceptibilidade e ponto isoeléctrico das β -lactamases de isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM

Isolados de <i>E. coli</i> produtores de β -lactamases de espectro alargado		
pl	5,4 + 5,9	
Antibiótico	Diâmetro do halo de inibição (mm)	CMI (μ g/ml)
Amoxicilina	6	>256
Carbencilina	6	ND
Amox. + Clav.	18-22	4
Cefalotina	6	>256
Cefoxitina	26-32	2
Ceftazidima	17-22	8-12
Cefotaxima	14-20	6-8
Ceftriaxona	16-20	8-12
Aztreonamo	26-28	1,5-2
Imipenemo	28-34	ND
Netilmicina	20-27	ND
Ác. Nalidíxico	6	ND
Norfloxacina	6-11	ND
Tetraciclina	6	ND
Cloranfenicol	25-30	ND
SXT	6-20	ND

ND- não determinado



Vinte e oito isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM foram seleccionados com cefatzidima (5 μ g/ml), dezanove com cefotaxima (2 μ g/ml), nove com ácido nalidíxico (50 μ g/ml) e dois com ampicilina (100 μ g/ml).

Em casos em que há diferenças nos resultados, são apresentados os valores limite dos halos de inibição de crescimento que os isolados apresentaram (Quadro XI).

Os antibiogramas de todos os isolados foram semelhantes. Nestes antibiogramas foi possível observar um notável sinergismo entre o disco de amoxicilina/ácido clavulânico e os discos de cefalosporinas de terceira geração e aztreonamo.

Todos os isolados de *E. coli* revelaram resistência à amoxicilina, carbenicilina, cefalotina e apresentaram elevada incidência de resistência a determinados antibióticos não β -lactâmicos, nomeadamente ao ácido nalidíxico, norfloxacina e tetraciclina. Não foram encontrados isolados resistentes à associação amoxicilina/ácido clavulânico, cefoxitina, imipenemo e netilmicina.

Os isolados que apresentaram susceptibilidade reduzida à ceftazidima e ceftriaxona.

4.3.2. Confirmação da detecção de β -lactamases de espectro alargado pelo método do “Epsilon-test”

Como todos os isolados de *E. coli* apresentavam fenótipo de resistência muito semelhante, usou-se o método do “E-test” para a confirmação da de β -lactamases de espectro alargado em três isolados de *E. coli* (FFUP165, FFUP177, FFUP213) usados como representantes do grupo.

A razão entre a concentração mínima inibitória para a ceftazidima e concentração mínima inibitória para a ceftazidima com ácido clavulânico, superior a 8, é indicação de que a estirpe é produtora de β -lactamase de espectro alargado (Quadro XII). Nestes isolados foi também possível observar uma deformação da zona elíptica de inibição da ceftazidima, outra indicação da presença destas enzimas.

Quadro XII. "E-test" para detecção de β -lactamases de espectro alargado

Isolado	TZ ($\mu\text{g/ml}$)	TZL ($\mu\text{g/ml}$)	TZ/TZL	Deteção
FFUP165	6	0,125	48	Positivo
FFUP177	8	0,125	64	Positivo
FFUP213	8	0,094	85	Positivo

Valores da concentração mínima inibitória ($\mu\text{g/ml}$) de ceftazidima sem ácido clavulânico (TZ), e ceftazidima com ácido clavulânico (TZL) para três isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM.

4.3.3. Perfil β -lactamásico

A caracterização do perfil β -lactamásico dos isolados de *E. coli*, produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM, foi realizada por focagem isoeléctrica.

A focagem isoeléctrica dos extractos brutos dos isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado revelaram, em todos os isolados, a presença de uma banda de pI 5,4, pI idêntico a TEM-1, e uma banda de pI 5,9, pI idêntico à banda TEM-6 usada como padrão (Quadro XI).

4.3.4. Avaliação da capacidade de transferência de genes responsáveis pela resistência aos oximino- β -lactâmicos

Com o objectivo de verificar qual a β -lactamase responsável pela resistência a cefalosporinas de terceira geração e a sua associação a um plasmídeo conjugativo, procedeu-se a ensaios de conjugação de isolados em estudo com a estirpe receptora *E. coli* K802N.

Em isolados em que não foi possível usar um marcador de contra-selecção adequado, pelo facto de apresentarem resistência a vários antibióticos, procedeu-se a ensaios de transformação com *E. coli* TG1.

Os transformantes (FFUP165F, FFUP177F, FFUP213F), seleccionados com ceftazidima (5 $\mu\text{g/ml}$), e os transconjugantes (FFUP165C, FFUP177C, FFUP213C) seleccionados com ceftazidima (5 $\mu\text{g/ml}$) e ácido nalidíxico (100 $\mu\text{g/ml}$) apresentaram,

relativamente aos antibióticos β -lactâmicos, o mesmo perfil de resistência dos isolados originais (FFUP165, FFUP177, FFUP213) (Quadro XIV). O antibiograma dos transformantes e transconjugantes obtidos demonstrou sinergismo entre o disco de amoxicilina/ácido clavulânico e cefalosporinas de terceira geração e aztreonamo.

A análise por focagem isoeléctrica dos transformantes e transconjugantes apenas revelou uma banda β -lactamásica, de pI 5,9 (Quadro XIII), o que sugere que seja esta a enzima responsável pela resistência aos oximino- β -lactâmicos.

Quadro XIII. "E-test" para a detecção de β -lactamases de espectro alargado

Isolado	TZ ($\mu\text{g/ml}$)	TZL ($\mu\text{g/ml}$)	TZ/TZL	Deteccção
FFUP165 F	8	0,094	85,1	Positivo
FFUP165C	8	0,094	85,1	Positivo
FFUP177F	8	0,125	85,1	Positivo
FFUP177C	8	0,125	64	Positivo
FFUP213F	8	0,094	85,1	Positivo
FFUP213C	8	0,125	64	Positivo

Valores da concentração mínima inibitória ($\mu\text{g/ml}$) de ceftazidima sem ácido clavulânico (TZ) e ceftazidima com ácido clavulânico (TZL) para transformantes (FFUP165F, FFUP177F, FFUP213F) e transconjugantes (FFUP165C, FFUP177C, FFUP213C) de isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM.

A presença destas enzimas foi confirmada pelo método do "E-test" (Quadro XIII) obtendo-se um resultado positivo em todos os transformantes e transconjugantes.

O perfil plasmídico dos isolados e dos respectivos transformantes e transconjugantes, obtido por electroforese em gel de agarose, permitiu associar a codificação desta β -lactamase de espectro alargado a um plasmídeo conjugativo de cerca de 30 Md (Figura II).

É também observado que a transferência da β -lactamase de espectro alargado, codificada por um plasmídeo conjugativo não foi acompanhada por genes que codificam a resistência a outros antibióticos não β -lactâmicos.

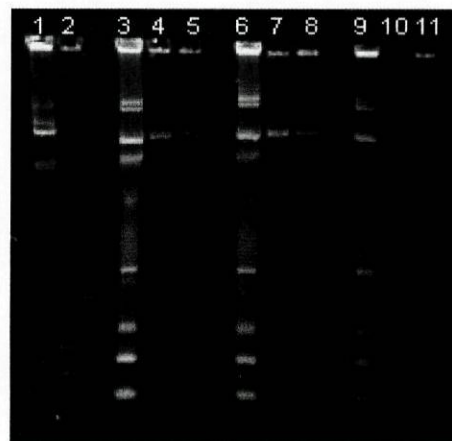


Figura II. Perfil plasmídico de isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM, transformantes e transconjugantes.
1 - *E. coli* VR1 (95Md, 41Md, 32Md), 2 - *E. coli* V517, 3 - FFUP165, 4 - FFUP165F, 5 - FFUP165C, 6 - FFUP177, 7 - FFUP177F, 8 - FFUP177C, 9 - FFUP213, 10 - FFUP213F, 11 - FFUP213C.

Quadro XIV. Perfil de susceptibilidade e ponto isoelectrico das β -lactamases de isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM, transformantes e transconjugantes

Antibiótico	FFUP165 ^a		FFUP165 F ^b		FFUP165FC ^c		FFUP177 ^a		FFUP177F ^b		FFUP177FC ^c		FFUP213 ^a		FFUP213F ^b		FFUP213FC ^c		TG1	K802N
	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)		
pl	5,4 + 5,9		5,9		5,4 + 5,9		5,9		5,9		5,9		5,4 + 5,9		5,9		5,9			
Amoxicilina	6	>256	6	>256	6	>256	6	>256	6	>256	6	>256	6	>256	6	>256	6	>256	18	17
Carbenicilina	6	ND	6	ND	6	ND	6	ND	6	ND	6	ND	6	ND	6	ND	6	ND	26	32
Amox. + Clav.	19	4	24	43	20	4	24	3	24	3	24	3	20	4	24	3	24	3	24	24
Cefalotina	6	>256	9	>256	12	>256	6	>256	6	>256	6	>256	6	>256	9	>256	9	>256	18	18
Cefoxítina	30	2	30	1,5	30	2	30	2	30	2	30	2	28	2	28	1,5	30	2	26	30
Cefotaxima	16	6	17	8	21	6	20	8	20	8	20	8	18	8	20	8	21	8	36	32
Ceftazidima	19	12	20	12	20	12	20	12	20	8	20	8	18	8	18	12	19	8	32	30
Ceftriaxona	16	12	18	12	22	12	19	8	20	8	20	8	16	8	18	8	20	8	32	32
Aztreonamo	28	1,5	28	1,5	28	2	26	2	26	2	28	2	26	2	27	2	28	1,5	26	34
Imipenemo	26	ND	28	ND	32	ND	30	ND	34	ND	34	ND	26	ND	34	ND	32	ND	32	30
Netilmicina	21	ND	28	ND	36	ND	23	ND	27	ND	30	ND	21	ND	30	ND	30	ND	28	27
Ác. nalidixico	6	ND	24	ND	6	ND	6	ND	24	ND	6	ND	6	ND	24	ND	6	ND	24	6
Norfloxacina	6	ND	32	ND	28	ND	6	ND	32	ND	28	ND	6	ND	32	ND	25	ND	34	26
Tetraciclina	6	ND	28	ND	28	ND	6	ND	25	ND	26	ND	6	ND	30	ND	25	ND	28	27
Cloranfenicol	25	ND	24	ND	26	ND	27	ND	26	ND	25	ND	26	ND	26	ND	23	ND	26	25
SXT	19	ND	32	ND	32	ND	16	ND	32	ND	32	ND	17	ND	32	ND	30	ND	32	31

^a isolado de águas marinhas produtor de β -lactamases 5,4 e 5,9; ^b transformante, em *E. coli* TG1, produtor de β -lactamase 5,9; ^c transconjugante, em *E. coli* K802N, de transformante (^b), produtor de β -lactamase 5,9. Diam – diâmetro do halo de inibição. ND- não determinado.

4.4. Tipagem de isolados de *Escherichia coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM obtida por ERIC-PCR.

Os cinquenta e oito isolados de *E. coli*, produtores de β -lactamases de espectro alargado, demonstraram perfil bioquímico idêntico e perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos estudados semelhantes. Em todos os isolados em que se caracterizou o perfil β -lactamásico foram observadas duas bandas β -lactamásicas de pI 5,4 e 5,9. Também o perfil plasmídico dos isolados se revelou igual. Estas observações permitiram pressupor a presença de uma única estirpe. Assim, procedeu-se à tipagem de vários isolados por ERIC-PCR.

Na figura III está representado o resultado da tipagem de isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM. Como controlos foram usados dois isolados de *E. coli*: *E. coli* FFUP31, que produz a enzima TEM-1, e a *E. coli* ATCC 259222.

No gel obtido verificou-se que os isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM apresentaram o mesmo número de bandas e com o mesmo tamanho. Esta observação sugere a presença de uma única estirpe produtora de β -lactamase derivada de TEM, isolada na águas marinhas em estudo (Figura III).

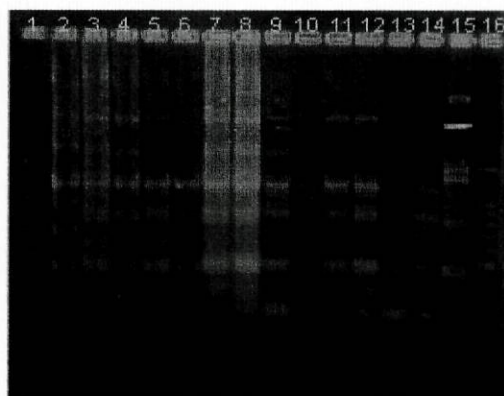


Figura III. Gel de agarose do resultado de ERIC-PCR.

1 - 100bp DNA Ladder (Promega), 2 - *E. coli* produtora de TEM - 1 (FFUP31), 3 a 14 - *E. coli* produtoras de β -lactamase de pI 5,4 + 5,9 (FFUP146, FFUP165, FFUP177, FFUP193, FFUP213, FFUP196, FFUP268, FFUP276, FFUP283, FFUP293, FFUP316, FFUP319), 15 - *E. coli* ATCC259222, 16 - 100bp DNA Ladder (Promega).

4.5. Isolados de *Escherichia coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado do tipo AmpC

4.5.1. Perfil de susceptibilidade

Durante a avaliação do perfil de susceptibilidade dois isolados de *E. coli*, FFUP139 e FFUP331, demonstraram resistência à cefoxitina e à associação ácido clavulânico/amoxicilina, características da produção de β -lactamases de tipo AmpC, o que mereceu um estudo mais detalhado dos seus mecanismos de resistência.

Quadro XV. Perfil de susceptibilidade e ponto isoeléctrico das β -lactamases dos isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado do tipo AmpC

Antibiótico	FFUP139		FFUP331	
	5,4+>8,2		5,4+>8,2	
	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)
Amoxicilina	6	>256	6	>256
Carbenicilina	6	ND	6	ND
Amox+ Clav.	9	>256	11	>256
Cefalotina	6	>256	6	>256
Cefoxitina	9	128	14	24
Ceftazidima	19	8	20	12
Cefotaxima	23	6	21	8
Ceftriaxona	22	6	20	8
Aztreonamo	28	2	28	1,5
Imipenemo	28	ND	32	ND
Netilmicina	9	ND	23	ND
Àc. Nalidíxico	6	ND	6	ND
Norfloxacina	9	ND	6	ND
Tetraciclina	22	ND	6	ND
Cloranfenicol	24	ND	6	ND
SXT	26	ND	6	ND

Diam—diâmetro dos halos de inibição. ND—não determinado.

O isolado FFUP139 foi seleccionado com cefotaxima (2µg/ml) e o isolado FFUP331 isolado com ceftazidima (5µg/ml).

No quadro XV, estão representados, os perfis de resistência de dois isolados de *E. coli*, FFUP139 e FFUP331, produtores de β-lactamase de espectro alargado do tipo AmpC, encontrados em amostras de águas marinhas.

Estes isolados, além de apresentarem resistência à amoxicilina, carbenicilina e cefalotina são também resistentes à associação amoxicilina/ácido clavulânico e à cefoxitina.

Em relação aos antibióticos não β-lactâmicos estudados, os isolados são resistentes ao ácido nalidíxico e norfloxacina. Apenas a estirpe FFUP139 é resistente à netilmicina, enquanto que, o isolado FFUP331 é resistente à tetraciclina, cloranfenicol e SXT.

4.5.2. Confirmação da detecção de β-lactamases de espectro alargado pelo método do “Epsilon-test”.

Quadro XVI. “E-test” para detecção de β-lactamases de espectro alargado

Isolado	TZ (µg/ml)	TZL (µg/ml)	TZ/TZL	Deteção
FFUP139	8	<4	>2	Negativo
FFUP331	12	<4	>3	Negativo

Valores da concentração mínima inibitória (µg/ml) de ceftazidima sem ácido clavulânico (TZ), e ceftazidima com ácido clavulânico (TZL), para isolados de *E. coli* produtores de β-lactamases de espectro alargado do tipo AmpC.

Os valores obtidos, menores que 8, indicam que estes isolados não são produtores de β-lactamases de espectro alargado do tipo TEM ou SHV (Quadro XVI).

4.5.3. Perfil β-lactamásico

O ponto isoeléctrico das β-lactamases de *E. coli* FFUP139 e FFUP331 foi determinado por focagem isoeléctrica, usando um gel de poliacrilamida com anfólitos

de gradiente de pH de 3 a 9 (PhastGel 3-9, Pharmacia). Estes isolados apresentaram duas bandas, uma de pl 5,4 e outra banda de pl superior a 8,2 (Quadro XV).

4.5.4. Avaliação da capacidade de transferência de genes responsáveis pela resistência às cefamicinas

Quadro XVII. Perfil de susceptibilidade e ponto isoeléctrico das β -lactamase de isolado de *E. coli* produtor de β -lactamase de espectro alargado do tipo AmpC, transformantes e tranconjugantes

Antibiótico	FFUP331 ^a		FFUP331F ^b		FFUP331C ^c	
	5,4 + >8,2		>8,2		>8,2	
	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)
Amoxicilina	6	>256	6	>256	6	>256
Carbenecilina	6	ND	18	ND	17	ND
Amox+ Clav.	11	>256	10	>256	10	>256
Cefalotina	6	>256	6	>256	6	>256
Cefoxitina	14	24	13	64	12	64
Ceftazidima	20	12	19	32	19	32
Cefotaxima	21	8	22	12	22	12
Ceftriaxona	20	8	22	24	20	24
Aztreonamo	28	1,5	26	2	26	2
Imipenemo	32	ND	30	ND	30	ND
Netilmicina	23	ND	29	ND	28	ND
Ác. Nalidíxico	6	ND	24	ND	6	ND
Norfloxacina	6	ND	30	ND	25	ND
Tetraciclina	6	ND	24	ND	27	ND
Cloranfenicol	6	ND	34	ND	26	ND
SXT	6	ND	24	ND	30	ND

^a isolado de águas marinhas produtoras de β -lactamases 5,4 e >8,2; ^btransformante, em *E. coli* TG1, produtora de β -lactamase >8,2, ^ctransconjugante, em *E. coli* K802N, de transformante (b), produtor de β -lactamase >8,2. Diam - diâmetro dos halos de inibição. ND - não determinado.

Apenas num isolado FFUP331 produtor de β -lactamases tipo AmpC foi possível a transferência de β -lactamases por transformação e conjugação. Estes transformantes foram seleccionados com cefoxitina (20 $\mu\text{g/ml}$) e os transconjugantes com ácido nalidíxico (100 $\mu\text{g/ml}$) e cefoxitina (20 $\mu\text{g/ml}$).

O antibiograma dos transformantes e transconjugantes obtidos demonstra, relativamente aos antibióticos β -lactâmicos, o mesmo perfil de resistência do isolado original relativamente à resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina, amoxicilina e cefoxitina, redução de susceptibilidade às cefalosporinas de terceira geração e susceptibilidade ao imipenemo (Quadro XVII).

A análise por focagem isoelectrica dos transformantes e transconjugantes apenas revelou uma banda β -lactamásica de pI superior a 8,2 (Quadro XVII).

Analisou-se o perfil plasmídico dos isolados originais e dos respectivos transformantes e transconjugantes em electroforese em gel de agarose. Foi possível associar a codificação desta β -lactamase de espectro alargado a um plasmídeo conjugativo de aproximadamente 95 Md.

A transferência da β -lactamase codificada por um plasmídeo conjugativo, não foi acompanhada por genes que codificam a resistência a outros antibióticos não β -lactâmicos.

4.6. Susceptibilidade a agentes antimicrobianos de isolados de *Klebsiella pneumoniae*

Na figura IV estão representados os valores de percentagens de resistência, determinados pelo método de difusão em agar, dos isolados de *K. pneumoniae*, obtidos a partir de águas marinhas, face a antibióticos β -lactâmicos e a outros grupos de antibióticos. Catorze isolados foram seleccionados com ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), dois com ceftazidima (5 $\mu\text{g/ml}$) e dois isolados foram seleccionado com cefotaxima (2 $\mu\text{g/ml}$).

Pela análise do gráfico (Figura IV), verifica-se que os isolados apresentam uma elevada percentagem de resistência à carbenicilina (88,9%). A resistência à cefalotina é de cerca de 22% e observa-se a mesma percentagem (5,5%) de isolados resistentes e com susceptibilidade intermédia à associação amoxicilina/ácido clavulânico. Não

foram encontrados isolados resistentes à cefoxitina, imipenemo ou netilmicina. A ceftazidima foi a cefalosporina de terceira geração à qual maior percentagem de isolados são resistentes (16,7%), enquanto que às restantes cefalosporinas de terceira geração, apenas foram encontrados isolados com susceptibilidade intermédia.

Relativamente a antibióticos não β -lactâmicos, verificou-se um número baixo de isolados resistentes, sendo o maior valor obtido de 16,55% ao ácido nalidíxico.

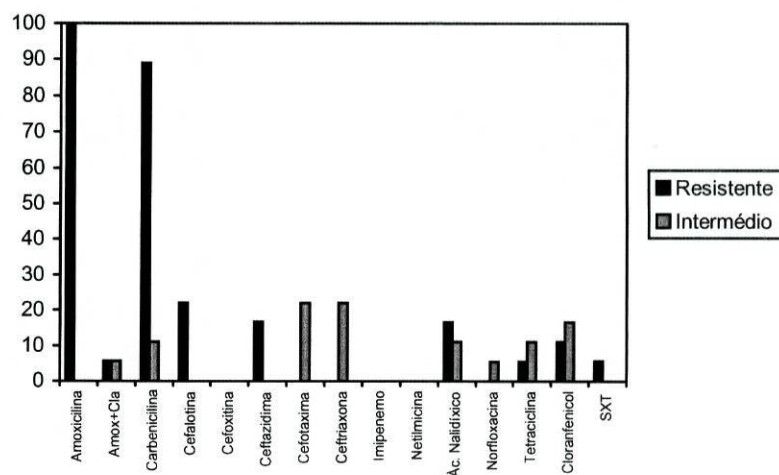


Figura IV. Percentagens de resistência a agentes antimicrobianos dos isolados de *K. pneumoniae* (n=18)

4.7. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de β -lactamases derivadas de SHV

4.7.1. Perfil de susceptibilidade

No quadro XVIII estão representados os valores dos halos de inibição de crescimento e CMI dos isolados de *K. pneumoniae*, com β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM e SHV, isolados no presente estudo, face a diversos antibióticos. A escolha destes isolados foi realizada de acordo com o método de sinergismo.

Os isolados FFUP15 e FFUP348 foram seleccionados com ceftazidima (5 μ g/ml), os isolados FFUP58 e FFUP140 com cefotaxima (2 μ g/ml), e o isolado FFUP192 foi seleccionado com ampicilina (100 μ g/ml).

Quadro XVIII. Perfil de susceptibilidade e ponto isoeléctrico das β -lactamases dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de SHV

Antibiótico	FFUP15		FFUP58		FFUP140		FFUP192		FFUP348	
	7,0		5,4 + 7,6		7,6 + 8,2		7,0 + 8,2		7,0 + 8,2	
	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)
Amoxicilina	6	>256	6	>256	6	>256	6	>256	6	>256
Carbenicilina	6	ND	6	ND	6	ND	6	ND	6	ND
Amox.+ Clav.	21	4	11	32	14	16	22	4	20	6
Cefalotina	19	12	6	> 256	6	> 256	6	> 256	6	> 256
Cefoxitina	32	3	20	6	18	12	23	4	26	3
Ceftazidima	19	8	22	0.75	12	> 32	11	> 32	12	> 32
Cefotaxima	30	0.5	20	12	20	12	19	4	20	4
Ceftriaxona	30	0.25	19	3	18	4	20	3	19	4
Aztreonamo	28	2	34	<0,016	12	96	12	64	14	48
Imipenemo	29	ND	26	ND	22	ND	28	ND	28	ND
Netilmicina	20	ND	12	ND	24	ND	20	ND	25	ND
Ác. Nalidíxico	20	ND	23	ND	6	ND	15	ND	6	ND
Norfloxacina	23	ND	26	ND	23	ND	22	ND	15	ND
Tetraciclina	15	ND	11	ND	22	ND	21	ND	22	ND
Cloranfenicol	25	ND	6	ND	26	ND	15	ND	10	ND
SXT	28	ND	6	ND	24	ND	22	ND	22	ND

Diam – diâmetro dos halos de inibição. ND – não determinado.

Tal como verificado para os isolados de *E. coli*, todos os cinco isolados de *K. pneumoniae* revelaram resistência à amoxicilina e carbenicilina. Com excepção de um isolado (FFUP15), todos os outros revelaram resistência à cefalotina (CMIs >256).

Três isolados (FFUP140, FFUP192, FFUP348) apresentaram resistência à ceftazidima (CMI>32), e apenas o isolado FFUP58 (CMI=32) revelou resistência à associação amoxicilina/ácido clavulânico. De acordo com as CMIs obtidas, nenhum isolado apresentou, de acordo com as normas do NCCLS (1999), resistência a cefoxitina, cefotaxima e ceftriaxona.

Relativamente a antibióticos não β -lactâmicos, observa-se que apenas os isolados FFUP58 e FFUP348 apresentaram diminuição de susceptibilidade, respectivamente, à netilmicina e norfloxacin e que, apenas, o isolado FFUP58 revelou resistência ao SXT. Dois isolados, FFUP140 e FFUP348, demonstraram resistência ao ácido nalidíxico enquanto que o isolado FFUP192 apenas revelou diminuição de susceptibilidade a este antibiótico.

4.7.2. Confirmação da detecção de β -lactamases de espectro alargado pelo método do “Epsilon-test”

Quadro XIX. “E-test” para detecção de β -lactamases de espectro alargado

Isolado	TZ ($\mu\text{g/ml}$)	TZL ($\mu\text{g/ml}$)	TZ/TZL	Deteção
FFUP15	8	0,125	64	Positivo
FFUP58	0,75	0,125	6	Negativo
FFUP140	>32	0,25	128	Positivo
FFUP192	>32	0,19	168.4	Positivo
FFUP348	>32	0,125	128	Positivo

Valores da concentração mínima inibitória ($\mu\text{g/ml}$) de ceftazidima sem ácido clavulânico (TZ), e ceftazidima com ácido clavulânico (TZL), para os isolados de *K. pneumoniae* produtores de β -lactamases de espectro alargado

Com excepção do isolado FFUP58, todos os isolados de *K. pneumoniae* apresentaram um valor superior a 8 (resultado positivo) para a razão entre a concentração mínima inibitória para a ceftazidima e concentração mínima inibitória para a ceftazidima com ácido clavulânico (Quadro XIX).

4.7.3. Perfil β -lactamásico

A análise por focagem isoelectrica demonstrou que os isolados de *K. pneumoniae* apresentam diferentes perfis β -lactamásicos. Apenas um isolado (FFUP15) apresenta só uma banda electroforética, de pI 7,0. Os restantes apresentam duas bandas: o isolado FFUP58, revelou bandas de pI 5,4 e 7,6, enquanto que o isolado FFUP140 as bandas têm pI 7,6 e 8,2. Os isolados FFUP192 e FFUP348 apresentam o mesmo perfil, duas bandas de pI 7,0 e 8,2 (Quadro XVIII).

4.7.4. Avaliação da capacidade de transferência de genes responsáveis pela resistência aos oximino- β -lactâmicos

Nos isolados de *K. pneumoniae* FFUP140, FFUP192 e FFUP348 realizaram-se ensaios de transformação, por falta de marcador de contra-selecção.

Nos isolados FFUP15 e FFUP58 foram realizados ensaios de conjugação, não tendo sido conseguida a transferência do gene que codifica as β -lactamases de espectro alargado.

Apenas no isolado FFUP140 foi conseguida a transferência por transformação de β -lactamases de espectro alargado. Contudo, não foi conseguida a transferência destes genes por conjugação. Os transformantes obtidos foram seleccionados com ceftazidima (5 μ g/ml). A detecção da produção de β -lactamases de espectro alargado nos transformantes foi confirmada pelo método do "E-test" (Quadro XX).

Quadro XX. "E-test" para a detecção de β -lactamases de espectro alargado

Isolado	TZ (μ g/ml)	TZL (μ g/ml)	TZ/TZL	Detecção
140 F	12	0.125	96	Positivo

Valores da concentração mínima inibitória (μ g/ml) de ceftazidima sem ácido clavulânico (TZ) e ceftazidima com ácido clavulânico (TZL) para transformante (140F) de *K. pneumoniae* produtor de β -lactamases de espectro alargado derivadas de SHV.

Quadro XXI. Perfil de susceptibilidade e ponto isoeléctrico das β -lactamases em isolado de *K. pneumoniae* produtor de β -lactamases de espectro alargado derivadas de SHV e transformante

Antibiótico	140 ^a		140F ^b	
	7,6 + 8,2		8,2	
	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)	Diam (mm)	CMI (μ g/ml)
Amoxicilina	6	>256	6	>256
Carbenecilina	6	ND	6	ND
Amox+ Clav.	14	16	22	8
Cefalotina	6	> 256	12	32
Cefoxitina	18	12	26	1.5
Ceftazidima	12	> 32	15	12
Cefotaxima	20	12	22	4
Ceftriaxona	18	4	20	3
Aztreonamo	12	96	8	96
Imipenemo	22	ND	30	ND
Netilmicina	24	ND	27	ND
Ác. Nalidíxico	6	ND	23	ND
Norfoxacina	23	ND	32	ND
Tetraciclina	22	ND	25	ND
Cloranfenicol	26	ND	27	ND
SXT	24	ND	30	ND

^a estirpe isolada de águas marinhas produtor de β -lactamases 7,6 e 8,2; ^b transformante, em *E. coli* TG1, produtora de β -lactamase 8,2. Diam – diâmetro dos halos de inibição. ND – não determinado.

Os plasmídeos do isolado original, assim como do transformante obtido, foram extraídos pela técnica Kado & Liu (1981) e visualizados em gel de agarose com brometo de etídeo, juntamente com plasmídeos de estirpes padrão, *E. coli* V517 e *E. coli* VR1. Foi assim possível observar no transformante um plasmídeo de aproximadamente 35 Md

4.8. Distribuição temporal de isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtores de β -lactamases de espectro alargado

Quadro XXII. Distribuição dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de β -lactamase de espectro alargado pelas praias ao longo do trabalho.

	Praia do Molhe	Praia de Gondarém	Praia de Matosinhos
Mês	Espécie - n.º de isolados - identificação		
Setembro 1999	<i>K. pneumoniae</i> BLEA-1 (FFUP15)		
Novembro 1999	<i>K. pneumoniae</i> BLEA-1 (FFUP58)		
Fevereiro 2000			<i>E. coli</i> BLEA-1 <i>E. coli</i> AmpC-1(FFUP139) <i>K. pneumoniae</i> BLEA-1 (FFUP140)
Março 2000	<i>E. coli</i> BLEA-5	<i>E. coli</i> BLEA-7	<i>E. coli</i> ESBL-4 <i>K. pneumoniae</i> BLEA-1 (FFUP192)
Abril 2000	<i>E. coli</i> BLEA-1		
Mai 2000	<i>E. coli</i> BLEA-11	<i>E. coli</i> BLEA-12	<i>E. coli</i> BLEA-15
Junho 2000	<i>E. coli</i> AmpC- 1(FFUP331)		<i>E. coli</i> BLEA-1
Julho 2000	<i>K. pneumoniae</i> BLEA-1 (FFUP348)	<i>E. coli</i> BLEA-1	

No decurso da avaliação de susceptibilidade pelo método de difusão em agar, foram escolhidos os isolados produtores de β -lactamases de espectro alargado, pelo teste de sinergismo de cefalosporinas de terceira geração com o ácido clavulânico.

A distribuição ao longo do tempo e pelas praias dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de β -lactamases de espectro alargado está representado no quadro XXII.

Cinquenta e oito isolados de *E. coli* apresentaram um comportamento típico da existência de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM. Isolados com este fenótipo foram encontradas em todas as praias em estudo (Quadro XXII).

Cinco isolados de *Klebsiella pneumoniae* também apresentaram um comportamento típico de produção de β -lactamases de espectro alargado de tipo SHV. Três destes isolados foram provenientes da praia do Molhe (FFUP15, FFUP58 e FFUP348), os restantes são provenientes da praia de Matosinhos (FFUP140 e FFUP192).

Obtiveram-se também isolados produtores de β -lactamases de espectro alargado do tipo AmpC, um destes isolados foi obtido nas águas da praia de Matosinhos (FFUP139) e o outro da praia do Molhe (FFUP331).

4.9. Hibridação com sonda TEM

A preparação de sonda específica para o gene codificador de β -lactamases do tipo TEM foi efectuada no sentido de avaliar a sua utilidade como técnica rápida de despiste de coliformes produtores destas enzimas e como auxílio na identificação de plasmídeos codificadores destas enzimas aquando da análise electroforética de extractos plasmídicos.

No formato *Dot blot* usou-se como amostra o DNA total das estirpes e no formato *Southern blot* os plasmídeos das estirpes extraídos pela técnica de Kado & Liu (1981).

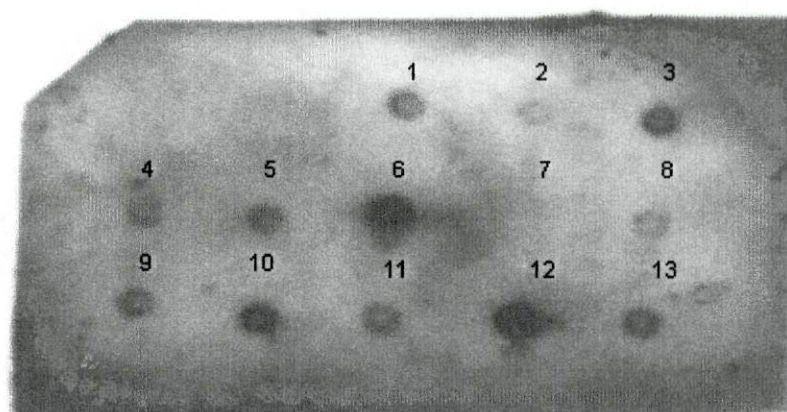


Figura V. Hibridação em formato *Dot-blot* entre sonda TEM e DNA total.

1 - *E. coli* com β -lactamases de pl 5,4 (FFUP52), 2 - *K. pneumoniae* com β -lactamases de pl 5,4 + 7,6 (FFUP58), 3 a 6 - *E. coli* com β -lactamase de pl 5,4 (FFUP73, FFUP106, FFUP 115, FFUP121), 7 - *K. pneumoniae* com β -lactamases de pl 7,6 + 8,2 (FFUP140), 8 - *E. coli* com β -lactamase de pl 5,4 (FFUP147), 9 - *E. coli* com β -lactamases de pl 5,4 + 5,9 (FFUP65), 10 - Transformante de *E. coli* com β -lactamase de pl 5,9, 11 - *E. coli* com β -lactamases de pl 5,4 + 5,9 (FFUP177), 12 - *E. coli* com β -lactamases de pl 5,4 + >8,2, 13 - *E. coli* com β -lactamase de pl 5,4 (FFUP31).

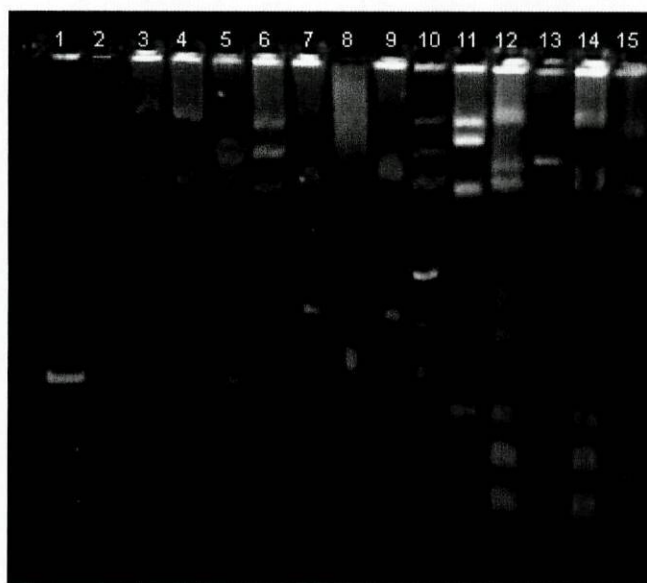


Figura VI. Gel de agarose para hibridação com sonda TEM.

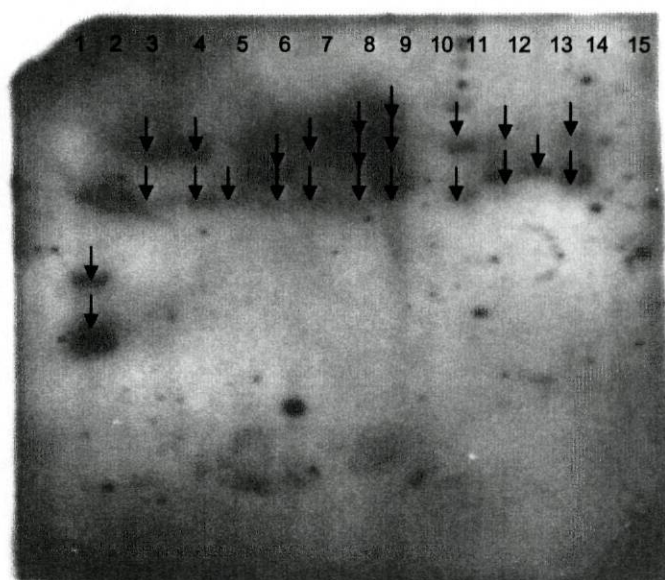


Figura VII. Hibridação em formato *Southern-blot* entre sonda TEM e DNA plasmídico. 1- *E.coli* UCB1 (PBR322), 2 - *E. coli* K802N, 3 e 4 - *E. coli* com β -lactamase de pl 5,4 (FFUP31 e FFUP52), 5 - *K. pneumoniae* com β -lactamases de pl 5,4 + 7,6 (FFUP58), 6 a 9 - *E. coli* com β -lactamase de pl 5,4 (FFUP73, FFUP106, FFUP115, FFUP121), 10 - *K. pneumoniae* com β -lactamases de pl 7,6 + 8,2 (FFUP140), 11 - *E. coli* com β -lactamase de pl 5,4 (FFUP147), 12 - *E. coli* com β -lactamases de pl 5,4 + 5,9 (FFUP165), 13 - Transformante de *E. coli* com β -lactamase de pl 5,9, 14 - *E. coli* com β -lactamase de pl 5,4 + 5,9 (FFUP177), 15 - *E. coli* com β -lactamases de pl 5,4 + >8,2

Nas figuras V e VII estão representados os resultados de hibridação com sonda TEM, na figura V usando o formato *Dot blot* e na figura VII o formato *Southern blot*.

No formato *Dot-blot*, como era de prever, não se verificou hibridação com a sonda no isolado produtor de β -lactamases de pI 7,6 e 8,2, β -lactamases de tipo SHV (figura V), tendo-se verificado hibridação com os restantes isolados. No *Southern-blot*, verifica-se que as β -lactamases de tipo TEM se localizam em plasmídeos de elevado tamanho (Figura VII). Nos isolados de *E. coli* produtores de β -lactamase de espectro alargado derivadas de TEM (FFUP165 e FFUP177), a sonda hibridou com 2 plasmídeos que podem corresponder aos plasmídeos que codificam a enzima TEM-1 e a enzima de pI 5,9 (da família TEM) responsável pelo fenótipo de resistência às cefalosporinas de terceira geração.

5. Discussão

A presença de coliformes em águas costeiras marinhas poderá indiciar uma contaminação fecal constituindo um potencial problema de saúde pública.

De acordo com Instituto Nacional da Água entre 1999 e 2000, as águas das zonas balneares de onde são provenientes as amostras utilizadas neste trabalho, relativamente a parâmetros microbiológicos e físico-químicos, foram classificadas de aceitáveis a más (INAG, 2001). Estas praias poderão eventualmente sofrer a influência de um efluente de águas residuais urbanas, situado em Sobreiras (estuário do rio Douro). Até à data da colheita das amostras deste trabalho este efluente era lançado no rio sem tratamento prévio.

Verificou-se um predomínio da espécie *Escherichia coli* relativamente aos outros coliformes isolados neste trabalho (Quadro IX). Esta espécie é um habitante nativo do tracto intestinal do Homem e outros animais de sangue quente (Sousa, 2000) e também um patogénico comum em pacientes ambulatorios e em doentes hospitalares. *E. coli* está associada a vários tipos de infecções humanas, tais como infecções urinárias, gastroenterites, pneumonias, septicémias e abscessos (Kelly *et al.*, 1985; Sousa, 2000).

Uma vez que *E. coli* é um habitante normal do tracto intestinal, facilmente é disseminada no ambiente através de fezes (Krumperman, 1983). É conhecida a sua capacidade de sobrevivência em ambientes aquáticos poluídos, tais como esgotos não tratados (Murray *et al.*, 1984) e águas marinhas (Carrillo *et al.*, 1985; Fuentes *et al.*, 1983; Valdes-Collazo *et al.*, 1987). Este factores podem explicar a predominância desta espécie nas amostras processadas.

Apesar de em menor número, foram também isoladas estirpes de *Klebsiella spp.*, um género ubíquo na natureza. Esta espécie tem dois habitats, o ambiente, onde pode

ser encontrada em águas superficiais, esgotos, solo ou em plantas e superfícies mucosas do homem e outros mamíferos, os quais coloniza (Podschun & Ullmann, 1998).

Como patogénico oportunista, *Klebsiella* spp. afecta principalmente doentes hospitalares imunocomprometidos e que padecem de outras doenças tais como "diabetes mellitus" ou obstrução pulmonar crónica, sendo um dos principais agentes de infecções nosocomiais. Diversos tipos de infecções podem ser causadas por *Klebsiella* spp., como por exemplo, infecções urinárias, pneumonia, septicémia, infecções dérmicas e septicémia neonatal (Podschun & Ullmann, 1998).

Além de se terem isolado bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* nas águas marinhas, também foram isoladas espécies fermentadoras de lactose, oxidase positiva. Estas características sugerem a presença de bactérias do género *Aeromonas*. As espécies deste género crescem em meio de Macconkey e fermentam hidratos de carbono, são resistentes à penicilina, ampicilina, carbenicilina e ticarcilina (Von Graevenitz, 1985). Além disso, a sua capacidade de sobrevivência permite-lhe uma ampla distribuição em diversos ambientes aquáticos, incluindo águas marinhas costeiras (Boira, 1996).

5.1. Resistência a agentes antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* de águas marinhas

Escherichia coli apresenta um fenótipo naturalmente sensível a antibióticos β -lactâmicos (Philippon *et al.*, 1986), apesar de possuir uma β -lactamase constitutiva, que normalmente não se expressa em quantidade suficiente para causar resistência (Sanders & Sanders, 1992). Sendo assim, a resistência a este grupo de antibióticos, mediada por β -lactamases, pode ser devida à aquisição de novos genes, ou de mutações que afectam a expressão da sua β -lactamase cromossómica (Bush, 1989; Sanders, 1992). No entanto, é de maior relevância a resistência resultante da aquisição de β -lactamases plasmídicas, tais como OXA-1, SHV-1, TEM-2, e principalmente, TEM-1 (Pérez-Moreno *et al.*, 1997). Estima-se que aproximadamente 50% de isolados clínicos de *E. coli* produzam a enzima TEM-1 (Livermore, 1995) e que

esta enzima corresponda a cerca de 80% de todas as β -lactamases codificadas por plasmídeos na família *Enterobacteriaceae* (Du Bois *et al.*, 1995).

Os resultados obtidos neste trabalho revelam que os isolados de *E. coli* de águas marinhas costeiras da zona urbana do Porto e resistentes à ampicilina apresentam uma elevada incidência de resistência, *in vitro*, à carbenicilina (100%), cefalotina (54,4%) e, mais raramente à associação ácido clavulânico/amoxicilina (2,64%) e cefoxitina (3,5%). Os valores de susceptibilidade intermédia obtidos face à cefotaxima (48,3%) e ceftriaxona (45,7%) devem-se à presença de isolados de *E. coli* (n=58) produtoras de β -lactamases de espectro alargado (Figura I).

Conforme verificado para os isolados de origem clínica da zona urbana do Porto (Sousa *et al.*, 1989 a, b; 1991) e para os provenientes de águas de consumo (Quinteira, 1999), o restabelecimento da susceptibilidade face à associação amoxicilina/ácido clavulânico dos isolados de águas marinhas, que apresentam resistência à amoxicilina, corrobora a presença de β -lactamases codificadas por genes que se situam em plasmídeos. Com efeito, caracterizaram-se os perfis β -lactamásicos dos isolados de *E. coli* resistentes à ampicilina e não produtores de β -lactamases de espectro alargado, tendo-se verificado apenas uma única banda electroforética de pl 5,4, idêntico ao da β -lactamase padrão (TEM-1) (Quadro X).

A enzima TEM-1 hidroliza penicilinas, cefalosporinas de primeira geração e algumas de segunda geração sendo, no entanto, relativamente ineficaz face a cefuroxima, aztreonamo, imipenemo e cefalosporinas de terceira geração (Bush *et al.*, 1995; Sanders & Sanders, 1992; Sanders, 1992). Tendo em conta o fenótipo de resistência obtido (Quadro X) para os isolados com banda electroforética de pl 5,4, pode-se considerar esta enzima como TEM-1.

Os resultados obtidos com hibridação com sonda TEM em alguns isolados de *E. coli* com β -lactamases de pl 5,4 demonstraram que esta enzima está presente em diferentes plasmídeos de elevado tamanho (Figura VII).

No Norte de Portugal, foram anteriormente realizados estudos de incidência de isolados de *E. coli* resistentes a antibióticos β -lactâmicos. Em 1991, foram estudados 2063 isolados de *E. coli* oriundos de doentes hospitalares e ambulatoriais da zona urbana do Porto (Sousa *et al.*, 1991). Os resultados obtidos por estes autores demonstram que estes isolados apresentam um elevado nível de resistência a

ampicilina (55,3%) e carbenicilina (52,8%), mas são geralmente susceptíveis a outros β -lactâmicos apresentando 4,4% resistência à cefalotina, 3,5% à associação ácido clavulânico/amoxicilina, 3,2% à cefoxitina e 0,5% à cefotaxima. Mais recentemente, um estudo envolvendo isolados de *E. coli* isoladas de águas de consumo demonstrou que 9% das isolados apresentaram resistência à amoxicilina, 6% à carbenicilina e 9% à cefalotina (Quinteira, 1999).

5.2. Resistência a agentes antimicrobianos de isolados de *Klebsiella pneumoniae* de águas marinhas

A maioria das estirpes de *K. pneumoniae* isoladas de clínica possuem uma β -lactamase cromossômica. Esta enzima é constitutiva e normalmente produzida em nível baixo, sendo contudo, suficiente para proteger contra a ampicilina, carbenicilina e ticarcilina (Livermore, 1995).

Os isolados de *K. pneumoniae* de águas marinhas apresentaram uma elevada incidência de resistência à amoxicilina (100%) e carbenicilina (88,9%), e mais reduzida à cefalotina (22%), e amoxicilina/ácido clavulânico (5,5%). Relativamente à resistência a oximinocefalosporinas, verificou-se 16,7% de resistência à ceftazidima e 22% de isolados com diminuição de susceptibilidade à cefotaxima e ceftriaxona, em resultado da presença de isolados de *K. pneumoniae* (n=5) produtores de β -lactamases de espectro alargado (Figura IV).

Apenas 88,9% dos isolados demonstraram resistência à carbenicilina, os restantes isolados apresentaram um halo de inibição (20 mm) que, apesar de próximo do halo considerado resistente (19 mm), não permitiu classificar as estirpes como resistentes.

Estudos de susceptibilidade de *K. pneumoniae* a diferentes antibióticos revelaram em isolados de águas de consumo elevados valores de resistência à amoxicilina (95%) e carbenicilina (87%) e reduzida incidência de resistência à cefalotina (9%) e amoxicilina/ácido clavulânico (9%) (Quinteira, 1999). Valores semelhantes de incidência de resistência, foram obtidos para isolados hospitalares e de ambulatório: elevada resistência a amoxicilina (100%) e ticarcilina (100%), moderada resistência à cefalotina (27,4%) e fraca resistência à amoxicilina/ácido clavulânico (Neto *et al.*, 1992).

À semelhança dos resultados obtidos para isolados de *K. pneumoniae* de origem clínica (Neto *et al.*, 1992) e águas de consumo (Quinteira, 1999), os resultados de resistência obtidos para isolados de *K. pneumoniae* isoladas de águas marinhas e não produtoras de β -lactamases de espectro alargado, poderão ser consequência da expressão da β -lactamase cromossômica. Esta β -lactamase cromossômica (SHV-1) confere resistência às aminopenicilinas e carboxipenicilinas, mas não altera a susceptibilidade a outros β -lactâmicos.

5.3. *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM em águas marinhas

Desde a introdução de cefalosporinas de terceira geração em ambiente hospitalar as bactérias Gram negativo têm reagido a estes antibióticos, principalmente com a produção de novos tipos de β -lactamases de espectro alargado, mediadas por plasmídeos (Matsumoto & Inoue, 1999).

Isolados de *E. coli*, produtores de β -lactamases de espectro alargado foram pela primeira vez descritos em Portugal durante um estudo de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos de isolados de doentes hospitalares e ambulatoriais colhidos entre 1988 e 1990 (Sousa *et al.*, 1991). A caracterização molecular das enzimas que conferiam a resistência aos oximino- β -lactâmicos revelou a presença de SHV-5 (Peixe, 1996) e TEM-6b (Peixe *et al.*, 1996).

No presente trabalho, isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado foram inicialmente detectados através do teste de sinergismo, e posteriormente confirmados por "E-test" (Quadro XV). O método de sinergismo demonstrou ser um método eficaz, reprodutível, e com sensibilidade para a detecção destas enzimas. Além disso verificou-se concordância entre os resultados obtidos com este teste e o método de "E-test".

Nestes isolados foi visualizado um notável sinergismo entre o disco da associação amoxicilina/ácido clavulânico, os discos de todas as cefalosporinas de terceira geração usadas (ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona) e o disco de aztreonamo.

A partir de amostras provenientes de águas costeiras de praias da zona urbana do Porto, encontraram-se 58 isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro

alargado derivadas de TEM. É de salientar a permanência destes isolados nas diferentes praias desde Fevereiro a Julho de 2000. Contudo, os isolados foram predominantemente obtidos nos meses de Março e Maio de 2000 (Quadro XXII). O baixo número de isolados obtidos ($n=1$) entre estes meses poderá ser resultado da elevada pluviosidade ocorrida em Abril de 2000. O isolamento desta estirpe durante vários meses poderá reflectir o lançamento constante de águas residuais que atingem as praias em estudo.

Observou-se que todos estes isolados apresentaram um comportamento muito similar no que respeita à susceptibilidade aos antibióticos estudados.

A semelhança de comportamento face aos diversos antibióticos, perfil β -lactamásico e plasmídico idênticos, sugeria que estes isolados seriam uma mesma estirpe, tendo por caracterização genómica de alguns destes isolados, através de ERIC-PCR (Figura III) confirmado esta hipótese.

O método ERIC-PCR é um método simples, altamente reprodutível, que permite distinguir estirpes estreitamente relacionadas, deduzir relações filogenéticas entre estirpes e, ainda, estudar a sua diversidade numa variedade de ecossistemas. Este método foi usado com sucesso, na diferenciação de algumas estirpes, como por exemplo, de *Bartonella* (Rodriguez-Barradas *et al.*, 1995), *Citrobacter diversus* (Woods *et al.*, 1992), *Enterobacter aerogenes* (Georghiou *et al.*, 1995), *Rhizobium meliloti* (De Bruijn, 1992), *Francisella tularensis* (De la Puente-Redondo *et al.*, 2000), *Haemophilus influenzae* (Gomez-de-Leon *et al.*, 2000); *Pasteurella multocida* (Loubinoux *et al.*, 1999), na diferenciação de estirpes de *E. coli* de origem animal ou humana (Dombek *et al.*, 2000) e na separação de grupos filogenéticos e não patogénicos de *E. coli* (Johnson & O'Brian, 2000).

Os isolados marinhos de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM apresentaram resistência às aminopenicilinas, carboxipenicilinas, cefalosporinas de primeira geração, e susceptibilidade à cefoxitina e imipenemo. Além disso, estes isolados revelaram diminuição da susceptibilidade às cefalosporinas de terceira geração (Quadro XI). Este fenótipo de resistência, está habitualmente associado a oximino- β -lactamases plasmídicas derivadas de TEM-1, 2 ou SHV-1 (Bush *et al.*, 1995; Sirot, 1995). Além dos isolados apresentarem resistência a antibióticos pertencentes à família dos β -lactâmicos também revelaram resistência ao ácido nalidíxico, norfloxacina e tetraciclina.

Em Portugal, recentemente (Caniça *et al.*, 2000), foram estudadas trezentas e vinte e duas estirpes de *E. coli* provenientes de laboratórios hospitalares da zona Norte, Centro e Sul. A frequência de resistência de estirpes à amoxicilina encontrada foi de 58% (186/322), 7% à associação amoxicilina/ácido clavulânico e 17% à cefalotina. Das cento e oitenta e seis estirpes resistentes à amoxicilina, apenas 8 estirpes com teste de sinergismo positivo são resistente aos oximino- β -lactâmicos: resistência à cefotaxima (n=1), ao aztreonamo (n=3), à ceftazidima e aztreonamo (n=2), à ceftazidima e aztreonamo e ceftriaxona (n=1) e à ceftazidima e aztreonamo e ceftriaxona e cefotaxima (n=1) (Caniça *et al.*, 2000). Os principais mecanismos de resistência encontrados, nestas estirpes foram a hiperprodução de β -lactamases do tipo TEM-1 e a produção de enzimas do tipo OXA-1, ambas detectadas em estirpes resistentes à associação amoxicilina/ácido clavulânico (Caniça *et al.*, 2000). Este trabalho não revela, contudo, o perfil β -lactamásico das estirpes com prova de sinergismo positivo.

De acordo com as CMI's obtidas para as oximinocefalosporinas, os isolados marinhos de *E. coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado obtidos não são considerados resistentes à ceftazidima (CMI 8-12 $\mu\text{g/ml}$), cefotaxima (6-8 $\mu\text{g/ml}$) e ceftriaxona (8-12 $\mu\text{g/ml}$), de acordo com NCCLS (1999) (Quadro XI). No entanto, Katsanis *et al.* (1994) demonstraram que as CIMs de cefotaxima e ceftriaxona, para isolados de *E. coli* que produzem β -lactamases de espectro alargado, frequentemente não excedem o "breakpoint" que permite considerar a bactéria como resistente. Contudo, *in vivo*, estes isolados poderão funcionar como resistentes, originar casos de insucessos terapêuticos.

Determinou-se o ponto isoeléctrico em isolados pertencentes ao grupo que apresentava um fenótipo de resistência similar. Todos os isolados revelaram duas bandas de β -lactamase, uma banda de pI 5,4, um ponto isoeléctrico semelhante a TEM-1, e outra banda de pI 5,9 (Quadro XI). Com ponto isoeléctrico próximo de 5,9 foram já descritas diversas enzimas, nomeadamente TEM-4 (Paul *et al.*, 1989), TEM-6 (Bauernfeind & Hörl, 1987), TEM-8 (Goussard & Courvalin, 1999), TEM-27 (Morosini *et al.*, 1995) e TEM-52 (Pai *et al.*, 1999). No Norte de Portugal, foi já isolada uma estirpe hospitalar de *E. coli* produtora de β -lactamase de espectro alargado com pI 5,87, que foi identificada como TEM-6b (Peixe, 1996).

A posterior sequenciação nucleótida da β -lactamase produzida por *E. coli* proveniente de águas marinhas permitirá identificar esta β -lactamase e eventualmente, facilitar a identificação da sua origem.

Nos isolados de *E. coli* em estudo, a presença concomitante de TEM-1, nestes isolados, poderá compensar a perda de actividade β -lactamásica que acompanha as β -lactamases de espectro alargado (Jacoby, 1994).

A utilização de uma sonda para o gene TEM e a sua utilização em transformantes permitiu verificar que o gene que codifica a β -lactamase de espectro alargado se encontra num plasmídeo diferente do que os que codificam a TEM-1 (Figura VII). Apesar desta enzima não ser TEM-1, o pequeno número de mutações não é suficiente para impedir a hibridação nas condições de restringência usadas.

Através de ensaios de transferência de genes verificou-se que a β -lactamase de espectro alargado de pl 5,9 estava associada a um plasmídeo conjugativo de 30 Md.

Ao contrário de resultados obtidos para estirpes de origem clínica (Peixe, 1996), a transferência dos genes que codificam a resistência aos β -lactâmicos não foi acompanhada por genes que conferem resistência a outros antibióticos.

O facto de se ter conseguido demonstrar a capacidade de transferência é relevante, uma vez que estes isolados são provenientes do meio ambiente. Convém salientar que diversos autores demonstraram já a possibilidade de transferência de genes em ambiente marinho quer através de transformação (Paul *et al.*, 1991; Stewart & Sinigalliano, 1990) quer através de conjugação (Dahlberg *et al.*, 1998; Fernandez-Astorga *et al.*, 1992; Gauthier & Breittmayer, 1990; Goodman *et al.*, 1993). Este fenómeno não deixa de ser preocupante, não só pela possibilidade destes microrganismos ocasionarem infecções, tanto por ingestão, inalação, contacto ou mesmo consumo de alimentos marinhos, como também, pela sua capacidade de transferirem os genes codificadores destas enzimas a outros microrganismos, incluindo bactérias comensais do Homem, peixes e outros organismos marinhos e às autóctones.

5.4. *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro alargado do tipo AmpC em águas marinhas

Neste trabalho, foram encontrados dois isolados de *E. coli* (FFUP139 e FFUP331) que devido às suas características fenotípicas de resistência suscitaram particular atenção. Além de apresentarem resistência às aminopenicilinas, carboxipenicilinas e diminuição da susceptibilidade às cefalosporinas de terceira geração, também apresentam resistência à cefoxitina e à associação amoxicilina/ácido clavulânico (Quadro XV). Este comportamento é típico de β -lactamases do tipo AmpC (Bush *et al.*, 1995).

A resistência de *E. coli* a amoxicilina/ácido clavulânico e à cefoxitina pode ser resultado da hiperprodução da enzima cromossômica, ou produção de enzimas AmpC mediadas por plasmídeos. Genes que codificam β -lactamases de tipo AmpC são frequentemente encontrados no cromossoma de diversos membros da família *Enterobacteriaceae*, tais como *Enterobacter*, *Shigella*, *Providencia*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, e *E. coli* (Livermore, 1995).

Diversos trabalhos descrevem o aumento de frequência de isolados clínicos de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de β -lactamases AmpC plasmídicas. Contudo, a frequência real destas enzimas continua desconhecida uma vez que, muitos laboratórios têm dificuldade em detectá-las (Coudron *et al.*, 2000). Por exemplo, num estudo que abrangeu diferentes laboratórios do Connecticut, 28 (74%) de 38 laboratórios em falharam na detecção de estirpes produtoras de β -lactamases de tipo AmpC (Tenover *et al.*, 1999). Estes resultados podem sugerir que o sistema (NCCLS, 1999) usado para a detecção de estirpes produtoras de β -lactamases de tipo AmpC não é eficaz, não sendo contemplados métodos para este efeito, pelo NCCLS (Coudron *et al.*, 2000).

Os ensaios de transferência de genes, permitiram associar num isolado (FFUP331) o fenótipo de resistência do tipo AmpC a um plasmídeo conjugativo. O antibiograma do transformante e transconjugante obtidos, revelou o mesmo perfil de resistência aos antibióticos β -lactâmicos da estirpe original (Quadro XVII). A análise do perfil β -lactamásico do transformante e transconjugante obtidos, por focagem isoeléctrica, revelou apenas uma banda electroforética de pl superior a 8,2 (Quadro

XVII). O aumento do halo de inibição da carbenicilina observado nos transformantes e transconjugantes obtidos poderá ser justificado pela fraca capacidade de hidrólise de β -lactâmicos com substituintes lipofílicos pelas enzimas AmpC (Mazzariol *et al.*, 2000).

No outro isolado de *E. coli* produtor de β -lactamase do tipo AmpC (FFUP139), não foi possível associar a resistência à cefoxitina a um plasmídeo, não sendo de excluir a possibilidade de se tratar de uma estirpe hiperprodutora de AmpC.

5.5. *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro alargado derivadas de SHV em águas marinhas

Apesar de β -lactamases de espectro alargado poderem ser encontradas numa variedade de patogénicos Gram negativo, *K. pneumoniae* é a espécie na qual este tipo de enzimas é mais frequentemente verificada (Jacoby, 1994; Sirot, 1995; Yuan *et al.*, 2000). São desconhecidas as razões pelas quais diferentes tipos destas enzimas são maioritariamente encontradas em *K. pneumoniae*, quando comparadas com outros géneros, embora seja sugerido que esta espécie é um bom vector para plasmídeos que possuam genes que codificam estas enzimas, ou porque esta espécie permita a evolução de genes que codificam as β -lactamases de espectro alargado mais rapidamente que outras enterobactérias (Livermore, 1995), ou ainda, devido à presença de sequências que permitam a aquisição de integrões (Rasmussen & Bush, 1997).

Frequentemente são descritos, em todo o Mundo, surtos de infecções causados por isolados de *K. pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro alargado (Fiett *et al.*, 2000; French *et al.*, 1996; Gaillot *et al.*, 1998; Gniadkowski *et al.*, 1998; Peña *et al.*, 1998; Pitout *et al.*, 1998; Shannon *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 2000).

Livermore & Yuan (1996) estudaram, em 1994, a produção de β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Klebsiella* sp. de 35 unidades de cuidados intensivos, em países do oeste e sul da Europa. Dos 966 isolados avaliados 220 (23%) produziam este tipo de enzimas. A incidência de *K. pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro alargado variou nos diferentes países, sendo o menor valor obtido na Alemanha (9%) e os maiores em Portugal (49%) e na Turquia (59%). Um

estudo posterior demonstrou que a média de incidência da produção de β -lactamases de espectro alargado na Europa em 1997-8 foi de 25% (Babini & Livermore, 2000).

Além do estudo da incidência da produção de β -lactamases de espectro alargado, foi também estudada a incidência de resistência múltipla (Livermore & Yuan, 1996), verificando-se que, as estirpes produtoras de β -lactamases de espectro alargado apresentam também 76% de resistência à gentamicina, 52% à amicacina e 31% à ciprofloxacina.

Diversos trabalhos têm documentado a incidência da resistência a cefalosporinas de espectro alargado em bactérias isoladas de pacientes com infecções nosocomiais, contudo, relativamente à existência destas bactérias na comunidade não existe muita informação. Um estudo realizado em França (Goldstein *et al.*, 1995) revelou que cerca de 5% de isolados de *K. pneumoniae* da comunidade produziam β -lactamases de espectro alargado. Aproximadamente 14% destes isolados foram obtidos de pacientes previamente hospitalizados e 24% de pacientes que receberam tratamento antibiótico nos 3 meses que antecederam a análise. Este trabalho permite concluir que bactérias produtoras de β -lactamases de espectro alargado encontradas na comunidade poderão ser resultado do facto destes pacientes albergarem estirpes resistentes adquiridas em hospitais. Mais recentemente, estudos realizados em França (Goldstein, 2000) e Irlanda (Cormican *et al.*, 1998), demonstram a existência de estirpes produtoras de β -lactamase de espectro alargado em pacientes da comunidade. Actualmente, a nível da comunidade este tipo de bactérias, além de ser descrito em humanos, começa também a ser encontrado em animais, uma vez que foi possível isolar uma estirpe de *E. coli* produtora de β -lactamases de espectro alargado a partir de urina de um cão (Teshager *et al.*, 2000).

Em Portugal, isolados de *K. pneumoniae* produtores de β -lactamases de espectro alargado foram verificados em diversos hospitais do norte de Portugal (Ferreira *et al.*, 1992; Ferreira, 1997). A incidência destas isolados em 1992, apresentava já um valor de 14,3% (Ferreira *et al.*, 1992; Ferreira, 1997). A β -lactamase de espectro alargado do tipo SHV-5 foi prevalente nestes isolados.

No presente trabalho, foram obtidos cinco isolados de *K. pneumoniae* produtores de β -lactamases de espectro alargado derivadas de SHV. Tal como a metodologia usada para os isolados de *E. coli*, estes foram detectados pelo método de sinergismo

de duplo disco. No antibiograma dos isolados FFUP140, FFUP192 e FFUP348 foi possível observar sinergismo entre todos os oximino- β -lactâmicos usados e a associação amoxicilina/ácido clavulânico. No isolado FFUP15 o sinergismo apenas foi verificado com o disco de ceftazidima e aztreonamo, enquanto que no isolado FFUP58 o sinergismo foi observado com os discos de cefotaxima e ceftriaxona e o disco de amoxicilina/ácido clavulânico.

Quando confirmadas por "E-test" (Quadro XX), a detecção com tiras de ceftazidima revelou-se negativa no isolado FFUP58. Este facto poderá dever-se à baixa eficiência hidrolítica para a ceftazidima das β -lactamases de espectro alargado produzidas por esta estirpe. Com efeito, este isolado possui duas β -lactamases de pl 5,4 e 7,6. A enzima de pl 5,4 poderá corresponder a TEM-1, os resultados obtidos por hibridação, quer por *Dot blot* (Figura V), assim como *Southern blot* (Figura VII) vêm reforçar a hipótese desta enzima ser da família TEM. A enzima de pl 7,6 poderá corresponder a enzima de tipo SHV-2, que poderá ser a responsável pela resistência às cefalosporinas de terceira geração. As enzimas do tipo SHV-2, são consideradas cefotaximases, pois apresentam nível de resistência superior para a cefotaxima que para a ceftazidima (Du Bois *et al.*, 1995). Esta enzima não foi transferida nem por conjugação nem por transformação usando como selecção a cefotaxima (2 μ g/ml).

Em três isolados de *K. pneumoniae* (FFUP140, FFUP192, FFUP348) foi possível observar a presença de uma β -lactamase de pl 8,2. No isolado FFUP140 esta β -lactamase está acompanhada de um β -lactamase de pl 7,6 e nas restantes de uma β -lactamase 7,0. Uma β -lactamase de pl 7,0 foi também encontrada no isolado FFUP15, que apresentava apenas resistência à ceftazidima (Quadro XVIII), de acordo com o seu ponto isoeléctrico esta enzima poderá ser considerada do tipo SHV-3 (Bush *et al.*, 1995).

A resistência à associação amoxicilina/ácido clavulânico foi verificada nos isolados FFUP58 e FFUP140, que apresentaram CMIs, respectivamente de 32 μ g/ml e 16 μ g/ml (Quadro XVIII). Em ambos os isolados há a produção de duas β -lactamases, o que poderá condicionar esta resistência, uma vez que, no isolado FFUP140, por transformação, foi isolada a β -lactamase de pl 8,2, não se verificando resistência à associação amoxicilina/ácido clavulânico no transformante (Quadro XXI). No caso do

isolado FFUP58, esta resistência poderá ser resultado da presença concomitante de TEM-1 (Ferreira, 1997).

À semelhança dos resultados obtidos por Ferreira (1997), apenas foi possível num isolado (FFUP140) a transferência dos genes que codificam a enzima de pl 8,2. A não transferibilidade, por transformação, de genes que codificam a β -lactamase de espectro alargado, nos outros isolados, poderá ser resultado da localização destes genes no cromossoma através de estrutura tipo transposição (Jacoby & Han, 1996).

A transferência de genes que codificam a β -lactamase de pl 8,2 permitiu observar o comportamento desta β -lactamases num sistema isogénico (Sanders, 1992). O transformante, apresentou menores valores de CMI para as cefalosporinas de terceira geração, mas igual valor de CMI para o aztreonamo quando comparado com a isolado inicial (Quadro XX).

6. Conclusões

A presença em águas marinhas de espécies com importância clínica e resistentes a antibióticos tem sido raramente avaliada desconhecendo-se, em Portugal, a existência de qualquer estudo anterior sobre este tema.

O isolamento de estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* resistentes a diferentes antibióticos e, nomeadamente aos β -lactâmicos, nas praias em estudo, indiciam uma elevada contaminação por esgotos urbanos, facto provavelmente decorrente dos emissores localizados nas zonas próximas. É de salientar que alguns isolados foram encontrados durante um longo período de tempo nas águas marinhas analisadas, o que poderá ser resultado do lançamento de águas residuais e/ou da sua capacidade de sobrevivência.

A detecção nas três praias da zona urbana do Porto de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro alargado é de grande relevância pela gravidade associada às infecções por estas estirpes e por indiciar a presença, em elevada incidência, destes isolados em hospitais ou na comunidade, ou em ambos.

Apesar da baixa incidência de estirpes de *E. coli* produtoras de β -lactamases de espectro alargado encontrada na comunidade, foi possível obter um elevado número de isolados de *E. coli* com β -lactamases de espectro alargado derivadas de TEM, enzimas associadas à utilização clínica de oxímio- β -lactâmicos.

No presente trabalho foi detectada a presença de isolados de *E. coli* produtoras de β -lactamases de espectro alargado do tipo AmpC, apesar de desconhecermos a sua existência em isolados clínicos portugueses.

O isolamento de *K. pneumoniae* produtoras de diferentes tipos de β -lactamases derivadas de SHV, tipo SHV-2, SHV-3 e SHV-5, poderá denotar uma maior diversidade no tipo de enzimas produzidas por isolados clínicos desta espécie.

Este trabalho constituiu uma primeira descrição a nível mundial da presença de isolados produtores de β -lactamases de espectro alargado em águas marinhas.

Os resultados obtidos justificam a realização futura de um estudo de incidência de coliformes produtores de β -lactamases de espectro alargado na comunidade, além de um maior conhecimento da sua incidência, tipo de mecanismos de resistência e epidemiologia de disseminação a nível hospitalar.

7. Bibliografia

- Acar, J. & Courvalin, P.**, 1998. La fin de l'âge d'or des antibiotiques. *La Recherche*. **314**: 50-52.
- Alcaide, E. & Garay, E.**, 1984. R-plasmids transfer in *Salmonella* spp. isolated from wastewater and sewage-contaminated surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 435-438.
- Altherr, M. R. & Kasweck, K. L.**, 1982. In situ studies with membrane diffusion chambers of antibiotic resistance transfer in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 838-843.
- APHA, AWWA & WEF**, 1992. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18th Ed American Public Health Association, Washington D. C.
- Arakawa, Y., Ohta, M., Kido, N., Mori, M., Ito H., Komatsu, T., Fuji, Y. & Kato, N.**, 1989. Chromosomal β -lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 63-70.
- Arlet, G., Bami, G., Décrè, D., Flippo, A., Gaillot, O. & Lagrange, P. H.**, 1995. Molecular characterisation by PCR- restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiology Letters*. **134**: 203-208.
- Arlet, G., Goussard, S., Courvalin, P. & Philippon, A.**, 1999. Sequences of the fgenes for the TEM-20, TEM-21, TEM-22, and TEM-29 extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 969-971.
- Arlet, G. & Philippon, A.**, 1991. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic Dna probes for three main types of transferable β -lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol. Lett.* **82**: 19-26.
- Arlet, G., Rouveau, M., Fournier, G., Lagrange, P. H. & Philippon, A.**, 1993. Novel, plasmid-encoded, TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* conferring resistance to aztreonam than to extended-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 2020-2023.
- Arlet, G., Rouveau, M. & Philippon, A.**, 1997. Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum β -lactamase. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**: 163-167.
- Armstrong, J. L., Calomiris, J. J. & Seidler, R. J.**, 1982. Selection of antibiotic-resistant standard plate count during water treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 308-316.

- Armstrong, J. L., Shigeno, D. S., Calomiris, J. J. & Seidler R. J.**, 1981. Antibiotic resistance in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 277-283.
- Babini, G. S. & Livermore, D. M.**, 2000. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiela* spp. Collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J. Antimicro. Chemother.* **45**: 183-189.
- 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**: 3673-3678.
- Barnaud, G., Arlet, G., Veerdet, C., Gaillot, O., Lagrange, P. H. & Philoppon, A.**, 1998. *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible beta-lactamase (DHA-1) with an ampR gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 2352-2358.
- Bauernfeind, A., Chong, Y. & Schweighart, S.**, 1989. Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infecton.* **17**: 316-321.
- Bauernfeind, A. & Hörl, G.**, 1987. Novel R-factor borne β -lactamase of *Escherichia coli* conferring resistance to cephalosporins. *Infection.* **15**: 257-259.
- Bauernfeind, A., Schneider, I., Jungwirth, R., Sahly, H. & Ullmann, U.**, 1999. A novel type of AmpC β -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumoniae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1924-1931.
- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R. & Giamarellon, II.**, 1996a. Characterization of the plasmidic β -lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 221-224.
- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Wilhelm, R. & Chong, Y.**, 1996b. Comparative characterization of the cephamycinase *bla*_{CMY-1} gene and its relationships with other β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 1926-1930.
- Bauernfeind, A., Wagner, S., Jungwirth, R., Schneider, I. & Meyer, D.**, 1997. A novel class C β -lactamase (FOX-2) in *E. coli* conferring resistance to cephamycins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2041-2046.
- 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**: 1285-1292.
- Bell, J. B., Elliot, G. E. & Smith, D. W.**, 1983. Influence of sewage treatments and urbanization on selection of multiple resistance in fecal coliform populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 227-232.
- Bell, R. B.**, 1978. Antibiotic resistance patterns of fecal coliforms isolated from domestic sewage before and after treatment in an aerobic lagoon. *Can. J. Microbiol.* **24**: 886-888.
- Belliveau, B. H., Starodub, M. E. & Trevors, J. T.**, 1991. Occurrence of antibiotic and metal resistance and plasmids in *Bacillus* strains isolated from marine sediments. *Can. J. Microbiol.* **37(7)**: 513-520.

- Ben, S. R., Fournier, G., Mabilat, C., Hassen, A. B. & Philippon, A.**, 1990. Two novel transferable extended-spectrum β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. *FEMS Microbiol Lett.* **67**: 33-38.
- Bennett, P. M.**, 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**: 1-4.
- Bergmans, H. E. N., Die, I. M. & Hoekstra, W. P. M.**, 1981. Transformation in *Escherichia coli*: stage in the process. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 564-570.
- Billot-Klein, D., Gutmann, L. & Collatz, E.**, 1990. Nucleotide sequence of the SHV-5 β -lactamase gene of a *Klebsiella pneumoniae* plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 2439-2441.
- Bogosian, G., Sammons, L. E., Morris, P. J. L., O'Neil, J. P., Heitkamp, M. A. & Weber, D. B.**, 1996. Death of the *Escherichia coli* K-12 strain W3110 in sl and water. *App. Environ. Microbiol.* **62**: 4114-4120.
- Bogosian, G., Morris, P. J. L. & O'Neil, J. P.**, 1998. a mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state.. *App. Environ. Microbiol.* **62**: 4114-4120.
- Boira, R. M. A.**, 1996. Hydrophila group Aeromonads in environmental waters. *Culture.* **17(2)**: 2-4.
- Bonnet, R., DeChamps, C., Sirto, D., Chanal, C., Labia, R. & Sirto, J.**, 1999. Diversity of TEM mutants in *proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2671-2677.
- Boon, P. I. & Cattanach, M.**, 1999. Antibiotic resistance of native and fecal bacteria isolated from rivers, reservoirs and sewage treatment facilities in Victoria, south-eastern Australia. *Letters Appl. Microbiol.* **28**: 164-168.
- Bou, G., Oliver, A., Ojeda, M., Monzón, C. & Martínez-Beltrán,** 2000. Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-type plasmid-mediated β -lactamases from an *Escherichia coli* isolated in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2549-2553.
- Bradford, P. A., Jacobus, N. V., Bhachech, N. & Bush, K.**, 1996. TEM-28 from an *Escherichia coli* clinical isolate is a member of the His-164 family of TEM-1 extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 260-262.
- Bradford, P. A., Urban, C., Jaiswal, A., Mariano, N., Projan, S. J., Rahal, J. J. & Bush, K.**, 1995. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolysing β -lactamase, identified in *Escherichia coli* isolated from hospitalised nursing home patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 899-905
- Bradford, P. A., Urban, C., Mariano, N., Prijan, S. J., Rahal, J. J. & bush, K.**, 1997. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 563-569.
- Bret, L., Chanal, C. C., Sirot, D., Chaibi, E. B., Labia, R. & Sirot, J.**, 1998. Chromosomally encoded ampC-type beta-lactamase in a clinical isolate of *Protesu mirabilis*.

- Budnick, G. E., Howard, R. T. & Mayo, D. R.**, 1996. Evaluation of Enterolert for numeration of Enterococci in recreational waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3881-3884. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 563-569.
- Burton, N. F., Day, M. J., & Bull, A. T.**, 1982. Distribution of bacterial plasmids in clean and polluted sites in a south Wales river. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: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**: 1211-1233.
- Bush, K. & Jacoby, G.**, 1997. Nomenclature of TEM β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**: 1-3.
- Bush, K. & Miller, G. H.**, 1998. Bacterial enzymatic resistance: β -lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. *Current Opinion Microbiol.* **1**: 509-515.
- 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**: 1238-1242.
- Canica, M., Ferreira, M., Vaz-Pato, V., Ferreira, E. & GEMVSA**, 2000. Mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos em estirpes de *Escherichia coli* de origem clínica. *Arq. Med.* **14(Supl. 3)**: P163.
- Capone, D. G. & Bauer, J. E.**, 1992. Microbial processes in coastal pollution. In *Environmental Microbiology*, pp 191-237, Wiley-Liss, Inc.
- Carneiro, G., Sousa, J. C., Queirós, M. I., Guimarães, C., Peixe, L. M., Ferreira, H. M. N.**, 1993. Comportamento, *in vitro*, de estirpes patogênicas de *Enterobacter cloacae* face aos antibióticos β -lactâmicos. *Rev. Port. Doenças Infecç.* **16(2)**: 119-123.
- Carrilo, M. E., Estrada, E. & Hazen, T. C.**, 1985: Survival and enumeration of fecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a tropical rain in a tropical rains forest watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 468-476.
- CE report**, 1998. Water quality in the European Union. <http://www.europa.eu.int/water/water-bathing/microbio.html> (4/08/1999).
- Chanal, C. M., Poupart, M-C., Sirot, D., Labia, R., Sirot, J. & Cluzel, R.**, 1992. Nucleotide sequence of CAZ-2, CAZ-6 and CAZ-7 β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 1817-1820.
- Chanal, C. M., Sirot, D., Bret, L., Chatron, P., Labia, R. & Sirot, J.**, 1997. Novel extended-spectrum TEM-type β -lactamase from an *Escherichia coli* isolate resistant to ceftazidime and susceptible to cephalotin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 715-716.
- Chanal, C. M., Sirot, D., Malaure, H., Poupart, M.-C. & Sirot, J.**, 1994. Sequences of CAZ-3 and CTX-2 extended-spectrum β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 2452-2453.

- Chanal, C. M., Sirot, D. L., Petit, A., Labia, R., Morand, A., Sirot, J. L. & Cluzel, R. A., 1989.** Multiplicity of TEM-derived β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the same hospital and relationships between the responsible plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 1915-1920.
- Chanawong, A., M'Zali, F. H., Heritage, J., Lulitanond, A. & Hawkey, P. M., 2000.** Characterisation of extended β -lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and restriction fragments. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**: 85-9.
- Cohen, M. L., 1994.** Antimicrobial resistance: prognosis for public health. *Trends in Microbiology.* **24**: 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.
- Cormican, M. G., Marshall, S. A. & Jones, R. N., 1996.** Detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBL)-producing strain by the Etest ESBL screen. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1880-1884.
- Cormican, M., Morris, D., Corbett-Feeney, G. & Flynn, J., 1998.** Extended spectrum beta-lactamase production and flourquinolone resistance in pathogens associated with community acquired urinary tract infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **32**: 317-319.
- Cornaglia, G., Russel, K., Satta, G. & Fontana, R., 1995.** Relative importance of outer membrane permeability and group 1 β -lactamase as determinants of meropenem and imipenem activities against *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 350-355.
- Corkill, J. E., Cuevas, L. E., Gurgel, R. Q., Greensill, J., Hart, C. A., 2001.** SHV-27, a novel cefotaxime-hydrolysing β -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**: 463-465.
- Coudron, P. E., Moland, E. S. & Sanders, C. C., 1997.** Occurrence and detection of extended-spectrum β -lactamases in members of family *Enterobacteriaceae* at a veterans medical center: seek and you may find. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2593-2597.
- Coudron, P. E., Moland, E. & Thomson, K. S., 2000.** Occurrence and detection of AmpC beta-lactamase among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1791-1796.
- Courvalin, P., 1996.** Evasion of antibiotic action by bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**: 855-869.
- Cravedi, J-P., Choubert, G. & Delous, G., 1987.** Digestibility of chloranfenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. *Aquaculture.* **60**: 133-141.
- Dahlberg, C., Bergström, M. & Hermansson, M., 1998.** In situ detection of high levels of horizontal plasmid transfer in marine bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2670-2675.
- Dahlberg, C., Linberg, C., Torsvik, V. L., & Hermansson, M., 1997.** Conjugative plasmids isolated from bacteria in marine environment show various degrees of homology to each other

and are not closely related to well-characterized plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4692-4697.

Davies, C. M., Long, J. A., Donald, M. & Ashbolt, N. J., 1995. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1888-1896.

Davies-Colley, R. J., Bell, R. G. & Donnison, A. M., 1994. Sunlight inactivation of enterococci and fecal coliforms within sewage effluent diluted in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2049-2058.

Davies, J. E., 1993. Grandeur et décadence des antibiotiques. *La Recherche.* **24**: 1354-1361.

Decreto Lei n.º 236/98. Diário da República 178/1998 I série.

De Bruijn, F. J., 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**: 2180-2187.

De Bruijn, F. J., Rademaker, J., & Schneider, M., 1996. Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analyses. In *Biology of Plant-Microbe Interaction; Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions* (Eds Stacey, G., Mullin, B. & Gresshoff, P.), pp 497-502, APS Press.

DeFlaun, M. F., Paul, J. H. & Davis, D., 1986. Simplified method for dissolved DNA determination in aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 654-659.

De la Puente-Redondo, V. A., Del Blanco, G., Gutiérrez-Martín, C. B., García-Pena, F. J. & Ferri, E. F. R., 2000. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1016-1022.

Dever, L. A. & Dermody, T. S., 1991. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch. Intern. Med.* **151**: 886-895.

De Vicente, A., Avilés, M., Codina, J. C., Borrego, J. J. & Romero, P., 1990. Resistance to antibiotics and heavy metals of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from natural waters. *J. Appl. Bacteriol.* **68**: 625-632.

Dombek, P. E., Johnson, L. K., Zimmerley, S. T., Sadowsky, M. J., 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2572-2577.

Doménech-Sánchez, A., Hernández-Allés, S., Martínez- Martínez, L., Benedí, V. J. & Albertí, S., 1999. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: Its role in β -lactam antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **181**: 2726-2732.

Du Bois, S. K., Marriott, M. S., Amyes, S. G. B., 1995. TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**: 7-22.

Dudley, M., 1995. Bacterial resistance mechanisms to β -lactam antibiotics: assessment of management strategies. *Pharmacotherapy.* **15**: 9-14.

- Essack, S. Y., Hall, L. M. C., Livermore, D. M. & Pillay, D. G.,** 1998. TEM-62 and TEM-63, novel β -lactamases isolated in South African, nosocomial *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Program Abst. 38th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.* abstr.C-9.
- Essack, S. Y., Hall, C. M. C., Pillary, D. G., McFadyen, M. L. & Livermore, D. M.,** 2001. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamase isolated in 1994-1996 at a teaching hospital in Durhan, South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45:** 88-95.
- Fernandez-Astorga, A., Muela, A., Cisterna, R., Iriberry, J. & Barcina, I.,** 1992. Biotic and abiotic factors affecting plasmids transfer in *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **58:** 392-398.
- Ferreira, H. M. N.,** 1997. β -lactamases de espectro alargado e enzimas inativadoras dos aminoglicosídeos em estirpes hospitalares portuguesas de *Klebsiella pneumoniae*. Tese de Doutoramento. Universidade do Porto.
- Ferreira, H. M. N., Sousa, J. C. & Peixe, L. M.,** 1992. Caracterização das β -lactamases responsáveis pela resistência de estirpes hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* aos antibióticos β -lactâmicos. *Rev. Port. Doenças Infec.* **15:** 207-209.
- Fiett, J., Palucha, A., Miaczynka, B., Stankiewicz, M., Przondo-Mordarska, H., Hryniewicz, W. & Gniadkowski, M.,** 2000. A novel complex mutant β -lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing Klebsiellae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44:** 1499-1505.
- Fish, J. T. & Pettibone, G. W.,** 1995. Influence of freshwater sediment on the survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. As measured by three methods of enumeration. *Letters Appl. Microbiol.* **20:** 277-281.
- Fortineau, N., Poirel, L. & Nordmann, P.,** 2001. Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 form *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemotherapy.* **47:** 207-210.
- Franceschini, N., Perilli, M., Segatore, B., Setacci, D., Amicosante, G., Mazzariol, A. & Cornaglia, G.,** 1998. Ceftazidime and aztreonam resistance in *Providencia stuartii*: characterization of a natural TEM-derived extended spectrum β -lactamase, TEM-60. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42:** 1459-1462.
- 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. *Epidem. Infec.* **98:** 258-299.
- French, G. L., Shannon, K. P., & Simmons, N.,** 1996. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 β -lactamase. *J. Clin. Microbiol.* **34:** 358-363
- Fuentes, F. A., Biamon, E. J. & Hazen, T. C.,** 1983. Bacterial chemotaxis to effluent from a rum distillery in a tropical near shore coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **46:** 1438-1441.
- Fujioka, R. S.,** 1997. Indicators of marine recreational water quality. In *Manual of Environmental Microbiology*. (Eds. Hurst, C.J., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., Stetzenbach, L. D. & Walter, M. V.), pp.176-183. ASM, Washington, D.C.

- Fujioka, R. S., Hashimoto, H. h., Siwak, E. B. & Young, R. H. F.,** 1981. Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *App. Environ. Microbiol.* **41**: 690-696.
- Gaillot, O., Clement, C., Simonet, M. & Philippon, A.,** 1997. Novel transferable beta-lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**: 85-87.
- Gaillot, O., Marújouls, C., Abachin, É., Lecuru, F., Arlet, G., Simonet, M. & Berche, P.,** 1998. Nosocomial outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1357-1360.
- Gauthier, M. J. & Breitmayer, A. B.,** 1990. Gene transfer in marine environments. In *Bacterial Genetics in Natural Environments*. 1st Ed, pp 10-110.
- Gazouli, M., Tzouvelekis, L. S., Prinarakis, E., Miriagou, V. & Tzelepi, E.,** 1996. Transferable cefoxitin resistance in enterobacteria from Greek hospital and characterization of a plasmid-mediated group 1 β -lactamase (LAT-2). *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 1736-1740.
- Gazouli, M., Tzouvelekis, L. S., Vatopoulos, A. C. & Tzelepi, E.,** 1998. Transferable class C β -lactamase in *Escherichia coli* strains isolated in Greek hospitals and characterization of two enzyme variants (LAT-3 and LAT-4) closely related to *Citrobacter freundii* AmpC β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**: 419-425.
- Georghiou, P. R., Hamill, R. J., Wright, C. E., Versalovic, J., Koeuth, T., Watson, D. A. & Lupsky, J. R.,** 1995. Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: identification of hospital associated strains by molecular techniques. *Clin. Infect. Dis.* **20**: 84-94.
- Georgopapadakou, N. H.,** 1993. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 2045-2053.
- Gniadkowski, M., Palucha, A., Grzesiowski, P. & Hryniewicz, W.,** 1998. Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in Warsaw, Poland: Clonal spread of the TEM-47 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL-encoding genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 3079-3085.
- Gniadkowski, M., Schneider, I., Jungwirth, R., Hryniewicz, W. & Bauernfeind, A.,** 1998. Ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from three polish hospitals identification of three novel TEM- and SHV-5 type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 514-520.
- Gobernado, M. & Hontangas, J. L.,** 1997. Cefalosporinas de primera y segunda generación. *Rev. Esp. Quimioter.* **10 (Supl. 4)**: 7-15.
- Gold, H. S. & Moellering, R. C.,** 1996. Antimicrobial-drug resistance. *New England J. Med.* **335**: 1445-1453.
- Goldstein, F. W.,** 2000. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary infections in France. Multicentre Study Group. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* **19**: 112-117.

- Goldstein, F. W., Péan, Y., Gretnre, J. & The Vigil'Roc Study Group**, 1995. Resistance to ceftraixone and other β -lactams in bacteria isolated in the community. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 2516-2519.
- Gomez-de-Leon., P., Santos, J. I., Caballero, J., Gomez, D., Espinosa, L. E., Moreno, I., Piñero, D. & Cravioto, A.**, 2000. Genomic variability of *Haemophilus influenzae* isolated from Mexican children determined by using enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and PCR. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2504-2511.
- Goñi-Urriza, M., Capdepuy, M., Arpin. C., Raymond, N.,Caumette, P. & Quentin, C.**, 2000. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 125-132.
- Goodman, A. E., Hild, E., Marshall, K. C. & Hermansson, M.**, 1993. Conjugative plasmid transfer between bacteria under simulated marine oligotrophic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1035-1040.
- Goussard, S. & Courvalin, P.**, 1999. Updated sequence information for TEM β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 367-370.
- Gouveia, M. L.**, 1996. Zonas balneares: elementos e critérios determinantes para a sua avaliação. *Rev. Port. Saúde Públ.* **14(2)**: 23 –35.
- Goyal, S. M. & Adams, W. N.**, 1984. Drug-resistant bacteria in continental shelf sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 861-862.
- Goyal, S. M., Gerba, C. P. & Melnick, J. L.**, 1977. Occurrence and distribution of bacterial indicators and pathogens in canal communities along the Texas Coast. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 139-149.
- Grave, K., Engelstad, M., Søli, N. E. & Håstein, T.**, 1990. Utilization of antibacterial drugs in Salmonid farming in Norway during 1980-1988. *Aquaculture.* **86**: 861-862.
- Gutmann, L., Kitzis, M. D., Billot-Klein, D., Goldstein, F., Tran Van Nhieu, G., Lu, T., Carlet, J., Collatz, E. & Williamson, R.**, 1988. Plasmid-mediated β -lactamase (TEM-7) involved in resistance to ceftazidime and aztreonamo. *Rev. Infect. Dis.* **10**: 860-866.
- Hada, H. S. & Sizemore, R. K.**, 1981. Incidence of plasmids in marine *Vibrio* spp. Isolated from an oil field in the north-western Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 199-202.
- Hall, R. M.**, 1997. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Found. Symp.* **207**: 192-202.
- Hayes, J. D. & Wolf R. C.**, 1990. Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem J.* **272**: 281-295.
- Helmer, R., Hespanhol, I. & Saliba L. J.**, 1991. Public health criteria for the aquatic environment: recent WHO guidelines and their application. *Water Science Technol.* **24(2)**: 35-42.
- Hermasson, M., Jones, G. W. & Kjelleberg, S.**, 1987. Frequency of antibiotic and heavy metal resistance, pigmentation and plasmids in bacteria of the marine air-water interface. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2338-2342.

- Herwing, R. P., Gray, J. P. & Weston, D. P.**, 1997. Antibacterial resistant bacteria in superficial sediments near salmon net cage farms in Puget Sound, Washington. *Aquaculture*. **149**:163-183.
- Horii, T., Arakawa, Y., Ohta, M., Ichiyama, S., Wacharotayankun, R. & Kato, N.**, 1993. Plasmid-mediated AmpC-type β -lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum β -lactams, including moxalactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 984-990.
- Hughes, D. & Andersson, D. I.**, 1997. Carbon starvation of *Salmonella typhimurium* does not cause a general increase of mutation rates. *J. Bacteriol.* **179**: 6688-6691.
- Ichige, A., Matsutani, S., Oishi, K. & Mizushima, S.**, 1989. Establishment of gene transfer systems and construction of the genetic map of marine *Vibrio* strains. *J. Bacteriol.* **171**: 1825-1834.
- INAG**, 2001. Zonas Balneares. http://www.inag.pt/snirh/dados_sintese/zbalnear/praias2000_h.html (28-02-2001)
- Jacobsen, P. & Berglind, L.**, 1988. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture*. **70**: 365-370.
- Jacoby, G.**, 1994. Genetics of extended-spectrum β -lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**(supl. 1): 2-11.
- Jacoby, G. & Archer, G.**, 1991. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *New England J. Med.* **324**: 601-612.
- Jacoby, G. & Bush, K.**, 2001. Amino acid sequences for Tem, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant β -lactamases. <http://www.lahey.org/studies/webt.htm> (27/04/2001).
- Jacoby, G. A. & Han, P.**, 1996. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 908-911.
- Jacoby, G. A. & Medeiros, A. A.**, 1991. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1697-1704.
- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G. & Philippon, A.**, 1988. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* **10**: 867-878.
- Jiang, S. C. & Paul, J. H.**, 1998. Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2780-2787.
- Jonhson, J. R. & O'Brian, T. T.**, 2000. Improved repetitive-element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli*. *Clin. Diagnostic Lab. Immunolog.* **7**: 265-273.
- 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.

- Katsanis, G. P., Spargo, J., Ferraro, M. J., Sutton, L. & Jacoby, G. A.**, 1994. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 691-696.
- Katzung, B. G.**, 1998. Beta-lactam antibiotics & other inhibitors of cell wall synthesis. In *Pharmacology* (Ed. Katzung, B. G.) 7th Ed. pp 724-742.
- Kelly, M. T., Brenner, D. J. & Farmer III, J. J.**, 1985. *Enterobacteriaceae*. In *Manual of Clinical Microbiology*. 4th Ed. (Eds Lennette, E. H., Balows, A., Hausler Jr., W. J. & Shadomy, H. J.), pp 263-277, ASM, D.C.
- Kim, J. & Lee, H.-J.**, 2000. Rapid discriminatory detection of genes coding for SHV β -lactamases by ligase chain reaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1860-1864.
- Kliebe, C., Nies, B. A., Meyer, J. F., Tolxdorff-Neutzling, R. M., & Wiedemann, B.**, 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 2096-2100.
- Kohler, T., Michea-Hamzepour, M., Plesiat, P., Kahr, A. L. & Pechere, J. C.**, 1997. Differential selection of multidrug efflux systems by quinolonas in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2540-2543.
- Krumperman, P. H.**, 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 165-170.
- Kruse, H. & Sørum, H.**, 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmid between bacteria of diverse origins in nature microenvironments. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4015-4021.
- Kurokawa, H., Yagi, T., Shibata, N., Shibayama, K., Kamachi, K. & Arakawa, Y.**, 2000. A new SHV-derived extended-spectrum β -lactamases (SHV-24) that hydrolyzed ceftazidime through a single- amino- acid substitution (D179G) in the omega-loop. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1725-1727.
- Labia, R., Morand, A., Chaibi, E. B., Peduzzi, J., Barthelemy, M., Cavallo, X., Grobost, F. & Sirot, D.**, 1997. A clavulanate-susceptible TEM-derived β -lactamase of isoelectric point 5,2 with altered kinetic constants. *Program Abstr. 37th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.* Abstr. C-189.
- Leiza, M. G., Perez-Diaz, J. C., Ayala, J., Casselas, J. M., Martínez-Beltran, J., Bush, K. & Baquero, F.**, 1994. Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase with two molecular variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 2150-2157.
- Levésque, C., Piché, L., Larose, C. & Roy, P. H.**, 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combination of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 185-191.
- Levy, S. B.**, 1997. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. In *Antibiotics resistance: origins, evolution, selection and spread*. (Ciba Found. Symp. 207) (Eds. Chadwick, D & Goode, J.) pp.1-14, Wiley Chichester, England
- Li, X-Z., Zhang, L., Srikumar, R., Poole, K.**, 1998. β -lactamases inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 399-403.

- Lima, N.**, 1998. Biotecnologia Microbiana. In *Microbiologia* (Eds. Ferreira, W.F.C. & Sousa, J.C.), vol. I, pp 311-334, Lidel., Lisboa
- Livermore, D.**, 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 557-584.
- Livermore, D.**, 1999. ESBL epidemiology and their relationship to other β -lactamases. Highlights of an Official symposium at the 21st International congress of Chemotherapy, Birmingham. UK.
- Livermore, D. & Dudley, M. N.**, 2000. Antimicrobials: better use, better drugs, or both? *Current Opinion Microbiol.* **3**: 487-488.
- Livermore, D. M. & Yuan, M.**, 1996. antibiotic resistance and production of extended-spectrum β -lactamases amongst *Klebsiella* spp. From intensive care units in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**: 409-424.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Ziporsky, S. L., Matsudaire, P. & Darnell, J.**, 1996. In *Molecular Cell Biology*. 3rd Ed. Scientific American Books.
- Lorenz, M. G. & Wackernagel, W.**, 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Reviews.* **58**: 563-602.
- Loubinoux, J., Lozniewski, A., Lon, C., Garin, D., Weber, M. & Le Faou, A. E.**, 1999. Value of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR for study of *Pasteurella multocida* strains isolated from mouths of dogs. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2488-2492.
- Lövgren, T., Hurkainen, P. & Dahlén, P.**, 1992. Detection of lanthanide chelates by time-resolved fluorescence. In *Nonisotopic DNA Probe Techniques*. (Ed. Krica, L. J.), pp 228-260, Academic Press, Inc.
- Lupski, J. R. & Weinstock, G. M.**, 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* **174**: 4525-4529.
- Mach, P. A. & Grimes, D. J.**, 1982. R-plasmid transfer in wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1395-1403.
- Mabilat, C. & Courvalin, P.**, 1990. Development of "Oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 2210-2216.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J.**, 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Marchese, A., Arlet, G., Schito, G.C., Lagrange, P. H. & Philippon, A.**, 1998. Characterization of FOX-3, an AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase from an Italian isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 464-467.
- Martinez, J. L. & Baquero, F.**, 2000. Mutations frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1771-1777.
- Martínez- Martínez, L., Hernández-Allés, S., Albertí, S., Tomás, J. M., Benedí, V. J. & Jacoby, G. A.**, 1996. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 342-348.

- Martínez- Martínez, L., Pascual, A., Hernández-Allés, S., Alvarez-Díaz, D., Suárez, A. I., Tran, J., Benedí, V. J. & Jacoby, G. A.**, 1999. Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1669-1673.
- Masuda, N., Gotoh, N., Ishii, C., Sakagawa, E., Ohya, S. & Nishino, T.**, 1999. Interplay between chromosomal β -lactamases and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 400-402.
- Mastrantonio, P., Cardines, R. & Spigaglia, P.**, 1996. Oligonucleotides probes for detection of cephalosporinases among *Bacteroides* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 1014-1016.
- Matsumoto, Y. & Inoue, M.**, 1999. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible Class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 307-313.
- Mazzariol, A., Cornaglia, G. & Nikaido, H.**, 2000. Contributions of the AmpC β -lactamase and the AcrAB multidrug efflux in intrinsic resistance of *Escherichia coli* K-12 to β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1387-1390.
- McArthur, J. V. & Tuckfield, R. C.**, 2000. Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: effects of industrial pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3772-3726.
- Medeiros, A. A.**, 1984. β -lactamases. *Brush Medical Bulletin.* **40**: 18-27.
- Medeiros, A. A.**, 1997. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generation of β -lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* **24 (suppl.)**: S19-S45.
- Mendes, B.**, 1998. Microbiologia da água. In *Microbiologia* (Eds. Ferreira, W.F.C. & Sousa, J.C.), vol. I, pp 285-296, Lidel, Lisboa.
- Miller, R. V.**, 1998. Bacterial gene swapping in nature. *Scientific American.* **278 (1)**: 47-51.
- Mira-Gutiérrez, J. & García-Martos, P.**, 1997. Vibrios de origen marino en patología humana. *Enfer. Infecc. Microbiol. Clin.* **15**: 383-388
- Moe, C. L.**, 1997. Waterborne transmission of infectious agents. In *Manual of environmental Microbiology*. In *Manual of Environmental Microbiology*. (Eds. Hurst, C.J., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., Stetzenbach, L. D. & Walter, M. V.), pp.136-152. ASM, Washington, D.C.
- Moland, E. S., Sanders, C. C. & Thomson, K. S.**, 1998. Can results obtained with commercially available microscan microdilution among *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with hidden resistance to expanded-spectrum cephalosporins and aztreonam? *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2575-2579.
- Moreno, R. C.**, 1997. Los principios generales de la terapéutica antiinfecciosa. In *Microbiología sanitaria y clínica* (Ed. Anglada, R. R.), pp 256-281, Editorial Síntesis.
- Morosini, M. I., Canton, R., Martínez-Beltrán, J., Negri, J. C., Pérez-Díaz, J. C., Baquero, F. & Blázquez, J.**, 1995. New extended-spectrum TEM-type β -lactamase from *Salmonella enterica subsp. enterica* isolated in a nosocomial outbreak. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 458-461.

- Munro, P. M., Flautau, G. N., Clément, R. L. & Gauthier, M. J.**, 1995. Influence of the RpoS (KatF) Sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in seawater. *App. Environ. Microbiol.* **61**: 1853-1858.
- 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**: 73-77.
- M`Zali, F. H., Chanawong, A., Kerr, K. G., Birkenhead, D. & Hawkey, P. M.**, 2000. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**: 881-885.
- M`Zali, F. H., Gascoye-Binzi, D. M., Heritage, J. & Hawkey, P. M.**, 1996. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV β -lactamases using polymerase chain treaction single strand conformationak polymorphism (PCR-SSCP). *J. Antimicrob. Chemother.* **37**: 797-802.
- Nadjar, D., Rouveau, M., Verdet, C., Donayb, L., Herrmann, J., Lagrange, P. H., Philippon, A. & Arleta, G.**, 2000. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing transferable ampC-type beta-lactamase (ACC-1) originating from *Hafnia alvei*. *FEMS Microbiol Lett.* **187**: 35-40.
- Nakae, T., Nakajima, A., Ono, T., Saito, K. & Yoneyama, H.**, 1999. Resistance to β -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the Mex AB-OprM efflux pump and β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1301-1303.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards**, 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth Informational Supplement.
- Naumovski, L., Quinn, J. P., Miyashiro, D., Patel, M., Bush, K., Singer, S. B., Graves, D., Palzkill, T. & Arvin, A. M.**, 1992. Outbreak of ceftazidime ressitance due to a novel extended-spectrum β -lactamase in isolates from a cancer patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 1991-1996.
- 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. Doenças Infecç.* **15(2)**: 121-124.
- Neuwirth, C., Labia, R., Siebor, E., Pechinot, A., Madec, S., Chaibi, E. B. & Kazmierczak.,** 2000. Characterization of TEM-56, a novel β -lactamase produced by a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 453-455.
- Nicolas, M.-H., Jarlier, N. H., Philippon, A. & Cole, S. T.**, 1989. Molecular characterization of the gene encoding SHV-3 β -lactamase responsible for transferable cefotaxime resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 2096-2100.
- Niemi, J. S., Niemi, R. M., Malin, V. & Poikolainen, M. L.**, 1997. Bacteriological quality of finnish rivers and lakes. *Environ. Toxicol. Water Quality.* **12**:15-21.
- Niemi, M., Sibakov, M. & Niemela, S.**, 1983. Antibiotic resistance among different species of fecal coliforms isolated from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 79-83.
- Nikaido, H.**, 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**: 5853-5859.

- Nikaido, H.**, 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion Microbiol.* **1**: 516-523.
- Nordmann, P. & Guibert, M.**, 1998. Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**: 128-131
- Nuesch-Inderbinen, M. T., Kayser, F.H. & Hachler, H.**, 1997. Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 943-949.
- Olsen, J. E.**, 1999. Antibiotic resistance: genetic mechanisms and mobility. *Acta Vet. Scand. Suppl.* **92**: 15-22.
- Paul, G. C., Gerbaud, G., Bure, A., Philippon, A. M., Pangon, B., Courvalin, P.**, 1989. TEM-4, a new plasmid-mediated β -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 1958-1963.
- Pai, H., Lyu, S., Lee, J. H., Kim, J., Kwon, Y., Kim, J. W. & Choe, K. W.**, 1999. Survey of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1758-1763.
- Papanicolau, G. A., Medeiros, A. A. & Jacoby, G. A.**, 1990. Novel plasmid-mediated β -lactamases (MIR-1) conferring resistance to oxymino- and α -methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 2200-2209.
- Parente, A. M. & Sousa, J. C. F.**, 1998. Características morfológicas e ultraestruturais dos microrganismos procariotas. In *Microbiologia* (Eds. Ferreira, W. F. C. & Sousa, J. C.), vol. I, pp 19-51, Lidel, Lisboa.
- 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.
- Paul, G. C., Gerbaud, G., Bure, A., Philippon, A. M., Pangon, B., Courvalin, P.**, 1989. TEM-4, a new plasmid-mediated β -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 1958-1963.
- Payne, D. J. & Farmer, T. H.**, 1998. Biochemical and enzyme kinetic applications for the characterization of β -lactamases. In *Methods in Molecular Medicine*. (Eds N. Woodford, N. & Johnson, A. P.). Vol 15, pp 513-535. Humana Press Inc. Totowa, N.J.
- Payne, D. J. & Thomson, C. J.**, 1998. Molecular approaches for detection and identification of β -lactamases. In *Methods in Molecular Medicine*. (Eds N. Woodford, N. & Johnson, A. P.). Vol 15, pp 495-512. Humana Press Inc. Totowa, N.J.
- Payne, D. J., Woodford, N. & Amyes, S. G. B.**, 1992. Characterization of the plasmid-mediated β -lactamase BIL-1. *J. Antimicrob. Chemother.* **30**: 119-127.
- Peduzzi, J., Barthelemy, M., Tiwari, K., Mattioni, D. & Labia, R.**, 1989. Structural features related to hydrolytic activity against ceftazidime of plasmid-mediated SHV-type CAZ-5- β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 2160-2163.

- Peixe, L. M. V.**, 1996. Caracterização de β -lactamases plasmídicas de espectro ampliado em *E. coli*. Tese de Doutoramento. Universidade do Porto.
- Pelczar, M. J., Chan, E. C. S. & Krieg, N. R.**, 1993. *Microbiology. Concepts and Applications*. McGraw-Hill, Inc.
- Pelczar, M. J., Krieg, N. R. & Chan, E. C. S.**, 1981. *Microbiologia II*. MacGraw-Hill, Brasil. 5ª Ed.
- Peña, C., Pujol, M., Ardanuy, C., Ricart, A., Pallares, R., Liñares, J., Ariza, J. & Gudiol, F.**, 1998. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 53-58.
- Perea, E. J. & Martínez-Martínez, L.**, 1997. Actividad de cefepima frente a enterobacterias productoras de betalactamasas. *Rev. Esp. Quimioter.* **10 (Supl. 4)**: 19-24.
- Pereira, J. M.**, 1998. Genética Microbiana. In *Microbiologia* (Eds. Ferreira, W. F. C. & Sousa, J. C.), vol. I, pp 125-140, Lisboa. Lidel.
- Perilli, M., Segotore, B., de Massis M. R., Riccio, M. L., Bioneli, C., Zollo, A., Rossolini, G. M. & Zollo, A.**, 2000. Tem-27, a new extended-spectrum β lactamase detected in *Proteus mirabilis* e *Morganella morganii* in Italy. *J. antimicrob. Chemother.* **44**: 2537-2539.
- Petit, A., Sirot, D. L., Chanal, C. M., Sirot, J. L., Labia, R., Gerbaud, G. & Cluzel, R. A.**, 1988. Novel plasmid-mediated β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than other broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 626-630.
- Pettibone, G. W., Sullivan, S. A. & Shiaris, M. P.**, 1987. Comparative survival of antibiotic-resistant and sensitive fecal indicator bacteria in estuarine water. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1241-1245.
- Philippon, A., Paul, G. & Nevot, P.**, 1986. Mécanisme de résistance enzymatique aux bêta-lactamines. *La Presse Médicale.* **15 (46)**: 2290-2296.
- Pitout, J. D. D., Sanders, C. C. & Sanders, E.**, 1997. Antimicrobial resistance with focus on β -lactam resistance in Gram negative bacilli. *American J. Medic.* **103**: 51-59.
- Pitout, J. D. D., Thomson, K. S., Hanson, N. D., Ehrhardt, A. F., Moland, E. S. & Sanders, C. C.**, 1998. β -lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1350-1354.
- Podschun, R. & Ullmann, U.**, 1998. *Klebsiella* spp. as a nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 589-603.
- Poirel, L., Le Thomas, I., Naas, T., Karim, A. & Nordmann, P.**, 2000. Biochemical sequence of GES-1 a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 622-632.
- Poirel, L., Naas, T., Guibert, M., Chaibi, E. B., Labia, R. & Nordmann, P.**, 1999. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel Class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 573-581.

- Poldbielski, A., Schonling, J., Melzer, B., Warnatz, K. & Leusch, H.-G.**, 1991. Molecular characterization of a new plasmid-encoded SHV-type β -lactamase (SHV-2 variant) conferring high-level cefotaxime resistance upon *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 569-578.
- Pommepeuy, M., Butin, M., Derrien, A., Gourmelon, M., Colweell, R. R. & Cormire, M.**, 1996. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *App. Environ. Microbiol.* **62**: 4621-4626.
- Poupart, M.-C., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R. & Sirot, J.**, 1991. Identification of CTX-2, a novel cefotaximase from a *Salmonella mbandaka* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1498-1500.
- Poyart, C., Mugnier, R., Quesnes, G., Berche, R. & Trieu-Cuot.**, 1998. A novel extended-spectrum TEM-type β -lactamases (TEM-52) associated with decreased susceptibility to moxalactam in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 108-113.
- Prinarakis, E. E., Miriagou, V., Tzelepi, E., Gazouli, M. & Tzouvelekis, L.S.**, 1997. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 838-840.
- Prinarakis, E. E., Tzelepi, E., Gazouli, M., Mentis, A. F. & Tzouvelekis, L.S.**, 1996. Characterization of a novel SHV β -lactamases variant that resembles the SHV-5 enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**: 229-234.
- Quinn, J. P., Miyashiro, D., Sahm, D., Flamm, R. & Bush, K.**, 1989. Novel plasmid-mediated β -lactamase (TEM-10) conferring selective to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 1451-1456.
- Quinteira, S. M. B.**, 1999. Resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *Enterobacteriaceae* isoladas de águas de consumo. Tese de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Rasheed, J. K., Anderson, G. J., Yigit, H., Quenan, A. M., Doménech-Sánchez, A., Swenson, J. M., Biddle, J. W., Ferraro, M. J., Jacoby, G. A. & Tenover, F. C.**, 2000. characterization of the extended-spectrum beta-lactamases reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC700603), which produces the novel enzyme SHV-18. *antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2382-2388.
- Rasheed, J. K., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., Steward, C., Hill, B., Medeiros, A. A. & Tenover, F. C.**, 1997. Evolution of extended-spectrum β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 647-653.
- Rasmussen, B. A. & Bush, K.**, 1997. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 223-232.
- Recchia, G. D. & Hall, R. M.**, 1995. Gene cassettes: a new class of mobile elements. *Microbiol.* **141**: 3015-3027.
- Reig, R., Roy, C., Hermida, M., Ternel, D. & Coira, A.**, 1993. A survey of beta-lactamases from 618 isolates of *Klebsiella* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**: 29-35.
- Rice, L. B., Carias, L. I., Hujer, A. A., Bonafede, M., Hutton, R., Huyen, C. & Bonomo, R. A.**, 2000. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 β -lactamase and an outer

membrane protein change confer resistance to ceftazidima and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 362-367.

Rice, L. B., Marshall, S. H., Carias, L. L., Sutton, L. & Jacoby, G. A., 1993. Sequences of MGH-1, YOU-1, YOU-2 extended spectrum β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 2760-2761.

Ripp, S. & Miller, R. V., 1995. Effects of suspended particulates on the frequency of transduction among *Pseudomonas aeruginosa* in a freshwater environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1214-1219.

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**: 1089-1093.

Rosenau, A., Cattier, B., Gousset, N., Harriau, P., Philippon, A. & Quentin, R., 2000. *Capnocytophaga ochracea*: characterization of a plasmid-encoded extended spectrum TEM-17 β -lactamase in the phylum *Flavobacter-Bacteroides*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 760-762.

Roy, P. H., 1999. Horizontal transfer of genes in bacteria. *Microbiol. Today.* **26**: 168-170.

Sanders, C. C., 1992. β -lactam of Gram negative bacteria: New challenges for new drugs. *Clin. Infect. Dis.* **14**: 1089-1099.

Sanders, C. C., Barry, A. L., Washington, J. A., Shubert, C., Moland, E. S., Traczewski, M. M., Knapp, C. & Mulder, R., 1996. Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* with the Vitek ESBL test. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2997-3001.

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.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.

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**: 987-995.

Saye, D. J., Ogunseitan, O. A., Sayler, G. S. & Miller, R. V., 1990. Transduction of linked chromosomal genes between *Pseudomonas aeruginosa* strains during incubation in-situ in a freshwater habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 140-145.

Shannon, K., Stapleton, P., Xiang, X., Johnson, A., Beattie, H., El Bakri, F., Cookson, B. & French, G., 1998. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial outbreaks of infection in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3105-3110.

Shaw, D. R. & Cabelli, V. J., 1980. R-plasmid transfer frequencies from environmental isolates of *Escherichia coli* to laboratory and fecal strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 756-764.

- Silva, M. G., Sousa, J. C., Peixe, L. V., Ferreira, H. M. N., Queirós, M. L., Guimarães, C. & Leitão, R.**, 1993. Comportamento, *in vitro*, de espécies patogénicas hospitalares de *Citrobacter freundii* face aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos. *Rev. Port. Doenças Infecç.* **16** (2): 125-128.
- Sinton, L. W., Davies-Colley, R. J. & Bell, R. G.**, 1994. Inactivation of enterococci and fecal coliforms from sewage and meatworks effluents in seawater chambers. *App. Environ. Microbiol.* **60**: 2040-2048.
- Sinton, L. W., Finlay, R. K. & Lynch, P. A.**, 1999. Sunlight inactivations of fecal bacteriophages and bacterial in sewage-polluted seawater. *App. Environ. Microbiol.* **65**: 3605-3613.
- Siroto, D.**, 1995. Extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **36** (Suppl. 4): 19-34.
- Siroto, J., Labia, R. & Thabaut, A.**, 1987. *K. pneumoniae* strains more resistant to ceftazidime than to other third-generation cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* **20**: 611-612.
- Siroto, D., Recule, D., Chaibi, E. B., Bret, L., Croize, J., Chanal, C. C., Labia, R. & Siroto, J.**, 1997. a complex mutant of TEM-1 beta-lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 1322-1325.
- Siroto, D. J., Siroto, J., Labia, R., Morand, A., Courvalin, P., Darfeuille-Michaud, A., Perroux, R. & Cluzel, R.**, 1987. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* **20**: 323-334.
- Smith, J. T. & Lewin, C. S.**, 1993. Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology. *Veterin. Microbiol.* **35**:233-242.
- Spencer, R. C., Wheat, P. F., Winstanley, T. G., Cox, D. M. & Plested, S. J.**, 1987. Novel β -lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* conferring unusual resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **20**: 919-921.
- Solo-Gabrielle, H. M., Wolfert, M. A., Desmarais, T. R. & Palmer, C. J.**, 2000. Sources of *Escherichia coli* in a subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 230-237.
- Sougakoff, W., Goussard, S. & Courvalin, P.**, 1988. The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiol Lett.* **56**: 343-348.
- Sougakoff, W., Petit, A., Goussard, S., siroto, D., Bure, A. & Courvalin, P.**, 1989. Characterization of the plasmid genes *blaT-4* and *blaT-5* wch encode the broad-spectrum β -lactamases TEM-a and TEM-5 in Enterobacteriaceae. *Gene.* **78**: 339-348.
- Sousa, J. C. F.**, 2000. *Enterobacteriaceae*. In *Microbiologia* (Eds. W.F.C. Ferreira & J.C. Sousa), vol.II, pp 99-110, Lisboa. Lidel.
- 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 *E. coli* from Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**: 437-440.
- Sousa, J. C. F., Peixe, L. V., Ferreira, H., Pinto, M. E., Nascimento, M. S. J., Sousa, M. I. & Cabral, M.**, 1998. In *Microbiologia* (Eds. W.F.C. Ferreira & J.C. Sousa), vol. I, pp 239-270, 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*, Porto. Ordem dos Farmacêuticos
- Speldooren, V., Heym, B., Labia, R. & Nicolas-Chanoine, M. H.**, 1998. Discriminatory detection of inhibitor-resistant β -lactamases in *Escherichia coli* by Single-Strand polymorphism-PCR. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **42**: 879-884.
- Spratt, B. G.**, 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science.* **264**: 388-393.
- Stapleton, P., Wu, P. J., King, A., Shannon, K., French, G. & Phillips, I.**, 1995. Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **39**: 2478-2483.
- 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**: 1818-1824.
- Sutcliffe, J. G.**, 1978. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 3737-3741
- Tenover, F. C., Mohammed, M. J., Gorton, T. S. & Dembek, Z. F.**, 1999. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum β -lactamases: survey of laboratories in Connecticut. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 4065-4070.
- Tenover, F. C. & Unger, E. R.**, 1993. Nucleic acid probes for detection and identification of infectious agents. In *Diagnostic Molecular Microbiology, principles and Applications*. Eds D.H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, T. J. White. ASM, Washigton D. C. pag. 3-26.
- Teshager, T., Domínguez, L., Moreno, M. A., Saénz, Y., Torres, C. & Cardeñosa, S.**, 2000. Isolation of an SVH-12 β -lactamases-producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **44**: 3483-3484.
- Tessier, F., Arpin, C., Allery, A. & Quentin, C.**, 1998. Molecular characterization of a TEM-21 β -lactamase in a clinical isolate of *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **42**: 2125-2127.
- Thomson, K. S. & Sanders, C. C.**, 1992. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double disk and three-dimensional test. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **36**: 1877-1882.

- Thomson, K. S., Sanders, C. C. & Moland, E. S.**, 1999. Use of microdilution panels with and without β -lactamases inhibitors as a phenotypic test for β -lactamase production among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **43**: 1393-1400.
- Trieu-Cuot, P. & Poyart, C.**, 1998. Visite guidée au cœur de l'arsenal bactérien. *La Recherche.* **314**: 62-66.
- Tzouvelekis, L. S., Tzelepi, E., Mentis, A. F. & Tsakris, A.**, 1993. Identification of a novel plasmid-mediated β -lactamase with chromosomal cephalosporinase characteristics from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**: 645-654.
- Tzouvelekis, L. S., Vatopoulos, A. C., Katsanis, G. & Tzelepi, E.**, 1999. Rare case of failure by an automated system to detect extended-spectrum β -lactamase in a cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2388.
- Valdes-Collazo, L., Schultz, A. J. & Hazen, T. C.**, 1987. Survival of *Candida albicans* in tropical marine waters and fresh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1762-1767.
- Vercauteren, E., Descheemaeker, P., Ieven, M., Sanders, C. C. & Goossens, H.**, 1997. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β -lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2191-2197.
- Verdet, C., Arlet, G., Ben Redjeb, B., Ben Hassen, A., Lagrange, P. H. & Philippon, A.**, 1998. Characterisations of CMY-4, an AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase in a Tunisian clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *FEMS Microbiol Lett* **169**: 235-240.
- Von Gravenitz, A.**, 1985. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In *Manual of Clinical Microbiology*. Fourth Ed. Eds Lennette, E. H., Balows, A., Hausler Jr., W. J., Shadomy, H. J., ASM, D.C. 278-281.
- Vuye, A., Verschraegen, G. & Claeys, G.**, 1989. Plasmid-mediated β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* resistant to ceftazidime. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **33**: 757-761.
- Webber, D. A., Sanders, C. C., Bakken, J. S. & Quinn, J. P.**, 1990. A novel chromosomal TEM derivative and alterations in outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **162**: 460-465.
- Wichels, A., Biel, S. S., Gelderblom, H. R., Brinnkhoff, Muyzer, G. & Schütt, C.**, 1998. Bacteriophage diversity in the North sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4128-4133.
- Wiggins, B. A., Andrews, R. W., Conway, R. A., Corr, C. L., Dobratz, E. J., Dougherty, D. P., Eppard, J. R., Knupp, S., Limjoco, M. C., Mettenburg, J. M., Rinehardt, J. M., Sonsino, J., Torrijos, R. L. & Zimmerman, M. E.**, 1999. Use of antibiotic resistance analysis to identify nonpoint sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3483-3486.
- Winokur, P. L., Bureggemann, A., DeSalvo, D. L., Hoffmann, L., Apley, M. D., Uhlenhopp, E. K., Pfaller, M. A. & Doern, G. V.**, 2000. Animal and human multiresistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **33**: 757-761.

- Woodford, N., Payne, D. J., Johnson, A. P., Weinbren, M. J., Perinpanayagam, R. M., George, R. C., Cookson, B. D. & Amyes, S. G. B., Amyes, 1990. Transferable cephalosporins resistance not inhibited clavulanate in *Escherichia coli*. *Lancet*. **336**: 253.
- Woods, C. R., Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. R., 1992. Analysis of relationships among isolates of *Citrobacter diversus* by using DNA fingerprintings generate by repetitive sequence-based primers in polymerase chain reaction. *J. Clin. Microb.* **30**: 2921-2929.
- Wu, S. W., Dornbush, K., Kronvall, G. & Norgren, M., 1999. Characterization and nucleotide sequence of a *Klebsiella oxytoca* cryptic plasmid encoding a CMY-type β -lactamase: confirmation that the plasmid-mediated cephamycinase originated from the *Citrobacter freundii* AmpC β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1350-1357.
- Yang, N., Bhachech, N., Braford, P. A., Jett, B. D., Sahm, D. F. & Bush, K., 1998. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates producing TEM-10 and TEM-43 β -lactamases from St. Louis, Missouri. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 715-716.
- Yuan, M., Hall, L. M. C., Hoogkamp-Korstanje, J. & Livermore, D. M., 2001. SHV-14, a novel bta-lactamase variant in *Klebsiella pneumoniae* isolates f5rom Nijmegen, The Netherlands. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 309-311.
- Yan, J. J., Wu, S. M., Tsai, S. H., Wu, J. J. & Su, I. J., 2000, Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in Southern Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **44**: 1438-1442.
- Yuan, M., Hall, L. M. C., Savelkoul, H. M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. & Livermore, M., 2000. SHV-13, a novel extended-spectrum β -lactamase, in *Klebsiella peumoniae* isolated from patients in a intensive care unit in Amsterdam. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **44**: 1081-1084.
- Young, H. K., 1993. Antimicrobial resistance spread in aquatic environments. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**:627-635.

