Lívia de Carvalho Fontes

MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBACTERIANOS EM MEMBROS DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEA RECUPERADOS DE AMBIENTES AQUÁTICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Nilton Lincopan

Versão Corrigida

A versão original encontra-se arquivada no Setor de Comunicação do ICB

São Paulo
2012

RESUMO

FONTES, L. C. **Monitoramento da Resistência aos Antibacterianos em Membros da Família Enterobacteriaceae Recuperados de Ambientes Aquáticos no estado de São Paulo, Brasil.** 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Enterobactérias são importantes agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (IrAS), podendo contaminar ambientes aquáticos poluídos por atividades antropogênicas. O uso indiscriminado de antibacterianos (ATB) na medicina humana e veterinária tem resultado no aumento do número de bactérias resistentes, sendo que ambientes aquáticos podem ser importantes locais para a sua seleção e disseminação, assim como, para a aquisição de elementos genéticos associados. O objetivo desse estudo foi monitorar a disseminação de enterobactérias, com perfil de resistência aos ATB, em ambientes aquáticos do estado de São Paulo investigando o seu contexto genético. O perfil de resistência foi caracterizado por antibiograma qualitativo (Kirby-Bauer) e quantitativo (CIM) seguindo as recomendações do CLSI. A produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) foi avaliada pela técnica da dupla-difusão em disco e/ou utilizando fitas de E-test ESBL. Genes codificando ESBLs e resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) foram investigados por PCR, e a similaridade genética foi avaliada por ERIC-PCR. De 2009-2010, 135 enterobactérias, resistentes a pelo menos um ATB, foram isoladas de rios urbanos, represas, e estações de tratamento de esgoto. O fenótipo multirresistente (MR) foi predominante em 64% dos isolados, sendo que houve uma alta prevalência de *Escherichia coli* (80%) e *Klebsiella pneumoniae* (48%). Dentre estas espécies, 8% dos isolados apresentaram fenótipo ESBL (cefotaxima, $CIM_{50} \geq 64$ μg/ml) devido à presença de genes $bla_{CTX\text{-}M}$*-like*, enquanto que a presença de genes *qnr-like* foi confirmada em 7% dos isolados resistentes à ciprofloxacina ($CIM_{50} \geq 32$μg/ml). A tipagem por ERIC-PCR, nos isolados carregando genes $bla_{CTX\text{-}M}$ e/ou genes *qnr*, revelou ausência de relação clonal entre as cepas de *K. pneumoniae* (n=10), enquanto que cepas de *E. coli* (n= 12) foram agrupadas em nove *clusters* (> 90% de similaridade). Neste trabalho, reportamos a ocorrência de genes de resistência de importância clínica em enterobactérias recuperadas de ambientes aquáticos no estado de São Paulo, Brasil.

Palavras chave: Enterobacteriaceae. Ambiente. Multirresistência. Antibacterianos. Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Fluoroquinolonas.

ABSTRACT

FONTES, L. C. **Surveillance of antibacterial resistance among Enterobacteriaceae from environmental water samples in São Paulo State, Brazil.** 2012. 79 p. Master's Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Members of the Enterobacteriaceae are important agents of healthcare-associated infections (HAI) and often inhabit aquatic environments polluted by anthropogenic activities. The widespread use of antibiotics in human medicine and veterinary has resulted in increasing number of bacterial resistance to antimicrobial agents, and aquatic environments can be favorable settings for efficient selection of these populations, as well as, for the exchange of resistance genes mediated by horizontal transfer of mobile elements. The aim of this study was to monitor the spread of Enterobacteriaceae with an antimicrobial-resistant profile in aquatic environments in Sao Paulo state, and to investigate their genetic background. The antimicrobial resistance profiles were characterized by using qualitative (Kirby-Bauer) and quantitative (MIC) susceptibility methods in accordance to CLSI guidelines. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) phenotypes were identified by double-disk diffusion, and by using ESBL E-test strips. Genes encoding ESBLs and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) were investigated by PCR and genotyping of isolates carrying these genes was performed by ERIC-PCR. From 2009 to 2010, 135 bacterial isolates of Enterobacteriaceae resistant to at least one antibiotic were isolated from various water sources such as rivers, dams and sewage treatment plants, in the state of Sao Paulo, Brazil. A total of 87/135 isolates (64%) exhibited a multidrug-resistant phenotype with a high prevalence of *E. coli* (80%) and *Klebsiella pneumoniae* (48%) strains, of which 8% showed a positive ESBL phenotype (cefotaxime, $MIC_{50} \geq 64$ µg/ml) related to $bla_{CTX\text{-}M}$-like genes. The presence of *qnr*-like genes was confirmed in 7% isolates (ciprofloxacin $MIC_{50} \geq$ 32µg/ml). ERIC-PCR genotyping among isolates carrying $bla_{CTX\text{-}M}$-*like* and/or *qnr* genes revealed absence of clonal relationship among *K. pneumoniae* strains (n=10), whereas *E. coli* strains (n=12) were grouped into the nine clusters (>90% similarity). In this study, we report the occurrence of resistance genes in clinically important Enterobacteriaceae recovered from aquatic environments in São Paulo state, Brazil.

Key words: Enterobacteriaceae. Environment, Multidrug resistance, Fluoroquinolone. Antimicrobial agents. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL). Fluoroquinolones.

1 INTRODUÇÃO

O amplo uso de antibióticos na medicina humana e na produção animal tem resultado no aumento do número de bactérias comensais e patogênicas resistentes a agentes antimicrobianos, o que vem se tornando um dos principais problemas de saúde pública (SORUM e ABÉE-LUND, 2002; RIVERA-TAPIA, 2003; KIFFER et al., 2005; SADER et al., 2001; DALLA-COSTA et al., 2003; GALES et al., 2003; PAVEZ et al., 2008; LINCOPAN et al., 2005; 2006; ZAVASCKI et al., 2005; DOYLE et al., 2011).

Bactérias resistentes aos antibióticos são encontradas em diferentes nichos ecológicos. Dentre esses nichos, o ambiente aquático é considerado o mais eficiente para a seleção de populações bacterianas resistentes, bem como para a troca de genes de resistência, por meio de elementos genéticos móveis (ALI ABADI e LEES, 2000; WEGENER e MOLLER, 2000; LU et al., 2010; LUBICK, 2011).

Dentre os agentes bacterianos mais frequentemente encontrados nestes ambientes destacam-se membros da família Enterobacteriaceae, os quais são importantes agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (IrAS) (MINARINI et al., 2007; 2008; 2009), o que torna o ambiente uma fonte para a disseminação e aquisição destas bactérias resistentes (ALLEN et al., 2010). De fato, tem sido reportado em revistas de alto impacto que, o aparecimento da resistência aos antibióticos no ambiente é relevante para a saúde humana devido à crescente importância de infecções zoonóticas, bem como a necessidade de investigar a emergência de patógenos resistentes (ALLEN et al., 2011; WALSH et al., 2011; LUBICK, 2011).

Nos últimos anos, devido ao crescimento acelerado da população e da urbanização, os ecossistemas aquáticos vêm sendo profundamente alterados em função de diversos impactos ambientais de origem antrópica, tais como: desvio do curso natural de rios, lançamento de efluentes domésticos e industriais não tratados, desmatamentos, mineração, eutrofização artificial, introdução de espécies exóticas e outros (GOURLART e CALLISTO, 2003).

No ambiente aquático, do ponto de vista sanitário, o que realmente põe em risco a saúde pública é a ocorrência de poluição fecal, pela possibilidade de estarem presentes também microrganismos patogênicos, como bactérias, vírus, protozoários e ovos de helmintos, agentes frequentemente responsáveis por doenças de veiculação hídrica (GELDREICH, 1998). Vários estudos têm demonstrado que infecções humanas, tanto intestinais como extra-intestinais, podem

ser causadas por microrganismos veiculados por águas contaminadas por fezes e urina. A possibilidade dos ambientes aquáticos servirem de reservatório a diversos microrganismos sustentando a sobrevivência dos mesmos nesses habitats, assume, em seu aspecto epidemiológico, considerável importância.

Outro problema que atinge o ambiente aquático é a contaminação por bactérias resistentes provenientes dos seres humanos e animais expostos a antibióticos (SHAKIBAIE et al., 2009; AL-BAHRY et al., 2009; GUSATTI et al., 2009; PRADO et al., 2008), seja pelo uso terapêutico ou pela ingestão acidental de alimentos contaminados com bactérias resistentes que poderiam colonizar transitoriamente hospedeiros, e/ou alimentos contendo resíduos de antimicrobianos com posterior eliminação pelas fezes que poderiam contaminar ambientes aquáticos através do esgoto (GUSATTI et al., 2009; PRADO et al., 2008; COSTA et al., 2006).

Com relação à ambientes aquáticos, o uso profilático de antibióticos na aquicultura tem se tornado comum, principalmente em países industrializados, onde não há regulamentação para o uso de drogas nestes ambientes (XI et al., 2009; SEIFRTOVÁ et al., 2009). Assim, muitos produtores ignoram que o uso indiscriminado de antibióticos proporciona, dentre os principais riscos, a seleção de bactérias resistentes no ambiente aquático; a alteração da microbiota dos ambientes de cultivo; e a transferência de resistência para bactérias potencialmente patogênicas aos seres humanos (HÖLMSTROM et al., 2003). Portanto, o uso de antibióticos na aquicultura deve ser controlado, a fim de se reduzir a disseminação de resistência entre bactérias patogênicas ou da microbiota comensal de peixes e de outros organismos cultivados, além de evitar o risco da presença de resíduos nos alimentos destinados ao consumo humano (BRUUN et al., 2003).

No Brasil, rios urbanos são frequentemente afetados por atividades antropogênicas. Em São Paulo, os rios Tietê e Pinheiros são um exemplo. O rio Tietê (o maior rio do Estado de São Paulo) nasce nos contrafortes ocidentais da Serra do Mar, a 840 metros de altitude, no município de Salesópolis, a apenas 22 Km do Oceano Atlântico. Dirigindo-se para o interior do Estado de São Paulo, no rumo sudoeste-noroeste, o rio Tietê percorre 1.100 quilômetros do território paulista, indo desaguar no rio Paraná, na divisa com Mato Grosso do Sul. Na Região Metropolitana de São Paulo, o rio Tietê e seus afluentes constituem a chamada Bacia Hidrográficas do Alto Tietê, que apresenta um quadro crítico de poluição de suas águas, que

percorrem a cidade de São Paulo e/ou o estado de São Paulo, englobando vários reservatórios ao longo de seu curso (SUARES ROCHA et al., 2010). Estes reservatórios são utilizados para prover água de consumo, como fonte para irrigação agrícola e como fonte de recreação (SUARES ROCHA et al., 2010). No entorno urbano, ambos os rios são conhecidos por serem altamente poluídos pela contaminação por efluentes industriais e domésticos, e por córregos urbanos que deságuam nos mesmos (SUARES ROCHA et al., 2010). Já o rio Pinheiros, recebe resíduos de muitos efluentes domésticos e industriais passando pela área metropolitana da cidade de São Paulo. Assim, dados de qualidade da água apontam níveis elevados de poluição, como resultado da enorme taxa de decomposição da matéria orgânica e industrial, constantemente despejada no seu leito. A água do rio Pinheiros apresenta temperatura elevada, alta concentração de poluentes, além disso, libera mau cheiro pela degradação anaeróbia, confirmada pela ausência de oxigênio dissolvido, o que a caracteriza como sendo anóxica (SMA 2002).

1.1 Antibacterianos

Os antibióticos agem como indutores para a expressão de genes bacterianos que codificam mecanismos de resistência a essas drogas (BUTAYE et al., 2003) favorecendo a seleção natural destas populações, seguindo o principio Darwiniano de sobrevida do mais forte. Assim, na presença de genes que codificam resistência, a seleção de uma população de microrganismos resistentes pode ser uma conseqüência da pressão decorrente do uso exacerbado de antibióticos, sendo que o poder de seleção é proporcional ao tempo de exposição das bactérias ao antibiótico (ALI ABADI e LEES, 2000).

No Brasil, como antecedente desfavorável, dados da ANVISA têm mostrado que o consumo anual de antimicrobianos em 2004 e 2005 excedeu 1200 toneladas (ANVISA 2006; LOCATELLI et al., 2011). Na data avaliada, o maior consumo correspondeu aos compostos da classe dos beta-lactâmicos reportando-se um elevado consumo de amoxicilina (390 toneladas), ampicilina (184 toneladas), cefalexina (163 toneladas), sulfametoxazol (133 toneladas), tetraciclina (45 toneladas), norfloxacina (38 toneladas), ciprofloxacina (30 toneladas) e trimetoprim (27 toneladas).

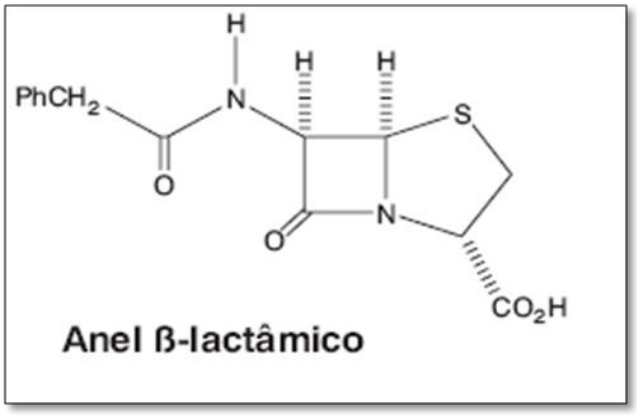
Locatelli e colaboradores (2011) avaliaram a presença de resíduos de antibióticos na Bacia do Rio Atibaia, o que confirma que, não há regulamentação para a diminuição do aporte

destes resíduos que entram no ambiente aquático, se tornando cada vez mais concentrados, uma vez que não são eliminados. Este trabalho mostrou que aspectos antropogênicos e sazonais afetam os níveis destes compostos nas amostras de água. Por exemplo, em períodos chuvosos a porcentagem de detecção de níveis de antibióticos, foi menor (LOCATELLI, et al 2011).

1.2 Antibióticos beta-lactâmicos/cefalosporinas

Antibióticos beta-lactâmicos são amplamente utilizados, pois possuem baixa toxicidade (sendo usados para tratar uma ampla gama de infecções), o que tem contribuído diretamente na emergência de resistência a estes antibióticos (LIVERMORE, 1995). Os mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos incluem a dificuldade dos antibióticos atingirem suas enzimas alvo por impermeabilidade e/ou ativação de bombas de efluxo, e/ou a hidrolise direta por beta-lactamases (WALSH, 2011), que são enzimas com capacidade de romper o anel beta-lactâmico (Figura 1) inativando sua ação sobre as células bacterianas. Entre os antibióticos beta-lactâmicos, as cefalosporinas representam uma das classes mais utilizadas deste tipo de antibiótico.

Figura 1. Estrutura química de um beta-lactâmico

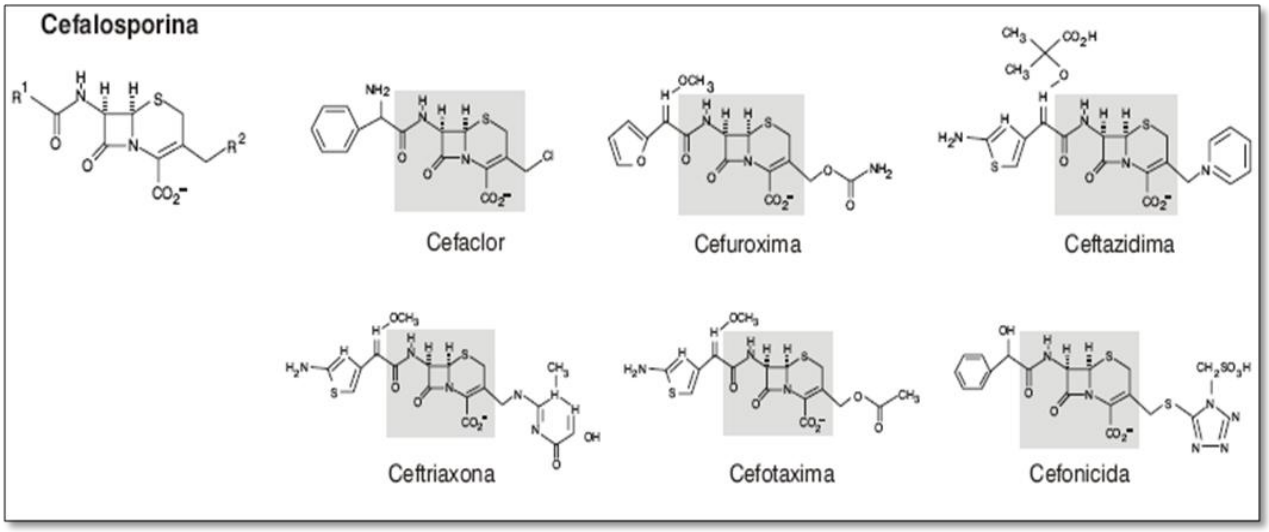


Fonte: Modificado de Rosário e Grumach, (2006).

As cefalosporinas (Figura 2) caracterizam-se pelo seu amplo espectro de ação no combate de uma ampla gama de infecções bacterianas, espectro que tem evoluido farmaceuticamente caracterizando cefalosporinas de primeira a quinta-geração (BUSH e JACOBY, 2010). De fato,

do ponto de vista microbiológico, a principal razão do uso excessivo de cefalosporinas é seu amplo espectro de atividade antibacteriana. Consequentemente, o crescimento da disseminação de cepas produtoras de beta-lactamase tem sido gradual em função do tempo e tipo de cefalosporina lançada no mercado.

Figura 2: Estrutura química das cefalosporinas



Fonte: Rosário e Grumach, (2006).

1.2.1 Descoberta e desenvolvimento das cefalosporinas

O *Acremonium cephalosporium*, que representou o ponto de partida para o descobrimento de todas as cefalosporinas, foi descoberto em 1948 na costa da Sardenha (Itália), por Joseph Brotzu (CORNAGLIA, 2000). A cefalosporina C foi isolada do caldo de cultura desse fungo. Além de ter uma modesta atividade antibacteriana, esta não foi produzida em grandes quantidades até a década de 60, quando foi descrito um novo procedimento a fim de obter o ácido 7-aminocefalosporânico. Este desenvolvimento abriu o caminho para a síntese de grande número de moléculas semi-sintéticas (Figura 2), e em 1964 as cefalosporinas de primeira geração (cefalotina e cefaloridina) chegaram ao mercado (BROTZU, 1948). Hoje, diferentes classes (ou "gerações") de cefalosporinas permitem uma classificação microbiológica destes compostos com base em seu espectro antibacteriano.

Cefalotina e cefaloridina foram introduzidos na prática clínica em 1964, seguido por cefazolina. A busca por novos derivados capazes de resistir à ação de beta-lactamases produzidas por bactérias gram-negativas levou à síntese da segunda geração de cefalosporinas. No início dos anos 70, foi relatado que algumas espécies de *Streptomyces* produtores de 7-alfametoxi cefalosporinas, também conhecida como cefamicina (p.ex. cefoxitina e cefotetan), caracterizava altos níveis de resistência à hidrólise feita pela maioria das beta-lactamases. Outros compostos deste grupo foram introduzidos na prática clínica, mas foram caracterizados pela presença de um anel cefêmico metoximínico (cefuroxima) ou um anel-thiomethyl-tetrazólio (cefamandol) na mesma posição C-7 (GILBERT et al., 1998). A produção contínua de novos compostos levou à descoberta de novos derivados menos hidrolisáveis pelas beta-lactamases, até o desenvolvimento da cefotaxima, a primeira cefalosporina de "Terceira geração" e, a primeira cefalosporina de "Amplo espectro". Cefotaxima se apresenta 100 vezes mais ativa do que o cefamandol sobre bactérias gram-negativas. Mudanças na posição da molécula C-3 foram os principais responsáveis para a melhoria das propriedades farmacocinéticas dessa droga (CORNAGLIA, 2000).

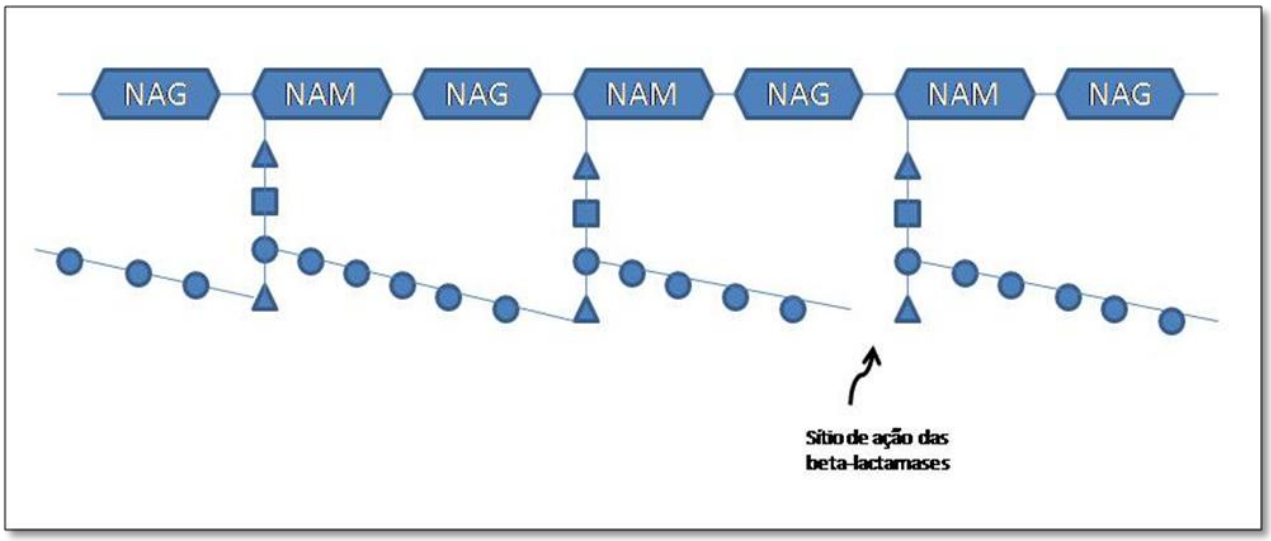
A busca por novos compostos não parou após a introdução de cefalosporinas de terceira geração na prática clínica e levou a síntese de compostos zwitteriônicos de quarta geração (cefepime e cefpiroma) caracterizados por um grupo de amônio quaternário na posição C-3. Cefalosporinas de quarta geração têm um espectro antibacteriano bastante semelhante ao de cefotaxima. Devido à sua natureza zwitteriônica, estes compostos atravessam muito rapidamente a membrana externa da célula bacteriana e são mal hidrolisados por beta-lactamases de classe C, intrínseca em algumas espécies) no espaço periplasmático (CORNAGLIA, 20000).

1.2.2 Mecanismo de ação e resistência aos antibacterianos

As cefalosporinas são uma classe de antibacterianos beta-lactâmicos que inibem a síntese da parede celular bacteriana interferindo na sua integridade, essencial para o crescimento e desenvolvimento bacteriano. O principal mecanismo de ação destes compostos ocorre na atividade da transpeptidase, na fase de biossíntese do peptideoglicano. As cefalosporinas contêm

em sua estrutura um anel beta-lactâmico (Figura 1), que interage com proteínas denominadas PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*), inibindo a enzima envolvida na reação de transpeptidação, responsável pela ligação entre as cadeias de tetrapeptídeos do peptideoglicano. Assim, não é possível a formação das ligações entre os tetrapeptídeos de cadeias adjacentes de peptideoglicano (Figura 3), causando perda de rigidez da parede celular (TRABULSI e ALTHERTHUM, 2008).

Figura 3: Sítio de ação das beta-lactamases entre as ligações peptídicas



Fonte: FONTES, 2011

Com relação à resistência aos antibacterianos, entre as bactérias da família Enterobacteriaceae, a produção de beta-lactamases é o mais importante mecanismo de resistência contra agentes beta-lactâmicos (JACOBY e MUNOZ-PRICE, 2005; SANDERS e SANDERS, 1992). Membros da família Enterobacteriaceae comumente expressam beta-lactamases de espectro restrito, porém, o uso indiscriminado de antibióticos tem levado à emergência e disseminação de beta-lactamases de amplo espectro, codificadas por plasmídeos, que conferem resistência às penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, muitas vezes utilizadas em esquemas terapêuticos em humanos e animais (BUSH et al., 1995; LIVERMORE, 1995).

Em 1983, um grupo de enzimas nomeadas de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) foi detectado em cepas de *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* na Alemanha (KNOTHE et al., 1983). Este grupo de enzimas foi primeiramente referido como resultado de genes presentes em plasmídeos, como o TEM-1, TEM-2 e SHV-1, os quais sofreram mutações semelhantes, resultando em substituições no aminoácido terminal e no sítio ativo destas enzimas. Estas alterações (mutações) modificam estruturalmente o sítio ativo da enzima, causando aumento de sua ação sobre as cefalosporinas. Como resultado, sua ação não se restringe apenas às penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração, mas, também, sobre as oxiamino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona) e monobactans (aztreonam) (STÜRENBURG e MACK, 2003).

As ESBLs, geralmente podem ser bloqueadas por inibidores de beta-lactamases, como por exemplo, o clavulanato, sulbactam e tazobactam. Além disso, as bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido também apresentam resistência a outras drogas não-beta-lactâmicas, o que causa dúvidas quanto à conduta terapêutica para estes casos (WARREN et al., 2008; MARRA et al., 2006; DHANJI et al., 2010).

Infelizmente, a utilização indiscriminada e sem critérios destes antibacterianos, também tem favorecido a seleção de bactérias produtoras de ESBLs, que conferem resistência a estes agentes (MEDEIROS, 1997). A primeira mutação observada na produção de ESBLs foi a enzima SHV-2, que foi encontrada em uma cepa de *Klebsiella ozaenae*, isolada na República Federal da Alemanha, em 1983 (LIVERMORE, 1995). A partir destes primeiros achados, o isolamento destas bactérias que carregam esses genes de resistência vem se tornando cada vez mais comum, inclusive em animais, alimentos contaminados e ambientes aquáticos. Além disso, tem sido encontrado em diversos gêneros de enterobactérias, como em *Escherichia, Klebsiella, Proteus*, e também em bacilos gram-negativos não-fermentadores de glicose, como a *Pseudomonas aeruginosa* (AMBLER, 1980).

O método mais utilizado para triagem de ESBL é aproximação de discos que consiste em dispor discos de cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina e cefepime), além de aztreonam a aproximadamente 25 mm de distância, centro-centro, do disco com inibidor (clavulanato, tazobactam, sulbactam) (CARTER, 2000). O sinergismo indica a produção de ESBL (RADICE, 2002). A zona de sinergismo é comumente denominada de “zona fantasma”. A

utilização de fitas comerciais de E-test ESBL (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) também são utilizadas para triagem e/ou confirmação do fenótipo de ESBL, no qual a queda de pelo menos três vezes na Concentração Inibitória Mínima (CIM) do antibiótico quando o mesmo é associado a um inibidor indica a produção de ESBL (FERNANDES, 2009).

1.2.3 Classificação ESBL

Hoje, mais de 370 variantes naturais de ESBLs diferentes são conhecidas atualmente no mundo todo (STÜRENBURGet al., 2005). Estas enzimas pertencem filogeneticamente à classe de beta- lactamases denominadas "*Serine-Beta-Lactamases*" que, juntamente com as "*Metallo-Beta-Lactamases*", formam os dois grandes grupos de enzimas que possuem a capacidade de degradar antibióticos beta-lactâmicos (SHAH et al., 2004).

A relação entre as enzimas ESBLs foi mais bem representada pelo esquema de classificação de Ambler, baseada na similaridade entre as seqüências de aminoácidos também conhecida como classificação molecular. Esta classificação baseia-se na seqüência de aminoácidos e nucleotídeos destas enzimas (AMBLER et al., 1991).

Atualmente, há 04 classes moleculares conhecidas (A, B, C e D). As classes A, C e D agem através do mecanismo baseado nas "Serinas", enquanto a classe B ou *Metallo-beta-lactamases* necessitam de Zinco (Zn) para sua ação. A maioria das bactérias produtoras de ESBLs estão contidas na classe molecular "A" de Ambler (AMBLER, 1980), caracterizadas pela presença do sítio ativo "*Serina*".

Outro esquema de classificação muito utilizado é o modelo descrito por Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH K. et al., 1995; BUSH, 2001) que recentemente apresentaram uma atualização do esquema de classificação, no qual dividiram as enzimas em 4 grandes grupos (1, 2, 3 e 4) e subgrupos (a, b, c, d, e, f) (BUSH et al.,1995; BUSH, 2001; BUSH e JACOBY, 2010).

O grupo 01 no esquema de Bush-Jacoby-Medeiros é formado por cefalosporinases (beta-lactamases) que não sofrem inibição pelo ácido clavulânico, e que pertencem à classe molecular C de Ambler. O grupo 02 são penicilinases e/ou cefalosporinases (beta-lactamases) que sofrem inibição pelo ácido clavulânico, também pertencentes às classes moleculares A e D de Ambler. O

grupo 03 são enzimas que possuem no seu sítio ativo a necessidade de Zinco (Zn) para exercerem seu efeito, e por esse motivo são chamadas de "*Zinco-beta-lactamases*" ou simplesmente "*Metallo-beta-lactamases*", e correspondem à classe molecular B de Ambler. E finalmente existe o grupo 04, onde se localizam as penicilinases (beta-lactamases) que não são inibidas pelo ácido clavulânico e ainda não estão inseridas em um grupo molecular definido (SHAH et al., 2004; BUSH e JACOBY, 2010).

1.3 Quinolonas/Fluoroquinolonas

As quinolonas/fluoroquinolonas são um grupo de antibacterianos sintéticos, cujo espectro de atividade é focado em bactérias gram-negativas, mas vem se expandindo sobre gram-positivos, anaeróbios e micobactérias.

Atualmente, outro problema de importância epidemiológica no Brasil é a emergência de cepas resistentes às fluoroquinolonas (MINARINI et al., 2008; CASTANHEIRA et al., 2007), lembrando que antibióticos como ciprofloxacina e enrofloxacina são amplamente utilizadas para terapia de infecções clínicas humanas e veterinárias, respectivamente, e até mesmo utilizados como promotores de crescimento (THORSTEINSDOTTIR et al., 2009). Os antibióticos da classe das fluoroquinolonas apresentam potente atividade contra grande número de bactérias gram-positivas e gram-negativas, e como resultado de seu amplo espectro de ação, as fluoroquinolonas têm sido prescritas como terapia empírica em muitos casos de infecção humana e animal (HURST et al., 2002).

Na década de sessenta do século passado foi introduzido na prática clínica o ácido nalidíxico (primeira quinolona usada como antimicrobiano) (Figura 4). No entanto, a importância deste grupo reside nas mudanças ao final de 1970 quando criaram um grande número de agentes antibacterianos.

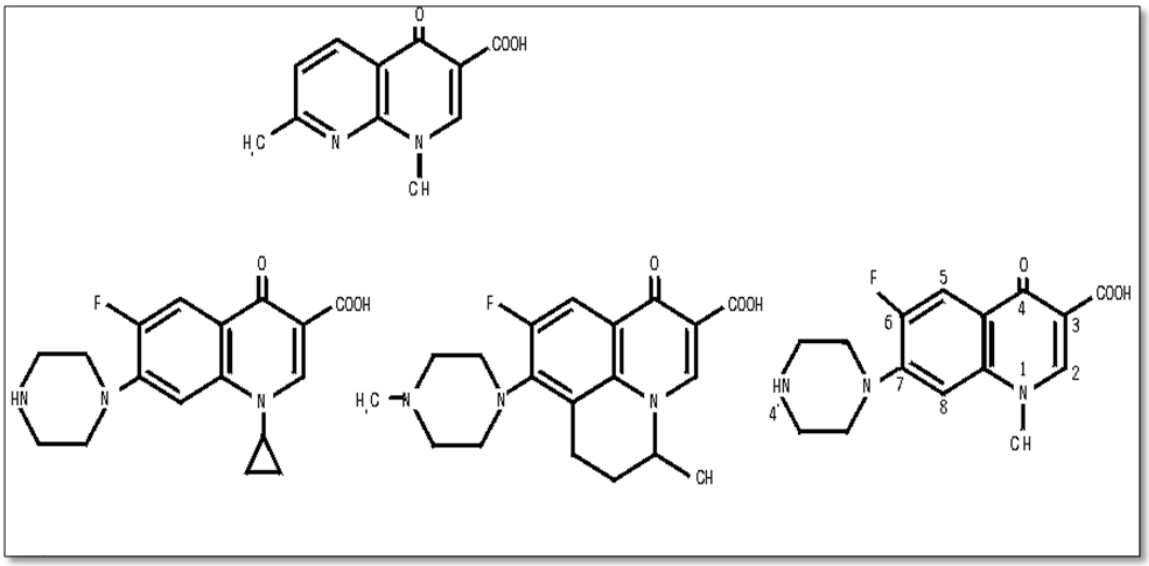
A primeira geração (ácido nalidíxico, ácido pipemídico), pouco utilizado hoje em dia, tem atividade contra a família bacteriana Enterobacteriaceae e alguns outros gram-negativos e são praticamente inativos contra bactérias gram-positivas, anaeróbios e atípicos (BOLON, 2011).

Embora muitas substituições tenham sido realizadas com o propósito de expandir a atividade contra diversos patógenos, o uso clínico de quinolonas de segunda geração

(norfloxacina) (Figura 4) permaneceu limitado pelo seu restrito espectro de atividade, (APPELBAUM e HUNTER, 2000).

Em meados da década de 80, foi lançada a ciprofloxacina (primeira fluoroquinolona, com amplo espectro de atividade) (Figura 4), desde então, surgiram outras quinolonas, cuja adição de flúor levou à classificação de seus compostos como fluoroquinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina). Em virtude da emergência da resistência bacteriana às gerações anteriormente citadas, iniciou-se o desenvolvimento de novas quinolonas, caracterizando a quarta geração (moxifloxacino) desses compostos com a adição de um grupamento metoxi (APPELBAUM e HUNTER, 2000; BOLON, 2011).

Figura 4: Estrutura básica de quinolonas/fluoroquinolonas



Fonte: Modificada de Jackson et al., 1998.

1.3.1 Mecanismos de ação e Resistência

As quinolonas associam-se às enzimas DNA gyrase e Topoisomerase IV, impedindo o enovelamento da molécula de DNA, tendo efeito bactericida. Mutações no sítio ativos destas enzimas (DNA gyrase e Topoisomerase IV) constituíam o principal mecanismo de resistência às quinolonas. A atividade antimicrobiana de fluoroquinolonas é baseada na inibição das topoisomerases, enzimas heterotetraméricas compostas por duas subunidades A e B

respectivamente codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* na DNA girase e pelos genes *parC* e *parE* na topoisomerase IV (NAKAMURA, et al., 1989; PAN e FISHER, 1996; KIM, et al., 2010).

Até 1998, todos os mecanismos conhecidos de resistência às quinolonas eram cromossomal, porém, a partir daí, resistência à quinolonas mediada por plasmídeos, PMQR tem sido descritas (JOHNSON, et al, 2008; ROBICSEK, et al, 2006; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, et al, 2008).

Desde a introdução do ácido nalidíxico em 1960, o antibiótico ciprofloxacina é considerado, entre a classe das quinolonas o agente antimicrobiano mais consumido em todo o mundo (ACAR e GOLDSTEIN, 1997; CHENIA e PILLAY, 2006). O seu alto consumo, somado aos erros em seu emprego na terapêutica, tem sido considerado fatores responsáveis pelo rápido desenvolvimento da resistência bacteriana a esta classe de antibióticos (NAHEED et al., 2004; BIEDENBACH et al., 2006).

1.3.2 PMQR

Determinantes de resistência do tipo PMQR incluem: as proteínas Qnr (QnrA, QnrB, QnrS, QnrC e QnrD), que protegem a DNA girase e topoisomeraseIV da inibição por quinolonas; a variante de aminoglicosídeo acetiltransferase aac(6')-lb-cr, capazes de acetilar e subsequentemente reduzir a atividade de norfloxacina e ciprofloxacina, e; as recentemente descritas bombas de efluxo, proteína QepA, envolvidas na expulsão das fluoroquinolonas para fora da células bacterianas (PÉRICHON,et al, 2007; YAMANE, et al, 2007; CATTOIR e NORDMANN, 2009; CAVACO, et al, 2009; MARTINEZ-MARTINEZ, et al, 2008).

Genes do tipo *qnr* foram descobertos em 1998, e foram associados com a produção de pentapeptídeos repetidos que protegem a enzima DNA gyrase da ação desta classe de quimioterápicos, ligando-se ao sítio ativo da enzima em vez de se ligarem ao DNA. Estes genes foram encontrados em plasmídeos.

A integração dos genes *qnr* em diferentes plasmídeos proporcionou a rápida disseminação desse mecanismo de resistência às quinolonas. O surgimento e a propagação de resistência às quinolonas dependem do patógeno (que é mais ou menos sensível), do antibiótico

(que é mais ou menos ativo), do local da infecção e da carga bacteriana (a mais elevada carga bacteriana, a maior probabilidade de surgimento e seleção de mutantes resistentes), da integridade dos mecanismos de defesa do hospedeiro, e da dose utilizada (adequada ou baixa), entre outros fatores.

Além dos genes *qnr*, a resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) pode ser devido à inativação de fluoroquinolonas por uma transferase, *aac-(6 ')-Ib-cr*, que leva à acetilação das moléculas de fluoroquinolonas, tornando-as inativas. O gene *aac-(6 ')-Ib-cr* é uma subvariante de uma outra acetilase, *aac-(6 ')-Ib* aminoglicosídeo acetiltransferase, com duas mutações pontuais que permitem a ligação aoo sítio ativo da molécula, com posterior acetilação de forma similar ao que ocorre com canamicina e amicacina (VETTING et al, 2008; ROBICSEK, 2006; WARBURG et al, 2009).

A aquisição e disseminação de genes de resistência às cefalosporinas de amplo espectro e fluoroquinolonas, apresentam-se como um grave problema de saúde pública, uma vez que o meio aquático pode constituir uma fonte potencial para a mobilização destes genes de resistência e a disseminação das bactérias com perfil de multirresistência. Este panorama, requer a implementação de controle principalmente na redução dos resíduos de antibacterianos que são despejados diretamente nos ambientes aquáticos, assim como o esgoto comunitário e hospitalar.

6 CONCLUSÕES

- Houve predominância de isolados das espécies *E. coli* e *K. pneumoniae* nas amostras de água coletadas.
- As taxas de resistência aos antimicrobianos foram altas tanto em *E. coli* quanto em *K. pneumoniae*
- Os valores da Concentração Inibitória Mínima ultrapassou os valores do ponto de corte para todos os antimicrobianos para 90% dos isolados, exceto no caso da tetraciclina que tanto a CIM_{90}quanto a CIM_{50}apresentou valores abaixo do ponto de corte.
- Todas as amostras foram sensíveis ao imipenem, ertapenem e pip/tazobactam;
- Um total de 87 isolados da família Enterobacteriaceae se mostraram multirresistentes, ou seja, resistentes a pelo menos 3 antibacterianos de diferentes classes.
- Um total de 12 cepas de *E. coli* e 10 cepas de *K. pneumoniae* eram produtoras de ESBL e/ou PMQR.
- O grupo filogenético A foi o mais frequente dentre as amostras de *E. coli*, sendo identificada duas cepas pertencente ao grupo B1 (ambas caracterizadas como de baixa virulência ou comensais) e duas cepas pertencentes ao grupo D, caracterizadas como altamente viruluntas (patogênicas).
- Seis amostras de *E. coli* carregavam o gene *qnr* , quatro carregavam o gene $bla_{CTX\text{-}M}$ e 2 carregavam ambos os genes,
- Quatro amostras de *K. pneumoniae* carregavam o gene *qnr*, quatro carregavam o gene $bla_{CTX\text{-}M}$2 carregavam ambos os genes,
- A tipagem por ERIC-PCR, nos isolados carregando genes $bla_{CTX\text{-}M}$ e/ou genes *qnr*, revelou ausência de relação clonal entre as cepas de *K. pneumoniae* (n=10), enquanto que cepas de *E. coli* (n= 12) foram agrupadas em nove *clusters* (> 90% de similaridade).

REFERÊNCIAS

ACAR, J. F.; GOLDSTEIN, F. W. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones.**Clin. Infect. Dis.,** Jan;24 Suppl. 1, S67-7, 1997.

AL-BAHRY, S. N.; MAHMOUD, I. Y.; AL-KHAIFI, A., ELSHAFIE, A. E.; AL-HARTHY, A. Hability of multiple antibiotic resistant bacteria in distribution lines of treated sewage effluent used for irrigation.**Water Sci. Technol.**, v. 60, n. 11, p. 2939-2948, 2009.

ALLEN, S. E.; BOERLIN, P.; JANECKO, N.; LUMDSEN, J. S.; BARKER, I. K.; PEARL, D. L.; REID-SMITH, R. J.; JARDINE, C. Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolates from wild small mammals living in swine farm, residential, landfill, and natural environments in southern Ontario, Canada. **Appl. Environ.Microbiol.** v. 77, n. 3, p. 882-888, 2011.

ALI ABADI, F. S.; LEES, P. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.14, p.307-313, 2000.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases.**Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.

AMBLER, R. P.; COULSON, A. F.; FRÈRE, J. M.; GHUYSEN, J. M.; JORIS, B.; FORSMAN, M.; LEVESQUE, R. C.; TIRABY, G.; WALEY, S. G.; A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochem. J**. v. 276, pt. 1, p. 269-270, 1991.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA - National Health Surveillance Agency, National assembly for the regulation of the drug market. Available at: http://www.anvisa.gov.br/monitora/cmed/index.htm, 2006

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION.APHA. 1992**.** Standards methods for the examination of water and waste water**.** 18 ed. APHA, Washington, 1998

APPELBAUM, P. C.; HUNTER, P. A.; The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **Int. J. Antimicrob. Agents**. v. 16, n. 1, p. 5-15, 2000

BALSALOBRE, L. C.; DROPA, M.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Detection of metallo B-lactamases-encoding genes in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 1, p. 1-4, 2009.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BIEDENBACH, D. J.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R.; JONES, R. N. Characterization of fluoroquinolone-resistant beta-hemolytic *Streptococcus* spp. isolated in North America and Europe including the first report of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus dysgalactiae*subspecies *equisimilis*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**. v. 55, n. 2, p. 119-127, 2006.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BOLON, M. K. The newer fluoroquinolones. **Med. Clin. North Am.** v. 95, n. 4, p. 793-817, 2011.

BROTZU, G. Ricerche su di un nuovo antibiotico. **Lav. Ist. Igiene di Cagliari,** v.1, p. 1-7, 1948.

BRUUN, M. S.; MADSEN, L.; DALSGAARD, I. Efficiency of oxytetracycline treatment in rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum* strains having different in vitro antibiotic susceptibilities. **Aquaculture**, v. 215, p. 11-20, 2003.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Update functional classification of beta-lactamases.A**ntimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin. Infect. Dis.** v. 32, n. 7, p. 1085-1089, 2001.

BUSH, L. M.; CALMON, J.; JOHNSON, C. C. Newer penicillins and beta-lactamase inhibitors. : **Infect. Dis. Clin. North Am.** v. 9, n. 3, p.653-686, 1995.

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria.**Int. J. Antimicrob. Agents.**v. 22, n. 3, p. 205-210, 2003.

CANTÓN, R.; RUIZ-GARBAJOSA, P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistancegenes.**Curr. Opin. Pharmacol.** v. 11, n. 5, p.477-485, 2011.

CARATTOLI, A.; BERTINI, A.; VILLA, L.; FALBO, V.; HOPKINS, K. L.; THRELFALL, E. J. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **J. Microbiol. Methods.**v. 63, n. 3, p. 219-228, 2005.

CARNEIRO, D. O.; FIGUEIREDO, H. C. P.; PEREIRA JÚNIOR, D. J.; LEAL, C. A. G.; LOGATO, P. V. R. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. vol. 59 n. 4, 2007.

CARTER, M. W.; OAKTON, K. J.; WARNER, M.; LIVERMORE, D. M. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella* with the Oxoid combination disk method. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, n. 11, p. 4228-4232, 2000.

CASTANHEIRA, M.; PEREIRA, A. S.; NICOLETTI, A. G.; PIGNATARI, A. C.; BARTH, A. L.; GALES, A. C. First report of plasmid-mediated *qnr*A1 in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 51, n. 4, p. 1527-1529, 2007.

CATTOIR, V. ; WEILL, F. X. ; POIREL, L.; FABRE, L.; SOUSSY, C. J.; NORDMANN, P. Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France.**J. Antimicrob. Chemother**; v. 59, p. 751–754, 2007.

CATTOIR, V. ; POIREL, L. ; ROTIMI, V. ; SOUSSY, C. J.; NORDMANN, P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 60, p. 394–397, 2007.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *Qnr*B4 identified in France in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate co-expressing a *Qnr*S1 determinant. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 51, p. 2652–2653, 2007.

CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. **Curr. Med. Chem.** v. 16, n. 8, p. 1028-1046, 2009.

CAVACO, L. M.; HASMAN, H.; XIA, S.; AARESTRUP, F. M. *qnr*D, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. **Antimicrob.Agents Chemother.** v. 53, p. 603-608, 2009.

CHAPMAN, P. A.; ELLIN, M.; ASHTON, R.; SHAFIQUE, W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **Int. J. Food Microbiol.** v. 68, n. 1-2, p. 11-20, 2001.

CHENIA, H. Y.; PILLAY, B.; PILLAY, D. Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. **J. Antimicrob. Chemother**. v. 58, n. 6, p. 1274-1278, 2006.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group.**Appl. Environ. Microbiol.** v. 66, n. 10, p. 4555-4558, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agents antimicrobianos por diluição para crescimento de bactérias aeróbias. 21st suplemento informativo. **CLSI document M100-S21**, USA, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agents antimicrobianos por diluição para crescimento de bactérias aeróbias. 15st suplemento informativo.**CLSI document M100-S19**, USA, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals **CLSI document M31-A3**, USA, 2009.

COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Euro Surveill**. v. 13, n. 47, 2008

CORNAGLIA, G. Mezzo secolo di cefalosporine: le basi razionali di un sucesso. **Le infezioni in medicina.**: v. 1, p. 18-23, 2000.

COSTA, M. M. et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras**., v. 26, n. 1, p. 5-8, 2006.

DALLA-COSTA, L. M.; COELHO, J. M.; SOUZA, H. A. P. H. M.; CASTRO, M. E. S.; STIER, C. J. N.; BRAGAGNOLO, K. L.; RIA-NETO, A.; PENTEADO-FILHO, S. R.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baummannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **J. Clin. Microbiol..** v. 41, p. 3403-3406, 2003.

DENTON, M.Enterobacteriaceae. **Int. J. Antimicrob. Agents.** v. 3, Suppl. S9-S22, 2007.

DHANJI, H.; MURPHY, N. M.; DOUMITH, M.; DURMUS, S.; LEE, S. S.; HOPE, R.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 65, n. 12, p. 2534-2537, 2010.

DOYLE, J. S.; BUISING, K. L.; THURSKY, K. A.; WORTH, L. J.; RICHARDS, M. J. Epidemiology of infections acquired in intensive care units. **Semin. Respir. Crit. Care Med.** v. 32, n. 2, p. 115-138, 2011.

FERNANDES, S. A.; PATERSON, D. L.; GHILARDI-RODRIGUES, A. C.; ADAMS-HADUCH, J. M.; TAVECHIO, A. T.; DOI, Y. CTX-M-2-producing *Salmonella typhimurium* isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microb. Drug Resist**. v. 15, n. 4, p. 317-321, 2009.

FONTES, L. C.; NEVES, P. R.; OLIVEIRA, S.; SILVA, K. C.; HACHICH, E. M.; SATO, M. I.;LINCOPAN N. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo-β-lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmtD1 in an urban river. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 55, n. 6, p. 3063-3064, 2011.

FUENTEFRIA, D. P.; FERREIRA, A. E.; CORÇÃO, G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: Are they genetically related? **Journal of Environmental Management.** v. 92, n. 1, p. 250–255, 2011.

GALES, A. C.; MENEZES, L. C.; SILBERT, S.; SADER, H. S.Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-β-lactamase. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 52, p. 699-702, 2003.

GELDREICH E. E. The bacteriology of water. In: **Microbiology and microbial infections**. 9th ed. London: Arnold; 1998.

GILBERT, D. N.; MOELLERING Jr. R. C.; SANDE, M. A. In the Sanford guide to antimicrobial therapy. **Antimicrob. Therapy.** Inc., 1998.

GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Rev. FAPAM**, V. 2, n. 1, 2003.

GUSATTI, C. de .;, FERREIRA, A. E.; FUENTEFRIA, D. B.; CORÇÃO, G. Resistance to beta-lactams among *Acinetobacter* spp isolated from hospital sewage in southern Brazil]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v. 42, n. 2, p. 183-187, 2009.

HERNADEZ, J. R.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; CANTÓN, R.; COQUE, T. M.; PASCUAL, A. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 49, p. 2122-2125, 2005.

HÖLMSTROM, K.; GRÄSLUND, S.; WAHLSTRÖM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTSSON, B.; KAUTSKY, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.38, p.255-266, 2003.

HURST, M.; LAMB, H. M.; SCOTT, L. J.; FIGGITT, D. P. Levofloxacin: an updated review of its use in the treatment of bacterial infections. **Drugs**, v. 62, p. 2127-67, 2002.

JACKSON, L. C.; REYES, L. A. M.; HAMILTON, M. L. Quinolonas y terapia Antimicrobiana. **Acta Médica**; v. 8, n. 1, p. 58-65, 1998.

JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. The new beta-lactamases. **N. Engl. J. Med**. v. 352, n. 4, p. 380-391, 2005.

JOHNSON, L.; SABEL, A.; BURMAN, W. J. Emergence of fluoroquinolone resistance in outpatient urinary *Escherichia coli* isolates. **Am. J. Med.** v. 121, n. 10, p. 876-884, 2008.

KIFFER, C.; HSIUNQ, A.; OPLUSTIL, C.; SAMPAIO, J.; SAKAQAMI, E.; TUNER, P.; MENDES, C.; MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **Braz. J. Infect. Dis**; v. 9, n. 3, p. 216-224, 2005.

KIM, M. S.; JUN, L. J.; SHIN, S. B.; PARK, M. A.; JUNG, S. H.; KIM, K.; MOON, K. H.; JEONG, H. D. Mutations in the *gyrB, parC,* and *parE*genes of quinolone-resistant isolates and mutants of *Edwardsiella tarda*. **J. Microbiol. Biotechnol**. 2010 Dec;20(12):1735-43.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRCMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection.** v. 11, n. 6, p. 315-317, 1983.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. J. Diagnóstico Microbiológico. **Medsi,** Rio de Janeiro, 2001.

LI, C. R. ; LI, Y. ; ZHANG, P. A. Dissemination and spread of CTX-M extended spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* in central China. **Int. J. Antimicrob. Agents**; v. 22, p. 521-525, 2003.

LINCOPAN, N.; LEIS, R.; VIANELLO, M. A.; de ARAUJO, M. R.; RUIZ, A. S.; MAMIZUKA, E. M. Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1611-1613, 2006.

LINCOPAN, N.; McCULLOCH, J. A.; REINERT, C.; CASSETTARI V. C.; GALES, A.C.; MAMIZUCA, E. M. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **J. Clin. Microbiol.** v. 43, n. 1, p. 516-519, 2005.

LIVERMORE, D. M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol.** v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.

LOCATELLI, M. A.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**. v. 60, n. 3, p. 385-393, 2011.

LU, S. Y.; ZHANG, S. N.; GENG, T. Y.; LI, C. M.; YE, D. S.; ZHANG, F.; ZOU, H. W. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. **Appl. Environ. Microbiol**.; v. 76, p. 5972-5976, 2010.

LUBICK, N. Tools for tracking antibiotic resistance. **Environ. Health Perspect**. v. 119, n. 5, p. 214-217, 2011.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin. Microbiol. Infect**. May 7. 2011

MARRA, A. R.; WEY, S. B.; CASTELO, A.; GALES, A. C.; CAL, R. G.; FILHO, J. R.; EDMOND, M. B.; PEREIRA, C. A. Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiellapneumoniae* : impact of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. **B. M. C. Infect. Dis**. v. 6, p. 24, 2006.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; ELIECER CANO, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ J.; CALVO, J.; PASCUAL, A. Plasmidmediated quinolone resistance. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.** v. 6, p. 685-711, 2008.

MEDEIROS, A. A.; CRELLIN, J. Comparative susceptibility of clinical isolates producing extended spectrum beta-lactamases to ceftibuten: effect of large inocula. **Pediatr. Infect. Dis. J.**v. 16, Suppl. n. 3, S49-55, 1997.

MINARINI, L. A.; POIREL, L.; TREVISANI, N. A.; DARINI, A. L.; NORDMAN, P. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**. v. 65, n. 2, p. 202-206, 2009.

MINARINI, L. A. ; POIREL, L. ; CATTOIR, V. ; DARINI, A. L. ; NORDMAN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **J. Antimicrob. Chemother**. v. 62, n. 3, p. 474-478, 2008.

MINARINI, L. A.; GALES, A. C.; DARINI, A. L. First report of plasmidmediated resistance to quinolones and cefotaxime in an *Enterobacter cloacae* strain isolated from an outpatient in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 51, p. 401–402, 2007.

MINARINI, L. A.; GALES, A. C.; PALAZZO, I. C.; DARINI, A. L. Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Curr. Microbiol.** v. 54, n. 5, p. 335-341, 2007.

NAHEED A, KALLURI P, TALUKDER KA, FARUQUE AS, KHATUN F, NAIR GB, MINTZ ED, BREIMAN RF. Fluoroquinolone-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 in northeastern Bangladesh**. Lancet. Infect. Dis**. v. 4, n. 10, p. 607-608, 2004.

NAKAMURA, S.;NAKAMURA, M.;KOJIMA, T,;YOSHIDA, H. *gyrA* and *gyrB* Mutations in Quinolone-Resistant Strains of *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemoth**. v. 33, n. 2, p. 254-255, 1989.

NORDMANN P, POIREL L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes**. Clin. Microbiol. Infect.** v. 8, p. 321-331, 2002.

OLIVEIRA, S.; FONTES, L. C.; SILVA, K. C.; PUSZTAI,J.; HACHICH, E. M.; SATO, M. I. Z.; LINCOPAN, N.Dissemination of kpc-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and oxa-23-

positive Acinetobacter baumannii in urban rivers, São Paulo, Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 26., 2011. Foz de Iguaçu. **Abstracts.**..São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011. p. 2017-1.

PARK, C. H.; ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A.; SAHM, D.; HOOPER, D. C. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. **Antimicrob. Agents Chemother**.;v**.** 50, n. 11, p. 3953–3955, 2003.

PAN XS, FISHER LM. Cloning and characterization of the *parC* and *parE*genes of *Streptococcus pneumoniae* encoding DNA topoisomerase IV: role in fluoroquinolone resistance. **J Bacteriol.** 1996 Jul;178(14):4060-9.

PAVEZ, M.; NEVES, P.; DROPA, M.; MATTE, M. H.; GRINBAUM, R.; DE ARAUJO, M. R. E.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC beta-lactamase in Brazil. **J. Med. Microbiol.** v. 57, n. 12, p. 1590-1592, 2008.

PEREIRA, A. S.; ANDRADE, S. S.; MONTEIRO, J. et al. Evaluation of the susceptibility profiles, genetic similarity and presence of *qnr* gene in *Escherichia coli* resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals. **Braz. J. Infect. Dis.** v. 11, p. 40–43, 2007.

PÉRICHON, B.; COURVALIN, P.; GALIMAND, M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 51, p. 2464-2469, 2007.

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B.; CHURCH, D. L.; MENARD, M. L., JOHNSON, J. R. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 49, n. 11, p. 4667-4670, 2005.

PRADO, T.; PEREIRA, W. C.; SILVA, D. M.; SEIKI, L. M.; CARVALHO, A. P.; ASENSI, M. D. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 46, n. 1, p. 136-141, 2008.

RADICE, M.; POWER, P.; DI CONZA, J.; GUTKIND, G.Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 46, n. 2, p. 602-604, 2002.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de Antibióticos usados na produção animal brasileira. **R. Bras. Ci. Solo,**v, 34, p.:601-616, 2010

RIBEIRO, V. B. **Caracterização de determinantes de virulência, resistência e integrons classe 1 em cepas de Salmonella enterica isoladas a partir de alimentos e fontes**

relacionadas. 2007. [s.p]. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia) – Faculdade de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RIVERA-TAPIA, J. A. Antibiotic resistance, public health problem. **An. Med. Hosp. ABC**. v. 48, p. 42-47, 2003.

ROBICSEK, K.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C.The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **Lancet. Infect. Dis.** v. 6, n. 10, p. 629-640, 2006.

ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G. A. Fluoroquinolone- modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. **Nat. Med.** v. 12, p. 83-88, 2006.

ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; SAHM, D. F.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 50, n. 8, p. 2872-2874, 2006.

ROSÁRIO, N. A.; GRUMACH, A. S. Alergia a beta-lactâmicos na clínica pediátrica: uma abordagem prática. **J. Pediatr**. v. 82, n. 5 suppl 0, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T.; eds. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.3, 1989.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A .; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz. J. Infect. Dis.** v. 5, n. 4, p. 200-214, 2001.

Secretaria do Estado do Meio Ambiente. SMA - São Paulo. Coordenadoria de Planejamento Ambiental. Informações básicas para o planejamento ambiental. São Paulo, SMA, 84p. 2002.

SANDERS, C. C.; SANDERS, W. E. Jr .beta-Lactam resistance in gram-negative bac-teria: global trends and clinical impact. **Clin. Infect. Dis.** v.15, n. 5, p. 824-839, 1992.

SEIFRTOVÁ, M.; NOVÁKOVA, L.; LINO, C.; PENA, A.; SOLICH, P. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. **Anal Chim. Acta.** v. 649, n. 2, p.158-179, 2009.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; AHMED, S.; HAMEED, A. Extended-spectrum beta-lactamases (ESbLs): characterization, epidemiology and detection. **Crit. Rev. Microbiol.** v. 30, n. 1, p. 25-32, 2004.

SHAKIBAIE, M. R.; JALILZADEH, K. A.; YAMAKANAMARDI, S. M. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes among gram negative bacteria in sewage and lake water and influence of some physico-chemical parameters of water on conjugation process. **J. Environ. Biol**. v. 30, n. 1, p. 45-49, 2009.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, p. 573, 1973.

SORUM, H.; ABÉE-LUND, T. M. Antibiotic resistance in food-related bacteria _ a result of interfering with the global web of bacterial genetics. **Int. J. Food Microbiol**., v. 78, p. 43-56, 2002.

STÜRENBURG, E.; MACK, D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **J. Infect**. v. 47, n. 4, p. 273-295, 2003.

STÜRENBURG, E.; SOBOTTKA, I.; LAUFS, R.; MACK, D. Evaluation of a new screen agar plate for detection and presumptive identification of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 51, n. 1, p. 51-55, 2005.

SUARES ROCHA, P.; AZAB, E.; SCHIMIDT, B.; STORCH, V.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Changes in toxicity and dioxin-like activity of sediments from the Tietê River (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 73, n. 4, p. 550-558, 2010.

THORSTEINSDOTTIR, T. R.; HARALDSSON, G.; FRIDRIKSDOTTIR, V.; KRISTINSSON, K. G.; GUNNARSSON, E. Prevalence and Genetic Relatedness of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolated From Animals, Foods and Humans in Iceland. **Zoonoses Public Health.** Nov 13. 2009.

TOSIN, I.; SILBERT, S.; SADER, H. S.The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among Gram-negative rods in Brazilian Hospitals. **Braz. J. Infect. Dis.** v. 7, p. 360-369, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5 ed. Atheneu, São Paulo, 2008.

VETTING, M. W.; PARK, C. H.; HEGDE, S. S.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C.; BLANCHARD, J. S. Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant. **Biochemistry**. v. 16, p. 9825-9835, 2008.

XI, C.; ZHANG, Y.; MARRS, C. F.; YE, W.; SIMON, C.; FOXMAN, B.; NRIAGU, J. Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 75, n. 17, p. 5714-5718, 2009.

YAMANE, K.; WACHINO, J.; SUZUKI, S. New plasmidmediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 51, p. 3354-3360, 2007.

WALSH, T. R.; WEEKS, J.; LIVERMORE, D. M.; TOLEMAN, M. A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. **Lancet. Infect. Dis.** v. 11, n. 5, p. 355-362, 2011.

WANG, M. H.; XU, X.; WU, S. et al. A new plasmid-mediated gene for quinolone resistance, *qnr*C, found in a clinical isolate of Proteus mirabilis. Antimicrob. Agents Chemother. v. 53, n. 5, p. 1892-1897, 2009.

WARBURG, G.; KOREM, M.; ROBICSEK, A. Changes in aac(6')-Ib-cr prevalence and fluoroquinolone resistance in nosocomial isolates of *Escherichia coli* collected from 1991 through 2005. **J. Antimicrob. Agents Chemother**. v. 53, p. 1268-1270, 2009.

WARREN, R. E.; HARVEY, G.; CARR, R.; WARD, D.; DOROSHENKO, A. Control of infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms in hospitals and the community. **Clin. Microbiol. Infect**. v. 14, Suppl. n. 1, p. 124-133, 2008.

WEGENER, H. C.; MOLLER, N. F. Reducing the use of antimicrobial agents in animals and man.**J. Med. Microbiol.** v.49, p.111-113, 2000.

WOODFORD N, ZHANG J, WARNER M, KAUFMANN ME, MATOS J, MACDONALD A, BRUDNEY D, SOMPOLINSKY D, NAVON-VENEZIA S, LIVERMORE DM. *Arrival of Klebsiella pneumoniae* producing *KPC carbapenemase* in the United Kingdom. v. 62, n. 6, p. 1261-1264, 2008.

ZAVASCKI, A. P.; GASPARETO, P. B.; MARTINS, A. F.; GONÇALVES, A. L.; BARTH, A. L. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-β-lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.** v.56, p. 1148-1151, 2005.