

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E PRESENÇA DE β -
LACTAMASES DE ESPECTRO EXPANDIDO (ESBLs) EM**

Aeromonas.

ADRIANA DE CARLI

Caxias do Sul

2006

ADRIANA DE CARLI

**RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E PRESENÇA DE β -
LACTAMASES DE ESPECTRO EXPANDIDO (ESBLs) EM**

Aeromonas.

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade
de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau
de Mestre em Biotecnologia.**

Mestranda: Adriana De Carli

Orientador: Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa

Co-orientador: Dr. Sergio Echeverrigaray

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa, pelo acompanhamento, confiança, sabedoria e competência com que conduziu a orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray, pela inteligência, que admiro muito, ensinamentos e apoio constante durante todo o desenvolvimento desta pesquisa e, principalmente, pela compreensão e estímulo que me deu para superar as dificuldades.

Ao Jucimar e ao Júnior, pelo auxílio, apoio e companheirismo.

À Luciana, pela amizade e palavras de força e coragem.

A todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada, pela colaboração, ótima convivência e amizade.

Ao Dr. Jéferson Luis Mezzomo, meu amigo e companheiro de profissão, pelo apoio constante nas horas difíceis.

Aos professores Doutores Ana Paula Longaray Delamare e Dagoberto Vanoni Godoy pela disponibilidade, atentas críticas, sugestões e auxílio nas revisões.

À minha família, principalmente ao Gustavo, meu irmão, pela ajuda, conforto e carinho.

À Universidade de Caxias do Sul e ao Instituto de Biotecnologia, pela oportunidade que me foi dada de fazer parte, ainda que temporariamente, de seu quadro de pesquisadores e de sua estrutura acadêmica.

**Ao Rogério e à Marina,
pelas horas de ausência.**

INDICE	
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Resistência bacteriana a antimicrobianos	16
2.1.1 Resistência a antibióticos β-lactâmicos	17
2.1.2 Resistência a outros antimicrobianos	25
2.2 Epidemiologia das β-lactamases de efeito expandido (ESBLs)	27
3 O GÊNERO <i>Aeromonas</i>	31
3.1 Epidemiologia	31
3.2. Fatores de virulência em <i>Aeromonas</i>	32
3.3. Distribuição e Expressão de genes de resistência a antibióticos em <i>Aeromonas</i>	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Resistência a antibióticos em isolados de <i>Aeromonas</i>	47
4.2 Presença de β-lactamases de efeito ampliado (ESBLs) em <i>Aeromonas</i>	56
4.3 Atividade β-lactamásica em <i>Aeromonas</i>	63
5 CONCLUSÕES	70
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de <i>Aeromonas</i> avaliados .	37
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para a caracterização de β -lactamases de efeito expandido(ESBLs) em <i>Aeromonas</i> .	41
Tabela 3. Comprimentos de onda espectrofotométrica para antibióticos.	45
Tabela 4. Antibiogramas de 62 isolados de <i>Aeromonas</i> .	48
Tabela 5. Teste fenotípico de β -lactamases de efeito expandido (ESBLs) em <i>Aeromonas</i> .	57
Tabela 6. Resistência a antibióticos nas linhagens DH5 α , IBAer 114 e conjugantes selecionados em cloranfenicol e ampicilina.	62
Tabela 7. Atividade β -lactamásica de extratos de <i>Aeromonas</i> sobre distintos substratos β -lactâmicos.	64
Tabela 8. Efeito do EDTA e PMSF sobre a atividade penicilinásica e cefalosporinásica dos extratos brutos de IBAer 114.	66
Tabela 9. Inativação térmica das β -lactamases dos isolados IBAer 114 e IBAer 107.	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Antibiogramas representativos de dois isolados de <i>Aeromonas</i> .	47
Figura 2. Percentagem de isolados de <i>Aeromonas</i> resistentes e sensíveis a antibióticos β -lactâmicos.	50
Figura 3. Percentagem de isolados de <i>Aeromonas</i> resistentes e sensíveis a outros antibióticos.	52
Figura 4. Variação nas percentagens de resistência à tetraciclina e clotrimazol entre isolados humanos e suínos.	53
Figura 5. Perfil plasmidial de isolados de <i>Aeromonas</i> .	56
Figura 6. Amplificação do fragmento correspondente ao gene TEM (717 pb) no isolado IBAer 114.	59
Figura 7. Amplificação de genes da família CTX em <i>Aeromonas</i> .	60
Figura 8. Amplificação de genes <i>ampC</i> em <i>Aeromonas</i> .	60
Figura 9. Presença do gene CTX(a) e TEM(b) em conjugantes IBAer 114 e <i>E.coli</i> K12	63
Figura 10. Atividade β -lactamásica dos extratos de <i>Aeromonas</i> sobre distintos substratos β -lactâmicos.	65
Figura 11. Efeito do EDTA e PMSF sobre a atividade penicilínica e cefalosporínica dos extratos brutos de IBAer 114.	66
Figura 12. Inibição da atividade penicilínica dos extratos brutos dos isolados IBAer 114, IBAer 107, IBAer 130 e Clo 1.	67
Figura 13. Inativação térmica das β -lactamases dos isolados IBAer 114 e IBAer 107.	68
Figura 14. Inativação térmica a 50°C das penicilinas presentes em extratos brutos de IBAer 114.	69

RESUMO

O gênero *Aeromonas* representa um importante grupo de patógenos emergentes responsáveis por diversas afecções em animais e em humanos. Nestes, as *Aeromonas* têm sido associadas a infecções intestinais e extraintestinais em pessoas imunocompetentes e comprometidas, tanto na comunidade como em ambiente hospitalar. É de consenso geral que a resistência a antibióticos nessas bactérias pode vir a representar um problema potencial no tratamento das infecções. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a frequência de resistência a distintos antibióticos em bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas de humanos e de suínos, com ênfase na resistência a antibióticos β -lactâmicos. Foram avaliados um total de 62 isolados, frente a um painel de 15 antibióticos, evidenciando-se uma elevada percentagem de bactérias resistentes a mais de três antibióticos β -lactâmicos, além de alta resistência à tetraciclina, ao cotrimazol e ao cloranfenicol. Entre os antibióticos testados, os mais eficazes contra as *Aeromonas* foram os ciprofloxacina, os gentamicina e os tobramicina. Alta frequência de *Aeromonas* resistentes à tetraciclina e ao cotrimazol foi evidenciada em isolados de suínos, mostrando a importância da pressão de seleção exercida por uso indiscriminado desses antibióticos nas rações. A maior parte dos isolados com resistências múltiplas apresentou plasmídios conjugativos e alguns plasmídios de baixo peso molecular; os quais, em princípio, podem estar associados à resistência a antibióticos. Entre os isolados com resistência a vários antibióticos β -lactâmicos, um apresentou características fenotípicas

de ESBL. A análise, através de PCR, confirmou a presença de três genes de β -lactamases de espectro expandido (TEM, CTX e ampC) neste isolado. Os genes TEM e CTX foram transferidos por conjugação para *E. coli*, junto com a resistência ao cloranfenicol e à gentamicina, indicando que todos esses genes se encontram em plasmídeo conjugativo. A análise da atividade β -lactamásica em três isolados mostrou que a mesma é muito elevada em bactérias desse gênero. No isolado portador de ESBLs, as metalo- β -lactamases são responsáveis pela maior parte da atividade penicilinásica e apenas por uma pequena parte da atividade sobre cefotaxima. Constatou-se ainda que a atividade β -lactamásica de *Aeromonas* é inibida por temperaturas acima de 40°C, apresentando um decréscimo linear da atividade em função do tempo.

ABSTRACT

The genus *Aeromonas* represents an important group of emergent pathogens responsible for several disorders in animals and humans. In humans there are associated with intestinal and extra-intestinal infections in immunocompetent and compromised person of the community and hospital settings. It is of general concern that antibiotic resistance will potentially become a problem among *Aeromonas* strains causing infections. In this sense, the objective of the present work was to evaluate the frequency of resistance to different antibiotics in *Aeromonas* isolated from humans and suines, with enfasis in the resistance to β -lactamic antibiotics. A total of 62 isolates were evaluated against a panel of 15 antibiotics showing high percentage of resistance to more than three β -lactam antibiotics, as well as resistance to tetracycline, cotrimazol and cloranphenicol. The most efficient antibiotics against *Aeromonas* were ciprofloxacin, gentamicin, and tobramicin. High frequency of tetracyclin and cotrimazol resistance was evidenced among suine isolates, showing the selection pressure effect exerced by the indiscriminate use of these antibiotics on feed. Most isolates with multiple resistance harbored conjugative plasmids and some exhibited low molecular plasmids, that may be associated with antibiotic resistance. Among isolates with multiple resistance to β -lactam antibiotics, one showed a characteristic ESBL phenotype. PCR analysis confirmed the presence of three extended spectrum β -lactamase genes (TEM, CTX, and ampC) in this isolate. The TEM and CTX genes were transferred by conjugation to *E. coli*, together

with the resistances to chloranphenicol and gentamicin, indicating that all these genes are present in a conjugative plasmid. The analysis of β -lactamase activity in three isolates showed that is very high in this *Aeromonas*. In the isolate with ESBLs, the metallo- β -lactamases are responsible for the main penicillinasic activity but just for a small part of the activity on cefotaxime. The β -lactamasic activity of *Aeromonas* is inhibited by temperatures over 40°C, showing a linear decrease on the activity in function of time.

1. INTRODUÇÃO

Quando surgiram os primeiros antibacterianos entre o início e meados do século XX, uma euforia geral tomou conta da humanidade, supondo que os mesmos acabariam com alguns dos mais importantes flagelos como a sífilis, a tuberculose, as pneumonias, o cólera, entre outras doenças causadas por bactérias. Entretanto, quase imediatamente foi constatado que os microrganismos, através de mutações, de transferência horizontal e vertical de genes e sob efeito da crescente pressão de seleção, rapidamente poderiam adquirir resistência aos antibacterianos utilizados, obrigando ao desenvolvimento constante de novos produtos.

Hoje, dados internacionais apontam que 70% das bactérias isoladas em hospitais apresentam resistência a, pelo menos, um dos antibióticos mais comumente utilizados; e diversas espécies bacterianas com potencial patogênico apresentam resistências múltiplas a antibióticos. (Adriana, fiz uma alteração aqui – inversão de termos na frase. Releia).

O aumento da frequência de microrganismos, particularmente bactérias, resistentes a antibióticos vem se tornando uma preocupação crescente em termos de saúde pública com reiterados alertas por parte de organizações nacionais e internacionais como o FDA (U.S. Food and Drug Administration), o CDC (Center for Disease Control and Prevention), WHO (World Health Organization), entre outras. Tal preocupação levou à criação, em 1996, do NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System)

nos Estados Unidos e, em 1998, do EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) na Europa. Essas organizações visam levantar constantemente dados relativos ao aumento e à dispersão da resistência a antibióticos em nível hospitalar, comunitário e ~~no meio~~ ambiental.

As bactérias do gênero *Aeromonas*, consideradas patógenos emergentes, são encontradas em praticamente todos os ambientes, podendo estar associadas a animais, a vegetais e ao homem. Em humanos, essas bactérias podem causar distintos tipos de doenças, como gastroenterites, otites, infecções cutâneas, bacteremias, septicemias, entre outras. Em animais, as informações são limitadas, mas sabe-se que elas estão presentes em peixes, moluscos, aves, suínos, entre outros.

Em termos de resistência a antibióticos, as *Aeromonas* representam um grupo particularmente preocupante, já que a maior parte das espécies e isolados possuem resistência a um ou mais antibióticos β -lactâmicos, em decorrência da presença de genes que codificam metalo- β -lactamases. Por outro lado, a sua ampla distribuição, a sua associação com animais e seu desenvolvimento em sistemas aquáticos e no solo ajudam a imprimir uma importante pressão de seleção para resistência a outros antibióticos como tetraciclina, sulfas, etc. Além disso, essas bactérias apresentam elevada capacidade de intercâmbio de genes entre si e com outros grupos bacterianos (enterobactérias, víbrios, etc.).

Assim sendo, o objetivo do presente trabalho é avaliar a frequência de resistência a distintos antibióticos em bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas de humanos e de suínos, com ênfase na resistência a antibióticos β -lactâmicos.

Os objetivos específicos podem ser resumidos em: (1) avaliação da resistência a

antibióticos em isolados de *Aeromonas*; (2) determinação fenotípica da presença de β -lactamases sensíveis ao ácido clavulânico; (3) avaliação da presença de genes codificadores de β -lactamases de efeito ampliado (ESBLs); (4) estudo do perfil plasmidial de *Aeromonas* resistentes a antibióticos; (5) avaliação da transferência conjugativa interespecífica de genes de resistência; e (6) determinação da atividade β -lactamásica em *Aeromonas*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O recente desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos em patógenos bacterianos, tanto de origem hospitalar como comunitário, representa uma das maiores preocupações mundiais. Assim, paralelamente ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas drogas, os microrganismos têm demonstrado uma grande capacidade de adaptação a essas drogas, conforme comprovam os estudos de Jones e Pfaller, 1998 e de Tenover (2001).

2.1 Resistência bacteriana a antimicrobianos

Os mecanismos bioquímicos de adaptação ou de resistência bacteriana incluem principalmente a inativação enzimática, a alteração da permeabilidade de membrana e a exclusão ativa do antimicrobiano; além de alteração nos receptores de fixação da droga, seja parede celular, ribossomo ou DNA cromossômico; e, por fim, modificações no sistema metabólico ou na síntese enzimática (Tavares, 2001).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um fenômeno genético e pode ser dividida em natural e adquirida. A natural ou intrínseca está relacionada a uma propriedade genética estável codificada pelo DNA cromossomal de acordo com Tavares (idem).

Ainda segundo Tavares (ibid.) e Padilha e Costa (2004), a resistência adquirida pode manifestar-se em apenas algumas cepas de uma mesma espécie bacteriana e,

portanto, imprevisível, resultando de mutação genética e/ou pela transferência horizontal de genes de resistência de outros microrganismos tanto de origem cromossomal quanto extracromossômica, representada pelos plasmídios e transposons.

Estudos de Tenover (2001) demonstram que, sem dúvida, a resistência bacteriana já era existente e conhecida, mas, atualmente, com a ampla utilização de inúmeras drogas, ocorre uma poderosa pressão seletiva às bactérias, levando ao aparecimento de cepas multiresistentes.

2.1.1. Resistência a antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos são medicamentos amplamente prescritos e úteis no combate de inúmeras bactérias.

Todas as classes possuem em comum o anel β -lactâmico e também compartilham um mecanismo de ação comum que é a morte bacteriana por inibição da síntese da parede celular constituída por peptidoglicanos.

As paredes celulares das bactérias são essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento normais. O peptidoglicano é um componente heteropolimérico da parede celular, o qual fornece uma rígida estabilidade mecânica por meio de uma estrutura em treliça com alto índice de ligações cruzadas.

A biossíntese do peptidoglicano envolve cerca de trinta enzimas bacterianas e se dá em três estágios, sendo o estágio final inibido pelos antibióticos β -lactâmicos, ou seja, ocorre uma inibição das transpeptidases com formação de esferoplastos e lise celular, segundo Petri Jr. (2001).

As classes importantes das penicilinas incluem as penicilinas G e V, altamente ativas contra cocos Gram-positivos sensíveis; as penicilinas resistentes a penicilinases, como a nafcilina, que são ativas contra o *Staphylococcus aureus*; a ampicilina e outros agentes com um espectro ampliado para Gram-negativos e as penicilinas de espectro expandido com atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, como a ticarcilina e a piperacilina (Petri Jr., 2001).

Os antibióticos do grupo das cefalosporinas são classificados por geração. Os agentes de primeira geração têm atividade contra Gram-positivos e atividade modesta contra Gram-negativos; os de segunda geração têm atividade um pouco melhor contra Gram-negativos e incluem alguns agentes com atividade anti-anaeróbica; os de terceira geração têm menos atividade contra Gram-positivos, porém atividade mais intensa contra as *Enterobacteriaceae*; e os de quarta geração, com um espectro semelhante ao da geração anterior, têm entretanto maior estabilidade à hidrólise por β -lactamases (Petri Jr., 2001).

Os mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos β -lactâmicos podem ser através de proteínas de ligação das penicilinas (PBPs), por impossibilidade de atingir o sítio ativo e por inativação enzimática. Esta pode ser através da produção de β -lactamases tipo penicilinases ou cefalosporinases, ou através da produção de β -lactamases de efeito expandido, conforme Petri Jr. (idem).

As β -lactamases constituem um grupo grande e heterogêneo de enzimas com mutações pontuais que levam a alterações na seqüência de aminoácidos e que, pela mediação de genes cromossomais ou plasmídiais, podem estar presentes em um número variável em espécies bacterianas.

As β -lactamases são amplamente distribuídas entre inúmeras espécies bacterianas e representam o principal grupo de enzimas envolvidas no mecanismo de resistência do tipo inativação enzimática para antimicrobianos β -lactâmicos, de acordo com Livermore (1995).

As β -lactamases são capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico através dos seguintes mecanismos: um, que utiliza o zinco como co-fator para a atividade enzimática, que é o menos freqüente; e outro, em que o anel β -lactâmico é atacado pela hidroxila livre da cadeia lateral do resíduo de serina, localizado no sítio ativo da enzima. Isso produz um éster acil covalente que sofre uma hidrólise e libera a enzima ativa e a droga inativada (Waley,1987).

Nas bactérias Gram-positivas, as β -lactamases são secretadas para o meio extracelular, tornando-se menos eficientes do que as β -lactamases produzidas pelas Gram-negativas, as quais estão localizadas no espaço periplasmático, entre a membrana e a parede celular, atingindo assim altas concentrações e maior eficácia.

De acordo com a classificação de Bush, Jacoby e Medeiros (1995), três grupos de β -lactamases possuem maior importância clínica: as β -lactamases do tipo *Amp C*, as β -lactamases que hidrolisam carbapenemos e as β -lactamases de espectro expandido.

As β -lactamases do tipo *Amp C*, do grupo 1 da classificação de Bush, Jacoby e Medeiros (1995) ou na classe C de Ambler (1980), são enzimas codificadas por genes cromossomais, apresentam graus variáveis de expressão entre espécies bacterianas, são resistentes à inibição pelo ácido clavulânico e sulbactam e podem ser induzidas por antibióticos β -lactâmicos. Essas enzimas podem conferir resistência a quase todos os β -lactâmicos, incluindo as penicilinas de amplo espectro, as cefalosporinas de segunda e

terceira gerações (cefepodoxima, ceftazidina, cefotaxima e ceftriaxone), as combinações com inibidores de β -lactâmicos e os monobactâmicos (aztreonam), exceto os carbapenêmicos (imipenem e meropenem) e as cefalosporinas de quarta geração (cefepima), de acordo com Sanders & Sanders (1998) e Livermore (1995).

O segundo grupo de relevância clínica diz respeito às β -lactamases de espectro expandido (ESBL, da sigla Extended-Spectrum β -Lactamases) e foram classificadas no grupo 2 de Bush, Jacoby e Medeiros (1995) ou classe A de Ambler (1980). O primeiro isolado de ESBL ocorreu na Alemanha, em 1983, em *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens* (Knoth *et al.*, 1983) e em seguida, entre 1985 e 1987, surtos de infecção por *K. pneumoniae* portadoras de ESBLs foram registrados em vários países europeus, como a França (Burn-Buisson *et al.*, 1987; Sirot *et al.*, 1987) e posteriormente, em 1989 e 1990, nos Estados Unidos (Quinn *et al.*, 1989; Jacoby, 1996).

As ESBLs contêm uma serina no sítio ativo e surgiram por mutações, com substituição de um ou mais aminoácidos próximos a esse sítio de tal modo que são encontradas variações nos seus níveis de atividade contras as cefalosporinas de terceira geração (Ambler, 1980; Jacoby, 1997). Conseqüentemente, as bactérias portadoras de ESBLs podem variar no padrão de resistência *in vitro*, dificultando a detecção desse fenótipo de resistência pelos testes de sensibilidade utilizados na rotina pelos laboratórios de microbiologia clínica (Jacoby, 1997).

Os genes que codificam para as enzimas ESBL estão geralmente localizados em plasmídios conjugativos, os quais podem transferir junto com a resistência a β -lactâmicos, determinantes de resistência a aminoglicosídeos, tetraciclinas, fluorquinolonas, cloranfenicol, trimetoprin, sulfonamidas, entre outros (Fernández-

Rodriguez , 1992; Jacoby & Sutton, 1991, Philippon, Arlet & Lagrange, 1994). Além disso, esses genes usualmente estão localizados em elementos genéticos móveis, os transposons, que podem, por meio de uma série de eventos de transposição e rearranjo, migrarem para diferentes plasmídios entre microrganismos da mesma espécie ou de espécies diferentes, aumentando a disseminação desse tipo de resistência, ainda de acordo com Jacoby & Sutton (1991); Philippon, Arlet & Lagrange (1994).

Com base na semelhança genética, e conseqüentemente, na seqüência de aminoácidos, as ESBLs são classificadas em famílias.

A primeira família é a da enzima TEM-1 - a β -lactamases (ESBL), mais encontrada nas bactérias Gram-negativas, sendo a responsável por mais de 90% da resistência à ampicilina em *E. coli*. Além disso, ela é capaz de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de primeira geração (Livermore, 1995).

A família TEM-1 é altamente polimórfica, sendo conhecidas mais de 130 enzimas dessa família. Este elevado polimorfismo tem sido útil para acompanhar a disseminação de genes de resistência individual (Jacoby & Bush, 2005).

A enzima TEM-1 foi encontrada em *E. coli*, no início dos anos 60, em um paciente na Grécia, chamado Temoniera, de onde surge a sua designação TEM. Poucos anos foram necessários para a sua disseminação, podendo atualmente ser encontrada em diferentes espécies de membros da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, entre outras espécies (Medeiros, 1984; Bradford, 2001).

Os variantes TEM-10, TEM-12 e TEM-26 estão entre as ESBLs mais comuns na América do Sul e América do Norte, segundo Paterson *et al.* (2003).

Na última década, variantes de TEM, resistentes a inibidores como ácido clavulânico e sulbactam, têm sido descritas. Segundo Bonomo *et al.* (1997) e Chaibi *et al.* (1999), essas variantes ainda preservam sensibilidade ao tazobactam.

Lefon-Guibout *et al.* (2000) encontraram 41% de isolados de *E. coli* portadores de TEM resistente a inibidores em hospitais da França, fato que mostra a elevada prevalência e disseminação dessa característica.

A seguir temos a família SHV, onde mais de 50 variantes são atualmente conhecidas, conforme Jacoby & Bush (2005), sendo as variantes SHV-5 e SHV-12 as mais comuns, segundo Paterson *et al.* (2003).

A SVH-1 é mais comumente encontrada em *K. pneumoniae*, sendo responsável por mais de 20% da resistência à ampicilina, mediada por plasmídios nesta espécie, segundo estudos de Tzouveleki e Bonomo (1999).

A maioria das variantes de SHV possui fenótipo de ESBL, caracterizadas pela substituição de um ou outro aminoácido, a qual determina maior ou menor especificidade por um determinado substrato. Assim sendo, a substituição da serina localizada na posição 238 por uma glicina reduz a eficiência de hidrólise da ceftazidima. A variante SVH-5 apresenta uma substituição da lisina da posição 240 por um glutamato, fato que reduz a eficiência na hidrólise de cefotaxima (Huletsky *et al.*, 1993).

Conforme Bradford (2001), além de *K. pneumoniae*, essas enzimas (SVH) têm sido encontradas em *Citrobacter diversus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras bactérias.

Uma nova família de ESBLs é representada pela CTX-M, inicialmente descrita na segunda metade dos anos 80, tendo crescido sua prevalência drasticamente a partir de

1995, afirma Bonet (2004). Ela tem sido encontrada em *Aeromonas sp*, *Salmonella enterica*, *E. coli* e outras espécies de *Enterobacteriaceae*. (Bradford, 2001).

A CTX-M tem aproximadamente 40% de semelhança com as famílias TEM e SHV. Estudos têm mostrado que ela hidrolisa cefalotina melhor que benzilpenicilina e preferencialmente hidrolisa cefotaxime que ceftazidine. Segundo Tzouvelekis *et al.* (2000), suspeita-se que o resíduo de serina na posição 237 é que fornece esse espectro de atividade.

Por definição, a β -lactamase CTX-M determina alto nível de resistência a aminopenicilinas (ampicilina ou amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina ou ticarcilina), ureido-penicilinas (piperacilina) e cefalosporinas de espectro estreito (cefalotina, cefaloride e cefuroxime), de acordo com pesquisas de Poirel *et al.* (2001 e 2002). As enzimas dessa família são eficientemente inibidas por tazobactam, mas pouco sensíveis a sulbactam ou clavulanato, segundo mostram os estudos de Sabetè *et al.* (2000); Tzouvelekis *et al.* (2000) e Bonnet (2004).

Isolados bacterianos portadores de CTX-M são mais encontrados na Europa oriental, América do Sul, Japão, China, Coreia, Tailândia, Vietnam e Índia. Entretanto, estudos recentes de Sabèté *et al.* (2000) mostraram a presença de CTX-M em 23 isolados espanhóis de *E. coli* e *Salmonella*, sugerindo um foco endêmico dessa enzima na Europa ocidental.

Os progenitores genéticos de CTX-M são de cromossomos *bla* das espécies *K. ascorbata*, *K. georgiana* e *K. cryocescens*, assim como outras espécies desconhecidas da família *Enterobacteriaceae*. Diferentes elementos, incluindo ISEcp 1 e Orf 153 podem estar envolvidos na transferência plasmidial desse gene, o codificador de CTX-M,

conforme Bonnet (2004). As lactamases da família OXA são representantes da classe funcional D e grupo funcional 2d, segundo Bush, Jacoby & Medeiros (1995). Esse tipo de ESBL confere resistência à ampicilina e à cefalotina e é caracterizado por sua alta atividade hidrolítica contra oxacilina e cloxacilina, sendo pobremente inibido por ácido clavulânico (Bradford, 2001).

As OXA têm sido encontradas principalmente em *Pseudomas aeruginosa* e são derivadas da OXA-10, com as seguintes substituições de aminoácidos: uma asparagina para serina na posição 73 ou um aspartato para glicina na posição 157. Em particular, esta última pode ser necessária para o alto nível de resistência à ceftazidima (Danel *et al*, 1999). A maioria das OXA conferem resistência à ceftazidima; e a OXA-17 confere resistência à cefotaxima e à ceftriaxone (ibidem, 1999).

As β -lactamases Amp C são mediadas por plasmídios e podem conferir resistência aos β -lactâmicos em *E. coli*, *Klebsiella* sp e *Salmonella* sp. Caracteristicamente, promovem resistência a cefamixinas e a oximino- β -lactâmicos, sendo resistentes também ao ácido clavulânico (Jacoby & Munoz-Price, 2005). Íntegrans estão envolvidos na aquisição do gene *Amp C* por parte de plasmídios conjugativos ou multicópia.

No grupo 3, conforme Bush, Jacoby e Medeiros, encontram-se as metalo- β -lactamases, enzimas codificadas por genes cromossômicos ou plasmidiais capazes de degradar praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos, exceto os monobactâmicos. Não são inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam, mas pelo EDTA (ácido etilenodiamino tetracético); e pelo ácido 2-mercaptopropiânico. As enzimas metalo- β -lactamases têm sido descritas em amostras de *Stenotrophomonas maltophilia*,

Burkholderia cepacia, *Aeromonas spp*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp* e *Pseudomonas aeruginosa* (Bush, 1989; Livermore, 1991; Senda *et al*, 1996 ; Kohl, 1999).

A determinação da produção das metalo- β -lactamases por PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) é a técnica mais adequada e satisfatória para sua confirmação. No entanto esse método tem um custo elevado e necessita de capacitação profissional para realizá-lo.

Arakawa *et al.* (2000) testaram vários produtos químicos inibidores das metalo- β -lactamases, estabelecendo um método de difusão com duplo disco, utilizando ácido-2 mercaptopropiônico. Entretanto seu uso é limitado em virtude da alta volatilidade desse composto.

Considerando os fatos descritos, Nakagima *et al.*(2001) propuseram um teste utilizando mercaptoacetato de sódio para triagem das metalo- β -lactamases. Esse método apresenta uma correlação de 94% com a análise molecular, usando-se a técnica de PCR; e a característica de ter alta reprodutibilidade, facilidade de execução e baixo custo, além de ter a vantagem de ser um composto estável, afirmam Santos Filho *et al* (2002).

2.1.2. Resistência a outros antimicrobianos

Com relação às tetraciclinas, os microrganismos que se tornaram resistentes a uma tetraciclina freqüentemente exibem resistência às demais. Em geral essa resistência é mediada por plasmídios e constitui um traço induzível. Os três principais mecanismos de resistência são: diminuição de acúmulo de tetraciclina em consequência de uma redução do influxo do antibiótico ou da aquisição de uma via de efluxo dependente de energia;

acesso reduzido das tetraciclinas ao ribossoma, devido à presença de proteínas que protegem o ribossoma; inativação enzimática das tetraciclinas, conforme estudos de Petri Jr. & Mandell (2001).

As bactérias podem ser resistentes à atividade antimicrobiana dos aminoglicosídeos em virtude da impossibilidade de penetração do antibiótico, da baixa afinidade do fármaco pelo ribossoma bacteriano ou da inativação do fármaco por enzimas microbianas. Os genes dessas enzimas são adquiridos primariamente por conjugação e transferência de DNA na forma de plasmídios e de fatores de transferência de resistência. Esses plasmídios, que se tornaram disseminados na natureza (especialmente em ambientes hospitalares), codificam um grande número de enzimas (mais de 20) e reduziram acentuadamente a utilidade clínica dos aminoglicosídeos. A amicacina é menos vulnerável a essas enzimas inativadoras, devido a cadeias laterais moleculares protetoras.

A aquisição de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos por enterococos tornou-se uma preocupação. Em diversos centros, um percentual significativo desses enterococos isolados, mostra-se altamente resistente a todos aminoglicosídeos por esse mecanismo de inativação enzimática. A resistência à gentamicina indica resistência à tobramicina, amicacina, canamicina e metilmicina, visto que a enzima inativadora é bifuncional e modifica todos esses aminoglicosídeos. Ocorre perda do efeito bactericida sinérgico da penicilina ou da vancomicina em associação a um aminoglicosídeo sobre enterococos.

A resistência decorrente de alterações na estrutura ribossômica é relativamente rara com os aminoglicosídeos, exceto com a estreptomicina, conforme Chambers (2001).

A resistência a sulfonamidas pode ocorrer em decorrência de mutações ao acaso ou por transferência plasmidial de genes de resistência. O mecanismo de resistência é geralmente determinado por uma alteração enzimática na célula bacteriana, caracterizada por baixa afinidade das sulfonamidas por enzimas que usam PABA diidropteroatosintase; diminuição da permeabilidade bacteriana ou efluxo ativo da droga; via metabólica alternativa para síntese de metabólitos; aumento na produção de metabólitos essenciais ou antagonistas a essa droga.

Com relação ao trimetopim + sulfametozol, o aumento da resistência bacteriana tem preocupado muito. Sabe-se que esta se deve à aquisição plasmidial, que causa uma alteração na diidrofoloreductase. Atualmente é um problema especial a resistência ao trimetoprim segundo Petri Jr. & Mandell (2001), por isso pacientes aidéticos, portadores de *Entobacteriaceae*, que recebem trimetopim + sulfametoxazol para profilaxia de pneumonia por *Pneumocystis carinii*, exigem especial atenção.

A resistência às quinolonas pode se desenvolver durante a terapia, via mutações em genes cromossomais bacterianos, codificando a DNA girase ou topoisomerase IV, ou por efluxo da droga (Oethinger et al,2000).

A resistência à cloranfenicol é, usualmente, causada por um plasmídeo decodificando acetiltransferase que inativa a droga por acetilação.

2.2. Epidemiologia das β -lactamases de efeito expandido (ESBLs)

As ESBLs são atualmente um problema mundial em pacientes hospitalizados. Isso começou na Europa ocidental pelo uso inicial de antibióticos β -lactâmicos de amplo espectro, conforme Jacoby & Munoz-Price (2005).

Nos Estados Unidos, a prevalência de bactérias com ESBL varia de 0 a 25%, dependendo da instituição, com média nacional de 3% (CDC National Nosocomial Infections Surveillance). Já na Europa, a prevalência depende de cada país; na Holanda, por exemplo, a prevalência é de menos de 1%, e na França, em torno de 40%, de acordo com Bradford (2001). No Japão, o percentual de resistência à β -lactâmicos por produção de ESBLs é muito pequeno, em torno de 0,1% em *E. coli* e 0,3% em *K. pneumoniae* (Yagi *et al*, 2000).

Com relação às ESBLs específicas, temos algumas regiões ou países que são referências. Por exemplo, a TEM-10 tem sido responsável por surtos nos Estados Unidos (Barroso *et al*, 2000); A TEM-3 é comum na França (Griadkowski *et al*, 1998); a TEM-47 tem surgido em surtos na Polônia; a SHV-12 e a SHV-2 são comumente encontradas na Coreia (Pai *et al*, 1999). Enfim, as ESBLs estão disseminadas mundialmente e a prevalência pode variar muito entre as áreas geográficas e entre as instituições.

As ESBLs ocorrem tipicamente em patógenos nosocomiais, principalmente em unidades de tratamento intensivo, ocasionando surtos severos, segundo foi constatado por vários pesquisadores: Winokur *et al*. (2001); Peterson *et al*. (2003); Navon-Venezia *et al*. (2003); Pessoa-Silva *et al*. (2003); Eckert *et al*. (2004); Jacoby & Munoz-Price (2005). Os fatores de risco específicos incluem: duração da internação hospitalar, severidade da doença, tempo em Unidade de Tratamento Intensivo, entubação e ventilação mecânica, cateterização urinária ou arterial e exposição prévia a antibióticos (RICE, 2005).

Com relação ao tratamento, o sucesso para o controle da disseminação dos organismos produtores de ESBLs envolve o uso de diferentes classes de antibióticos de

amplo espectro, principalmente, imipenem e piperacilina-tazobactam, afirmam Jacoby & Munoz-Price (2005).

Embora os produtores de ESBLs sejam isolados com maior frequência em amostras procedentes de pacientes hospitalizados, dados recentes sugerem que infecções por estes microrganismos já estão ocorrendo e poderão representar um problema emergente em pacientes não hospitalizados em diferentes países, como Irlanda, França, Polônia, Espanha, Estados Unidos, Israel, entre outros (Bradford *et al*, 2001; Goldstein, 2000; Lescure *et al*, 2001; Borer *et al*, 2002; Arpin *et al*, 2003; Rodriguez-Baño *et al*, 2004).

O aumento de prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs criou uma grande necessidade de testes laboratoriais que identifiquem com grande acurácia a presença dessas enzimas em isolados clínicos (Bradford, 2001). Assim sendo, em 2004, o NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) e atualmente o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), órgão responsável pela padronização de técnicas laboratoriais nos Estados Unidos, reavaliou seus procedimentos e critérios de interpretação, pois muitas vezes eram de difícil execução ou inacessíveis para muitos laboratórios e, também, ocorriam falhas na detecção dos fenótipos das ESBLs devido à falta de concordância dos resultados de concentração inibitória mínima (CIM).

Atualmente, o procedimento de rotina para triagem, recomendado pelo CLSI para detecção de ESBLs de amostras de *K. pneumoniae*, de *K. oxytoca* e de *E. coli* envolve antibiograma por disco-difusão ou diluição seriada em caldo de cultura com um ou mais antibióticos β -lactâmicos. A estes testes iniciais seguem-se os testes confirmatórios, nos quais há discos que medem a suscetibilidade à ceftazidima e à cefotaxima isoladas e

combinadas com ácido clavulânico (Jacoby & Munoz-Price, 2005).

As ESBLs são um grupo de enzimas heterogêneas que podem apresentar diferentes graus de atividades e de sensibilidades, dependendo do tipo do substrato testado. A suspeita do tipo de ESBL, conforme os dados epidemiológicos da literatura e da instituição, pode ser útil na determinação da escolha dos substratos.

Outro teste confirmatório preconizado é o teste de aproximação duplo-disco, quando se coloca um disco com amoxicilina-clavulanato e um outro contendo antibióticos β -lactâmicos. Uma alteração desse teste foi proposta por Jacoby e Han (1996), substituindo o disco de amoxicilina-clavulanato por sulbactam. Além dos anteriores ainda temos o teste tridimensional descrito por Thomson e Sanders (1992) e o E-test-ESBL, que envolve um gradiente de ceftazidima e de ácido clavulânico. Em geral, esses testes procuram uma redução da concentração inibitória mínima (CIM) na cefalosporina em presença de um inibidor de β -lactamase, dizem Thomson *et al.* (1999).

Apesar de todos estes testes serem utilizados, não existe consenso em relação à melhor metodologia que deva ser adotada (padrão-ouro). Trabalhos têm avaliado a acurácia desses testes e identificado as vantagens e limitações de cada um, visto que, no momento, nenhum deles apresenta 100% de sensibilidade ou especificidade para a detecção das ESBLs entre isolados clínicos de bactérias Gram-negativas (Bradford, 2001).

Nos últimos anos, têm surgido vários testes moleculares, que visam à identificação de enzimas ou de genes codificadores de ESBLs, como PFGE (pulsed-field gel electrophoresis), RAPD (random amplified polymorphic DNA) e PCR (polimerase chain reaction).

A detecção dos genes de β -lactamases é melhor pesquisada através de PCR com o uso de seqüências iniciadoras genéricas ou específicas, com ou sem utilização de enzimas de restrição (RFLP-PCR), ou ainda, por análise conformacional dos segmentos amplificados (SSCP) ou seqüenciamento dos mesmos, segundo Bradford (2001).

3. O gênero *Aeromonas*

As bactérias do gênero *Aeromonas* pertencem à família *Aeromonadaceae*, são anaeróbicas facultativas, representadas por bacilos Gram-negativos, conforme estudos de Martinez-Murcia *et al.* (1992), Kita-Tsukamoto *et al.*(1993) e Madigan *et al.* (2004). Podem ocorrer isoladas, aos pares ou em cadeias curtas. São oxidase e catalase positivas, reduzem nitrato a nitrito e fermentam a D-glicose com formação de ácido e/ou gás. A grande maioria das espécies cresce a uma temperatura bastante variada, entre 0-45°C (faixa ótima entre 22-28°C), toleram pH de 4,5-9,0 e apresentam comprovada tolerância à salinidade (Popoff *et al.*, 1981; Delamare *et al.*, 2000).

Segundo Popoff (1984), as espécies são divididas em dois grupos, baseados na motilidade e características térmicas de crescimento. As imóveis e psicrófilas representadas pela *A. salmonicida*. As móveis e mesófilas como *A. caviae*, *A. veronii* biótipo *sobria* e *A. hydrophila*.

3.1. Epidemiologia

Aeromonas sp são extremamente distribuídas e podem ser isoladas em ambiente aquático, como rios, lagos, água do mar, reservatórios, locais de tratamento de água potável e de esgoto (Krovacek *et al.*, 1994; Borrel *et al.*, 1997; Chacón *et al.*, 2003),

sendo reconhecidas como patógenos ocasionais de peixes e outros animais de sangue frio, de acordo com Krovacek *et al* (1994), Borrel *et al* (1997) e Santos *et al.* (1999). Atualmente, têm sido reconhecidas como patógenos humanos, dizem Santos *et al.* (1999), sendo associadas, principalmente a gastroenterites, afirmam Palumbo *et al.* (1985), Krovacek *et al* (1994), Janda *et al.* (1995) e Santos *et al* (1999).

As gastroenterites associadas a estes microrganismos acometem principalmente crianças menores de 5 anos de idade, porém adultos também são acometidos (Janda *et al*, 1995). O paciente com gastroenterite por *Aeromonas* apresenta diarreia líquida, febre, dor abdominal e, em casos mais graves, diarreia muco-sanguinolenta (Koreman, 1997; Teka *et al.*, 1999). Particularmente, as *A. hydrophila*, as *A. veronii* e as *A. caviae* são reconhecidas como agentes causadores de gastroenterite em humanos (Challapalli *et al.*, 1988; Kuijper *et al.*, 1989).

Outras infecções menos comuns que podem ser causadas por *Aeromonas sp* são: endocardite, meningite, abscessos intra-abdominais, peritonite, infecções de trato respiratório e urinário, septicemia e outras (Janda *et al.*, 1995; Colle *et al.*, 1996; Krovacek *et al.*, 1994; Albert *et al.*, 2000).

Muitos estudos referentes à etiologia das gastroenterites por *Aeromonas* têm estabelecido a água como principal veículo de transmissão desses patógenos (Botarelli e Ossiprandi, 1999), uma vez que a água pode favorecer sua disseminação através de práticas como irrigação e lavagem de alimentos e gado (Chopra e Houston, 1999; Bizani e Bandelli, 2001; Goñi-Urriza *et al.*, 2000). Fuzihara *et al* (1995) isolaram espécies de *Aeromonas* de águas cloradas e não-cloradas, sendo a *A. hydrophila* a espécie mais comum encontrada em água limpa. Muitas espécies de *Aeromonas* também podem ser

encontradas em alimentos frescos de origem animal (carnes de gado e porco, leite e peixes) e vegetal, bem como em alimentos processados (Altwegg, 1999; Albert *et al.*, 2000).

3.2. Fatores de virulência e patogenicidade em *Aeromonas*

Vários fatores de virulência têm sido descritos para explicar os processos de patogenicidade em *Aeromonas*. Dentre os principais fatores podemos citar a produção de biofilme (Linch *et al.*, 2002), de enterotoxinas hemolíticas, de proteases, de nucleases e de lipases, de acordo com Botarelli e Ossiprandi (1999) e a produção de enzimas proteolíticas extracelulares, segundo Albert *et al.* (2000), Chacón *et al.* (2003) e Watanabe *et al.* (2004).

Com relação à patogenicidade, temos a produção de enzimas, as metalo- β -lactamases e as ESBLs, o que tem se tornado o principal mecanismo de resistência aos antimicrobianos, conforme os estudos de Walsh *et al.* (1995 e 1997).

3.3. Distribuição e expressão de genes de resistência a antibióticos em *Aeromonas*

A sensibilidade a antimicrobianos em isolados clínicos de *Aeromonas spp* tem sido bastante estudada, porém sabe-se muito pouco sobre as espécies ambientais isoladas de depósitos naturais.

As águas fluviais recebem descargas contendo secreções tanto de humanos como de animais. Essas descargas podem conter agentes antimicrobianos associados a bactérias comensais resistentes que tornam-se resistentes a estes antimicrobianos. Conseqüentemente, a microbiota da água doce pode se tornar um reservatório de genes de

resistência antimicrobiana e contribuir para a limitação da eficiência do uso destes agentes (Montoya *et al.*, 1992; Sisti *et al.*, 1998).

Goñi-Urriza *et al.* (2000a) realizaram um estudo com 138 isolados de *Aeromonas spp* (104 *A. caviae*, 22 *A. sobria* e 12 *A. hydrophila*) isoladas em dois rios europeus, com o objetivo de observar a frequência de resistência antimicrobiana. Neste estudo, a maioria das espécies foi resistente à ampicilina (99%), ticarcilina (87%), cefalotina (93%) e à cefoxitina (56%). Este trabalho também mostrou uma suscetibilidade pobre à estreptomicina; com relação aos outros aminoglicosídeos, o estudo constatou que eles ainda conservaram sua suscetibilidade. Com relação às tetraciclina, o percentual constatado foi de 14%; já em relação ao cloranfenicol, a resistência foi rara. Nem sulfametoxazol (90%), nem trimetropin (42%) foram muito eficientes contra *Aeromonas spp*, mas o cotrimazol parece ter uma performance melhor. O ácido nalidíxico teve um perfil de resistência de 59% e, com relação às quinolonas, foi encontrada uma resistência grande à 1ª geração e melhora significativa com as fluorquinolonas, principalmente a ciprofloxacina (98%).

De modo geral, as três espécies de *Aeromonas* estudados têm um padrão similar de suscetibilidade aos antimicrobianos, exceto com relação ao imipenem, quando a *A. caviae* tem sensibilidade aumentada por não ter metalo- β -lactamase no seu fenótipo (Rossolini *et al.*, 1996).

Num trabalho subsequente, Goñi-Urriza *et al.* (2000b) realizaram um estudo sobre o impacto de efluentes urbanos na resistência bacteriana de *Aeromonas spp* e *Enterobacteriaceae*. Foram isoladas 118 espécies de *Aeromonas* (88 *A. caviae*, 19 *A. sóbria* e 11 *A. hydrophila*) do leito de um rio europeu. Sobre as espécies de *Aeromonas*,

75% mostrou pelo menos uma resistência adquirida, e desta, a mais freqüente foi a resistência ao ácido nalidíxico (43,2%). Resistência a múltiplos antimicrobianos foi rara (3,4%).

Em *Aeromonas* spp, embora numerosos plasmídios estejam presentes, parece que a resistência adquirida pode ser governada por genes cromossomais, segundo constatou Walsh *et al.* (1995).

O perfil genético das β -lactamases em *A. veronii* *bv sobria* tem sido bem caracterizado. Isolados destas espécies mostram a produção de três enzimas, uma penicilinase do grupo 2d de Bush, uma cefalosporinase do grupo 1 e uma metalo- β -lactamase, conforme demonstraram os estudos de Bush *et al.* (1995) e Walsh *et al.* (1995). Outras espécies de *Aeromonas* também produzem β -lactamases com perfil bioquímico similar, conforme Hayes *et al* (1994 e 1996).

As metalo- β -lactamases, principal enzima encontrada em *Aeromonas* spp, hidrolisam os carbapenens, como imipenem e meropenem e a hidrolização de outros antibióticos β -lactâmicos varia de enzima para enzima (Rossolini *et al.*, 1996).

A seqüência do gene decodificado *A. hydrophila*, enzima CphA, foi determinado por Massidda *et al.* (1991). Recentemente, um segundo gene *A. hidrophila* metalo- β -lactamase foi decodificado, CphA 2, conforme Rasmussen e Bush (1997), o qual mostra forte homologia ao CphA. Estudos de hibridização usando sondas com gene CphA mostram homólogos encontrados em *A. veronii*, *A. caviae* e *A. jandaei* (Rossolini *et al.*, 1995).

Uma metalo- β -lactamase de *A. veronii* *bv. sobria*, ImiS, tem sido purificada e caracterizada, e mostra ter um perfil muito similar ao CphA e ao *A. jandaei* Asb M1 β -

lactamase (Walsh *et al.*, 1996).

Ambas metaloenzimas CphA e ImiS e uma terceira enzima de *A. hydrophila*, decodificada por CphA2 mostram Asn-Tyr-His-Thr-Asp como sequência nos resíduos 88 até 92 como sítio ativo (Walsh *et al.*, 1998).

Walsh *et al.* (1997) examinaram amostras de *Aeromonas* em relação a sua atividade de produzir mutantes desreprimidos para produção de metalo- β -lactamase. Usaram plasmídios carreando os genes *cepS*, *ampS* e *CphA* de *A. hydrophila* e constataram que mutantes de *A. veronii* e de *A. hydrophila* produziram metalo- β -lactamase e mutantes de *A. caviae* não produziram, pois nesta espécie falta esse tipo de enzima (Rossolini *et al.*, 1995).

As metalo- β -lactamases requerem Zn^{+2} para sua atividade (Matagne *et al.*, 1999). Os primeiros inibidores sintéticos destas enzimas foram o álcool L-anidotrifluoromethyl e as cetonas, segundo Walter *et al.* (1996). Tiols, alguns aminoácidos e bifeniltetrazoles também têm sido reportados como bons inibidores, afirma Bounanga *et al.* (1998), Walter *et al.* (1999) e Toney *et al.* (1999).

Os antibióticos cefoxitina, moxalactam e ceftriaxone inativam irreversivelmente a *A. hydrophila* metalo- β -lactamase CphA (Quiroga *et al.*, 2000). No caso do cefoxitina, podem ocorrer dois mecanismos: no primeiro, a cisteína e o tiol livre da CphA reagem com o grupo exo-metileno da cefoxitina; no segundo, é mais complexo e ainda não totalmente elucidado. No caso do moxalactam, ocorre a formação de um dissulfito misto na reação entre este antibiótico e a enzima CphA (Zervosen *et al.*, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens e isolados de *Aeromonas*

No presente trabalho, foram estudados 62 isolados de *Aeromonas*, sendo 17 linhagens representativas das principais espécies do gênero obtidas de coleções internacionais e nacionais, 27 isolados obtidos de amostras de fezes humanas e 18 isolados obtidos de suínos. As denominações, as espécies e as origens são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Isolados de *Aeromonas* avaliados.

Isolado	Espécie	Origem
IBAer 001	A. h	ATCC 7966
IBAer 002	A. s	ATCC 43979
IBAer 003	A. i	ATCC 49904
IBAer 004	A. m	ATCC 33907
IBAer 005	A. salm	ATCC 33658
IBAer 006	A. c	ATCC 14486
IBAer 007	A. h	NCIB 9233
IBAer 008	A. c	ATCC 15468
IBAer 009	A. c	O. Cruz
IBAer 010	A. s	O. Cruz
IBAer 011	A. t	ATCC
IBAer 012	A. h	CECT 839
IBAer 013	A. h	CCT 191
IBAer 014	A. e	CECT 4341
IBAer 015	A. v	ATCC 35624
IBAer 016	A. euch	ATCC 23309
IBAer 017	A. a	ATCC 51208
IBAer 101	A. c	Diarreia humana – C. do Sul
IBAer 102	A. c	Diarreia humana – C. do Sul
IBAer103	A. h	Diarreia humana – C. do Sul
IBAer 104	A. c	Diarreia humana – C. do Sul
IBAer 105	A. c	Diarreia humana – C. do Sul
IBAer 106	A. h	Diarreia humana – C. do Sul
IBAer 107	A. c	Diarreia humana – C. do Sul
IBAer 109	A. h	Diarreia humana – C. do Sul

Isolado	Espécie	Origem
IBAer 110	A. s	Diarreia humana – C. do Sul
IBAer 111	A. h	Diarreia humana – C. do Sul
IBAer 112	A. h	Diarreia humana – C. do Sul
IBAer 113	A. h	Diarreia humana – C. do Sul
IBAer 114	A. h	Fezes humana - Planalto
IBAer 115	A. h	Fezes humana - Planalto
IBAer 116	A. h	Fezes humana - Planalto
IBAer 117	A. h	Fezes humana - Planalto
IBAer 118	A. sp	Fezes humana - Planalto
IBAer 119	A. sp	Fezes humana - Planalto
IBAer 120	A. h	Fezes humana - Planalto
IBAer 121	A. h	Fezes humana - Planalto
IBAer 126	A. h	Fezes humana - Planalto
IBAer 127	A. c	Fezes humana - Planalto
IBAer 128	A. h	Fezes humana - Planalto
IBAer 129	A. h	M1 lesão cutânea humana
IBAer 130	A. h	M2 isolado de jacaré ambiental
IBAer 132	A. h	M3 fezes humanas
IBAer 132	A. h	M4 lesão de peixe ambiental
IBAer S1	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer 171	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer 163	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer 166	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer 164	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer 146	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer S5	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer 160	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer 159	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer S2	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer S3	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer S4	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer 148	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer 153	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer 154	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer 155	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul
IBAer 157	A. sp	Suíno – pele – C. do Sul

Legendas: A. h : *Aeromonas hydrophila*
A.s : *Aeromonas sóbria*
A.i : *Aeromonas ichthiosmia*
A.m : *Aeromonas media*
A.salm. : *Aeromonas salmonicida*
A.c : *Aeromonas caviae*
A. t : *Aeromonas trota*
A.e : *Aeromonas encheleia*
A.v : *Aeromonas veronii*
A. euch : *Aeromonas euchrenophila*
ATCC : American Type Cultural Collection
NCIB : National Collection of Industrial Bacteria
CECT : Colección Española de Cultivo Tipo
CCT : Coleção de Culturas Tropicais

3.2 Manutenção e cultivo bacteriano

As culturas bacterianas foram mantidas à temperatura ambiente em tubos com tampa de rosca, contendo LB semi-sólido inclinado (triptona, extrato de levedura, NaCl,

agar), e congeladas (-20°C) em microtubos com capacidade para 1,5 ml, contendo meio LB com 15% de glicerol.

Para a realização dos experimentos, as bactérias foram semeadas por esgotamento em meio LB sólido e cultivadas a 30°C entre 18 e 24h. Colônias isoladas foram transferidas para novo meio sólido e novamente crescidas a 30°C entre 18 e 24h.

Para a realização dos testes de resistência a antibióticos, colônias isoladas de cada linhagem foram transferidas para meio LB líquido e cultivadas a 30°C entre 18 e 24h em agitador orbital (150 rpm).

3.3 Avaliação de resistência ou sensibilidade a antibióticos

A sensibilidade às drogas antimicrobianas foi realizada através da difusão de discos em agar Muller-Hinton (Difco), conforme preconizado pelo CLSI (2005).

As bactérias cultivadas por 18h em caldo LB sob agitação (200µl) foram semeadas sobre o meio com o auxílio de alça de Drigalski. Após a completa absorção do líquido pelo ágar foi colocado um multidisco de antibiograma para bactérias Gram-negativas (Multifar-15, Cefar). As placas foram então incubadas a 30°C por 24h. Após este período, os halos de inibição formados ao redor do disco de cada antibiótico foram medidos com auxílio de uma régua.

O multidisco de antibiograma utilizado contém 15 discos com os seguintes antibióticos e concentrações: ampicilina (AMP- 10µg), amicacina (AMI- 30µg), tobramicina (TOB- 10µg), tetraciclina (TET- 30µg), ciprofloxacina (CIP- 5µg), gentamicina (GEN- 10µg), sulfametoxazol (23,75µg) e trimetoprima (1,25µg) (SUT), cloranfenicol (CLO- 30µg), ceftazidima ** (CAZ- 30µg), ceftriaxona ** (CRO- 30µg),

cefotaxima ** (CTX- 30µg), cefoxitina * (CFO- 30µg), aztreonam (ATM- 30µg), amoxicilina (20µg) e ácido clavulânico (10µg) (AMC) e cefepima *** (CPM- 30µg).

A interpretação de resistência e/ou susceptibilidade aos antibióticos foi realizada com base no diâmetro dos halos de inibição, conforme a tabela do M100-S15 (CLSI, 2005) para enterobactérias.

*Cefalosporina de 2^a geração.

**Cefalosporina de 3^a geração.

***Cefalosporina de 4^a geração.

3.4 Determinação fenotípica de ESBLs

A identificação fenotípica de ESBLs, baseada na sensibilidade dessas enzimas ao ácido clavulânico, foi realizada de acordo com a metodologia preconizada pelo CLSI (2005). Para tanto, os isolados selecionados com base no antibiograma foram cultivados por 24h em caldo LB e semeadas (100µl) em meio Muller-Hinton. Sobre as placas foram colocados dois discos a 4cm de distância um do outro. Estes discos continham o antibiótico β-lactâmico e o antibiótico acrescido de 10µg de ácido clavulânico. Após incubação, os halos de inibição foram medidos (diâmetro), comparando-se os halos obtidos na ausência e na presença do ácido clavulânico. De acordo com as indicações do CLSI (2005), o aumento do halo superior a 5mm na presença de ácido clavulânico pode ser tomado como indicativo da presença de ESBL.

Os antibióticos utilizados (discos) foram: aztreonam (AZT- 30µg), ceftriaxona (CRO- 30µg), cefotaxima (CTX- 30µg), ceftazidima (CAZ- 30µg), todas da empresa Sensifar, e cefpodoxima (CPO- 10µg) da empresa Oxoid.

3.5 Detecção de genes de ESBLs por PCR

A detecção da presença de genes que codificam para ESBL foi realizada de acordo com a técnica e oligonucleotídeos iniciadores descritos por Paterson et al. (2003), com algumas modificações.

Vinte microlitros de uma cultura de 18h a 30°C em meio LB foram diluídos 1:10 com água Milli-Q autoclavada e utilizados diretamente na preparação das reações de amplificação. As amplificações foram realizadas em volume de 25µL contendo 20mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 0.25% Triton-X-100, 8 mM dNTPs, 60ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 1.25U de *Taq* Polimerase (Invitrogen), e 2µL de suspensão bacteriana.

As condições de amplificação foram um passo inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30s para abertura de fitas, 1 minuto para anelamento na temperatura adequada para cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 2) e 72°C por 1 minuto para extensão. Ao término dos 35 ciclos foi realizada uma extensão suplementar a 72°C por 5 minutos e resfriamento rápido das amostras até 4°C.

As amostras foram imediatamente depositadas em géis de agarose 1,2% em tampão TBE contendo brometo de etídio. Após separação eletroforética dos fragmentos em voltagem constante de 80V (aproximadamente 2 horas), os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e digitalizados com o auxílio de um sistema UVITEC com filtro laranja.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de genes que codificam para β -lactamases de efeito expandido (ESBLs) em *Aeromonas*.

Gene alvo ¹	Oligonucleotídeos iniciadores (5' → 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento esperado (pb)
<i>bla</i> _{SHV}	F- ATGCGTTATATTTCGCCTGTG R- TGCTTTGTTATTTCGGGCCAA	60	723
<i>bla</i> _{TEM}	F- AAACGCTGGTGAAAGTA R- AGCGATCTGTCTAT	45	717
<i>bla</i> _{CTX-M}	F- CGCTTTGCGATGTGCAG R- ACCGCGATATCGTTGGT	60	Variável
<i>bla</i> _{PER-1}	F- ATGAATGTCATTATAAAAAG R- TTGGGCTTAGGGCAG	45	882
<i>bla</i> _{AmpC}	F- ATCAAAACTGGCAGCCG R- GAGCCCGTTTTATGCACCCA	60	510

¹ Tabela adaptada de Paterson et al. (2003).

3.6 Avaliação de plasmídios bacterianos

A avaliação da presença de plasmídios em isolados de *Aeromonas*, selecionados com base no seu perfil de resistência a antibióticos, foi realizada através de análise de perfis eletroforéticos de DNA plasmidial, obtido por dois métodos: (1) o método simples por fervura (“boiling method”) e (2) o método de lise alcalina.

No método de fervura (“boiling method”), as linhagens de *Aeromonas* foram cultivadas por 18h a 30°C em 5ml de meio LB. Após este período, 1,0 ml da cultura foi transferido para um microtubo e centrifugado por 5min a 12000 RPM. As bactérias foram ressuspensas em 200 μ L de tampão STET (8% sacarose, 5% Triton-X-100, 50mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 8,0). A seguir, foram acrescentados 10 μ L de solução de lisozima (10 mg/mL em tampão STET) e as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 15min. Imediatamente, as amostras foram fervidas por 40 segundos e centrifugadas por 15min a 14000 RPM. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e

tratado com RNase A (10µg/mL) por 1h a 37°C. A seguir, as amostras foram purificadas com 200µL de clorofane (fenol:clorofórmio:álcool iso-amílico – 50:48:2). Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o DNA plasmidial precipitado com 2,5 volumes de etanol por 2h a -80°C. As amostras foram centrifugadas por 5min a 12000 RPM, o sedimento foi seco à temperatura ambiente, ressuspendido em 30µL de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA) e mantido a -20°C até o momento da avaliação. Esse método foi adaptado de Sambrook e Russell (2001).

O método de lise alcalina foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). Descrevendo rapidamente, os isolados bacterianos foram inoculados em 2mL de meio LB e cultivados por 18h a 30°C sob forte agitação. Volumes de 1,5ml das culturas foram transferidos para microtubos e centrifugados por 3min a 12000 RPM. Os sedimentos bacterianos foram ressuspendidos em 100µL de solução I gelada (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM glicose) e homogeneizados por vórtex. A seguir, 200µL de solução II (1% SDS em 0,2N NaOH) foram adicionados e misturados por inversão (5x). Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 10min e acrescidos de 150µL de solução III (acetato de potássio 5M pH 4,2) gelada. Após mistura por inversão, as amostras foram incubadas em banho de gelo por 5min. Ao término deste tempo, as amostras foram centrifugadas (5min, 12000 RPM, 4°C), sendo os sobrenadantes transferidos para novos tubos. Na continuação, foi realizada a purificação das amostras com clorofane e precipitação dos ácidos nucléicos com 2 volumes de etanol por 2min em banho de gelo. Os ácidos nucléicos foram recuperados por centrifugação (5min, 12000 RPM, 4°C), lavados com etanol 70% (1mL), secos à temperatura ambiente e ressuspendidos em 30µL de TE contendo 20µg/ml de RNaseA.

A presença de plasmídios foi avaliada através de eletroforese em géis de agarose 0,8% em tampão TBE contendo brometo de etídio. A separação foi realizada sob voltagem constante de 80V. A visualização das bandas foi realizada sob luz ultravioleta, sendo os géis digitalizados com um sistema UVITEC.

3.7 Transferência de resistência a antibióticos por conjugação

Para avaliação da transferência de resistência a antibióticos por conjugação foi escolhido o isolado IBAer 114 com amplo espectro de resistência a antibióticos e sensível ao ácido nalidíxico. Como receptora, foi utilizada a linhagem de *Escherichia coli* DH5 α (F⁻ mcrB mrr hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) leuB6 ara14 proA2 lacY1 galK2 xyl5 mtl1 rpsL20 (sm^R) supE44 λ) NA^R.

Para a conjugação, colônias isoladas da linhagem doadora e da receptora foram inoculadas em caldo LB e cultivadas por 18h a 30°C sob agitação. Após este período, 500 μ L de cada bactéria doadora foram misturados com o mesmo volume da bactéria receptora, e os tubos incubados sem agitação por 18h a 30°C. Após este período, as amostras foram diluídas até 10⁻² e semeadas (100 μ L) em meio LB com ácido nalidíxico (20 μ g/ml), como agente seletivo contra *Aeromonas* e os antibióticos apropriados a cada processo de conjugação (ampicilina –150 mg/L ou cloranfenicol –50 mg/L). As placas foram incubadas a 37°C entre 24 e 48h e colônias isoladas foram transferidas por esgotamento para nova placa contendo os antibióticos apropriados.

Conjugantes isolados foram avaliados quanto ao seu perfil de resistência a antibióticos através do método descrito no item 3.3; e para a presença dos genes TEM, CTX e ampC por PCR através do método descrito no item 3.5.

3.8 Determinação de atividade β -lactamásica

As linhagens de *Aeromonas* IBAer 001, IBAer 107 e IBAer 114 foram cultivadas em caldo LB sob agitação a 30°C por 18h. Esse pré-cultivo foi utilizado para inocular 50mL de meio LB numa proporção de 1:20. Essas novas culturas foram incubadas a 30°C com agitação (150 RPM). Ao atingirem $DO_{420}=0,3$ as culturas foram acrescidas de 30mg/L de ampicilina e o crescimento continuado até atingir uma $DO_{420}=0,8$. As bactérias foram então recuperadas por centrifugação (12000 RPM, 10min, 4°C), lavadas três vezes com tampão fosfato a 10mM pH 7,0, e finalmente ressuspendidas em 2,5mL do mesmo tampão. Essa suspensão foi aliqüotada em microtubos (500 μ L/tubo).

Para ruptura celular e liberação das β -lactamases associadas à parede celular, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente aquecidas em banho a 35°C por 10min. Este procedimento foi repetido 5 vezes e a suspensão foi centrifugada a 14000 RPM por 10min a 4°C. Os sobrenadantes foram misturados e novamente aliqüotados congelando-se as amostras a -80°C. Este procedimento foi adaptado de Bush e Singer (1989).

A quantidade de proteína presente no lisado foi avaliada através do método de Bradford (1976).

A atividade de β -lactamases dos extratos foi determinada através do método espectrofotométrico, descrito por O'Callaghan et al. (1969) e utilizado em *A. hydrophila* por Ko et al. (1998). Basicamente, 450 μ L de solução de antibiótico em tampão fosfato de sódio 10mM pH 7,2 aquecido a 30°C foram misturados com 50 μ L de extrato celular bruto e imediatamente transferidos para cubeta de quartzo com 1cm de passo óptico.

Leituras foram então realizadas em intervalos de 30 s por um período de 5 minutos no comprimento de onda adequado para cada antibiótico de acordo com a tabela a seguir.

Tabela 3 - Comprimento de onda espectrofotométrico para antibióticos.

	λ	Coef. Extinção ($\epsilon = M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
Ampicilina	235	-820
Cefotaxima	260	-7500
Cefuroxima	260	-7600
Ceftriaxona	260	-7600
Ceftazidima	260	-9000
Cefoxitina	260	-7500

Para fins de cálculo da atividade, foi utilizada a fórmula seguinte:

$$\text{Unidade} = (\Delta\text{abs} * 1000000 * 0,5) / (\epsilon * [\text{proteína (mg)}] * 2)$$

Onde, Δabs corresponde à média de diferença na absorvância entre intervalos consecutivos de leitura; 1000000 é fator de correção para μmoles ; 0,5 corresponde ao volume total utilizado; ϵ é o coeficiente de extinção molar em moles/L, [proteína (mg)] concentração de proteínas em miligramas na amostra e “2” é fator de correção para minutos, já que as leituras foram realizadas em intervalos de 30s.

Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que hidroliza 1 μmol de substrato por minuto por miligrama de proteína.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resistência a antibióticos em isolados de *Aeromonas*

Inicialmente foi avaliada a resistência a 15 antibióticos utilizados no controle de bactérias Gram-negativas através do sistema de difusão em discos. Como pode ser observado na Figura 1, foi constatada ampla variação na resistência aos antibióticos entre os isolados em estudo, fato evidenciado pelo tamanho dos halos de inibição frente aos distintos antibióticos.

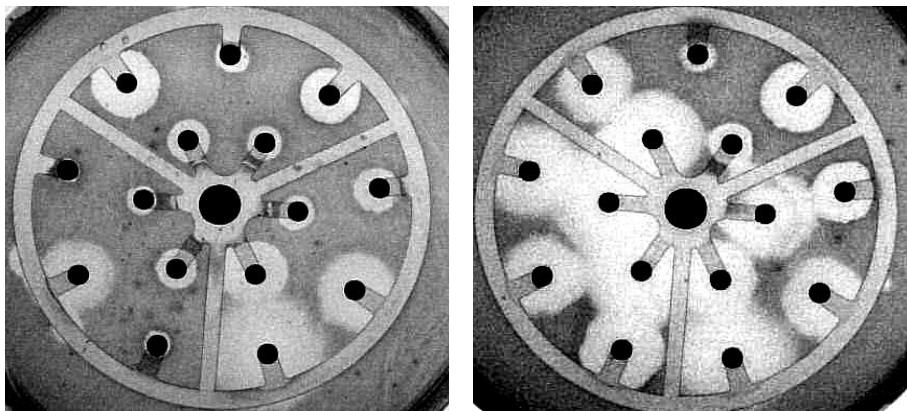


Figura 1 - Antibiogramas representativos de dois isolados de *Aeromonas*.

Conforme pode ser observado na Tabela 4, as linhagens de *Aeromonas* avaliadas, com exceção de IBAer 003 (*A. ichthiosmia*), IBAer 011 (*A. trola*) e IBAer 154 (*Aeromonas spp*), apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico, sendo que 92% das mesmas exibiram resistência à ampicilina.

Tabela 4 – Resistência antimicrobiana de 62 isolados de *Aeromonas*. Valores representam o tamanho dos halos de inibição em centímetros.

	Ampicilina	Anox + clav	Cefoxitina	Cefotaxima	Ceftriaxona	Cefepima	Ceftazidima	Aztreonam	Amicacina	Tobramicina	Tetraciclina	Ciprofloxacina	Gentamicina	Sulfa	Cloranfenicol
	AMP	AMC	CFO	CTX	CRO	CPM	CAZ	ATM	AMI	TOB	TET	CIP	GEN	SUT	CLO
1. Linhagens padrão															
IBAer 001	0	1,5	2,8	2,3	2	2,4	1,7	2	1,6	1,7	2	2,8	2,4	1,7	2,6
IBAer 002	2	3,2	4,5	3,4	3,8	2,8	1,6	4,5	4,2	4,5	4,5	3	2,6	1,9	1,3
IBAer 003	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
IBAer 004	2,7	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	3	4,5	2,6	2,8	3,2	4,5	4	0	3
IBAer 005	0,8	2,2	3,2	4	4	3	2,2	3,4	2,5	2,2	2	3	2,2	2	2,7
IBAer 006	0,7	1,4	3,4	3,8	4	3	2,7	3,2	1,6	1,5	2	2,5	1,5	0,7	3
IBAer 007	0	1,9	2,2	2,2	2	2	1,5	2	2,5	1,8	2	3	2,1	2,4	1,6
IBAer 008	1,4	2	2	2,6	3	2,6	2,4	2,6	1,8	1,8	2,3	3,4	2	0	2,8
IBAer 009	0	1,6	2,4	2,6	2,4	1,5	1,8	2	1,4	1,2	1,8	2,7	2	0	2
IBAer 010	2,1	2	1,3	3	2,7	2	2	2,5	2,3	2	2,1	3	2,3	2,5	2,7
IBAer 011	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	3,4	2,5	2,8	2,5	2,3	4,5
IBAer 012	1,1	1,6	3,4	4,2	4	3	3	3,3	2,4	2,3	4	3	2,6	2,6	3,1
IBAer 013	1,1	1,3	1,8	3	3	2,2	2,6	2,4	2	2,1	2,4	2,8	2,3	2,2	2,6
IBAer 014	1,5	2,2	1,3	3	2,6	2,5	2,2	2,4	1,5	1,7	2,7	3	1,3	2,5	1,7
IBAer 015	1,8	1,5	3	2,4	3,3	3	2,6	2,8	2,3	2	2,5	2,7	2,4	3	1,8
IBAer 016	0	1,5	2,2	3	2,2	2,2	2,2	2,4	1,9	1,9	2,2	2,5	2	2,2	2,6
IBAer 017	3	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	3	1,8	1,2	3	2,3	2,8	3,8
2. Isolados de amostras humanas															
IBAer 101	1,5	2	4,5	2,8	2,4	4	3	4	3	2,8	3,6	4,5	3,2	3,4	3,8
IBAer 102	0	1,3	3,4	4	1,3	2,8	2,6	2,8	2,1	2,1	2,6	3	2,4	3	3
IBAer 103	0	1,1	2	2,8	3	2,6	2,2	2,2	2,1	1,9	2,3	2,8	2	2,3	2,6
IBAer 104	0,6	1	2	2,8	2,4	2,8	2,2	3	2,2	2,2	2,7	3	2,2	2,7	2,8
IBAer 105	0	1,5	2,4	3	3,2	2,8	2,3	3,2	2,3	2,1	2,5	3	2,1	3	2,4
IBAer 106	0	1,2	2,1	3,2	2,6	2	0	0,7	1,8	1,9	2,1	2,8	2,1	2,7	1,6
IBAer 107	0,7	0,7	1,1	2	2	1,7	1,2	0	1,9	1,5	0,7	2,2	1,7	1,8	2,1
IBAer 109	1,1	1,4	2,2	3,2	3,2	2,6	2,6	2,8	3	2,6	2,6	4,6	2,8	2,6	3,6
IBAer 110	1	1,3	2,2	3,4	3,2	2,8	2,2	2,6	2,2	1,8	2,3	3	2,5	2,4	2,7
IBAer 111	0,7	1	2	2,2	1,7	2	1,1	0,7	2	1,5	1,2	1,7	2	1,7	1
IBAer 112	1	1,4	2,6	4	3,8	3	2,4	3,4	2,3	2,5	3	3	2,4	2,7	2,8
IBAer 113	0,7	1,2	2	2,4	3	2,4	2	2,6	2,2	2,1	2,6	2,6	2,3	2,5	2,8
IBAer 114	1	1	2	1,2	0,8	1,2	2,1	1	1,7	1,3	2,3	2,4	0,7	2	0,6
IBAer 115	0,7	1	1,8	2,4	3	2,4	2	0,7	2,1	2,1	2,7	3	2,4	2,4	2,8
IBAer 116	0,8	1,2	2	2	3	2,1	2	2	2,2	2,2	2,5	3	2,4	2	2
IBAer 117	1,2	1,1	2,6	2,8	2,4	2,4	2,2	0	1,9	1,7	1	2,5	1,7	2,3	2,4
IBAer 118	1	1,8	2,4	3	3,7	3,2	2,4	3	2,3	2,3	2	2,8	2,5	3	3,2
IBAer 119	0	1,4	4,5	3,4	2,8	3,2	3	3,4	2,8	2,5	2,5	4	2,2	2,5	3,1
IBAer 120	0	1,7	2	2,2	3,6	2,8	2,5	2,8	2,3	2	2	3	2,5	2,7	2,7
IBAer 121	0,8	1,4	2,4	3,2	3,4	2,8	2,6	3,6	2,5	2,5	2,6	3,4	2,4	3	3,2

Tabela 4 (cont.)- Antibiogramas de 62 isolados de *Aeromonas*.

	Ampicilina	Anox + clav	Cefoxitina	Cefotaxima	Ceftriaxona	Cefepima	Ceftazidima	Aztreonam	Amicacina	Tobramicina	Tetraciclina	Ciprofloxacina	Gentamicina	Sulfa	Cloranfenicol
	AMP	AMC	CFO	CTX	CRO	CPM	CAZ	ATM	AMI	TOB	TET	CIP	GEN	SUT	CLO
IBAer 126	0	1,4	2,6	3,8	3,8	3	3	3,6	2,5	2,6	2,4	3,2	2,8	2,8	3,1
IBAer 128	0	1,2	2,6	3,1	3,1	2,4	2,5	3,1	2,8	2	2,5	3,5	2,2	2,8	2,8
IBAer 127	0,7	1,7	2,2	3,2	3,6	3	2,5	2,8	2	2,3	2,6	3,6	2,2	2,4	3
IBAer 129	1,3	1,4	2,4	2,8	2,8	3	2,8	3,4	0	2,4	3	3,2	2,5	3	3,2
IBAer 130	0	1	2,2	3,2	3,4	2,8	2,5	3	2,1	2	2,8	3,4	2	0	1,8
IBAer 132	1,3	1,5	2,6	3,6	2,8	2,8	2,4	3,2	2	2	2,7	2,8	2,1	2,8	2,8
IBAer 132	1	1,3	2,6	3,4	2,4	3	2,8	3,4	2,3	2,2	2,8	3,2	2	2,8	3

3. Isolados de amostras suínas

IBAer S1	0	1,4	2	3,1	3,6	3,4	3	2,8	2,3	2,5	3,2	2,7	2,5	3	3,1
IBAer 171	0	1	1,8	3	2,4	3,2	2,2	3	2,5	2,4	3	3	2,5	2,2	2,7
IBAer 163	0	1,2	2,6	3	2,7	3	2,5	2,6	2,2	2	1,3	2,6	2,5	2,6	3,2
IBAer 166	0	1,2	1,2	2,8	2,8	2,2	2	2,7	1,3	1,4	0	2,4	2	0	1,1
IBAer 164	1,6	1,6	3,2	3	3	3,6	2,6	4	3,2	3	0,7	2,6	3,2	2,8	3,6
IBAer 146	0	0,8	0	3,4	1,8	3	2,4	3,4	2,5	2,5	1	1,7	2	0	2,7
IBAer S5	0	1,8	2,8	3,2	3,6	4	3	3,4	1,7	1,5	2,7	3,4	2,5	2	3,3
IBAer 160	0	1,4	4	4,1	4	3,6	3	3,4	3	2,8	3,6	3,6	2,6	3,4	3,2
IBAer 159	0	1	3	3,2	4,5	4	3	4,3	2,5	2,3	3,2	3	2,3	3	2,4
IBAer S2	0	2,2	1,2	3,2	2,8	3,2	2,8	4,5	2,9	2,8	1,7	3,7	3	2,1	2,6
IBAer S3	0	1	2,8	2,2	2,7	3,4	3	4	2,5	2,2	3,4	3,4	2,6	3,2	3,2
IBAer S4	0	1,1	2	2,8	2,6	2,4	2,4	3	2	2	2,5	3,3	2,3	0	2,4
IBAer 148	0	0	1,6	2,2	2	2	0	2,2	1,8	1,9	0,8	1,7	1,8	2,4	0
IBAer 152	0	0	4,5	4	3,4	2,6	2,2	3,2	1,6	1,4	2,8	3,4	2,2	1,4	2,3
IBAer 153	0,9	1,4	3,8	3,4	3,6	2,8	2	4	2,5	2,2	1	3,4	2,5	0,7	2,2
IBAer 154	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
IBAer 155	0	1,6	4,5	3,4	4	3	2,5	4	1,4	1,8	2,8	2,8	2,1	2,4	1,7
IBAer 157	0	1,4	2,4	2,8	2,6	2,6	2,5	3	2,7	2,1	2,1	1,7	2,4	2,4	1,5

* Fundo cinza corresponde à resistência com base na Tabela M100-15 (CLSI, 2005).

Resistência à ampicilina é uma característica normalmente encontrada em bactérias do gênero *Aeromonas*, particularmente nas espécies consideradas patogênicas para humanos, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* var. *sóbria*, segundo estudos de Walsh *et al.* (1997) e Goñi-Urriza *et al.* (2000a). Esta frequência é tão elevada que este antibiótico é utilizado na maior parte dos meios empregados para o isolamento dessas

bactérias (Palumbo *et al.*, 1985; Albert *et al.*, 2000; Abbott, 2003). Entretanto, em outras espécies de *Aeromonas*, como *A. trota*, a sensibilidade à ampicilina parece uma constante.

A maior parte das bactérias testadas (58 de 62 linhagens) apresentaram resistência concomitante à ampicilina e à associação amoxicilina/ácido clavulânico. De um modo geral, a ausência de sensibilidade ao ácido clavulânico está associada à produção de metalo- β -lactamases ou de AmpC, conforme Jacoby e Muñoz-Price (2005), característica comum em representantes do gênero *Aeromonas*, afirmam Walsh *et al.* (1997).

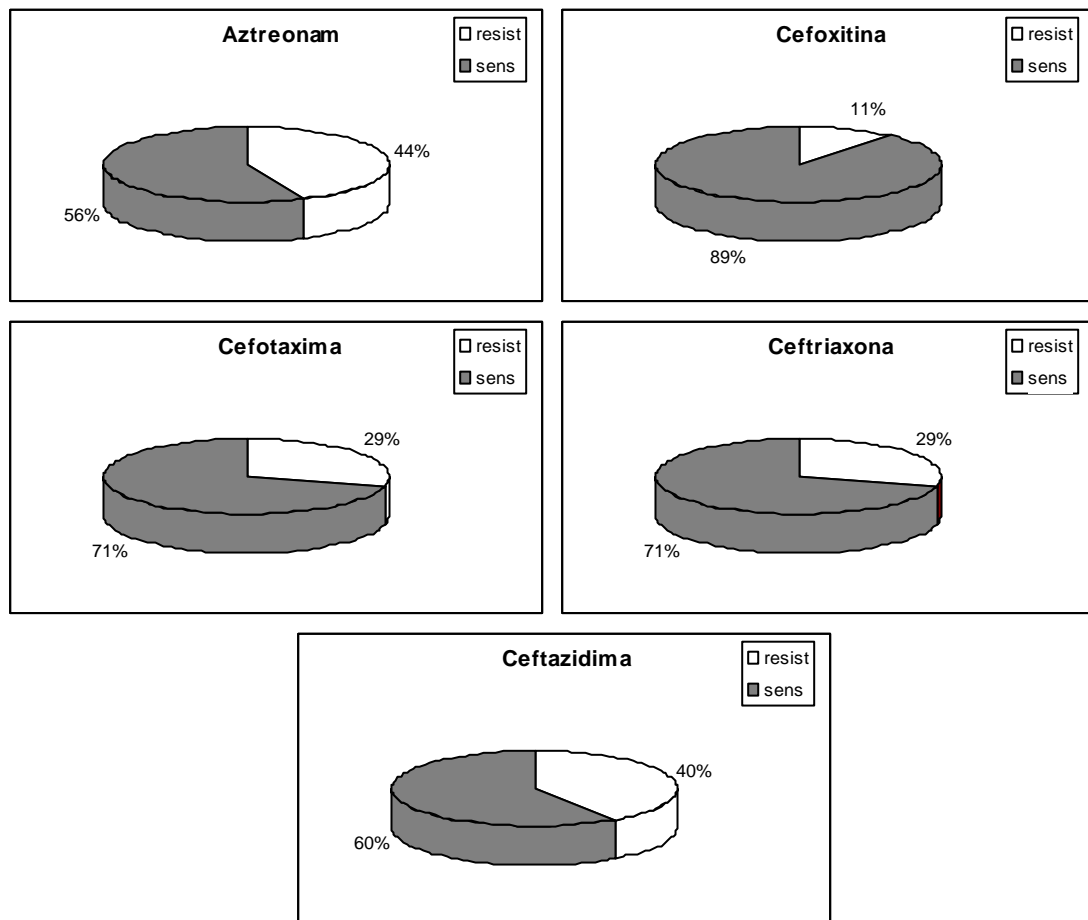


Figura 2 – Resistência de isolados de *Aeromonas* a Aztreonam, Cefoxitina, Cefotaxima, Ceftriaxona e Ceftazidima.

Além da resistência à ampicilina, percentagens elevadas de resistência a outros antibióticos β -lactâmicos foram constatadas. A percentagem de resistência ao aztreonam foi de 44%, 40% para ceftazidima, 29% para ceftriaxona e cefotaxima, e 11% para cefoxitina (Tabela 4 e Figura 2).

A resistência à ampicilina e a outros antibióticos β -lactâmicos em *A. veronii* var. *sobria* foi estudada por Rasmussen *et al.* (1994) e por Walsh *et al.* (1995a). Nesta espécie, foram identificadas três enzimas, uma penicilinase do grupo 2d (Bush *et al.*, 1995), uma cefalosporinase do grupo 1 e uma metalo- β -lactamase (Walsh *et al.*, 1995b). A presença de β -lactamases com perfis bioquímicos semelhantes aos de *A. veronii* var. *sobria* têm sido identificados em outras espécies como *A. salmonicida* (Hayes *et al.*, 1994) e *A. hydrophila* (ibidem, 1996). Além destas, genes *bla* com alta identidade com o gene que codifica para a β -lactamase TEM1 foram descritos em *A. caviae* (Sayeed *et al.*, 1996). Alguns genes responsáveis pela produção de β -lactamases são cromossômicos, como os genes *ampS* e *cepS* de *A. veronii* var. *sobria*, e *cphA* de *A. hydrophila*.

Conforme pode ser evidenciado, o tamanho dos halos de inibição no antibiótico ampicilina entre os isolados considerados resistentes variaram entre 0 e 2,1cm, evidenciando diferenças na atividade de penicilinas. Tais diferenças podem ser atribuídas a efeitos regulatórios, tipo e quantidade de enzima produzida ou à própria atividade específica das penicilinas, presentes em cada isolado. Quanto à expressão das β -lactamases, Walsh *et al.* (1995b) mostraram que as mesmas são reguladas de forma coordenada, sendo induzidas pela presença de antibióticos β -lactâmicos. Segundo estes autores, mutantes desreprimidos apresentam um aumento significativo da atividade de todas as enzimas.

Quanto à resistência a outros antibióticos, elevada frequência de resistência a cloranfenicol (18%), à tetraciclina (16%) e à sulfa (15%) foram constatadas entre os isolados analisados (Tabela 4 e Figura 3). Esses valores diferem em parte daqueles obtidos por Goñi-Urriza *et al.* (2000a) que observaram uma frequência de 14% de isolados resistentes à tetraciclina, baixa frequência de resistência ao cloranfenicol, e alta eficiência do cotrimazol sobre isolados de *Aeromonas* obtidos de águas fluviais.

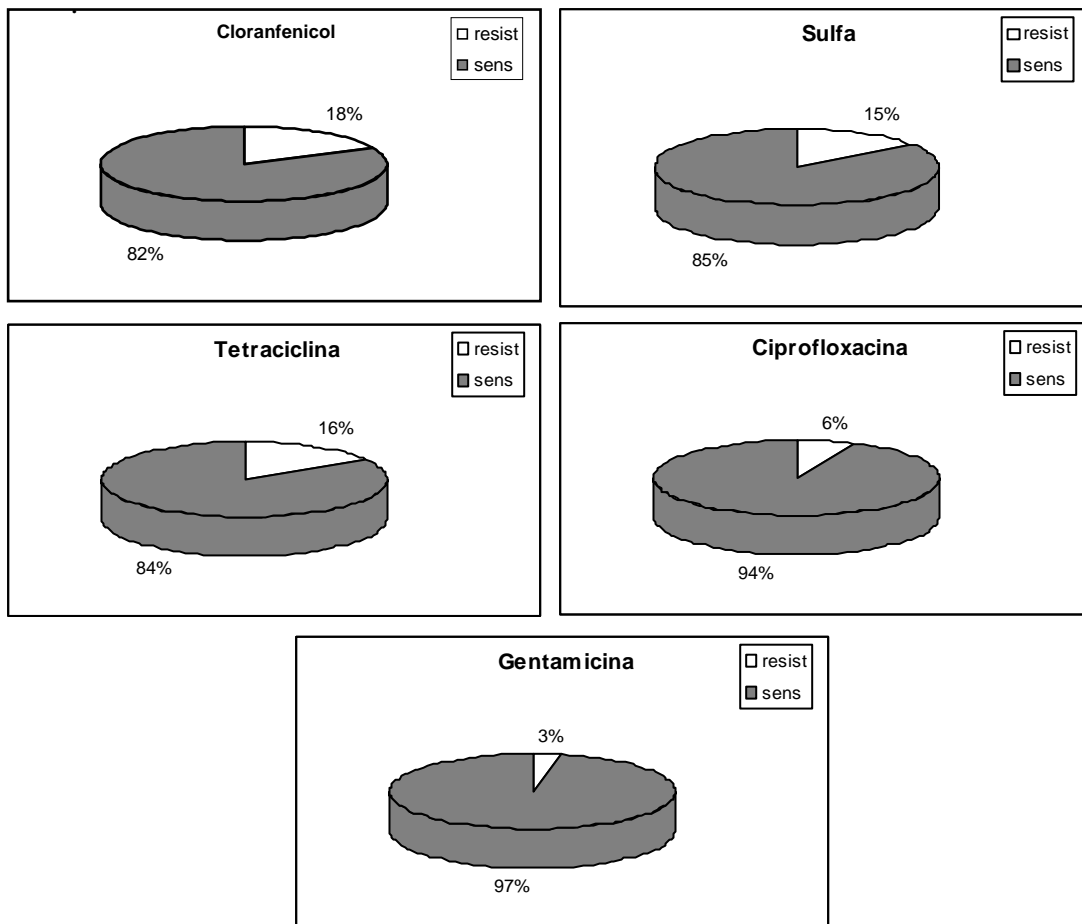


Figura 3 - Percentagem de isolados de *Aeromonas* resistentes e sensíveis ao cloranfenicol (A), à sulfametoxazol + trimetoprima (B), à tetraciclina (C), à ciprofloxacina (D) e à gentamicina (E).

Diferenças significativas nas percentagens de isolados resistentes à tetraciclina e à sulfametoxazol + trimetoprim foram observadas entre aqueles obtidos de amostras humanas e de amostras de suínos (Figura 4), sendo que a prevalência de isolados resistentes a esses antibióticos foi maior nos últimos. Tal diferença pode estar relacionada ao uso massivo de tetraciclina durante o processo de criação de suínos, fato que deve levar à seleção de microrganismos resistentes a esse antibiótico.

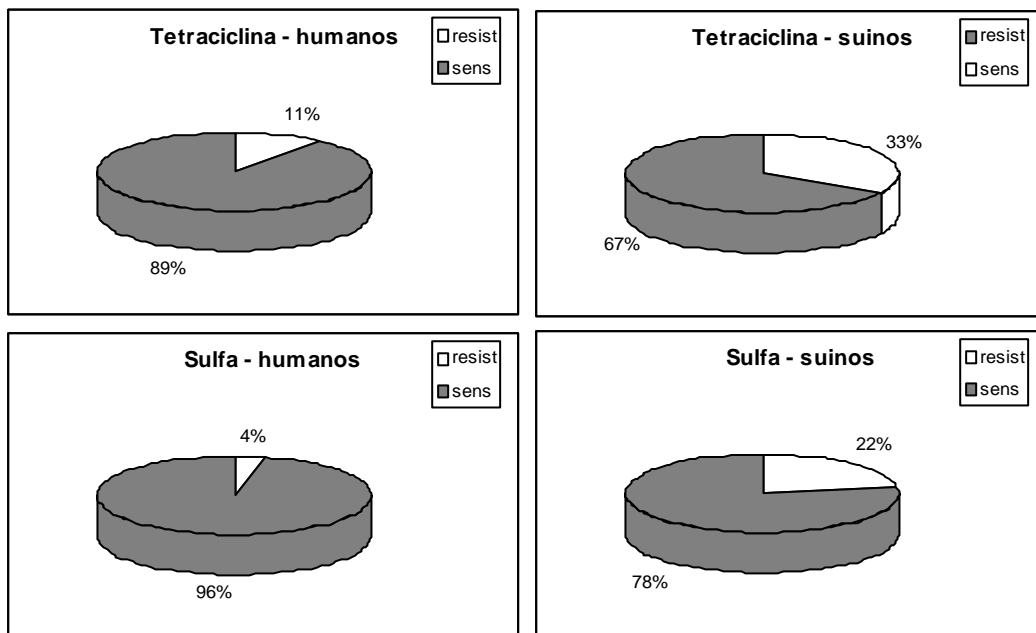


Figura 4 - Percentagens de resistência à tetraciclina e à sulfa entre isolados humanos e de suínos.

A utilização de tetraciclina e de derivados nas rações utilizadas para suínos é uma constante devido ao efeito desse antibiótico como promotor de crescimento (Rutz e Lima, 2006). Esta prática tem levado ao aumento de bactérias resistentes à tetraciclina em amostras de suínos, como mostra o trabalho realizado por Corrêa *et al.* (2005). Neste trabalho, os autores constataram alta frequência de enterococos resistentes à tetraciclina

em fezes de suínos tratados com rações. Dados referentes à resistência à tetraciclina em *Aeromonas* isoladas de suínos não são disponíveis.

A resistência à tetraciclina em *Aeromonas* tem sido associada à presença de genes específicos que conferem resistência à tetraciclina propriamente dita e à oxatetraciclina, sendo que alguns destes genes podem ser transferidos eficientemente para *E. coli* (Depaola *et al.*, 1988). Em diversos casos, a resistência à tetraciclina, assim como a outros antibióticos, tem sido associada a plasmídios de baixo peso molecular ou plasmídios conjugativos de alto peso molecular (Hedges *et al.*, 1985; Aoki, 1988; Chaudhury *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 1998). Esses genes de resistência à tetraciclina são frequentemente encontrados em elementos transponíveis que podem mudar de posição, sendo transferidos de plasmídios não conjugativos para conjugativos. Nesse sentido, Rhodes *et al.* (2000) e Schmidt *et al.* (2001) mostraram evidências claras de íntegrans associados à resistência à tetraciclina (*tetA*) e a outros antibióticos em plasmídios conjugativos de *Aeromonas*. Tal observação indica a existência de diversos mecanismos de transferência de resistência a antibióticos nessas bactérias.

Um fato que merece citação é a presença de genes de resistência à tetraciclina e à sulfas em elementos transponíveis já detectados em *Aeromonas* como o Tn1721 (Rhodes *et al.*, 2000), o que justifica a elevada (50%) frequência de isolados de suínos resistentes a ambos antibióticos.

Resistência múltipla à tetraciclina e à cotrimazol (sulfametoxazol + trimetoprim) foi encontrada em apenas três isolados (4,8%), frequência consideravelmente menor do que a observada por Schmidt *et al.* (2001) numa análise de *Aeromonas* móveis isoladas de trutas (28%). Entretanto, considerando apenas os isolados resistentes à tetraciclina ou

à cotrimazol, essa frequência é de 30% e 33%, respectivamente. Essa associação fica evidente no caso dos isolados de suínos, entre os quais 3/18 apresentaram resistência aos dois antibióticos, e onde 3/4 dos isolados resistentes à cotrimazol exibiram concomitantemente resistência à tetraciclina. Associação de resistência a esses dois grupos de antibióticos foi previamente constatada por Schmidt *et al.* (2001), sendo a mesma atribuída à presença de íntegrans de classe 1.

Nenhum dos antibióticos testados foi 100% eficiente contra os isolados de *Aeromonas* avaliados, sendo que os antibióticos mais efetivos foram a gentamicina (98%), a tobramicina (96,8%) e a ciprofloxacina (93,5%). Estes dados confirmam até certo ponto aqueles relatados por Ko *et al.* (1996), Goñi-Urriza *et al.* (2000 b), Vila *et al.* (2003), entre outros.

Considerando que uma parte importante dos genes de resistência a antibióticos encontra-se em plasmídios, passamos a analisar o perfil plasmidial de 20 isolados de *Aeromonas* selecionados com base no seu padrão de resistência a antibióticos (Tabela 4).

Conforme pode ser observado no esquema representado na Figura 5, 19 dos 20 isolados avaliados apresentaram pelo menos uma banda de alto peso molecular compatível com a presença de plasmídios conjugativos. Esses tipos de plasmídios são comumente encontrados em isolados de *Aeromonas* e correlacionados à resistência a diversos antibióticos, entre os quais a tetraciclina (Aoki, 1988; Adams *et al.*, 1998; Rhodes *et al.*, 2000).

Além dos plasmídios conjugativos, os isolados IBAer 163, IBAer S4, IBAer 148, IBAer 157, IBAer 015, IBAer 107, IBAer 111 e IBAer 130 apresentaram plasmídios de menor peso molecular. Essas bactérias se caracterizam pela presença de resistência a

vários antibióticos (Tabela 4) e os plasmídios em questão podem estar associados a esta resistência. Neste sentido, cabe lembrar que as resistências a antibióticos em *Aeromonas*, assim como em outras espécies bacterianas, podem ser plasmidiais ou cromossômicas e, com frequência, associadas a elementos transponíveis e íntegrans. Fato pelo qual a simples presença de plasmídios não pode ser tomada como confirmatória da base extracromossômica dessas resistências.

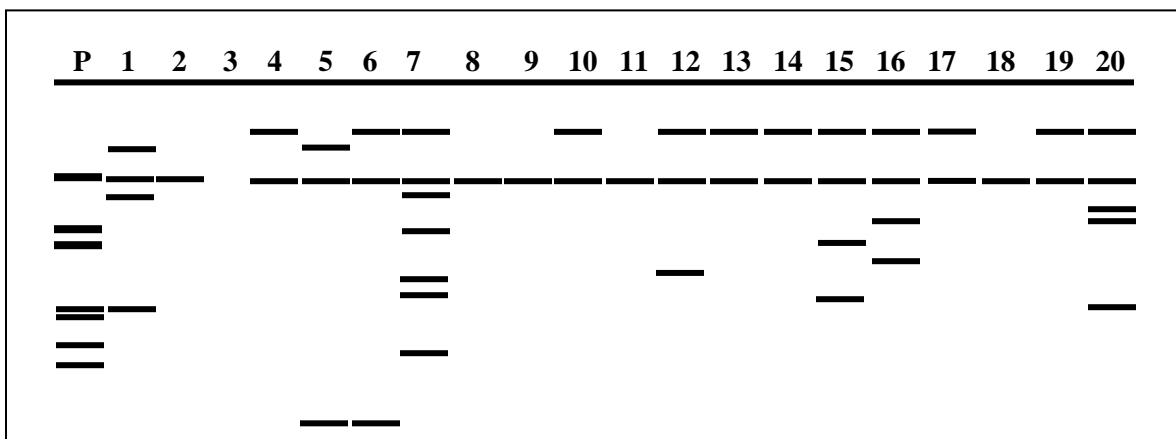


Figura 5. Perfil plasmidial dos isolados de *Aeromonas*. P- marcador Lambda Eco/Hind, 1- IBAer 163, 2- IBAer 166, 3- IBAer 164, 4- IBAer 146, 5- IBAer S4, 6- IBAer 148, 7- IBAer 153, 8- IBAer 157, 9- IBAer 001, 10- IBAer 014, 11- IBAer 009, 12- IBAer 015, 13- IBAer 017, 14- IBAer 106, 15- IBAer 107, 16- IBAer 111, 17- IBAer 114, 18- IBAer 117, 19- IBAer 129, 20- IBAer 130.

4.2 Presença de β -lactamases de efeito expandido (ESBLs) em *Aeromonas*

Conforme se verifica na Tabela 4, vários isolados de *Aeromonas* apresentaram resistência a diversos antibióticos β -lactâmicos, incluindo ampicilina, amoxicilina com ácido clavulânico, aztreonam e cefalosporinas. Esses isolados foram avaliados quanto à possível presença de β -lactamases de efeito expandido (ESBLs) através de teste de sensibilidade ao ácido clavulânico, preconizado como sistema indicativo de ESBLs pelo CLSI (2005).

De acordo com os resultados da Tabela 5, o isolado IBAer 114 apresentou um aumento igual ou maior que 0,4 cm no halo de inibição para todos os antibióticos testados, quando acrescidos de ácido clavulânico. Já os isolados IBAer 148 e IBAer 113 mostraram halos com aumento superior a 0,5cm em quatro dos antibióticos acrescidos de ácido clavulânico; e os isolados IBAer 166 e IBAer 016 exibiram este comportamento para dois antibióticos. A sensibilidade ao inibidor competitivo ácido clavulânico é considerada indicativo de ESBLs; entretanto, no caso de *Aeromonas*, em que as metalo- β -lactamases são freqüentes, o simples teste fenotípico é insuficiente para garantir a presença desses genes.

Tabela 5 - Teste fenotípico de β -lactamases de efeito expandido (ESBLs) em *Aeromonas*.

	CTX	CTX+CLA	CAZ	CAZ+CLA	CPO	CPO+CLA	ATM	ATM+CLA	CRO	CRO+CLA	Média					
IBAer 114	1,4	2,3	0,9	2,5	2,9	0,4	0	1,8	1,8	1,8	2,6	0,8	0	1,4	1,4	1,06
IBAer 148	2	2,5	0,5	1,5	2,3	0,8	0	0	0	1,1	1,1	1,1	0	1,8	1,8	0,84
IBAer 113	2,3	3,2	0,9	2	2,6	0,6	2,5	2,5	0	2,1	2,6	0,5	2,3	3,2	0,9	0,58
IBAer 166	1,8	1,8	0	2	2,6	0,6	0	0,9	0,9	2,4	2,4	0	2	2,6	0,6	0,42
IBAer 016	2,4	3,1	0,7	2,1	2,3	0,2	2,6	3,1	0,5	3,3	3,3	0	2,7	3,1	0,4	0,36
IBAer 007	2,6	2,7	0,1	1,7	2,4	0,7	2,3	2,5	0,2	2,6	3,2	0,6	2,5	2,4	-0,1	0,3
IBAer 120	2,5	3,2	0,7	2,5	2,5	0	0	0	0	2,1	2,8	0,7	1,8	1,8	0	0,28
IBAer 103	2,3	3	0,7	2,2	3,2	1	1,7	1,2	-0,5	1,8	3	1,2	2,8	1,7	-1,1	0,26
IBAer 106	3,5	4	0,5	2,4	3	0,6	2,8	2,8	0	3,2	3,3	0,1	3,3	3,4	0,1	0,26
IBAer 107	3	4	1	3,1	3,1	0	2,7	2,7	0	4	4,2	0,2	3,8	3,7	-0,1	0,22
IBAer 104	3	3,3	0,3	2,5	2,8	0,3	2,1	2,5	0,4	2,7	2,8	0,1	2,6	2,4	-0,2	0,18
IBAer 117	3,7	3,8	0,1	2,8	3,3	0,5	2,4	2,7	0,3	3,5	3,8	0,3	3,5	3,1	-0,4	0,16
IBAer 014	3,1	2,7	-0,4	2,7	3	0,3	1,9	2,4	0,5	2,6	3,2	0,6	2,6	2,2	-0,4	0,12
IBAer 110	2	2,8	0,8	2	1,4	-0,6	2,3	2,5	0,2	2,4	3,1	0,7	3,1	2,4	-0,7	0,08
IBAer 102	3,8	2,1	-1,7	2,5	2	-0,5	1,9	3	1,1	2,5	2,2	-0,3	1,9	3,6	1,7	0,06
IBAer 001	2,6	2,9	0,3	2	2	0	2,3	2,3	0	2,4	2,6	0,2	2,7	2,5	-0,2	0,06
IBAer 008	2,3	2,3	0	2	2,5	0,5	1,8	1	-0,8	2,5	2,5	0	2	2,3	0,3	-0
IBAer 171	1,3	1,1	-0,2	1,4	1,5	0,1	0,7	1,4	0,7	2,5	2,1	-0,4	1,5	1	-0,5	-0,06
IBAer 115	3,2	3,2	0	2,4	2,3	-0,1	2,2	2	-0,2	2,7	2,7	0	3	3	0	-0,06
IBAer 009	3,5	3,2	-0,3	2,8	2,8	0	2,4	1,5	-0,9	2,8	3	0,2	2,8	3,2	0,4	-0,12
IBAer 015	2,3	3	0,7	2,5	2,5	0	2,8	2,8	0	2,2	2,5	0,3	4	2,3	-1,7	-0,14
IBAer 111	3	2,8	-0,2	2,8	2,8	0	2,5	1	-1,5	3,5	3,5	0	2,4	3	0,6	-0,22
IBAer 146	2,8	1,6	-1,2	1,8	2,4	0,6	2	0,8	-1,2	2,5	2,7	0,2	2,7	2,1	-0,6	-0,44
IBAer 116	3,1	3,3	0,2	3	2,8	-0,2	2,4	1,4	-1	3,5	3,7	0,2	3,9	2,5	-1,4	-0,44

Diante dessa insuficiência, os 24 isolados, apresentados na Tabela 5, foram avaliados quanto à presença de genes que codificam para ESBLs através de PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores genéricos para ESBLs das famílias TEM, CTX, PER, SHV e *ampC*, conforme Tabela 2. Os resultados dessas análises mostraram que apenas o isolado IBAer 114 apresentou um segmento amplificado de aproximadamente 717pb esperado para genes TEM (Figura 6). Entretanto, segmentos amplificados de menor tamanho foram evidenciados nas linhagens IBAer 006, IBAer 009, IBAer 011 e IBAer 148. Esses segmentos podem ser atribuídos à presença de pseudogenes (genes TEM não funcionais) ou ampliações inespecíficas decorrentes da baixa temperatura de anelamento necessária devido ao baixo número de pares de bases no primer reverso utilizado (Tabela 2). De fato, desses isolados, IBAer 148 apresentou comportamento fenotípico compatível com a presença de ESBLs.

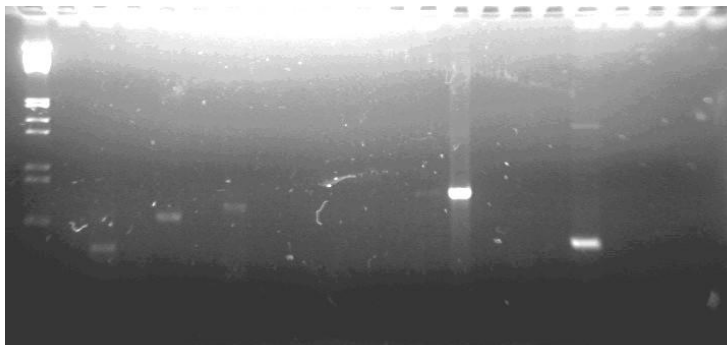


Figura 6 - Amplificação de fragmento correspondente ao gene TEM (717pb) no isolado IBAer 114. A partir da esquerda: padrão de peso molecular Lambda Eco/Hind, IBAer 001, IBAer 006, IBAer 007, IBAer 009, IBAer 010, IBAer 011, IBAer 111, IBAer 014, IBAer 016, IBAer 104, IBAer 106, IBAer 107, IBAer 114, IBAer 115, IBAer 116, IBAer 117, IBAer 148, IBAer 166, Branco.

O tamanho dos amplificadores esperados no caso dos genes da família CTX é variado. Conforme pode ser observado na Figura 7, ampliações inespecíficas foram obtidas com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a identificação de genes dessa família. O único isolado que apresentou um segmento amplificado de alta intensidade com tamanho correspondente ao esperado para genes que codificam para CTX (aproximadamente 500pb) foi IBAer 114. Outros isolados com segmentos amplificados de tamanho e intensidade compatível com a presença de genes que codificam para CTX foram IBAer 010, IBAer 104, IBAer 107 e IBAer 115, entretanto nenhum desses isolados apresentou fenótipo correspondente à presença de ESBLs.

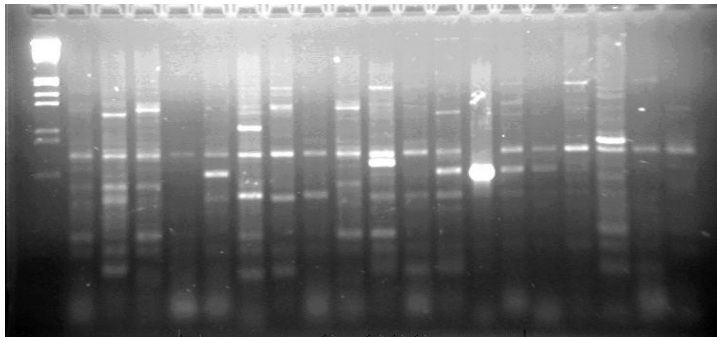


Figura 7 - Amplificação de genes que codificam para as B-lactamases da família CTX em isolados de *Aeromonas*. A partir da esquerda: padrão de peso molecular Lambda Eco/Hind, IBAer 001, IBAer 006, IBAer 007, IBAer 009, IBAer 010, IBAer 011, IBAer 111, IBAer 014, IBAer 016, IBAer 104, IBAer 106, IBAer 107, IBAer 114, IBAer 115, IBAer116, IBAer117, IBAer148, IBAer 166, Branco.

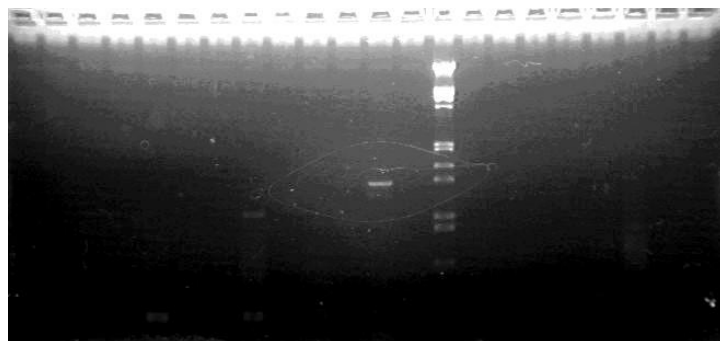


Figura 8 - Amplificação de genes *ampC* em isolados de *Aeromonas*.

Quanto à presença do gene *ampC*, um segmento amplificado com oligonucleotídeos iniciadores para este gene (*ampC*) foi observado apenas no isolado IBAer 114 (Figura 8). Este segmento apresentou peso molecular compatível com o esperado para este gene (aproximadamente 500pb).

Experimentos realizados com oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes que codificam para a família SHV e PER1 não resultaram em nenhum segmento amplificado, indicando que estes (SHV e PER1) não estão presentes nos isolados de *Aeromonas* estudados.

A frequência de β -lactamases de efeito expandido (ESBLs) é relativamente rara em *Aeromonas* (Ko et al., 1988). Entretanto essa característica rara pode estar em parte mascarada pela dificuldade de identificação fenotípica das ESBLs, em bactérias que possuem metalo- β -lactamases. Assim sendo, até o momento são poucos os registros de *Aeromonas* com ESBLs. Neste sentido, Marchandin *et al.* (2003) identificaram a presença do gene TEM 24 em um isolado de *Aeromonas*, obtido num hospital francês, associando a sua presença à transferência vertical a partir de *Enterobacter aerogenes* e,

segundo Quinteros *et al.* (2000, apud Radice *et al.*, 2002) evidenciaram a presença do gene CTX-M em isolados clínicos de *Aeromonas*, obtidos na Argentina.

Como um todo, os dados mostram que apenas um isolado (IBAer 114), obtido de uma amostra de fezes humanas de indivíduo não diarréico, apresentou características fenotípicas correspondentes à presença de β -lactamases de efeito expandido, com a presença de três genes que codificam para ESBLs (TEM, CTX e *ampC*). Esse isolado é particularmente interessante, sendo o único até o presente com presença múltipla de genes que codificam para ESBL.

Conjugantes entre IBAer 114 e *Escherichia coli* K12 foram obtidos através de métodos convencionais de mistura e co-cultivo de culturas bacterianas em fase exponencial, selecionadas em meio LB, contendo ácido nalidíxico como agente seletivo contra *Aeromonas*, e cloranfenicol ou ampicilina como agentes seletivos contra *E. coli*. Dois conjugantes selecionados em meio com cloranfenicol (Conj. Clo1 e Conj. Clo2) e dois selecionados em meio contendo ampicilina (Conj. Amp1 e Conj. Amp2) foram avaliados quanto ao seu perfil de resistência a antibióticos. Os resultados dessa análise (Tabela 6) mostram que, em ambos os casos, os conjugantes apresentaram perfis de resistência idênticos e comparáveis àqueles da linhagem doadora IBAer 114, incluindo a resistência a diversos antibióticos β -lactâmicos, à tobramicina, à gentamicina e ao cloranfenicol. A transferência concomitante por conjugação da resistência a esse conjunto de antibióticos, independente do sistema seletivo utilizado, associada à presença de plasmídio conjugativo de alto peso molecular no isolado IBAer114 (Figura 5) e nos conjugantes (dado não apresentado), é indicativo de que os genes responsáveis pelas resistências encontram-se no plasmídio conjugativo.

Tabela 6 - Resistência a antibióticos nas linhagens DH5 α , IBAer 114 e conjugantes selecionados em cloranfenicol e ampicilina.

	E. coli DH5 α	IBAer 114	Conjugantes			
			Conj. Clo1	Conj. Clo2	Conj. Amp1	Conj. Amp2
AMP	2,8	1,0	0,0	0,0	0,0	0,6
AMC	2,8	1,0	1,0	0,7	0,8	0,7
CFO	3,0	2,0	2,7	3,0	2,8	2,9
CTX	3,2	1,2	0,7	0,8	1,1	0,9
CRO	2,8	0,8	0,0	0,0	0,6	0,0
CPM	2,8	1,2	1,4	1,2	1,2	1,3
CAZ	2,8	2,1	1,8	2,4	2,2	2,2
ATM	3,0	1,0	1,4	1,2	1,0	1,1
AMI	2,8	1,7	1,8	2,0	2,4	2,6
TOB	2,4	1,3	1,3	1,3	1,4	1,2
TET	2,8	2,3	2,8	2,8	2,9	2,6
CIP	2,9	2,4	3,0	3,0	2,8	3,0
GEN	2,6	0,7	1,5	1,3	0,8	1,1
SUT	3,2	2,0	3,0	3,2	3,0	3,0
CLO	2,6	0,6	0,0	0,0	0,0	0,6

Visando provar que a resistência a diversos antibióticos β -lactâmicos (Tabela 6), evidenciada nos conjugantes, está associada à transferência de genes que codificam para ESBL, os parentais e conjugantes foram avaliados por PCR para a presença dos genes TEM, CTX e *ampC*.

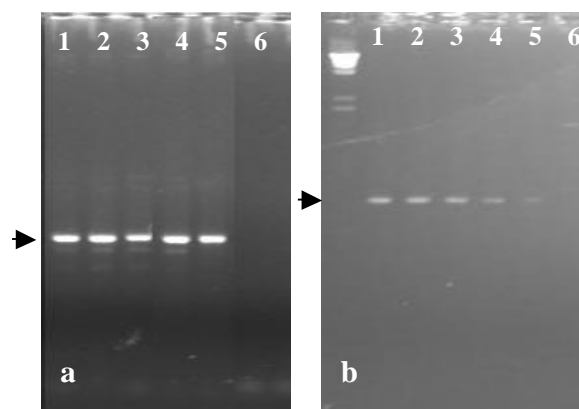


Figura 9 - Presença do gene CTX (a) e TEM (b) em conjugantes IBAer114 e *E. coli* K12. Amostras: 1- Conj. Clo1; 2- Conj. Clo2; 3- Conj. Amp1; 4- Conj. Amp2; 5- IBAer 114; 6- *E. coli* DH5 α .

Como pode ser evidenciado na Figura 9, os quatro conjugantes amplificaram segmentos correspondentes aos genes TEM e CTX. Entretanto nenhum deles mostrou a presença do gene *ampC*, gene usualmente cromossômico.

A presença de genes da família TEM e CTX em plasmídios conjugativos em *Aeromonas* foi previamente constatado por Marchandin *et al.* (2003) e por Quinteros *et al.* (2000, apud Radice *et al.*, 2002). Em ambos os casos esses determinantes foram passíveis de transferência para outras espécies bacterianas.

4.3 Atividade β -lactamásica em *Aeromonas*

Para fins de avaliação de atividade de β -lactamases em extratos celulares brutos, foram escolhidos três isolados de *Aeromonas*: (1) o isolado IBAer 114 foi escolhido devido ao seu perfil de resistência a antibióticos β -lactâmicos e à presença de genes que codificam para ESBL; (2) o isolado IBAer 130 foi selecionado por apresentar unicamente resistência à ampicilina e à combinação amoxicilina/ácido clavulânico, e (3) o isolado IBAer 107, por apresentar resistência a diversos antibióticos β -lactâmicos, mas ausência de ESBLs.

Como pode ser observado na Tabela 7 e Figura 10, a maior atividade β -lactamásica foi observada sobre a ampicilina, sendo que o isolado IBAer 114 apresentou atividade da ordem de 253,1 unidades, quando induzido com ampicilina e apenas 58,7 unidades na ausência de indução. Os outros isolados testados apresentaram atividade significativamente menor ao isolado IBAer 114. Nesse sentido, cabe observar que o tamanho do halo de inibição, obtido através do teste de disco, não apresenta relação com

a atividade, já que os isolados IBAer 130 e 107 apresentaram halo menor que o isolado IBAer 114.

Tabela 7 - Atividade β -lactamásica dos extratos de *Aeromonas* sobre distintos substratos β -lactâmicos.

	Isolados				
	IBAer114	IBAer130	IBAer107	Conj 1	IBAer114*
Ampicilina	253,1 \pm 12,2	27,9 \pm 1,7	25,9 \pm 2,1	64,0 \pm 2,5	58,7 \pm 1,8
Cefotaxima	132,5 \pm 3,3	0,4 \pm 0,2	0,2 \pm 0,2	5,1 \pm 0,5	4,3 \pm 0,3
Cefuroxima	107,2 \pm 4,8	0,0	0,0	0,0	0,5 \pm 0,1
Ceftriaxona	39,1 \pm 2,2	0,0	0,0	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,2
Ceftazidima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cefoxitina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

* Não induzida.

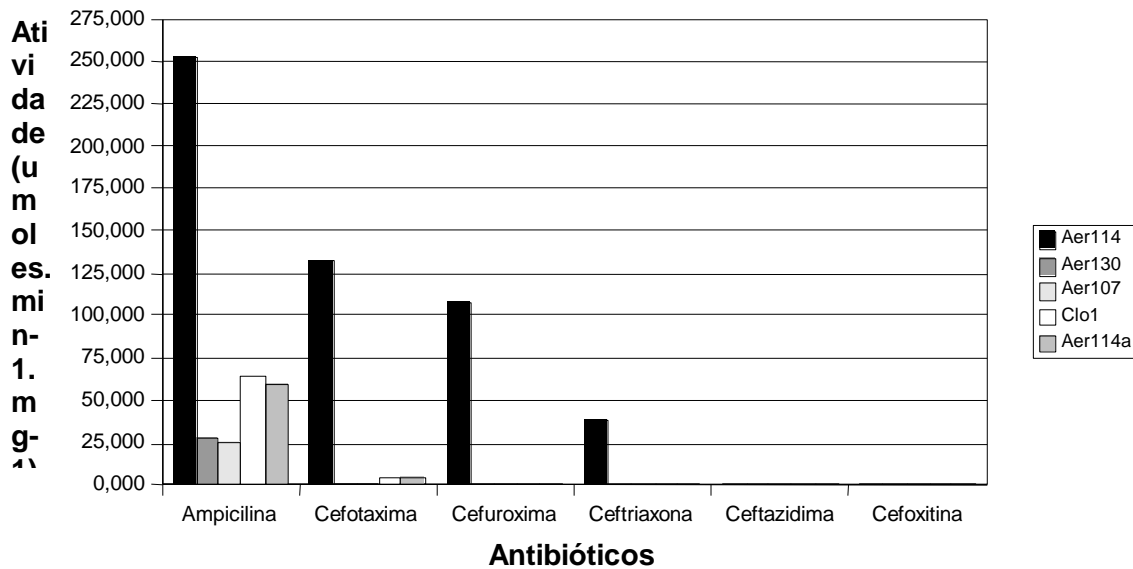


Figura 10 - Atividade β -lactamásica dos extratos de *Aeromonas* sobre distintos substratos β -lactâmicos.

A indução das β -lactamases de *Aeromonas* foi evidenciada por diversos autores. Os estudos de Alksne e Rasmussen (1997), mostraram que as β -lactamases de *Aeromonas* são reguladas de forma coordenada; sendo que mutantes desreprimidos,

segundo Walsh *et al.* (1997) e Ko *et al.* (1998) têm mostrado elevada atividade enzimática.

Os extratos protéicos do isolado IBAer 114 foram acrescidos de EDTA e PMSF em duas concentrações, visando avaliar a inibição de metalo e serino β -lactamases, respectivamente. Como pode ser observado na Tabela 8 e Figura 11, a adição de EDTA na concentração de 10mM provocou pequeno decréscimo na atividade β -lactamásica sobre ampicilina. Entretanto, quando a concentração do agente quelante foi elevada para 50mM, uma drástica redução (92%) da atividade sobre ampicilina foi evidenciada. Por outro lado, a presença de EDTA, mesmo em altas concentrações, provocou apenas uma redução de 15% na atividade enzimática sobre a cefotaxima. Este resultado mostra que grande parte da atividade sobre ampicilina é exercida por uma metalo- β -lactamase, enquanto que a atividade sobre a cefotaxima é exercida por enzimas que não dependem da presença de íons metálicos. Tal observação é confirmada pelos dados obtidos na presença de PMSF. Nesse caso, a atividade sobre a ampicilina é pouco influenciada pela adição de PMSF, enquanto a atividade sobre cefotaxima é drasticamente reduzida pela presença desse inibidor de enzimas que possui serina ou cistina no sítio ativo.

Tabela 8 - Efeito do EDTA e PMSF sobre a atividade penilínásica e cefalosporinásica dos extratos brutos de IBAer 114.

	Controle	EDTA 10mM	EDTA 50mM	PMSF 1mM	PMSF 5mM
Ampicilina	274,653	215,414	24,234	255,804	234,263
Cefotaxima	126,886	125,708	108,633	14,493	13,848

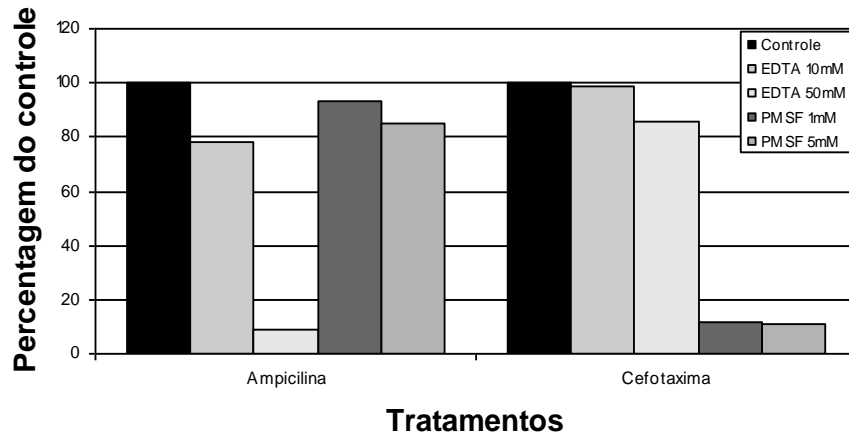


Figura 11 - Efeito do EDTA e PMSF sobre a atividade penilínásica e cefalosporínásica dos extratos brutos de IBAer 114.

Inibição por EDTA e por PMSF também foi realizada sobre extratos celulares das quatro linhagens e a atividade sobre ampicilina avaliada. Como pode ser observado na Figura 12, a adição de EDTA levou à redução de 100% da atividade penicilínásica nos isolados IBAer 107 e IBAer 130; reduziu a 87% da atividade do isolado IBAer114 e a apenas 4% da atividade do conjugante Clo1. Isso confirma que as linhagens IBAer 107 e 130 apresentam apenas metalo- β -lactamases e que grande parte da atividade penicilínásica de IBAer 114 é determinada metalo-B-lactamases.

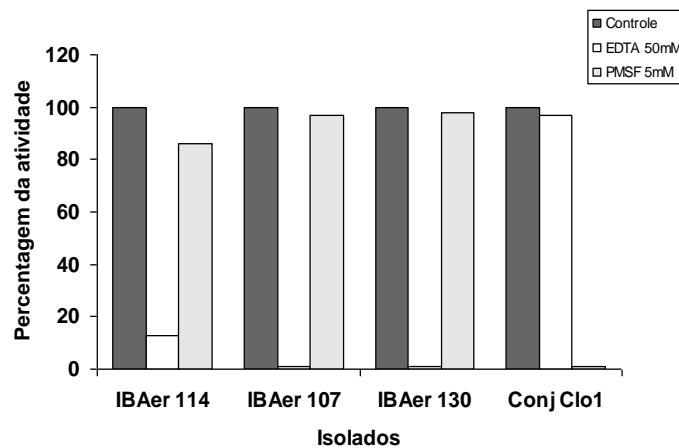


Figura 12 - Inibição da atividade penicilínásica dos extratos brutos dos isolados IBAer 114, IBAer 107 , IBAer 130 e do conjugante Clo1.

A comparação entre os perfis de inibição de IBAer 114 e do conjugante Clo1 mostra que o último recebeu apenas os genes determinantes das serino- β -lactamases, sendo as mesmas apenas inibidas por EDTA (agente quelante), mas drasticamente inativadas na presença de PMSF.

Quanto à inativação térmica, os dados apresentados na Tabela 9 e Figura 13 mostram que as β -lactamases produzidas pelo isolado IBAer 114 e IBAer 107 são sensíveis à temperatura, sendo que tanto a atividade sobre ampicilina como sobre cefotaxima sofrem pequena redução em tratamentos térmicos a 40°C e grande decréscimo a partir de 50°C. Já a atividade sobre a ampicilina dos extratos do isolado IBAer 107 mostra-se relativamente estável a 40°C, tendo redução progressiva com o aumento da temperatura para 50 e 60°C.

Tabela 9 - Inativação térmica das β -lactamases dos isolados IBAer 114 e IBAer 107.

	30°C		40°C		50°C		60°C	
	U/mg	%	U/mg	%	U/mg	%	U/mg	%
IBAer 114 AMP	274,6	100	188,5	68,6	56,5	20,6	32,3	11,8
IBAer 114 CTX	126,9	100	110,4	87,0	24,1	19,0	4,4	3,5
IBAer 107 AMP	42,0	100	42,6	100	20,4	63,6	1,4	4,5

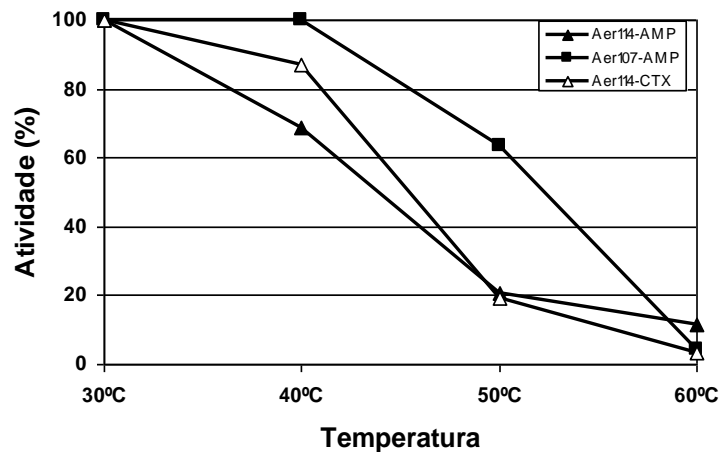


Figura 13 - Inativação térmica das β -lactamases dos isolados IBAer 114 e IBAer 107.

A curva de inativação térmica a 50°C dos extratos de IBAer 114 (Figura 14) permite evidenciar um comportamento linear a partir de 10min de tratamento, atingindo uma redução de 75% da atividade com 45min.

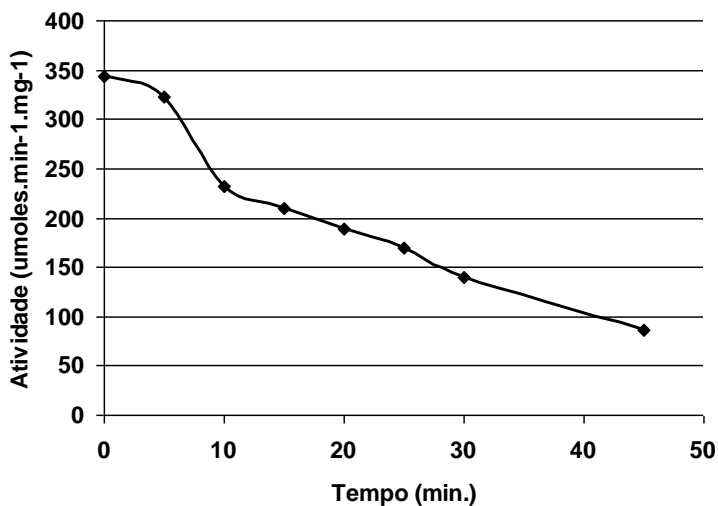


Figura 14 - Inativação térmica a 50°C das penicilinases presentes em extratos brutos de IBAer 114.

5 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos, podemos concluir:

1. As bactérias do gênero *Aeromonas* apresentam complexos perfis de resistência a antibióticos, exibindo alta frequência de resistência aos β -lactâmicos, à tetraciclina, ao cloranfenicol e ao cotrimazol (sulfametoxazol + trimetoprim).
2. As *Aeromonas* isoladas de suínos exibem alta frequência de resistência à tetraciclina e ao cotrimazol, fato que pode estar relacionado à utilização desses antibióticos durante a criação desses animais.
3. Os antibióticos mais eficientes no controle de *Aeromonas* são a gentamicina, a tobramicina e a ciprofloxacina.
4. A maior parte dos isolados de *Aeromonas* com resistência múltipla a antibióticos possuem plasmídios conjugativos associados ou não a plasmídios de baixo peso molecular.
5. A determinação fenotípica de β -lactamases de efeito expandido (sensibilidade ao ácido clavulânico) em *Aeromonas* é dificultada pela presença de metalo- β -lactamases com atividade sobre penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos.
6. Um isolado (IBAer 114) de *Aeromonas*, obtido de fezes de indivíduo sadio, mostrou características fenotípicas compatíveis com ESBLs, tendo confirmado a presença dos genes TEM, CTX e *ampC* por PCR.

7. Os genes TEM e CTX, assim como a resistência à cloranfenicol, à gentamicina e à tobramicina, foram transferidos para *E. coli* por conjugação mostrando a presença de plasmídeo conjugativo com diversos genes de resistência a antibióticos neste isolado.
8. Elevada atividade β -lactamásica foi evidenciada no isolado IBAer 114, assim como nos outros isolados avaliados, mostrando a eficiência dessas enzimas sobre diversos substratos.
9. As metalo- β -lactamases de *Aeromonas* IBAer 114 são responsáveis pela maior parte da atividade penicilínica, mas apenas por uma pequena parte da atividade sobre cefotaxima.
10. Apenas os genes responsáveis pelas serino- β -lactamases foram transferidos por conjugação para *E. coli*, confirmando a natureza cromossômica dos genes que codificam as metalo- β -lactamases nessas bactérias.
11. A atividade β -lactamásica de *Aeromonas* é inibida por temperaturas acima de 40°C, apresentando um decréscimo linear da atividade em função do tempo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, S.L. (2003). *Aeromonas and Plesiomonas*. In: **Manual of Clinical Microbiology**, 8th edn, pp. 701-705. Edited by P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Tenover & R.H. Tenover. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press.

Adams, C.A. ; Austin, B. ; Meaden, P.G. ; McIntosh, D. (1998). Molecular characterization of plasmid-mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonas salmonicida*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 4194-4201.

Albert, M.J. ; Ansaruzzaman, M. ; Talukder, K.A. ; Chopra, A.K. ; Khun, I. ; Rahman, M. ; Faruque, A.S.G. ; Islam, M.S ; Sack, R.B. ; Mollby, R. (2000). Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas sp.* isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. **J. Clin. Microbiol.** 38(10): 3785-3790.

Alksne, L.A. ; Rasmussen, B.A. (1997). Expression of the AsbA1, Oxa-12, and AsbM1 β -lactamases in *Aeromonas jandaei* AER14 is coordinated by two-component regulon. **J. Bacteriol.** 179: 2006-2013.

Altwegg, M. (1999). *Aeromonas and Plesiomonas*. In: Murray, P.R. ; Baron, M.A. ;

Pfaller, E.J. ; Tenover, F.C. ; Tenover, F.C. ; Tenover, F.C. ; Yolken, R.H. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology** American Society for Microbiology. pp.507-516.

Ambler, R.P.(1980). The structure of β -lactamases. **Philos. Trans. Roy. Soc. London Biol.** 289:321-331.

Aoki, T. (1988). Drug-resistant plasmids from fish pathogens. **Microbiol. Sci.** 5: 219-223.

Arakawa, Y. et al. (2000) . Convenient test for screening metallo- β -lactamase : producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **J. Clin. Microbiol.** 38 : 40-3.

Arpin, C. ; Dubois, V. ; Coulange, L. ; André, C. ; Fisher, I. ; Noury, P. ; Grobost, F. ; Brochet, J-P. ; Jullin, J. ; Dutilh, B. ; Larribet, G. ; Lagrange, I. ; Quentin, C. (2003). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private health care centers. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47(11): 3506-3514.

Avison, M.B. ; Niumsup, P. ; Nurmahomed, K. ; Walsh, T.R. ; Bennett, P.M. (2004). Role of the 'cre/blr-tag' DNA sequence in regulation of gene expression by *Aeromonas hydrophila* β -lactamase regulator BlrA. **J. Antimicrob. Chemother.** 53(2): 197-202.

Barroso, H. ; Freitas-Vieira, A. ; Lito, L.M. ; Cristino, J.M. ; Salgado, M.J. ; Neto, H.F. ;

- Sousa, J.C. ; Soveral, G. ; Moura, T. ; Duarte, A. (2000). Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases at a Portuguese hospital:TEM-10 as the endemic enzyme. **J. Antimicrob. Chemother** . 45: 611-616.
- Baunard, G. ; Delile, F. ; Rossier, A. ; Lambert, T. ; Philippon, A. ; Arlet, G. (2004). Dissemination of CTX-M-type β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. **Antimicrob. Agents Chemother**. 48(4) :1249-1255.
- Bebrone, C. ; Anne, C. ; DeVriendt, K. ; Devreese, B. ; Rossolini, G.M. ; Van Beeumen, J. ; Frère, J.M. ; Galeni, M. (2005). Dramatic broadening of the substrate profile of *Aeromonas hydrophila* CphA metallo- β -lactamase by site-directed mutagenesis. **J. Biol. Chem**. 280: 195-202.
- Bizani, D.; Brandelli, A. (2001). Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. **Braz. J. Microbiol**. 32: 334-339.
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrob. Agents Chemother**. 48:1-14.
- Bonnet, R.; Sampaio, J.L.M.; Lábia, C. ; De Champs, D.; Sirot, C.; Sirot, J. (2000). A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae*

isolated in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44: 1936-1942.

Bonomo, R.A.; Rudin, S.A.; Shales, D.M. (1997). Tazobactam is a potent inactivator of selected inhibitor-resistant class A β -lactamase FEMS. **Microbiol. Lett.** 71: 79-82.

Borer, A.; Gilad, J.; Menashe, G.; Peled, N.; Riesenber, K.; Schlaeffer, F. (2002). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains in community-acquired in Southern Israel. **Med. Sci. Monit.** 8(1): CR44-47.

Borrel, N.; Silvia, G.A.; Figueras, M.J.; Martinez-Murcia, J.A. (1997). Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA genes. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1671-1674.

Botarelli, E.; Ossiprandi, M.C. (1999). *Aeromonas* infections: an update. Disponível online <http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/bottarelli2/bottarelli.htm>

Bounaga, S.; Laws, A.P.; Galleni, M.; Page, M.I. (1998). The mechanism of catalysis and the inhibition of the *Bacillus cereus* zinc-dependent β -lactamase. **Biochem. J.** 331: 703-711.

Bradford, P.A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev.** 14(4): 933-951.

Bradford, P.A.; Urban, C.; Jaiswal, A.; Mariano, N.; Rasmussen, B.A.; Projan, S.J.; Rahal, J.J.; Bush, K. (1995). SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. **Antimicrob. Agents and Chemother.** 39(4): 899-905.

Brun-Bruissson, C.; Legrand, P.; Phillippon, A. et al. (1987). Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. **Lancet.** 2: 302-306.

Bush, K. (1989). Characterization of β -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** 33: 259-276.

Bush, K.; Singer, S.B. (1989). Effective cooling allows sonication to be used for liberation of β -lactamases from Gram-negative bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.** 24: 82-84.

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. (2001). New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin. Infect. Dis.** 32: 1085-1089.

- Chacón, M.R.; Figueras, M.J.; Castro-Escarpulli, G.; Soter, L.; Guavo, J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* sp. **Antonie van Leeuwenhoek**. 84: 269-278.
- Chaibi, E.B.; Sirot, D.; Paul, G.; Labia, R. (1999). Inhibitor-resistant TEM- β -lactamase: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. **J. Antimicrob. Chemother.** 43: 447-458.
- Challapalli, M.; Tess, B.R.; Cunningham, D.E.; Chopra, A.K.; Houston, C.W. (1988). *Aeromonas*-associated diarrhea in children. **Pediatric Infectious Disease Journal**. 7: 693-698.
- Chambers, F.H. (2001). The aminoglycosides. In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of the Therapeutics**. 10a ed. McGraw-Hill Companies.pp:1171-1218.
- Chaudhury, A.; Nath, G.; Shukla, B.N.; Sanyal, S.C. (1998). Biochemical characterization, enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmids of clinical and environmental *Aeromonas* isolates. **J. Med. Microbiol.** 44: 434-437.
- Chopra, A.K.; Houston, C.W. (1999). Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. **Microbiol Infect.** 1: 1129-1137.

- Corrêa, A.A.; Fuentefria, D.B.; Corção, G. (2005). Resistência a antimicrobianos em enterococos isolados de amostras de fezes de suínos. **Acta Sci. Vet.** 33: 155-159.
- Danel, F.; Hall, L.M.C.; Duke, B.; Gur, D.; Livermore, D.M. (1999). OXA-17, a further extend-spectrum variant of a OXA-10 β -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43: 1362-1366.
- Delamare, A.P.L.; Costa, S.O.P.; Da Silveira, M.M.; Echeverrigaray, S. (2000). Growth of *Aeromonas* species on increasing concentrations of sodium chloride. **Lett. Appl. Microbiol.** 30: 57-60.
- DePaola, A.; Flynn, P.A.; McPhearson, R.M.; Levy, S.B. (1988). Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline and oxytetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their environments. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 1861-1863.
- Eckert, C.; Gaultier, V.; Saladi-Allard, M.; Hidri, N.; Verdet, C.; Ould-Hocine, Z.; Fernández-Rodríguez, V.A.; Canton, V.R.; Pérez-Díaz, J.C.; Martínez Beltán, J.; Picazo, J.J.; Baquero, F. (1992). Aminoglycoside-modifying in clinical isolates harboring extended-spectrum β -lactamase-producing *klebsiellae*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 36: 2536-2538.

Gniadkowski, M.; Palucha, A.; Grzesioski, P.; Hryniewicz, W. (1998). Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in Warsaw, Poland: clonal spread of the TEM-47 extend-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL encoding gene. **Antimicrob. Agents Chemother.** 42: 3079-3085.

Goldstein, F.W. (2000). The multicentre study group. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in France. **Eur. J. Clin. Infect. Dis.** 19: 112-117.

Goñi-Urriza, M.; Pineau, L.; Capdepu, M.; et al. (2000a). Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. Isolated from two European rivers. **J. Antimicrob. Chemother.** 46: 297-301.

Goñi-Urriza, M.; Capdepu, M.; Arpin, C.; et al. (2000b). Impact of urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. **Appl. Environ. Microbiol.** 66(1): 125-132.

Hanson, N.D.; Sanders, C.C. (1999). Regulation of inducible AmpC β -lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. **Curr. Pharm. Design.** 5: 881-894.

Hayes, M.V.; Thomson, C.J.; Amyes, S.G.B. (1994). Three β -lactamases isolated from *Aeromonas salmonicida*, including a carbapenemase not detectable by conventional

methods. **Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 13: 805-811.

Hayes, M.V.; Thomson, C.J.; Amyes, S.G.B. (1996). The 'hidden' carbapenemase of *Aeromonas hydrophila*. **J. Antimicrob. Chemother.** 37: 33-44.

Hedges, R.W.; Smith, P.; Brazil, G. (1985). Resistance plasmids of Aeromonads. **J. Gen. Microbiol.** 131: 2091-2095.

Huletski, A.; Knox, J.R.; Levesque, R.C. (1993). Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of 3rd-generation cephalosporins by SHV-type β -lactamases probed by site-directed mutagenesis and 3-dimensional modeling. **J. Biol. Chem.** 268: 3690-3697.

Jacoby, G.A.; Sutton, L. (1991). Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother.** 35: 164-169.

Jacoby, G.A. (1997). Extended-spectrum β -lactamases and other enzymes providing resistance to oxymino- β -lactams. **Infect. Dis. Clin. N. Amer.** 11: 875-887.

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.

Ko, W.E.; Wu, H.M.; Chang, T.C.; Yan, J.J.; Wu, J.J. (1998). Inducible β -lactam resistance in *Aeromonas hydrophila*: therapeutic challenge for antimicrobial therapy. **J. Clin. Microbiol.** 36: 3188-3192.

Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C.; Winn, W.C. (2001). **Diagnóstico Microbiológico** . Ed. Médica e Científica Ltda., RJ. 1465p.

Krovacek, K.; Pasquale, V.; Baloda, S.B.; Soprano, V.; Conti, M.; Dmontet, S. (1994). Comparison of putative virulence factors in *Aeromonas hydrophila* stains isolated from the marine environment and human diarrheal cases in Southern Italy. **Appl. Environ. Microbiol.** 60(4):1379-1382.

Lawung, R.; Prachayasittikul, V.; Bulow, L. (2001). Purification and characterization of a β -lactamase from *Haemophilus ducreyi* in *Escherichia coli*. **Prot. Expr. Purif.** 23: 151-158.

Lefon-Guibout, V.; Speldooren, V.; Heym, B.; Nicolas-Chanoine, M.H. (2000). Epidemiological survey of amoxicilin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France: new genetic features of *bla*TEM genes. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44: 2709-2714.

Lemozy, J.; Sirot, D.; Chanal, C.; Hue, C.; Labia, R.; Dabernat, H.; Sirot, J.(1995). First

- characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. **Antimicrob. Agents Chemother.** 33: 2580-2582.
- Lescure, F.X.; Eveillard, M.; Douadi, Y.; Eb, F. (2001). Community-acquired multiresistant bacteria: an emerging problem? **J. Hosp. Infect.** 49:149-151.
- Lindberg, F.; Normark, S. (1986). Contribution of chromosomal β -lactamases to β -lactam resistance in enterobacteria. **Rev. Infect. Disc.** 8: 292-304.
- Livermore, D.M. (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** 8: 557-584.
- Linch, M.J.; Swift, S.; Fish, L.; Kirke, D.F.; Dodd, C.E.R.; Stewart, G.S.A.B.; Keevil, C.W.; Williams, P. (2002). The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. **Environm. Microbiol.** 4: 18-28.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (2004). **Microbiologia de Brock**. São Paulo : Prentice Hall .
- Marchandin, H., Godreuil, S., Darbas, H.; Jean-Pierre H. (2003). Extended-spectrum β -lactamase TEM-24 in an *Aeromonas* clinical strain: acquisition from the prevalent *Enterobacter aerogenes* clone in France. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47: 3994–3995.

- Martinez-Murcia, A.J.; Benlloch, S. ;Collins, M.D. (1992). Phylogenetic interrelationship of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing : lack of congruence with results of DNA/RNA hybridizations. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 42: 412-421.
- Matagne, A.; Lamotte-Brasseur, J.; Frere, J.M. (1999). Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity. **Biochem. J.** 330: 581-598.
- Medeiros, A.A. (1984). β -lactamases. **Br. Med. Bull.** 40: 18-27.
- Medeiros, A.A. (1997). Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. **Clin. Infect. Dis.** 24(1): S 19-45.
- Meyer, K.S.; Urban, C.; Eagan, J.A.; et al. (1993). Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late generation cephalosporins. **Ann. Intern. Med.** 119: 353-358.
- Montoya, R.; Dominguez, M.; Gonzalez, C.; Mondaca, M.A.; Zemelman, R. (1992). Susceptibility to antimicrobial agents and plasmid carrying in *Aeromonas hydrophila* isolated from two estuarine systems. **Microbios** . 69: 181-186.
- Nakajima, K. et al. (2001). Disk diffusion and microdilution tests for screening metallo- β -lactamase producing bacteria. **Abstract C-287**. In 101th ASM General Meeting,

Orlando.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2004). Approved standards M2-A8 and M7-A6: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourteenth Information Supplement. Wayne, PA, pp 161. [E o negrito?](#)

Naumovski, L.; Quinn, J.P.; Miyashiro, D.; et al. (1992). Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum β -lactamase in isolates from cancer patients. **Antimicrob. Agents Chemother.** 36: 1991-1996.

Navon-Venezia, S.; Hammer-Munz, O.; Schwartz, D.; et al. (2003). Occurrence and phenotypic characteristics of extended-spectrum β -lactamases among members of the family *Enterobacteriaceae* at the Tel-Aviv Medical Center (Israel) and evaluation of diagnostics tests. **J. Clin. Microbiol.** 41(1): 155-158.

Niumsop, P.; Simm, A.M.; Nurmahomed, K.; Walsh, T.R.; Bennett, P.; Avison, M.B. (2003). Genetic linkage of the penicillinase gene, *amp*, and *blrAB*, encoding the regulator of β -lactamase expression in *Aeromonas* spp. **J. Antimicrob. Chemother.** 51: 1351-1358.

Nukaga, M.; Mayama, K.; Hujer, A.M.; Bonomo, R.A.; Knox, J.R. (2003). Ultrahigh resolution structure of a class A β -lactamase: on the mechanism and specificity of the extend-spectrum SHV-2 enzyme. **J. Mol. Biol.** 328: 289-301.

- Oethinger, M.; Kern, W.V.; Jellen-Ritter, A.S.; McMurry, L.M. and Levy, S.B. (2000). Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44: 10-13
- Padilha, G.; Costa, S.O.P. (2004). Genética bacteriana. In: Trabulsi, L.R.; Alterthum, F. (Ed.) **Microbiologia**. 4^a ed. São Paulo. Atheneu. pp37-49.
- Pai, H.; Lyu, S.; Lee, J.H.; Kim, J.; Kwon, Y.; Kim, J.W.;Choe, K.W. (1999). Survey of extend-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. **J. Clin. Microbiol.** 37: 1758-1763.
- Palumbo, S.A.; Maxino, F.; Willians, A.C.; Buchanan, L.R.; Thayer, W.D. (1985). Starch-ampicilin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. **Appl. Environ. Microbiol.** 50(4): 1027-1030.
- Paterson, D.L. (2000). Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBL). **Clin. Microbiol. Infect.** 6: 460-463.
- Pereira, A.S.; Filho, J.R.C.; Tognim, M.C.B.; Sader, H.S. (2003). Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora

de β -lactamase de espectro estendido. **J. Bras. Patol. Méd. Lab.** 39(4): 45-50.

Pessoa-Silva, C.L.; Moreira, B.M.; Almeida, V.C.; et al. (2003). Extended-spectrum β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: risk factors for infection and colonization. **J. Hosp. Infect.** 53: 198-206.

Peterson, L.R.; Noskin, G.A. (2001). New technology for detecting multidrug-resistant pathogens in the clinical microbiology laboratory. **Emerg. Infect. Dis.** 7(2): 123-129.

Peterson, D.L.; Hujer, K.M.; et al. (2003). Extend-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV and CTX-M-type β -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47: 3554-3560.

Petri Jr., W.A. (2001). Antimicrobial Agents. In : Hardman, H.G.; Limbird, L.E. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutic.** 10^a ed. McGraw-Hill Companies. pp:1171-1218.

Philippon, A.; Arlet, G.; Lagrange, P.H. (1994). Origin and impact of plasmid-mediated of extended spectrum β -lactamases. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 13(10): S17-29.

Philippon, A.; Arlet, G.; Jacoby, G.A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type β -

lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother** . 46(1): 1-11.

Poirel, L.; Naas, T.; Le Thomas, I.; Karim, A.; Bingen, E.; Nordmann, P. (2001). CTX-M-type extend-spectrum β -lactamase that hydrolyses ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. **Antimicrob. Agents Chemother**. 45: 3355-3361.

Poirel, L.; Gniadkowski, M.; Nordmann, P. (2002). Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extend-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. **J. Antimicrob. Chemother**. 50: 1031-1034.

Poppoff, M.Y.; Coynault, C.; Kiredjan, M.; Lemelin, M. (1981). Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. **Curr. Microbiol.** 5: 109-114.

Poppoff, M.Y.; Lallier, R. (1994). Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas*. **Methods in Microbiology**. 16: 127-145.

Quinn, J.P.; Miyashiro, D.; Sahm, D.; et al. (1989). Novel plasmid-mediated β -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother**. 33: 1451-1466.

- Quiroga, M.I.; Franceschini, N.; Rossolini, G.M.; Gutkind, G.; Bonfiglio, G.; Franchino, L.; Amicosante, G. (2000). Interaction of cefotetan and metallo- β -lactamases produced in *Aeromonas sp.* and in vitro activity. **Chem.** 46: 177-183.
- Radice, M.; Power, P.; Di Conza, J.; Gutkind, G. (2002). Early dissemination of CTX-M derived enzymes in South America. **Antimicrob. Agents Chemother.** 46: 602-604.
- Randegger, C.C.; Keller, A.; Irla, M.; Wada, A.; Hächler, H. (2000). Contribution of natural amino acid substitution in SHV extend-spectrum β -lactamases to resistance against various β -lactams. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44: 2759-2763.
- Rasmussen, B.A.; Bush, K. (1997). Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** 41: 223-232.
- Rasmussen, B.A.; Keeney, D.; Yang, Y.; Bush, K. (1994). Cloning and expression of a cloxacillin-hydrolyzing enzyme and a cephalosporinase from *Aeromonas sobria* AER14M in *Escherichia coli*, requirement for an *E. coli* chromosomal mutation for efficient expression of the class D enzyme. **Antimicrob. Agents Chemother.** 38: 2078-2085.
- Rossolini, G.M.; Zanchi, A.; Chiesurin, A.; Amicosante, G.; Satta, G.; Guglielmetti, P. (1995). Distribution of *cphA* or related carbapenemase-encoding genes and production of carbapenemase activity in members of the genus *Aeromonas*.

Antimicrob. Agents Chemother. 39: 346-349.

Rossolini, G.M.; Walsh, T.; Amicosante, G. (1996). The *Aeromonas* metallo- β -lactamases: genetics, enzymology and contribution to drug resistance. **Microb. Drug Resist.** 2: 245-252

Rhodes, G.; Huys, G.; Sdwings, J.; McGann, P.; Hiney, M.; Smith, P.; Pickup, R.W. (2000). Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between *Aeromonas* in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant TetA. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 3883-3890.

Rice, L.B. (1999). Successful interventions for gram-negative resistance to extended-spectrum β -lactam antibiotics. **Pharmacotherapy.** 19: 120s-128s.

Rodriguez-Baño, J.; Navarro, M.D.; Romero, L.; et al. (2004). Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. **J. Clin. Microbiol.** 42(3): 1089-1094.

Rutz, F.; Lima, G.J.M.M. de (2006). O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no Brasil. *Incompleta*

Sabété, M.; Tarragó, R.; Navarro, F.; Miro, E.; Vergés, C.; Barbé, J.; Prats, G. (2000). Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolysing β -

lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44: 1970-1973.

Sanders, W.E.Jr.; Sanders, C.C. (1998). Inducible β -lactamases clinical and epidemiologic implications for use of newer cephalosporins. **Rev. Infect. Dis.** 10: 830-838.

Santos, J.A.; Gonzáles, C.J.; Otero, A.; Lopes, M.L.G. (1999). Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. **Appl. Envir. Microbiol.** 65: 5612-5614.

Santos Filho,L.; Santos,I.B.; Assis,M.L.; Xavier, D.E. (2002). Determinação da produção de metalo- β -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. **J. Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** 38(4): 291-296.

Sayeed, S.; Saunders, J.R.; Edwards, C.; Corkhill, J.E.; Hart, C.A. (1996). Expression of *Aeromonas caviae bla* genes in *Escherichia coli*. **J. Antimicrob. Chemother.** 38: 435-441.

Schmidt, A.S.; Bruun, M.S.; Dalsgaard, I.; Larsen, J.L. (2001). Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile *Aeromonas* from a fish farming environment. **Appl.**

Environ. Microbiol. 67: 5675-5682.

Senda, K.; Arakawa, Y.; Ichiyama, S.; Nakashima, K.; Ito, H.; Ohsuka, S.; Shimokata, K.; Kato, N.; Ohta, M. (1996). PCR detection of metallo- β - lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactamases. **J. Clin. Microbiol.** 34: 2909-2913.

Sirot, D.; Sirot, J.; Labia, R.; et al. (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.

Sisti, M.; Albano, A.; Brandi, G. (1998). Bactericidal effect of chlorine on motile *Aeromonas* spp. in drinking water supplies and influence of temperature on disinfection efficacy. **Letters in Applied Microbiology.** 26: 347-351.

Soilleux, M.J.; Morand, A.M.; Arlet, G.J.; Scavizzi, M.R.; Labia, R. (1996). Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extend-spectrum β -lactamases: prevalence of TEM-3 and first identification of TEM-26 in France. **Antimicrob. Agents Chemother.** 40: 1027-1029.

Tavares, W. (2001). Resistência bacteriana In: **Manual de antibióticos e quimioterápicos antinfeciosos**. 3. ed. São Paulo. Ateneu, ano. Cap.5, pp 55-144.

- Teka, T.; Faruque, G.S.A.; Hossain, I.M.; Fuchs, J.G. (1999). Aeromonas-associated diarrhea in Bangladesh in children: clinical and epidemiological characteristics. **Ann. Trop. Pediatrics.** 19: 15-20.
- Tenover, F.C. (2001). Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. **Clin. Infect. Dis.** 33(3): S108-115.
- Thomson, K.S. (2001). Controversies about extended-spectrum and AmpC β -lactamases. **Emerg. Infect. Dis.** 7(2): 333-336.
- Thomson, K.S.; Sanders, C.C. (1992). Detection of extend-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: Comparison of the double-disk and three-dimensional tests. **Antimicrob. Agents Chemother.** 36: 1877-1882.
- Thomson, K.S.; Sanders, C.C.; Moland, C.S. (1999). Use of microdilution panels with and without β -lactamase inhibitors as a phenotypic test for β -lactamase production among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43: 1393-1400.
- Toney, J.H.; Cleary, K.A; Hammond, G.G.; Yuan, X.; May, W.J.; Hutchins, S.M.; Ashton, W.T.; Vanderwall, D.E. (1999). Structure-activity relationships of biphenil tetrazoles as metallo- β -lactamase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 9: 2741-2746.

Tzouvelekis, L.S.; Bonomo, R.A. (1999). SHV-type β -lactamases. **Curr. Pharm. Des.** 5: 847-864.

Tzouvelekis, L.S.; Tzelepi, E.; Tassos, P.T.; Legakis, N.J. (2000). CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. **Int. J. Antimicrob. Agents.** 14: 137-143.

Vallares, M.H.; Felici, A.; Weber, G.; Adolph, H.W.; Zeppezauer, M.; Rossolini, G.M.; Amicosante, G.; Frère, J.M.; Galleni, M. (1997). Zn (II) dependence of the *Aeromonas hydrophila* AE036 metallo- β -lactamase activity and stability. **Biochemistry** 36: 11534-11541.

Waley, S. G. (1974). A spectrophotometric assay of β -lactamase action on Penicillins. **Biochem. J.** 139: 789-790.

Waley, S.G. (1987). An explicit model for bacterial resistance: application to β -lactam antibiotics. **Microbiol. Sci.** 4: 143-146.

Walsh, T.R.; Hall, L.; MacGowan, A.P.; Bennett, P.M. (1995a). Sequence analysis of two chromosomally mediated inducible β -lactamases from *Aeromonas sobria*, strain 163a, one a class D penicillinase, the other an ampC cephalosporinase. **J. Antimicrob. Chemother.** 36: 41-52.

Walsh, T.R.; Payne, D.J.; MacGowan, A.P.; Bennett, P.M. (1995b). A clinical isolate of *Aeromonas sobria* with three chromosomally mediated inducible β -lactamases: a cephalosporinase, a penicillinase and a third enzyme, displaying carbapenemase activity. **J. Antimicrob. Chemother.** 35: 271-279.

Walsh, T.R.; Stunt, R.A.; Nabi, J.A.; MacGowan, A.P.; Bennett, P.M. (1997). Distribution and expression of β -lactamase genes among *Aeromonas* spp. **J. Antimicrob. Chemother.** 40: 171-178.

Walsh, T.R.; Neville, W.A.; Haran, M.H.; Tolson, D.; Payne, D.J.; Baterson, J.H.; MacGowan, A.P.; Bennett, P.M. (1998). Nucleotide and amino acid sequences of the metallo- β -lactamase, ImiS, from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 42: 436-439.

Walter, M.W.; Felici, A.; Galleni, M.; Paul Soto, R.; Adlington, R.M.; Baldwin, J.E.; Frère, J.M.; Gololobov, M.; Schofield, C.J. (1996). Trifluoromethyl alcohol and ketone inhibitors of metallo- β -lactamases. **Bioorg. Med. Chem Lett.** 6: 2455-2458.

Walter, M.W.; Hernandez Valladares, M.; Adlington, R.M.; Amicosante, G.; Baldwin, J.E.; Frère, J.M.; Galleni, M.; Rossolini, G.M.; Schofield, C.J. (1999). Hydroxamate inhibitors of *Aeromonas hydrophila* AE-036 metallo- β -lactamases. **Bioorganic Chem.** 27: 35-40.

- Watanabe, N.; Morita, K.; Furukawa, T.; Manzoku, T.; Endo, E.; Kanamori, M.(2004). Sequence and analysis of amplified DNA fragments containing the region encoding the putative lipase substrate-binding domain and genotyping of *Aeromonas hydrophila*. **Appl. Envir. Microbiol.** 70(1):145-151.
- Winokur, P.L.; Canton, R.; Casellas, J.M.; et al. (2001). Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamases phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas and Western Pacific region. **Clinic. Infect. Dis.** 32(2): S94-103.
- Yagi, T.; Kruokawa, H.; Shibata, N.; Shibayama, K.; Arakawa, Y. (2000). A preliminary survey of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. **FEMS Microbiol. Lett.** 184: 53-56.
- Zervosen, A.; Valladares, M.H.; Devreese, B.; et al. (2001). Inactivation of *Aeromonas hydrophila* metallo- β -lactamase by cephamycins and moxalactam. **Eur. J. Biochem.** 268:3840-3850.