

Maria Eduarda Moreno da Silveira

Disseminação ambiental de bactérias e genes que conferem resistência a antibióticos e o seu possível impacto na saúde pública

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2009



Maria Eduarda Moreno da Silveira

Disseminação ambiental de bactérias e genes que conferem resistência a antibióticos e o seu possível impacto na saúde pública

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2009

Maria Eduarda Moreno da Silveira

Disseminação ambiental de bactérias e genes que conferem resistência a antibióticos  
e o seu possível impacto na saúde pública

Assinatura

Trabalho apresentado à Universidade Fernando  
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do  
grau de Licenciatura em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:

*Professora Doutora Carla Novais*

Porto 2009

## Sumário

Nos últimos 50 anos os antibióticos têm sido utilizados como agentes terapêuticos humanos e veterinários, como promotores do crescimento animal e algumas vezes em práticas agrícolas. O uso massivo destas moléculas, em diferentes ambientes, levou à selecção de bactérias multi-resistentes, em todas as regiões geográficas, devido à aquisição de mutações e elementos genéticos móveis (plasmídeos, integrões e transposões) portadores de genes, que conferem resistência a um, ou mais antibióticos (Schwarz *et al.*, 2001).

A disseminação de bactérias resistentes e dos seus respectivos genes é preocupante não só no meio hospitalar, mas também em outros locais que, directa ou indirectamente, contactam com o homem e o põem em risco de contrair infecções, ou de colonização com bactérias resistentes. São já alguns estudos que descreveram resistências a antibióticos em estirpes oriundas de esgotos, águas para consumo humano e recreativas, no ar e em alimentos de origem animal e vegetal (Zanetti *et al.*, 2001; Iversen *et al.*, 2002; Kühn *et al.*, 2005; Sapkota *et al.*, 2006). As descargas de efluentes de esgotos hospitalares e urbanos deficientemente tratados e de resíduos de antibióticos por parte da indústria farmacêutica, a utilização de estrume animal contaminado, o uso intensivo de antibióticos na produção animal e por vezes em práticas agrícolas têm sido algumas das razões apontadas, que podem justificar a presença de tais bactérias e genes nos alimentos, animais, em ambiente aquático e no ar (Guardabassi *et al.*, 1998; Schwarz *et al.*, 2001; Zanetti *et al.*, 2001; Iversen *et al.*, 2002; Sapkota *et al.*, 2006).

Para além de bactérias verdadeiramente patogénicas, ou oportunistas não podemos esquecer que muitos dos genes de resistência são transferíveis e que a própria flora autóctone dos diferentes ambientes pode servir não só como reservatório, mas também como local de amplificação destes genes fora dos hospitais.

Assim, é objectivo deste estudo fazer um trabalho de revisão sobre a disseminação de bactérias e genes que conferem resistência a antibióticos no ambiente, de modo a

contribuir para uma maior compreensão e divulgação do uso destas moléculas e do seu possível impacto na saúde pública. Tratando-se de um problema emergente a nível mundial, em que todos os profissionais de saúde se deverão encontrar envolvidos, parece-me fundamental que, enquanto futura profissional de Ciências Farmacêuticas, adquira competências sobre o tema, de forma que, num futuro próximo, possa contribuir para a educação ambiental e saúde pública das populações.

### **Abstract**

In the last fifty years, antibiotics have been used as human and veterinary therapeutic agents, such as animals growth promoters and, sometimes, in agricultural practices. The massive use of these molecules, in different environments, led to the selection of multi-resistant bacteria in all geographical regions due to the acquisition of mutations and mobile genetic elements (plasmids, integrons and transposons), carry genes that confer resistance to one or more antibiotics (Schwarz *et al.*, 2001).

The spread of resistant bacteria and their genes is worrying, not only in hospitals but also in other places, which directly or indirectly, into contact with the man and put at risk of contracting infections or colonization with resistant bacteria. Are already some studies that described resistance to antibiotics in strains from sewage, water for human consumption and recreation, air and food origin of animal and plant (Zanetti *et al.*, 2001; Iversen *et al.*, 2002; Kühn *et al.*, 2005; Sapkota *et al.*, 2006).The discharge of sewage effluents and urban hospitals poorly treated and the residues of antibiotics by the pharmaceutical industry, the use of manure contaminated, the intensive use of antibiotics in animal production and agricultural practices, have been some of the reasons that can justify the presence of such bacteria and genes in food, animals or in the aquatic environment and air (Guardabassi *et al.*, 1998; Schwarz *et al.*, 2001; Zanetti *et al.*, 2001; Iversen *et al.*, 2002; Sapkota *et al.*, 2006).

Besides pathogenic bacteria or opportunistic truly, we must not forget that many of the genes for resistance are transferable and that the indigenous flora of the different

environments can serve not only as a reservoir, but also as a place of amplification of these genes outside of hospitals.

So, the objective of this study is to do a review about the spread of bacteria and genes that confer resistance to antibiotics in the environment, to contribute to greater understanding and disclosure of the use of these molecules and their possible impact on public health. This is an emerging problem worldwide, where all health care professionals should be involved, it seems to me essential that, while professional future of Pharmaceutical Sciences, acquire knowledges on the subject, so that in the near future, I can give my contribute to peoples education on issues of environment and public health.

## Dedicatória Póstuma

Dedico, postumamente, ao meu pai, com muita saudade, carinho e reconhecimento, este trabalho, que traduz o culminar do meu percurso académico, ao longo destes seis anos, pois, estou ciente que teria sido, para si, uma grande alegria assistir ao *terminus* curricular da minha licenciatura em Ciências Farmacêuticas.

## **Agradecimentos**

Ao longo da realização deste trabalho, algumas foram as dificuldades com que me deparei para o prosseguir, que sem a ajuda e colaboração indispensável de algumas pessoas teria sido muito mais difícil concluí-lo. Deste modo, agradeço, de forma particular, expressando imensa gratidão e reconhecimento:

à *Professora Doutora Carla Novais*, orientadora deste trabalho, toda a disponibilidade, orientação e ajuda que me dedicou ao longo da sua elaboração;

ao *Professor Doutor Bruno Nunes* a cedência de alguma da bibliografia utilizada, nomeadamente, artigos científicos;

ao meu *filho* pelo seu inesgotável apoio, confiança e entusiasmo;

à minha *mãe* pela sua constante dádiva de carinho;

à minha *irmã* por ter acreditado na minha capacidade em ingressar e concluir esta licenciatura;

e, finalmente, ao meu querido amigo, *Luís Ribeiro*, que me transmitiu um apoio incondicional aliado a uma ajuda imprescindível.

Muito Obrigada!

## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>  | <b>14</b> |
| <b>CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ANTIBIÓTICOS.....</b>                             | <b>17</b> |
| 1 - HISTÓRIA E EVOLUÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS .....   | 17        |
| 2 - CLASSES DE ANTIBIÓTICOS, MECANISMOS DE ACÇÃO ASSOCIADOS E ESPECTRO DE<br>ACTIVIDADE..... | 20        |
| i) Antiparietais .....   | 22        |
| ii) Antimembranares .....  | 24        |
| iii) Inibidores da síntese proteica.....   | 25        |
| iv) Inibidores da síntese de ácidos nucleicos.....   | 27        |
| v) Antimetabolitos .....   | 28        |
| vi) Nitrofuranos .....   | 28        |
| <b>CAPÍTULO II - O USO DA ENGENHARIA GENÉTICA PELAS BACTÉRIAS ...</b><br>.....               | <b>32</b> |
| 1 - MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS .....   | 32        |
| 2 - ELEMENTOS GENÉTICOS ASSOCIADOS À DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS<br>ANTIBIÓTICOS .....   | 37        |
| i) Plasmídeos .....  | 38        |
| ii) Transposões e sequências de inserção .....   | 39        |
| iii) Integrões e cassetes de genes .....   | 41        |
| 3 - A RELAÇÃO DO <i>QUORUM SENSING</i> COM A RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS .....              | 42        |
| <b>CAPÍTULO III - EPIDEMIOLOGIA DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS<br/>NO AMBIENTE .....</b>    | <b>45</b> |
| 1 - A INFLUÊNCIA DO HOMEM E DOS ANIMAIS NA CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE .....                    | 45        |
| 2 - ANTIBIÓTICOS COMO ENTIDADES QUÍMICAS CONTAMINANTES.....                                  | 46        |
| 3 - EMERGÊNCIA DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS FORA DO AMBIENTE<br>HOSPITALAR .....  | 53        |
| 3.1 - O ambiente aquático.....   | 54        |
| 3.2 - O ambiente de produção animal.....   | 58        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3 - O ar como veículo de transmissão de bactérias resistentes .....                 | 63        |
| 4 - PREVENÇÃO DA DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS NO AMBIENTE...<br>..... | 63        |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>   | <b>65</b> |

## Índice de Figuras

|  |           |
|--|-----------|
| <b>CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ANTIBIÓTICOS.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>Fig.1.1</b> - Mecanismos de acção dos antibióticos .....  | 20        |
| <b>Fig.1.2</b> - Diferenças estruturais entre bactérias de Gram positivo e de Gram negativo .....                | 21        |
| <b>Fig.1.3</b> - Diferenças estruturais entre célula procariota e eucariota .....                                | 21        |
| <b>Fig.1.4</b> - Estrutura química da molécula do agente antimicrobiano Vancomicina                              | 23        |
| <b>Fig.1.5</b> - Estrutura química do antibiótico lipopeptídico cíclico Daptomicina .....                        | 25        |
| <b>CAPÍTULO II - O USO DA ENGENHARIA GENÉTICA PELAS BACTÉRIAS...</b>   | <b>32</b> |
| <b>Fig.2.1</b> - Diagrama comparativo entre as cinco famílias de bombas de Efluxo.....                           | 36        |
| <b>Fig.2.2</b> - Mapa genético do plasmídeo R100 .....   | 39        |
| <b>Fig.2.3</b> - Exemplo de um transposição que alberga vários genes de resistência.....                         | 40        |
| <b>Fig.2.4</b> - Estrutura de Tn9 e Tn10 .....   | 41        |
| <b>Fig.2.5</b> - Captação de cassete de genes por integrões .....  | 42        |
| <b>Fig.2.6</b> - Estrutura de integração e cassete de genes.....   | 42        |
| <b>CAPÍTULO III - EPIDEMIOLOGIA DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS NO AMBIENTE .....</b>                            | <b>45</b> |
| <b>Fig.3.1</b> - Vias de dispersão de antibióticos e/ou microrganismos a eles resistentes no meio ambiente ..... | 46        |
| <b>Fig.3.2</b> - Total de antibióticos consumidos em ambulatório em 26 países europeus em 2002 .....             | 49        |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>  | <b>65</b> |

## Índice de Tabelas

|  |           |
|--|-----------|
| <b>CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ANTIBIÓTICOS.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>Tabela 1.1</b> - Dados cronológicos relativos à descoberta de antibióticos e microrganismos associados à sua produção .....   | 18        |
| <b>Tabela 1.2</b> - Classes de antibióticos e seu mecanismo de acção .....   | 29        |
| <b>CAPÍTULO III - EPIDEMIOLOGIA DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS NO AMBIENTE .....</b>  | <b>45</b> |
| <b>Tabela 3.1</b> - Concentrações (ng/L) de fluoroquinolonas e sua variação sazonal em águas residuais hospitalares e afluentes e efluentes de ETARs na cidade de Coimbra, Portugal..... | 48        |
| <b>Tabela 3.2</b> - Volume de vendas de antibióticos em medicina veterinária como agentes terapêuticos e como promotores de crescimento em países membro da EU em 1997 .....             | 50        |
| <b>Tabela 3.3</b> - Antibióticos detectados, em µg/L, na estação de tratamento de águas de Pantcheru Enviro Tech Lda. na Índia .....   | 53        |
| <b>Tabela 3.4</b> - Percentagem de resistência em <i>E. coli</i> isolada de suínos doentes em 11 países europeus, no ano de 2004 .....   | 60        |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>  | <b>65</b> |

## Lista de Abreviaturas

*aac* – Acetiltransferase

*aad* – Adeniltransferase

ABC – ATP-Binding Cassette

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

*al.* – *alli*

*aph* – Fosfotransferase

CC – Complexo Clonal

CE – Comissão Europeia

*cit.* – citando

DDD – Dose Diária por Dia

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DHFR – Dihidrofolato Redutase

DHPS – Dihidropteroato Sintetase

EMA – European Agency for the Evaluation of Medicinal Products

ESAC – European Surveillance of Antimicrobial Consumption

ETARs – Estações de Tratamento de Águas Residuais

*etc.* – *et caetera*

EUA – Estados Unidos da América

EU – União Europeia

FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations

Fig. – Figura

g – Grama

In – Integrão

intI – Integrase

IR – Sequências Repetidas Invertidas

IS – Sequências de Inserção

Kb – Kilobases

Kg – Kilograma

L – Litro

LOQ – Limite de Quantificação

LPS – Lipopolissacarídeos  
MATE – Multidrug And Toxic Compound Extrusion  
MBLs – Metalo- $\beta$ -lactamases  
MFS – Major Facilitator Superfamily  
mg/L – Miligrama por litro  
mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro  
MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina  
NQ – Não Quantificado  
ng/L – Nanogramas por litro  
Omps – Proteínas da membrana externa  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PABA – Ácido *p*-aminobenzóico  
PBPs – Penicilin Binding Proteins  
R-plasmídeo – Plasmídeo Resistente  
RNA – Ácido Ribonucleico  
RND – Resistance Nodulation Divison  
SMR – Staphylococcal Multiresistance  
t – Tonelada  
Tn – Transposição  
tRNA – Ácido Ribonucleico de transferência  
 $\mu$ g/L – Microgramas por litro  
VTEC – *Escherichia coli* produtora de Verotoxina  
WHO – World Health Organization

Disseminação ambiental de bactérias e genes que conferem resistência a antibióticos e o seu possível  
impacto na saúde pública

## **Capítulo I – Considerações gerais sobre antibióticos**

## Capítulo I – Considerações gerais sobre antibióticos

### 1 – História e evolução dos antibióticos

A descoberta dos agentes antimicrobianos e a sua utilização no tratamento de infecções bacterianas revolucionou a história da medicina moderna, pois veio permitir o tratamento eficaz de doenças infecciosas até então consideradas mortais (ex: tuberculose, lepra, sífilis, infecções pulmonares e meningite bacteriana) (Ligon, 2004; Bryskier, 2005). Isto só foi possível, porque estes compostos mostraram ter capacidade de interferir com algumas estruturas e processos fundamentais envolvidos no crescimento bacteriano (bacteriostáticos), ou na sua sobrevivência (bactericidas).

O termo *antibiótico* foi criado, em 1889, por Vuillemin. No entanto, é só em 1942 que Waksman o utiliza para classificar compostos químicos naturais (Bryskier, 2005). Inicialmente, estes compostos eram obtidos através de reacções associadas ao metabolismo de diversos microrganismos (fungos, ou bactérias), como por exemplo *Actinomycetes* ou *Streptomyces* (Donadio *et al.* 2002; Thompson *et al.*, 2002; Cundliffe, 2006; Sousa, 2006; Madigan *et al.*, 2009). Um dos exemplos mais conhecidos é o antibiótico penicilina, um  $\beta$ -lactâmico produzido pelo fungo *Penicillium notatum*. Também revolucionaram a história da medicina a produção da estreptomicina por *Streptomyces griseus* e da tetraciclina por *Streptomyces* spp. Outros exemplos são destacados na Tabela 1.1. Actualmente, a produção dos antibióticos é realizada por síntese química total (ex: sulfonamidas, ou quinolonas), ou por semi-síntese (ex: ampicilina) (Brakhage, 1998; Bryskier 2005; Sousa, 2006; Madigan *et al.*, 2009).

**Tabela 1.1** – Dados cronológicos relativos à descoberta de antibióticos e microrganismos associados à sua produção (adaptado de Sousa, 2006).

| Dados cronológicos | Antibióticos            | Origem                           |
|--------------------|-------------------------|----------------------------------|
| 1928               | Penicilina              | <i>Penicillium notatum</i>       |
| 1935               | Sulfanilamida/Prontosil | <b>Síntese química</b>           |
| 1944               | Estreptomicina          | <i>Streptomyces griseus</i>      |
| 1944               | Gramicidina             | <i>Bacillus brevis</i>           |
| 1945               | Bacitracina             | <i>Bacillus licheniformis</i>    |
| 1947               | Cloranfenicol           | <i>Streptomyces venezuelae</i>   |
| 1947               | Polimixina              | <i>Bacillus polymyxin</i>        |
| 1948               | Cefalosporinas          | <i>Cephalosporium spp</i>        |
| 1952               | Eritromicina            | <i>Streptomyces erythreus</i>    |
| 1953               | Tetraciclina            | <i>Streptomyces spp</i>          |
| 1956               | Vancomicina             | <i>Streptomyces orientalis</i>   |
| 1957               | Rifampicina             | <i>Streptomyces mediterranei</i> |
| 1962               | Ácido Fúsidico          | <i>Fusidium coccineum</i>        |
| 1963               | Gentamicina             | <i>Micromonospora purpura</i>    |

A era moderna da antibioterapia iniciou-se, em 1936, com o uso da sulfanilamida (prontosil – um pró-fármaco) em infeções estreptocócicas (erisipela), estafilocócicas, gonocócicas e pneumocócicas (Bryskier, 2005). Em 1928, Alexander Fleming descobre a penicilina, sendo este um dos marcos mais significativos na História da Ciência, Medicina e Farmácia do séc. XX, pois esta era muito mais eficaz que as sulfonamidas no combate às infeções, anteriormente, referidas. No entanto, só cerca de dez anos mais tarde é que a comunidade científica se debruça sobre a investigação e produção deste antibiótico. Assim, a sua aplicação na terapêutica humana só se verificou nos anos quarenta, mais precisamente em 1941, quando Howard Florey e Ernest Chain, investigadores da Universidade de Oxford, em colaboração com outros cientistas, publicaram um artigo onde demonstraram as propriedades terapêuticas da penicilina. Devido ao contexto histórico da época – II Guerra Mundial – a necessidade da produção em larga escala deste antibiótico era urgente. Isto foi possível nos Estados Unidos, em 1943, com a colaboração de alguns laboratórios de Indústria Farmacêutica. Em 1944, a penicilina é distribuída em Portugal através da Cruz Vermelha (Pereira *et al.*, 2005;

Sousa, 2006). Finalmente, em 1945, foi atribuído o Prémio Nobel da Medicina e Fisiologia a Fleming, Florey e Chain pela sua descoberta e validação terapêutica.

Desde esta data até aos anos sessenta foram descobertos vários antibióticos (Tabela 1.1), sendo, seguidamente, descritos alguns exemplos. Em 1957, por digestão enzimática da benzilpenicilina, é obtido o ácido 6-aminopenicilâmico (6-APA), que permite o desenvolvimento de antibióticos semi-sintéticos, a partir de alterações nos radicais químicos das cadeias laterais do núcleo penemo. O primeiro antibiótico semi-sintético a ser produzido foi a meticilina (derivado da penicilina G). Logo a seguir surgem as primeiras cefalosporinas semi-sintéticas (derivadas da cefalosporina C), a partir de alterações nos radicais químicos das cadeias laterais do núcleo cefemo (ex: cefalotina em 1962 e cefalonidina em 1964) (Rolinson, 1998; EMEA, 1999; Sousa, 2006; Rolinson *et al.*, 2007).

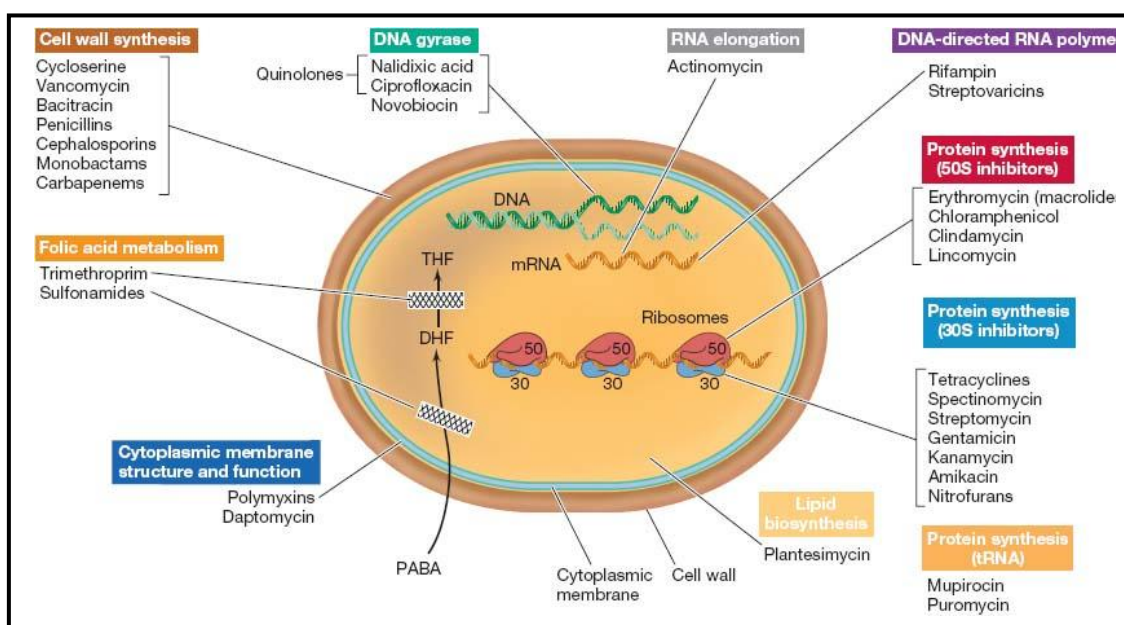
A ideia de que os antibióticos eram fármacos milagrosos e que resolviam o problema de todas as doenças infecciosas, foi desfeita com o aparecimento das primeiras resistências bacterianas. Assim, três anos após a utilização terapêutica da penicilina é identificada a produção de  $\beta$ -lactamases por *Staphylococcus aureus*. Em 1948, cerca de 50% dos isolados hospitalares de *S. aureus* são penicilina resistentes e dez anos depois este valor aumenta para 80%. No sentido de ultrapassar este problema, foi introduzida, em 1960, a meticilina. No entanto, em 1961, é identificado o primeiro isolado de *S. aureus* meticilina resistente. É também neste ano que aparecem as primeiras *Escherichia coli* resistentes à ampicilina. No decurso dos anos sessenta e setenta a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos é incrementada em vários géneros bacterianos. Em 1976, é isolado o ácido clavulânico (composto inibidor de algumas  $\beta$ -lactamases), que em associação com outros antibióticos como a amoxicilina (associação introduzida na terapêutica em 1981), aumenta o seu espectro de acção. Actualmente, existem  $\beta$ -lactamases que não são inibidas por este composto (Rolinson, 1998; Sousa, 2006).

Nos anos 80, a situação agrava-se com o aparecimento de isolados de *Streptococcus pneumoniae* resistentes à eritromicina, de bactérias de Gram negativo produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado e de *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina, entre

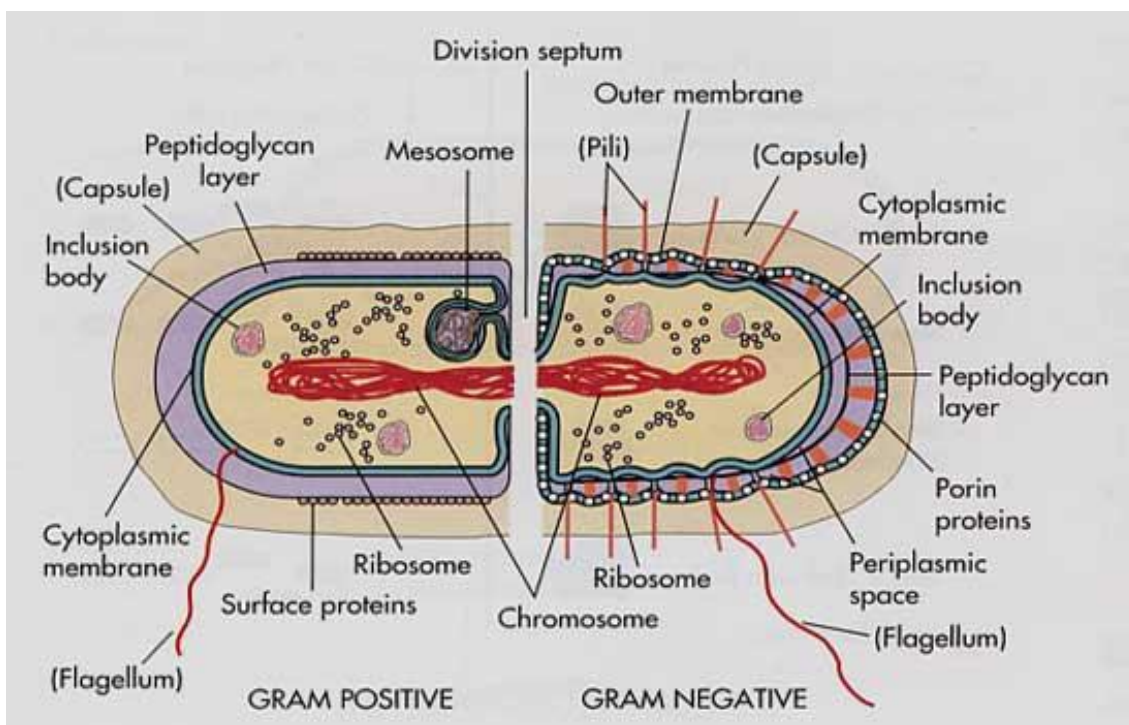
outros. Nos anos 90 são identificados os primeiros isolados de bactérias de Gram negativo produtoras de carbapenemases (EMEA, 1999; Sousa, 2006). Tendo em consideração esta realidade, é fácil de compreender a necessidade urgente da descoberta de novos agentes antibacterianos (Spellberg *et al.*, 2004).

## 2 – Classes de antibióticos, mecanismos de acção associados e espectro de actividade

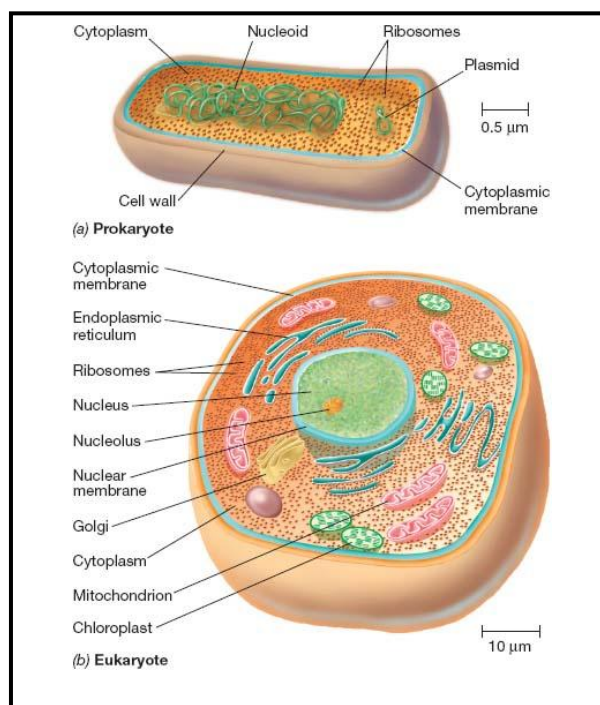
Os antibióticos encontram-se agrupados em classes/famílias, que diferem no seu mecanismo de acção sobre a célula bacteriana, quer ela seja de bactérias de Gram positivo, quer de Gram negativo (Fig.1.1 e Fig.1.2) (Bryskier, 2005; Murray *et al.*, 2005; Sousa, 2006; Madigan *et al.*, 2009). Estes agentes apresentam tropismo para as células procariotas, não actuando, de uma forma geral, nas células eucariotas, *Archaea* e vírus, devido a diferenças de organização celular (Fig.1.3). As diferenças estruturais entre as células procariotas e eucariotas também justificam a toxicidade selectiva dos antibióticos, relativamente, às primeiras (Murray *et al.*, 2005; Sousa, 2006; Madigan, *et al.*, 2009).



**Fig.1.1** – Mecanismos de acção dos antibióticos na célula bacteriana (Madigan *et al.*, 2009).



**Fig.1.2** – Diferenças estruturais entre bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. Ambas têm estruturas internas semelhantes. No entanto, as bactérias de Gram negativo possuem uma membrana externa, que funciona como uma barreira de impermeabilização (Murray *et al.*, 2005).



**Fig.1.3** – Diferenças estruturais entre célula procariota (a) e eucariota (b) (Madigan *et al.*, 2009).

Dentro dos principais grupos de antibacterianos incluem-se os antiparietais, antimembranares, inibidores da síntese proteica, inibidores dos ácidos nucleicos e antimetabolitos. (Bryskier, 2005; Sousa, 2006; Madigan *et al.*, 2009). Seguidamente, destacam-se algumas das famílias/moléculas mais, comumente, usadas.

**i) Antiparietais** (Fig.1.1, Tabela 1.2):

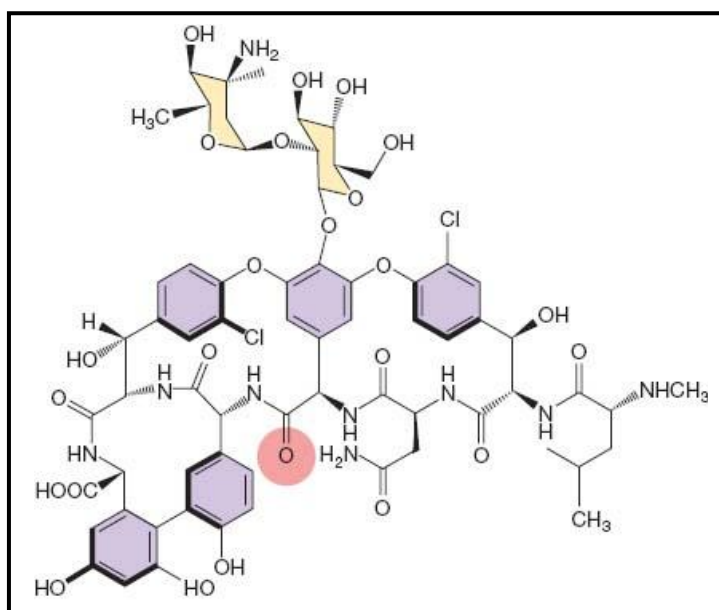
Estes agentes antibacterianos actuam ao nível de uma das fases da biossíntese do peptidoglicano (citoplasmática, membrana, ou parietal), levando à inibição da síntese desta macromolécula e, conseqüentemente, à lise celular (Essack, 2001; Bryskier, 2005; Sousa, 2006). Incluem vários grupos de compostos, destacando-se os  $\beta$ -lactâmicos e glicopéptidos pelo seu elevado consumo.

Os  $\beta$ -lactâmicos têm actividade em bactérias de Gram positivo e de Gram negativo (*Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. viridans*, *Hemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *etc.*) em crescimento e usam-se numa variedade enorme de infecções, nomeadamente, em otites do ouvido externo e médio, amigdalites, faringites, infecções da pele e tecidos moles, septicemias, infecções brônquicas e pulmonares, *etc.* Podem referir-se como exemplos as penicilinas e seus derivados, as cefalosporinas (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> gerações), os monobactams e os carbapenemos. Embora esta família de antibióticos apresente baixa toxicidade para os humanos e animais, podem, no entanto, desencadear-se reacções raras como a anafilaxia, nefrotoxicidade e coagulopatias (Bryskier, 2005; Sousa, 2006; Madigan *et al.*, 2009).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos actuam ao nível da síntese do peptidoglicano por inibição irreversível de proteínas alvo, localizadas na membrana citoplasmática bacteriana, designadas de PBPs (Penicilin Binding Proteins). Estas proteínas têm uma acção enzimática essencial na síntese do peptidoglicano, pois funcionam como substrato análogo do acil-D-alanil-D-alanina (componente do peptidoglicano) (Malouin *et al.*, 1986). Os PBPs são, geralmente, específicos da espécie bacteriana. Como exemplo podemos referir que em *Staphylococcus aureus* existem 4 PBPs (PBP<sub>1</sub>, PBP<sub>2</sub>, PBP<sub>3</sub> e PBP<sub>4</sub>) e em *Escherichia* 7 PBPs (1A, 1B, 2, 3, 4, 5, 6). Os vários  $\beta$ -lactâmicos podem

apresentar diferentes afinidades para os diversos PBPs, como é o caso da penicilina G e cefalosporinas para os PBPs<sub>1A</sub> e <sub>1B</sub>, imipenemo para o PBP<sub>2</sub>, o aztreonamo para o PBP<sub>3</sub> e a cefoxitina para o PBP<sub>5</sub> e <sub>6</sub> (Sousa, 2006).

Os glicopéptidos (vancomicina e teicoplanina) só são activos em bactérias de Gram positivo em crescimento uma vez que, o seu elevado peso molecular não lhes permite atravessar os canais de porina da membrana externa das bactérias de Gram negativo (Fig.1.2, Fig.1.4) (Finch *et al.*, 2005; Sousa, 2006; Madigan *et al.*, 2009). As moléculas desta família de antibióticos ligam-se ao dipeptídeo D-alanil-D-alanina de NAG-NAMA-pentapeptídeo-P-P-lipídeo (peptidoglicano) na interface da membrana citoplasmática. Desta forma, impedem a transferência de unidades recém sintetizadas de peptidoglicano para a matriz parietal em crescimento e, conseqüentemente, a síntese normal da parede celular. A lise da célula bacteriana é promovida pela acção de autolisinas endógenas. São utilizados, exclusivamente, a nível hospitalar, abrangendo infecções originadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Streptococcus* spp e a maioria de *Enterococcus* spp, entre outras bactérias de Gram positivo. Devido ao facto de serem fracamente absorvidos a nível intestinal são, frequentemente, utilizados para enterocolites por *Clostridium difficile* (Finch *et al.*, 2005; Sousa, 2006).



**Fig.1.4** – Estrutura química da molécula do agente antimicrobiano Vancomicina, pertencente ao grupo dos antibióticos glicopéptidos (Madigan *et al.*, 2009).

**ii) Antimembranares** (Fig.1.1, Tabela 1.2):

As membranas funcionam como barreiras protectoras à entrada de compostos nocivos à célula bacteriana e ainda intervêm em alguns processos do metabolismo celular (ex: respiração - cadeia transportadora de electrões). Consequentemente, a inibição da actividade da membrana compromete a sobrevivência celular.

A maior parte dos agentes antibacterianos antimembranares apresenta elevada toxicidade, sendo, frequentemente, utilizados por via tópica. Como exemplo podem referir-se a gramicidina A, tirotricina (activos contra bactérias de Gram positivo) e as polimixinas (activas em bactérias de Gram negativo). As polimixinas são moléculas polipeptídicas cíclicas, unidas por uma ligação amida a um ácido gordo. A molécula do antibiótico interactua com o lipídeo A dos lipopolissacarídeos (LPS) existentes nas bactérias de Gram negativo, permitindo a permeabilização da membrana externa por deslocação dos iões de cálcio e magnésio. É sugerido que a cauda do ácido gordo das polimixinas se ligue, electrostáticamente, às cargas negativas dos grupos fosfato dos fosfolípidos membranares. Deste modo, ao haver alteração da permeabilidade membranar produz-se um efluxo de potássio, aminoácidos e nucleótidos, originando a morte celular (efeito bactericida) (Sousa, 2006).

Recentemente, foi introduzida na terapêutica a daptomicina (Fig.1.5), uma molécula com acção antibacteriana, fortemente, dependente do ião cálcio, que se encontra em concentrações ideais no soro humano. Este ião vai ligar a daptomicina à membrana citoplasmática bacteriana, sendo, posteriormente, abertos canais que promovem o seu rompimento e, consequentemente, a saída de potássio, fenómenos de despolarização e a morte celular. Este antibiótico só é activo em bactérias de Gram positivo [ex: *Enterococcus* spp resistentes aos glicopéptidos (ERG), MRSA] uma vez que, possui um elevado peso molecular (Sousa, 2006; Cottagnoud 2008; Madigan *et al.*, 2009).



Os aminoglicosídeos (ex: gentamicina, estreptomicina, canamicina, neomicina, *etc.*) actuam em bactérias de Gram negativo e de Gram positivo (Sousa, 2006). A estreptomicina liga-se à proteína S12 da unidade ribossomal 30S, bloqueando a síntese proteica na fase de iniciação causando erro de leitura no mRNA (Berg *et al.*, 2002).

Quando administrados em monoterapia estes antibióticos só actuam em bactérias, que possuem a cadeia transportadora de electrões completa. No entanto, se associados a outras classes ( $\beta$ -lactâmicos, ou glicopéptidos) podem ser administrados a alguns microrganismos, naturalmente resistentes a eles, pelo facto de os antibióticos antiparietais favorecerem a sua entrada na célula. São por isso, frequentemente, usados em infecções graves causadas por vários agentes, nomeadamente, *Streptococcus* spp e *Enterococcus* spp. A utilização de aminoglicosídeos deverá ser monitorizada uma vez que, podem causar nefro e ototoxicidade (Sousa, 2006; Robles *et al.*, 2008; Madigan *et al.*, 2009).

As tetraciclinas apresentam um espectro alargado actuando em bactérias de Gram positivo e de Gram negativo de localização extracelular, ou intracelular (ex: *Rickettsia* spp, *Chlamydia* spp). Este antibiótico liga-se à subunidade ribossomal 30S e inibe a ligação do aminoacyl-tRNA ao local A do ribossoma (Berg *et al.*, 2002; Mascaretti *et al.*, 2003). O seu baixo custo faz também que sejam, largamente, usadas em medicina humana e animal. Devido à sua capacidade de quelatar o ião de cálcio apresentam afinidade para o tecido ósseo, dentes e unhas, sendo necessário algum cuidado na sua administração em crianças em fase de crescimento, grávidas, ou mulheres a amamentar. Outros efeitos adversos são as reacções de hipersensibilidade, irritação gástrica, fototoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Chopra *et al.*, 2001; Sousa, 2006; Robles *et al.*, 2008). Recentemente, foi introduzido no mercado um derivado da minociclina, a tigiciclina, que pertence à família das glicilciclinas. Esta molécula apresenta uma boa actividade contra bactérias de Gram negativo e de Gram positivo com resistência múltipla. A sua utilização é, exclusivamente, hospitalar.

Os macrólidos dividem-se em três subfamílias, sendo classificados consoante o número de átomos de carbono que compõem o anel lactónico. Ligam-se, reversivelmente, à

unidade ribossomal 50S inibindo a transpeptidização e translocação (elongação) (Mascaretti *et al.*, 2003). Assim, nos constituídos por 14 átomos é de referir a eritromicina, nos de 15 a azitromicina e nos de 16 a espiramicina. Embora apresentem, maioritariamente, actividade contra bactérias de Gram positivo, podem ser, ocasionalmente, utilizados em infecções por bactérias de Gram negativo como *Campylobacter* spp, *Legionella* spp, ou *Haemophilus* spp. Têm boa penetração intracelular, pelo que são úteis em infecções originadas por bactérias intracelulares (Jain *et al.*, 2004; Sousa, 2006).

Recentemente, foi introduzida no mercado uma nova família, as oxazolidinonas, cuja molécula representante é o linezolide. Este antibiótico liga-se à subunidade ribossomal 50S, perto da interface com a subunidade 30S, impedindo a formação do complexo ribossomal de iniciação 70S (Swaney *et al.*, 1998). Têm uma óptima actividade em infecções graves por bactérias de Gram positivo, sendo a sua utilização, exclusivamente, hospitalar (Sousa, 2006; Wilson *et al.*, 2008).

#### **iv) Inibidores da síntese de ácidos nucleicos** (Fig.1.1, Tabela 1.2):

Estes antibióticos interferem na síntese de DNA bacteriano, inibindo as enzimas DNA-girase e topoisomerasas, essenciais à sua replicação. A primeira é responsável por induzir o superenrolamento negativo no DNA bacteriano, enquanto que as segundas induzem o relaxamento e separação deste. Desta forma, impede-se a replicação e transcrição do DNA, dando origem a um efeito bactericida. Como exemplo desta classe é de referir a família das quinolonas, que são classificadas em quatro gerações. Da primeira geração faz parte o ácido nalidíxico, usado em infecções urinárias moderadas. A segunda geração inclui agentes como a ciprofloxacina, norfloxacina entre outros, que apresentam boa actividade contra bactérias de Gram negativo. A terceira (levofloxacina, moxifloxacina) e quarta gerações (trovofloxacina) apresentam actividade tanto em bactérias de Gram negativo como de Gram positivo (Sousa, 2006; Madigan *et al.*, 2009). Clinicamente são administrados no tratamento de infecções urinárias moderadas e graves, prostatite, infecções do tracto respiratório inferior, doenças sexualmente transmissíveis, gastroenterites e tecidos moles. Em termos de efeitos adversos, é de realçar que interferem com o desenvolvimento das cartilagens ósseas, não devendo, por

este motivo, ser administradas a crianças, grávidas e mães em fase de amamentação (Bryskier, 2005; Sousa, 2006; Madigan *et al.*, 2009).

**v) Antimetabolitos** (Fig.1.1, Tabela 1.2):

Estes agentes antibacterianos actuam na célula bacteriana por antagonismo competitivo do ácido *p*-aminobenzóico (PABA), que é um co-factor essencial à síntese do ácido fólico. Assim, ao impedir a produção deste composto, inibe-se o crescimento bacteriano e promove-se a sua morte. Dentro desta classe são de referir as sulfonamidas e o trimetoprim, duas moléculas que possuem efeito bacteriostático. No entanto, quando associadas têm um efeito sinérgico e uma actividade bactericida. As sulfonamidas vão inibir a enzima dihidropteroato sintetase (DHPS), que é responsável pela incorporação do PABA no ácido dihidropteróico. O trimetoprim é um inibidor da enzima dihidrofolato redutase (DHFR), que vai impedir a conversão do ácido di-hidrofólico em ácido tetra-hidrofólico. Ambos os antibióticos são activos em bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. Clinicamente são utilizados em infecções urinárias, disenteria bacilar e infecções do trato respiratório inferior. Não devem ser administrados durante a gravidez, amamentação e a recém-nascidos devido à sua elevada ligação às proteínas, pois libertam a bilirrubina que se encontra ligada à albumina, provocando encefalopatia tóxica. Podem ainda causar reacções de fotossensibilidade (Sousa, 2006).

**vi) Nitrofuranos** (Fig.1.1, Tabela 1.2):

Afectam vários sistemas enzimáticos bacterianos, que interferem nos mecanismos da síntese proteica, no metabolismo dos carboidratos (inibição da acetilcoenzima A), nas sínteses de DNA, RNA e parede celular. A nitrofurantoína é utilizada, exclusivamente, no tratamento de infecções urinárias baixas (cistite), sendo a sua actividade influenciada pelo pH urinário. Esta molécula é mais activa a pH ácido que alcalino, não devendo ser utilizada em infecções urinárias provocadas por bactérias produtoras de urease, como *Proteus spp*, *Serratia spp* e *Pseudomonas aeruginosa*. Não deve ser administrada a grávidas durante a lactação e em crianças com idade inferior a um ano. Vários são os efeitos adversos provocados por este antibiótico, sendo de realçar os hemáticos, em doentes com deficiência de glucose 6-fosfato-eritrocitária e crianças com imaturidade enzimática para a síntese da glutathiona, e efeitos pulmonares que, devido a tratamento

prolongado, pode levar a fibrose pulmonar associada à formação de radicais livres de oxigénio por autooxidação da nitrofurantoína reduzida nos tecidos (Amit *et al.*, 2002; Sousa, 2006; Peall *et al.*, 2007; Goemaere *et al.*, 2008).

**Tabela 1.2** – Classes de antibióticos e seu mecanismo de acção (adaptado de Sousa, 2006).

| Classes                                   | Antibióticos  | Mecanismo de acção   |
|---|---|--|
| Antiparietais                             | Fosfomicina<br>D-Cicloserina<br>$\beta$ -lactâmicos<br>Bacitracina (polipeptídeo)   | Inibição da síntese do peptidoglicano  |
|   | Vancomicina<br>Teicoplanina   | } Glicopeptídeos   |
| Antimembranares                           | Polimixinas<br>Tirotricina<br>Gramicidina<br>Daptomicina  | Inibição da função da membrana celular, afectando a sua permeabilidade.  |
| Inibidores da síntese proteica            | Aminoglicosídeos-<br>-aminociclitolis<br>Espectinomicina<br>Tetraciclina<br>Gliciliclinas<br>Cloranfenicol<br>Macrólidos<br>Lincosamidas<br>Estreptograminas<br>Mupirocina<br>Ácido Fusídico<br>Oxazolidinonas<br>Cetólidos<br>Evernimicina | Inibição dos mecanismos de transcrição ou tradução da síntese proteica.  |
| Inibidores da síntese de ácidos nucleicos | Rifampicina<br>Metronidazol<br>Quinolonas   | Podem actuar no DNA (ácido desoxiribonucleico), inibir a síntese do RNA (ácido ribonucleico), inibir o ácido tetrahidrofólico, alterar a estrutura do ácidos nucleicos, ou reduzir a formação de nucleotídeos. |
| Antimetabolitos                           | Sulfonamidas<br>Trimetoprim<br>PAS  | Inibem a biossíntese de co-factores folato, que vão impedir a formação de ácidos nucleicos e proteínas.  |
| Nitrofuranos                              | Nitrofurantoína   | Inibição da acetilcoenzima A, síntese de DNA e RNA, e parede celular.  |

Após o grande desenvolvimento da antibioterapia, com a descoberta/modificação de moléculas de antibióticos, verificou-se um declínio na investigação de novos compostos por parte das grandes empresas da Indústria Farmacêutica. Os factores associados a esta falta de investimento podem estar relacionados com o elevado custo de todo o processo de investigação, até à obtenção da Autorização de Introdução no Mercado (AIM) e o aparecimento rápido de resistências, com a consequente descontinuidade do uso das moléculas existentes no mercado. Deste modo, é colocada em sério risco a saúde pública mundial, devido à falta de alternativas para o tratamento de infecções bacterianas, provocadas por microrganismos com elevada resistência aos antibacterianos, actualmente, existentes (Spellberg *et al.*, 2004; Baker, 2006).

Disseminação ambiental de bactérias e genes que conferem resistência a antibióticos e o seu possível impacto na saúde pública

## **Capítulo II – O uso da Engenharia Genética pelas bactérias**

## Capítulo II – O uso da Engenharia Genética pelas bactérias

### 1 – Mecanismos de resistência a antibióticos

As bactérias habitam o planeta há cerca de três bilhões e meio de anos, muito antes de ter surgido a espécie humana (Bennett, 2008). Um estudo realizado e orientado por Dancer *et al.* (1997), na ilha Ellesmere na Islândia (Arquipélago Canadiano Ártico), com amostras recuperadas de glaciares, demonstrou a presença de bactérias resistentes a compostos antimicrobianos, com uma idade estimada em dois mil anos. É sugerido que, ao longo deste largo período de tempo, estes microrganismos foram-se adaptando às diferentes alterações ambientais, incluindo a presença de substâncias tóxicas. Esta capacidade de adaptação permitiu-lhes proliferar e colonizar o planeta, através de estratégias de alteração genética, que passa pela modificação do seu DNA.

Tal como referenciado no capítulo anterior, os antibióticos funcionam como agentes agressores para as bactérias, tendo estas adquirido mecanismos de defesa, que lhes permitem a sobrevivência na presença destas moléculas (Bennett, 2008). No entanto, pensando na comunidade microbiana circundante aos microrganismos produtores destas moléculas, conclui-se que o primeiro contacto, que os microrganismos tiveram com os antibióticos, foi muito antes da era da antibioterapia. Guardabassi *et al.* (2004) observaram genes com uma elevada homologia a *vanA*, *vanB*, *vanH* e *vanX* de *Enterococcus* spp em bactérias de solo (*Paenibacillus* spp e *Rhodococcus* spp), tendo conseguido encontrar 23 novas sequências com 86 a 100% de identidade a *vanA* de *Enterococcus* spp, em *Paenibacillus* spp de solo agrícola e jardins sem história de fertilização orgânica (Guardabassi *et al.*, 2006-FEMS). Os autores concluíram que as bactérias do solo desenvolveram uma necessidade física de se protegerem da acção dos glicopéptidos, antes da sua introdução na medicina humana.

O papel da produção de agentes antimicrobianos por bactérias foi, durante muito tempo, associado, exclusivamente, a um sistema de competição por espaço e nutrientes numa

comunidade polimicrobiana. No entanto, estudos recentes têm atribuído outras funções biológicas a estas moléculas. Linares *et al.* (2006) sugeriram que concentrações subinibitórias de antibióticos podem funcionar como sinais, que regulam a homeostase das comunidades microbianas ao promover alterações, que podem favorecer a sua sobrevivência no ambiente como a colonização de superfícies (formação de biofilmes e motilidade) e na luta contra predadores eucariotas (citotoxicidade). Por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* na presença de antibióticos como a tobramicina, tetraciclina e norfloxacina, em concentrações subinibitórias, é induzida a formar biofilmes. Adicionalmente, a tobramicina ainda estimula um aumento da motilidade e a tetraciclina estimula a expressão do sistema de secreção tipo III, envolvido em acções de citotoxicidade.

Apesar dos microrganismos resistirem aos antibióticos há milhões de anos, o desafio que impõem à terapêutica nunca foi tão difícil como na actualidade. Este problema foi-se agravando, nos últimos 50 anos, com o uso massivo de antibióticos como agentes terapêuticos humanos e veterinários, como promotores do crescimento animal e em actividades agrícolas, levando à selecção de bactérias multi-resistentes em todas as regiões geográficas e nichos ecológicos (Schwarz *et al.*, 2001).

A resistência bacteriana pode ser classificada como natural ou intrínseca (faz parte das características fenotípicas das espécies bacterianas), ou como adquirida (transferida entre bactérias) (EMEA, 1999; Harbottle *et al.*, 2006). Os dois tipos de resistência podem ser encontrados em todas as estirpes bacterianas patogénicas, ou na flora comensal de humanos, ou animais (EMEA, 1999; Harbottle *et al.*, 2006). Apesar de muitas bactérias apresentarem mecanismos de resistência naturais, que facilitam a sua sobrevivência em ambientes de elevada pressão selectiva, seguidamente, serão apenas exemplificados alguns dos adquiridos.

Um dos mecanismos de resistência mais comuns é a produção de enzimas, que alteram quimicamente a molécula de antibiótico inactivando-a. Um dos exemplos mais disseminados são as  $\beta$ -lactamases, enzimas que inibem a acção das moléculas da família dos  $\beta$ -lactâmicos através da cisão do anel  $\beta$ -lactâmico. Estas podem ser classificadas

quanto à sua função (sistema Bush-Jacoby-Medeiros), ou quanto à sua estrutura (sistema Ambler). Segundo o sistema Ambler estas enzimas são divididas em quatro grupos, designados de A, B, C, e D. As enzimas dos grupos A, C e D possuem um resíduo de serina no seu centro activo, enquanto que as do grupo B dependem da presença do cofactor zinco, sendo designadas por metaloenzimas. Actualmente, encontram-se descritas mais de 200 diferentes tipos de  $\beta$ -lactamases, podendo estar localizadas em elementos móveis, mobilizáveis, ou no cromossoma (Murray *et al.*, 2005; Paterson *et al.*, 2005). Algumas destas enzimas, após uma evolução associada a mutações, podem originar situações complicadas ao degradar a maioria das moléculas de  $\beta$ -lactâmicos. Como exemplo podem citar-se as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido e carbapenemases, que constituem, actualmente, uma ameaça séria à saúde pública pela sua elevada incidência e dispersão (Bradford, 2001; Paterson *et al.*, 2005). Curiosamente, alguns dos genes que codificam estas enzimas parecem ter uma origem ambiental, como CTX-M-8 descrita por Poirel *et al.* (2002) em *Kluyvera georgiana*.

Existem ainda outro tipo de enzimas, como as acetiltransferases (ex: *aac(6')-Ib*, *cat(A)*, *vat(D)*), fosfotransferases (ex: *aph(3')-I*) e adeniltransferases (ex: *aadA1*), que têm a capacidade de modificar quimicamente alguns antibióticos como por exemplo aminoglicosídeos, cloranfenicol, ou estreptograminas. Algumas enzimas têm actividade sobre diferentes moléculas dentro da mesma família (ex: *aac(6'')-Ie-aph(2')* que inactiva todos os aminoglicosídeos com excepção da estreptomicina), ou mesmo antibióticos de famílias diferentes (ex: *aac(6')-Ib-cr* degrada aminoglicosídeos e quinolonas) (Wright *et al.*, 1999; Galan *et al.*, 2000; Randall *et al.*, 2004; Harbottle *et al.*, 2006; Sabtcheva *et al.*, 2009). Grande parte destas enzimas foi detectada em elementos genéticos móveis (Bradford, 2001; Paterson *et al.*, 2005; Alekshun *et al.*, 2007).

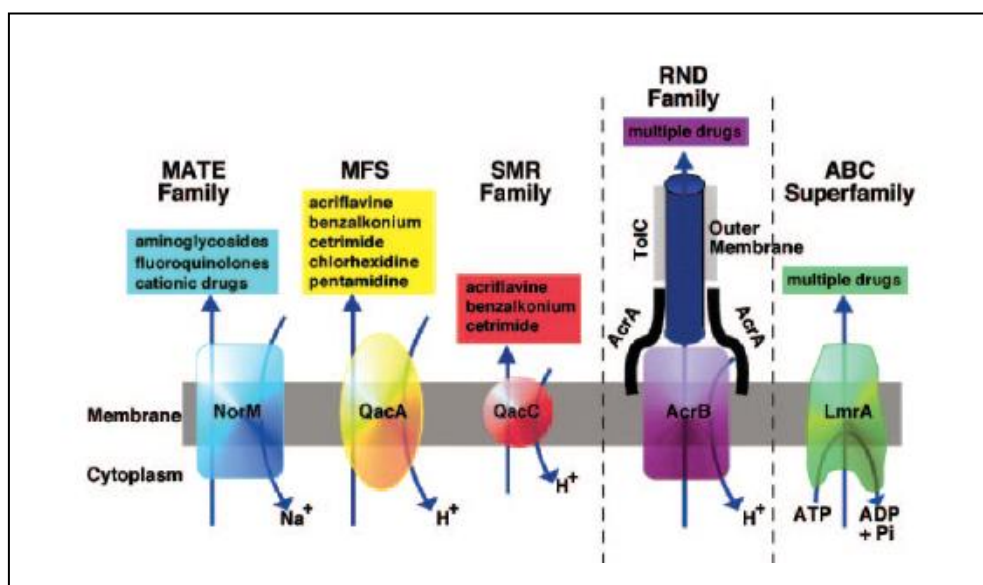
Outras estratégias usadas pelas bactérias incluem a alteração do local alvo de ligação dos antibióticos. Por exemplo os PBPs podem estar mutados ou recombinados, perdendo a sua afinidade para a molécula de antibiótico (Georgopapadakou, 1993). Esta situação é observada em vários géneros, nomeadamente, *Enterococcus* spp (*pbp5*), *Staphylococcus* spp (*pbp2a*), *Streptococcus* spp (*pbp2x*), ou *Haemophilus* spp (*pbp3*)

(Georgopapadakou, 1993; Goffin *et al.*, 1998; Fuda *et al.*, 2004). Esta falta de afinidade afecta, frequentemente, a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos. Por exemplo as bactérias designadas por MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina) possuem um *pbp2a*, que não possui afinidade para nenhuma destas moléculas (excepção ceftobiprol), constituindo hoje uma das maiores preocupações da saúde pública.

A alteração do local alvo também é verificada para a classe dos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B (ex: genes *erm*), em que a metilação do ribossoma impede a acção destes antibióticos na célula bacteriana. Este mecanismo de resistência é observado, sobretudo, em bactérias de Gram positivo, nomeadamente, em *Streptococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Staphylococcus* spp, bactérias anaeróbias, *etc.* (Sousa, 2006). Também alguns genes *tet*, que conferem resistência às tetraciclínas (ex: *tetM*, *tetO*, *tetQ*) através da sua ligação ao ribossoma, protegem a bactéria da acção do antibiótico (Speer *et al.*, 1992; Sousa, 2006). A resistência aos glicopéptidos está associada a vários genes designados de *van*, que induzem uma alteração química dos precursores do peptidoglicano ao substituírem uma D-alanina por lactato, ou serina (Murray *et al.*, 2005; Sousa, 2006; Alekshun *et al.*, 2007). Este mecanismo foi observado em bactérias de Gram positivo, sobretudo em *Enterococcus* spp (Sousa, 2006; Madigan *et al.*, 2009). Esta alteração da última molécula do precursor do peptidoglicano pode diminuir a afinidade para o antibiótico até cerca de 1000 vezes (Sousa, 2006).

Outra estratégia de sucesso é a expulsão dos antibióticos, pela célula bacteriana, através de bombas de efluxo. Estas impedem a acumulação de concentrações intracelulares de antibiótico suficientes para inibir processos do metabolismo bacteriano. A eficiência deste mecanismo pode ser incrementada por duas vias: expressão elevada da proteína que codifica a bomba de efluxo, ou substituição de um aminoácido nessa proteína que a torna mais eficiente no processo de expulsão. As bombas de efluxo encontram-se classificadas em cinco famílias de acordo com a sequência de aminoácidos (Fig.2.1): ABC (ATP-Binding Cassette), MFS (Major Facilitator Superfamily), RND (Resistance Nodulation Divison), SMR (Staphylococcal Multiresistance), MATE (Multidrug And Toxic Compound Extrusion).

Os sistemas de transporte MFS predominam nas bactérias de Gram positivo, enquanto que os RND e MATE predominam nas de Gram negativo (Poole, 2005; Piddock, 2006; Sousa, 2006). Estas estruturas expulsam, geralmente, mais do que um tipo de antibióticos e/ou antisépticos (Fig.2.1), como é o caso da bomba de efluxo AcrAB-tolC da família RND, que expulsa aminoglicosídeos, macrólidos, lincosamidas, glicinas e fluoroquinolonas, assim como compostos de amónio quaternário. Outros exemplos de resistência a antibióticos e respectivos genes que codificam para bombas de efluxo são:  $\beta$ -lactâmicos (ex: MexAB-OprM), macrólidos (ex: gene *mef*), quinolonas (ex: MdfA), tetraciclina (ex: gene *tetL*), entre outros. As bombas de efluxo foram observadas em géneros como *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Haemophilus*, entre outros (Poole, 2005; Piddock, 2006). Estas bombas de efluxo são codificadas por genes cromossómicos, ou transportadas por elementos genéticos móveis como sejam os plasmídeos (Yamane *et al.*, 2007; Martínez-Martínez *et al.*, 2008).



**Fig.2.1** – Diagrama comparativo entre as cinco famílias de bombas de Efluxo (Piddock, 2006).

Como último exemplo associado à resistência aos antibióticos pode citar-se a impermeabilização da membrana externa das bactérias de Gram negativo. Esta impermeabilização pode ser originada por mutações nos canais de porina (Omps), que

originam a perda de permeabilidade da membrana externa não permitindo a entrada de moléculas de antibióticos (Harbottle *et al.*, 2006). A OmpX, que se encontra nas bactérias *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e *E. cloacae*, ao sofrer mutações é responsável pela resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Dupont *et al.*, 2007).

Muitas outras estratégias são usadas pelas bactérias sendo, no entanto, as citadas as mais comuns.

## 2 – Elementos genéticos associados à disseminação da resistência aos antibióticos

A disseminação horizontal de genes de resistência pode ocorrer por 3 processos: transformação, transdução, ou conjugação.

**Transformação** – fragmentos de DNA livre (ex: célula lisada) são incorporados, directamente, numa célula receptora, produzindo nestas alterações genéticas (EMEA, 1999; Alekshun *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2009);

**Transdução** – o DNA da célula dadora é transferido para a célula receptora através de um bacteriófago (vírus bacteriano) lisogénico. Este mecanismo pode ocorrer por duas vias: a da transdução generalizada, ou especializada. A transdução generalizada permite a transferência de qualquer gene de uma bactéria para outra, através de partículas víricas defectivas que incorporam, aleatoriamente, DNA da célula dadora. Na transdução especializada é sempre a mesma porção de DNA que é transferida para o cromossoma bacteriano. Pode haver DNA diferente a ser transferido por distintos bacteriófagos, mas este e a sua descendência transportam sempre o mesmo DNA. A transdução especializada é mais eficaz que a generalizada (EMEA, 1999; Alekshun *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2009);

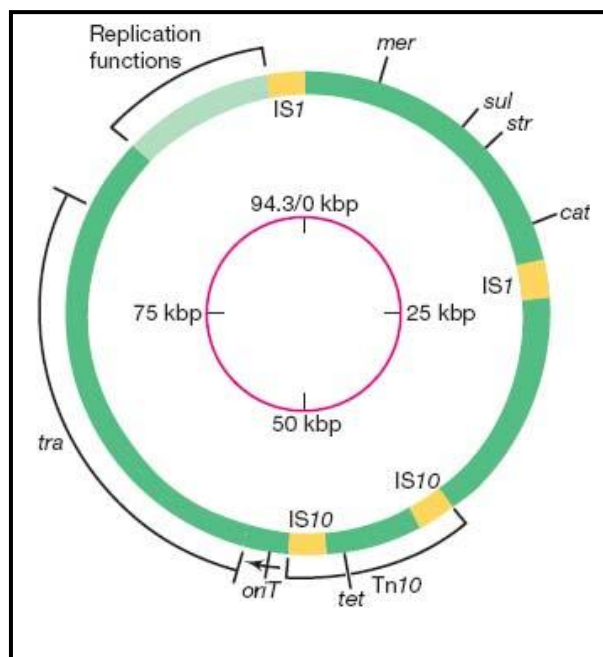
**Conjugação** – este mecanismo envolve o contacto célula-célula e a disseminação de elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposões) e mobilizáveis (plasmídeos, transposões, integrões/cassetes de genes) na sequência da sua inclusão nos anteriores (EMEA, 1999; Alekshun *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2009).

### **i) Plasmídeos**

A primeira vez que foi reportada a transferência de genes, que conferem resistência a antibióticos foi no Japão, em meados de 1950, quando foi detectado um R-plasmídeo em isolados de bactérias entéricas resistentes às sulfonamidas (Davies, 1997; Madigan *et al.*, 2009). Os plasmídeos são elementos extra-cromossomais de DNA circular com replicação autónoma do cromossoma, portadores de vários genes que conferem vantagens às bactérias, nomeadamente, a resistência a antibióticos. Os plasmídeos podem ser classificados como conjugativos (móveis), ou não conjugativos (mobilizáveis). Embora alguns sejam encontrados em apenas alguns géneros bacterianos, outros são considerados de largo espectro, estando disseminados por muitas bactérias (EMEA, 1999; Sousa, 2006; Madigan *et al.*, 2009).

Em algumas situações os plasmídeos podem transportar mais do que um tipo de genes de resistência. Davies (1995) relata que o plasmídeo R100 tinha genes que codificavam para a resistência às sulfonamidas, tetraciclina, estreptomicina, ácido fusídico e cloranfenicol (Fig.2.2). Este elemento genético foi observado em *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* e *Shigella* (Madigan *et al.*, 2009). Existem também descrições em que células bacterianas transportam mais do que um tipo de plasmídeo (EMEA, 1999; Bennet, 2008; Madigan *et al.*, 2009), cada um com o seu gene de resistência. Podem ocorrer nestas bactérias processos de co-transferência, em que mais do que um destes elementos genéticos são passados para células receptoras. Um exemplo da transferência e disseminação de genes resistentes a antibióticos por plasmídeos é o caso do gene *armA* (metilase que confere resistência aos aminoglicosídeos) que, inicialmente, foi detectado em *Klebsiella pneumoniae* num plasmídeo pIP1204 de 90 kb, que também transportava o gene CTX-M-3 (codifica as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido). O gene *armA* encontra-se disseminado por todo o mundo, tendo sido identificado em *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Shigella flexneri*. Este gene é transportado pelo transposão Tn1548, juntamente com os genes *ant(3'')(9)-I*, *sul1* e *dfrXII* (conferem resistência à estreptomicina, sulfonamidas e trimetoprim, respectivamente). É sugerido que a disseminação mundial deste gene se encontra, directamente, relacionada com a

possibilidade de auto-transferência de plasmídeos pertencentes a vários grupos de incompatibilidade (Galimand *et al.*, 2005).



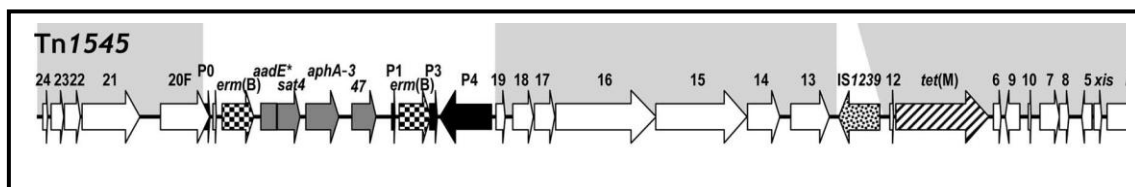
**Fig.2.2** – Mapa genético do plasmídeo R100. O círculo interior mostra o tamanho do plasmídeo em pares de kilobases; o círculo exterior mostra a localização de genes resistentes a antibióticos: *cat* – resistência ao cloranfenicol; *oriT* – origem da transferência conjugativa; *mer* – resistência ao ião de mercúrio; *sul* – resistência às sulfonamidas; *str* – resistência à estreptomicina; *tet* – resistência à tetraciclina; *tra* – função de transferência. São localizadas sequências de inserção (*IS10*) flanqueando o transposon *Tn10* e os genes que conferem resistência aos antibióticos (*IS1*) (Madigan *et al.*, 2009).

## ii) Transposões e sequências de inserção

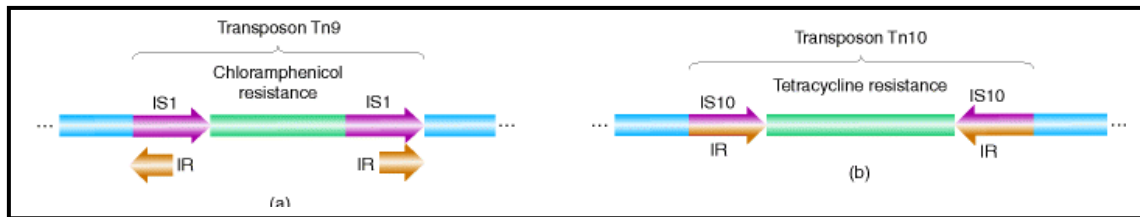
São sequências de DNA que se movem entre plasmídeos, entre plasmídeos e o cromossoma e entre o cromossoma e plasmídeos, aumentando, desta forma, o potencial para a disseminação da resistência aos antibióticos. Estes elementos movem-se entre células bacterianas através de plasmídeos (ex: *Tn1546*), ou sem recorrer a estes elementos genéticos. Neste último caso os transposões têm capacidade de se autotransferirem, sendo denominados de transposões conjugativos (ex: *Tn916*). Os transposões conjugativos e não conjugativos estão associados a vários tipos de resistências a antibióticos incluindo aos glicopéptidos (ex: *Tn1546*, *Tn1549*),

tetraciclina (ex:Tn916, Tn5397), macrólidos (ex: Tn917, Tn1545), cloranfenicol (ex:Tn5252, Tn4453),  $\beta$ -lactâmicos (ex:Tn3, Tn21), aminoglicosídeos (ex: Tn4051, Tn1548), etc. (Fig. 2.3) (Lyras *et al.*, 1998; Calatayud *et al.*, 2007; Doi *et al.*, 2007; Henderson-Begg *et al.*, 2008). Tal como os plasmídeos, estes elementos genéticos são estruturas modulares que, muitas vezes, sofrem recombinações, inserções e deleções, originando novos elementos que conferem resistência a mais do que um antibiótico. É o caso de Tn1545, ou Tn3872 responsáveis pela resistência à tetraciclina, macrólidos e aminoglicosídeos (Fig.2.3) (Calatayud *et al.*, 2007; Cochetti *et al.*, 2008). A resistência a transposões está associada quer a bactérias de Gram positivo, quer a bactérias de Gram negativo. Têm sido, frequentemente, observados em bactérias como *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrio*, entre outras (Hughes *et al.*, 2001). Estes transposões que, para além de genes responsáveis pela sua transposição, albergam genes de resistência a antibióticos são denominados de transposões compostos (Fig.2.3).

As sequências de inserção (IS) são pequenos elementos móveis, contendo o gene da transposase (responsável pela transposição) flanqueada por sequências repetidas (IR). Quando as IS estão na periferia de outros genes, ou fragmentos grandes de DNA podem mediar a sua transferência (Fig.2.4). É caso da IS256 que pode ser detectada tanto em bactérias de Gram positivo como de Gram negativo e que flanqueia o transposão conjugativo Tn4001, que se encontra relacionado com a resistência aos aminoglicosídeos em *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp e *Streptococcus* spp (Depardieu *et al.*, 2007).



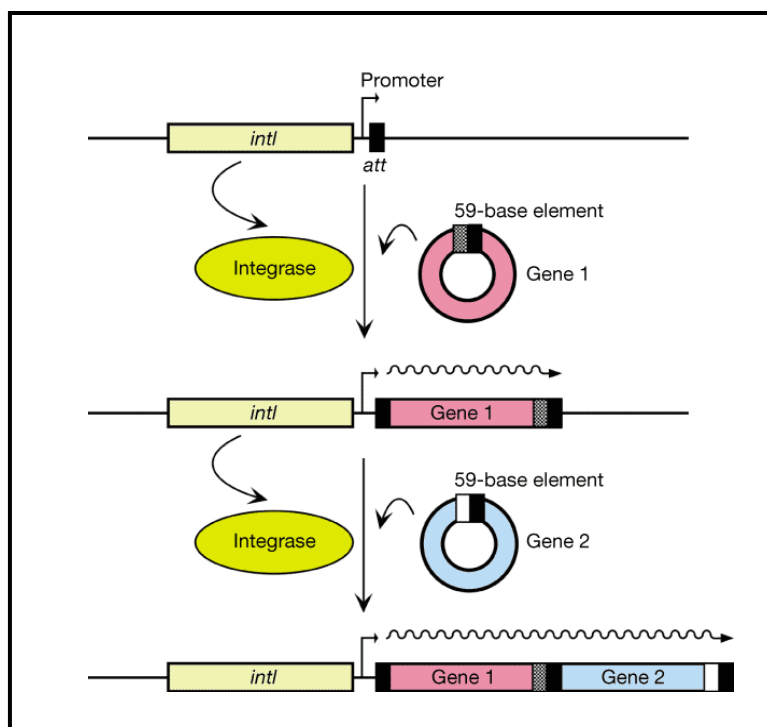
**Fig.2.3** – Exemplo de um transposão que alberga vários genes de resistência. Tn1545 confere resistência a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B (gene *ermB*), resistência à estreptotricina (*sat4*) e tetraciclina (gene *tetM*) (Cochetti *et al.*, 2008).



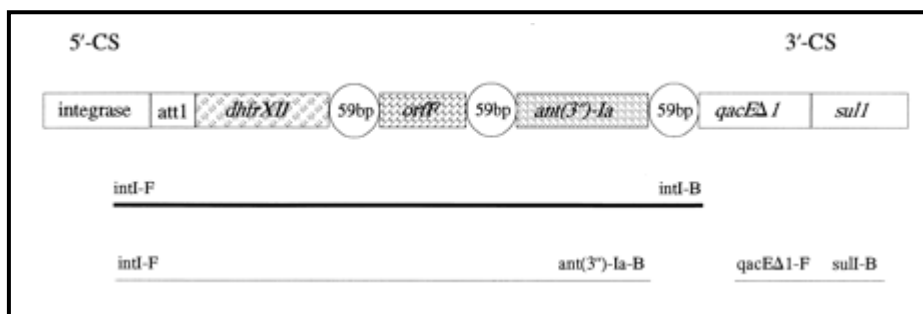
**Fig.2.4** – Estrutura de Tn9 e Tn10. Tn9 transporta genes que codificam a resistência ao cloranfenicol e Tn10 à tetraciclina. Ambos os transposões possuem sequências de inserção responsáveis pela sua mobilidade: IS1 e IS10, respectivamente (Griffiths *et al.*, 1999).

### iii) Integrões e cassetes de genes

Os integrões são elementos genéticos mobilizáveis por plasmídeos e transposões, podendo encontrar-se nestes, ou no cromossoma. Os integrões são constituídos por três regiões, duas conservadas e uma variável. Esta última contém cassetes de genes, que codificam resistências aos antibióticos e desinfetantes. As cassetes de genes são elementos que incluem um gene e um local de recombinação (Fig.2.5). Uma das regiões conservadas do integrão possui uma integrase, que é responsável pelo local específico de inserção das cassetes de genes (Fig.2.5 e 2.6) (Dalsgaard *et al.*, 2000; Ochman *et al.*, 2000). Estes elementos genéticos são, fundamentalmente, encontrados em bactérias de Gram negativo como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *etc.* Vários autores descreveram o seu envolvimento na resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e sulfonamidas (Dalsgaard *et al.*, 2000; Rowe-Magnus *et al.*, 2000; Madigan *et al.*, 2009).



**Fig.2.5** – Captação de cassete de genes por integrões: *intI1*, integrase; *attI* – local de integração; P – promotor; *gene1* e *gene 2* – cassetes de genes integradas (Ochman *et al.*, 2000).



**Fig.2.6** – Estrutura de integração e cassete de genes detectados em *Vibrio cholerae* O1: *attI* – local responsável pela recombinação; *qacEΔ1* e *sulI* – genes que codificam resistência a desinfetantes e sulfonamidas, respectivamente (Dalsgaard *et al.*, 2000).

### 3 – A Relação do *Quorum sensing* com a resistência aos antibióticos

As bactérias são organismos sociáveis capazes de intercomunicarem entre si, através de uma linguagem própria designada de *Quorum sensing*, que lhes permite actuarem em grupo e agirem como um organismo multicelular, obtendo benefícios que nunca conseguiriam actuando isoladas (Bassler *et al.*, 2006; Rasmussen *et al.*, 2006). Essa

linguagem realiza-se através da produção de pequenas moléculas de baixo peso molecular também designadas por auto-indutores, permitindo controlar a sua densidade populacional. Quando atingem uma elevada concentração, as bactérias alteram a sua expressão genética, de forma a produzirem um vasto leque de processos como a secreção de factores de virulência, formação de biofilmes, bioluminescência, esporulação e conjugação, o que lhes permite adaptarem-se ao stress ambiental (Geske *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007). Burmølle *et al.* (2006) observaram em estirpes de bactérias marinhas (*Microbacterium phyllosphaerae*, *Shewanella japonica*, *Dokdonia donghaensis* e *Acinetobacter lwoffii*), extraídas da alga verde *Ulva australis*, que estas tinham uma maior capacidade de resistir ao peróxido de hidrogénio, tetraciclina e à acção da proteína antibacteriana AlpP de *Pseudomonas tunicata*, quando permaneciam em comunidade, do que em culturas individuais. Em conjunto estas bactérias formavam biofilmes com maior massa, que lhes aumentava a sua capacidade de sobrevivência. É sugerido que o sistema *Quorum sensing* será o grande responsável pelo aumento de competência destas espécies quando em sinergismo. Liang *et al.* (2008) observaram em *Pseudomonas aeruginosa* a activação da expressão de genes, que codificam para a síntese de piocianina (composto fenazínico que actua como factor de virulência competitivo e molécula sinalizadora de *quorum sensing*) na presença de concentrações subinibitórias de tetraciclina. Segundo os autores a produção de compostos fenazínicos pode funcionar como resposta competitiva à produção de compostos antimicrobianos por outros microrganismos, como seja a tetraciclina produzida por *Actinomycetes* dos solos. É ainda sugerido que a resistência à tetraciclina pode ter como origem a exposição da *Pseudomonas aeruginosa* a este agente, ao longo da sua evolução e não apenas pela utilização clínica deste antibiótico.

Perante a preocupante situação actual, relativamente, à emergência de estirpes bacterianas multi-resistentes aos antibióticos e a falta de alternativas terapêuticas para fazer face a esta situação, estudos científicos sugerem que a modulação do *Quorum sensing* com compostos antagonistas, será uma possível alternativa para atenuar os mecanismos de resistência destes organismos (Rasmussen *et al.*, 2006; Bjarnsholt *et al.*, 2007; Geske *et al.*, 2007; Lesic *et al.*, 2007).

Disseminação ambiental de bactérias e genes que conferem resistência a antibióticos e o seu possível  
impacto na saúde pública

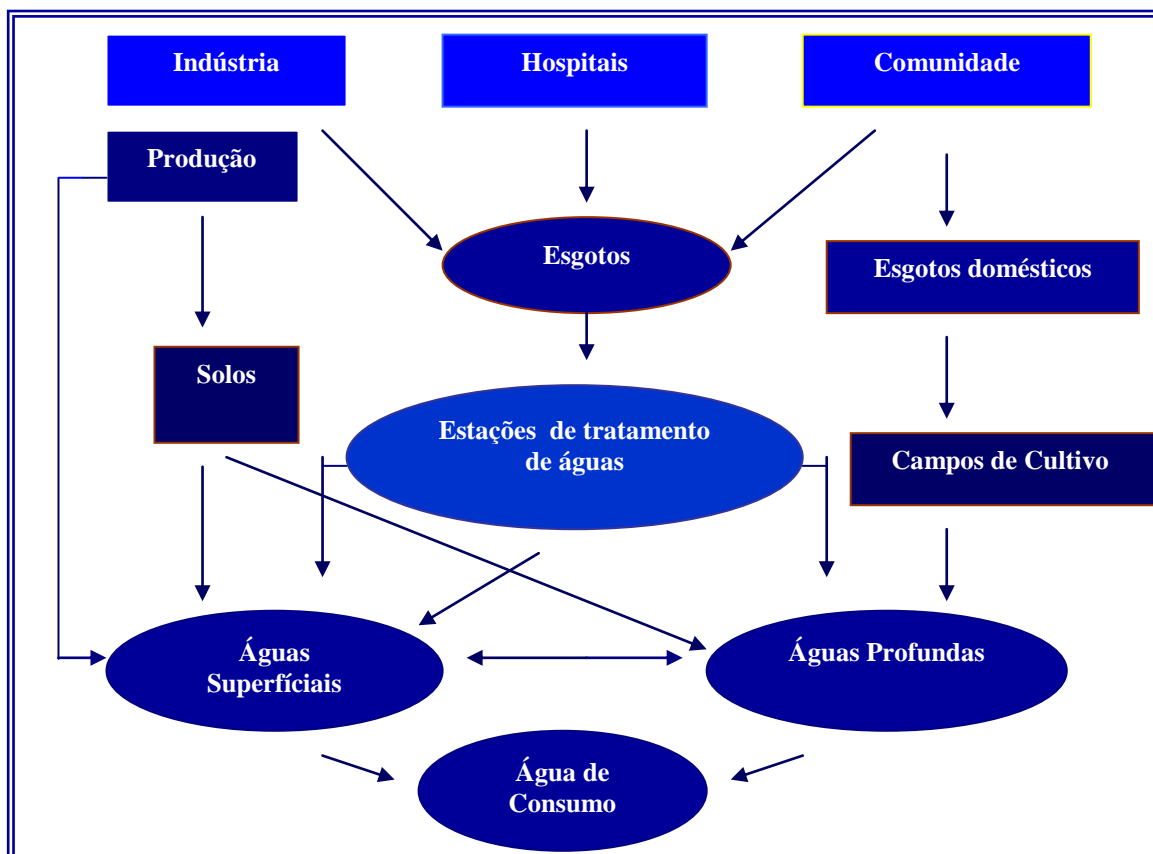
### **Capítulo III – Epidemiologia da resistência aos antibióticos no ambiente**

### **Capítulo III – Epidemiologia da resistência aos antibióticos no ambiente**

#### **1 – A influência do Homem e dos animais na contaminação do ambiente**

**Actualmente, os antibióticos têm um papel fundamental na medicina humana e veterinária uma vez que,** são utilizados com finalidades terapêuticas, profiláticas, ou como promotores de crescimento animal (Schwarz, et al., 2001). Recentemente, tem-se verificado um crescente interesse e preocupação na detecção destes fármacos e de microrganismos a eles resistentes no meio ambiente (águas superficiais e profundas, ar, solo, animais e alimentos) uma vez que, a sua presença pode constituir um risco para a saúde pública (Hirsh et al., 1999; Cabello, 2006; Peng et al., 2006; Sarmah et al., 2006).

**A excreção de resíduos biológicos é a forma mais comum de entrada dos fármacos no ambiente. As descargas de efluentes de esgotos (hospitalares, urbanos e da indústria farmacêutica) e o uso intensivo de antibióticos na produção animal e em práticas agrícolas têm sido algumas das razões apontadas, para justificar a presença de bactérias e genes de resistência em vários nichos ecológicos (Fig.3.1) (Guardabassi et al., 1998; Schwarz et al., 2001; Zanetti et al., 2001; Iversen et al., 2002; Sapkota et al., 2006). Neste sentido, este capítulo pretende fazer uma revisão da influência do homem, incluindo as actividades de produção animal, na contaminação do ambiente extra-hospitalar com moléculas de antibióticos e/ou microrganismos a eles resistentes.**



**Fig.3.1** – Vias de dispersão de antibióticos e/ou microrganismos a eles resistentes no meio ambiente (Adaptado de Giger *et al.*, 2003).

## 2 – Antibióticos como entidades químicas contaminantes

Muitas das moléculas de antibióticos libertadas para o ambiente não são eliminadas no organismo humano ou animal, sendo excretadas na sua forma original, levemente transformadas, ou conjugadas com moléculas polares. Estes produtos conjugados são, facilmente, clivados durante o processo de tratamento de esgotos, podendo, inclusivamente, ser libertados pelas ETARs na forma de metabolitos activos (Heberer, 2001). É o caso de alguns antibióticos excretados na forma de Glucoronilcloranfenicol, ou N-4-acetilsulfamida que, após excreção e entrada nas ETARs, são, novamente, transformados na sua forma activa original – cloranfenicol e sulfamida, respectivamente (Hirsh *et al.*, 1999). Embora muitos destes metabolitos sejam encontrados nas águas em baixas concentrações, é preocupante o seu efeito nos

ecossistemas que lhes estão expostos continuamente (Giger *et al.*, 2003) uma vez que, estas moléculas possuem comportamentos físico-químicos característicos dos xenobióticos (Sanderson, *et al.*, 2003). De facto, a acumulação de antibióticos e outros fármacos em águas, solos e alimentos pode levar ao aparecimento de efeitos adversos nos humanos, como reacções alérgicas, ou genotoxicidade (Webb, *et al.*, 2003). Estudos de toxicidade aguda e crónica, realizados com antibióticos em organismos como *Daphnia magna*, sugerem alterações nos seus diversos estádios de desenvolvimento e na sua reprodução (Flaherty, *et al.*, 2005; Isidori, *et al.*, 2005). Como exemplo pode referir-se o estudo realizado por Flaherty *et al.* (2005) em que expuseram *Daphnia magna* a misturas de antibióticos (eritromicina, trimetoprim, lincomicina e sulfametoxazol), numa concentração máxima total de 30 a 500µg/L, demonstrando alterações sexuais nestes organismos. Não pode ser esquecido que os antibióticos e outras substâncias, existentes no ambiente, podem ter uma actividade sinérgica, sendo imprevisível o seu efeito nos ecossistemas (Flaherty, *et al.*, 2005).

Estudos de investigação, realizados ao longo de duas décadas, revelaram que mais de quarenta fármacos diferentes podem ser encontrados em águas de rios, águas profundas e, até mesmo, em água para consumo (Hirsch *et al.*, 1998). Nos Estados Unidos da América (EUA), observou-se a presença de cerca de 95 compostos orgânicos nas águas de saneamento municipal, incluindo 35 antibióticos como tetraciclina, macrólidos, sulfonamidas e fluoroquinolonas (Kolpin *et al.*, 2002). Também na Europa, se verificaram situações semelhantes. No Norte de Itália, observou-se que as águas do rio Po, entre 1997 e 2001, se encontravam contaminadas com macrólidos, lincosamidas e quinolonas, com concentrações máximas que oscilavam entre 0,9ng/L para a eritromicina e 248,9ng/L para a lincomicina (Castiglioni *et al.*, 2004). Outro estudo especula sobre a presença dos antibióticos oxitetraciclina e eritromicina (muito consumidos em Inglaterra) no ambiente aquático inglês, sugerindo que a sua presença pode estar associada ao facto de estes antibacterianos não serem biodegradáveis em grande extensão e, simultaneamente, não se adsorverem às lamas das ETARs (Jones *et al.*, 2002). Em França, no estuário do rio Sena, foram detectadas dezassete moléculas de antibióticos em concentrações que atingem os 544ng/L. Posteriormente, comprovou-se que, aquando das descargas das ETARs, estes agentes atingiam concentrações ainda

mais elevadas (Tamtam *et al.*, 2008). Também em Portugal, foram detectados resíduos de antibióticos no ambiente aquático. Em Coimbra, demonstrou-se a presença de fluoroquinolonas em águas residuais de quatro hospitais e em afluentes e efluentes das ETARs (tabela 3.1) (Seifrtová *et al.*, 2008).

**Tabela 3.1** – Concentrações (ng/L) de fluoroquinolonas e sua variação sazonal em águas residuais hospitalares e afluentes e efluentes de ETARs na cidade de Coimbra, Portugal (tabela adaptada de Seifrtová *et al.*, 2008).

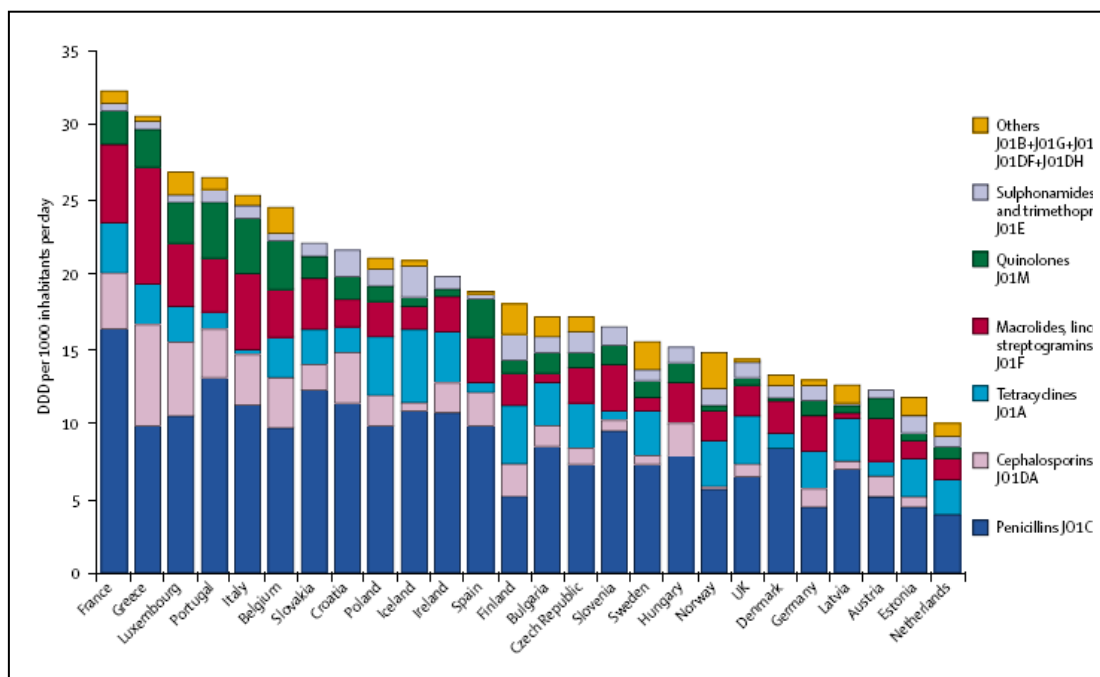
| Fluoroquinolonas | Hospitais         |                   | ETARs         |               |
|------------------|-------------------|-------------------|---------------|---------------|
|                  | Primavera         | Outono            | Primavera     | Outono        |
| Ciprofloxacina   | 1,554.5 - 2,893.0 | 619.0 – 2,927.2   | 309.2 – 667.1 | 100.8 – 418.8 |
| Ofloxacina       | 353.3 – 2,289.0   | 1,585.5 – 9,451.9 |               |               |
| Norfloxacina     | 228.9 – 134.5     | 88.5 – 334.0      | 29.6 – 191.2  | 35.0 – 455.0  |
| Enrofloxacina    | n.q. <sup>a</sup> | n.q. <sup>a</sup> | 211.5 – 447.1 | 53.7 – 121.8  |

<sup>a</sup> Não quantificado (<LOQ)

Outros estudos reportam a presença desta classe de antibióticos em efluentes de esgotos de ETARs de França, Itália, Grécia e Suíça (Golet *et al.*, 2001; Golet *et al.*, 2002; Nakata *et al.*, 2005). Estes e outros dados são preocupantes, pois parecem reflectir a baixa eficácia das ETARs nos tratamentos das águas residuais e seus respectivos resíduos.

A grande quantidade de alguns antibióticos observada nas águas de saneamento municipal não é de estranhar, tendo em conta a percentagem de consumo humano e animal destas moléculas nos diferentes países europeus, incluindo Portugal (EMEA, 1999; Goossens, *et al.*, 2005; Seifrtová *et al.*, 2008). Um estudo realizado, entre os anos de 1997 e 2002, através do projecto *European Surveillance of Antimicrobial Consumption* (ESAC), descreve a quantidade de antibióticos consumidos em ambulatório em vinte e seis países europeus. No ano de 2002, a França foi o país da Europa, que apresentou o consumo total de antibióticos mais elevado com um factor de 32.2 DDD (dose diária por dia por 1000 habitantes) e a Holanda o que apresentou o consumo mais baixo com um factor de 10.0 DDD (Fig.3.2) (Goossens, *et al.*, 2005).

Disseminação ambiental de bactérias e genes que conferem resistência a antibióticos e o seu possível impacto na saúde pública



**Fig.3.2** – Total de antibióticos, em unidades de Dose Diária por Dia (DDD) consumidos em ambulatório em vinte e seis países no ano de 2002 (Goossens *et al.*, 2005).

De facto, a rejeição desadequada de fármacos pelas populações pode contribuir para a presença destas moléculas no ambiente. Neste contexto, Bound *et al.* (2005), durante o Verão de 2003, pesquisaram em Inglaterra, de que forma é que a comunidade eliminava fármacos indesejados, quer fosse por se encontrarem fora dos prazos de validade, quer pelo facto de os pacientes não completarem a medicação prescrita. Curiosamente, concluíram que cerca de 63% das pessoas os colocava no lixo doméstico, 21,8% entregava-os nas farmácias e 11,5% utilizava os esgotos domésticos para os eliminar. Este e outros estudos alertam para a necessidade de educar as populações, no sentido de compreenderem os malefícios para a saúde pública da presença de resíduos de antibióticos no ambiente, a curto e longo prazos.

Outra fonte de contaminação ambiental é o ambiente de produção animal. Segundo *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA), só em 1997, foram utilizadas na União Europeia cerca de 4700t de antibióticos em medicina veterinária (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2** – Volume de vendas de antibióticos em medicina veterinária como agentes terapêuticos e como promotores de crescimento em países membro da EU em 1997 (EMEA, 1999 *cit. in* Boatman 1998).

| Países             | Vendas de promotores de crescimento<br>(t de substância activa) | Vendas de agentes terapêuticos<br>(t de substância activa) |
|--------------------|---|--|
| Áustria            | 23  | 8  |
| Bélgica/Luxemburgo | 110   | 125  |
| Dinamarca          | 75  | 60   |
| Finlândia          | <1  | 12   |
| França             | 339   | 492  |
| Alemanha           | 255   | 488  |
| Grécia             | 15  | 110  |
| Irlanda            | 34  | 22   |
| Itália             | 100   | 389  |
| Noruega            | 226   | 300  |
| Portugal           | 24  | 44   |
| Espanha            | 198   | 616  |
| Suécia             | <1  | 20   |
| Reino Unido        | 191   | 788  |

Este consumo é, possivelmente, reflectido por estudos como os de Hirsch *et al.* (1999) na Alemanha, que detectaram 18 antibióticos em diversas amostras extraídas de efluentes de esgotos e águas de superfície. Entre estas moléculas foi detectado cloranfenicol, um antibiótico pouco usado em medicina humana e proibido em medicina veterinária desde 1995 na Alemanha. Os autores propuseram como justificação para as concentrações detectadas o uso ilegal desta molécula nos animais. Também em Itália, foi realizado um estudo sobre a contaminação do ambiente aquático através de práticas de aquacultura. Entre os antibióticos, usualmente, utilizados neste tipo de explorações constam a amoxicilina, sulfamerazina, tianfenicol, flumequina e oxitetraciclina, sendo os dois últimos os mais relevantes neste tipo de explorações. De facto, a flumequina e oxitetraciclina foram detectadas no sedimento e no ambiente circundante dessas explorações italianas (Lalumera *et al.*, 2004). Outros estudos apontaram a presença de

resíduos de antibióticos como as tetraciclinas, sulfonamidas e cloranfenicol também utilizados de forma massiva em explorações de aquacultura (Migliore *et al.*, 1996; Hirsh *et al.*, 1999, *cit. in* Baticados e Paclibare, 1992). Estes são adicionados directamente no alimento, ou por simples adição à água, acabando o seu excesso por se depositar nos sedimentos, onde são degradados, ou, lentamente, libertados na água circundante (Hirsh *et al.*, 1999, *cit. in* Lai *et al.*, 1995 e Smith *et al.*, 1996). Esposito *et al.* (2007) citam estudos realizados pela FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations) onde é demonstrado o crescimento exponencial das explorações de aquacultura na produção de peixe, moluscos e marisco, constatando-se que em 1970 a produção atingia os 3,9% e em 2003 31,9%. A presença de antibióticos nas aquaculturas pode levar, posteriormente, à contaminação de águas profundas e de superfície.

Associada à problemática do vasto consumo de antibióticos de uso veterinário, em doses subterapêuticas, encontra-se a utilização do estrume animal para fertilização dos campos agrícolas. Uma vez que, a eliminação dos agentes antibacterianos é feita através da excreção, constatou-se que os fertilizantes naturais contêm metabolitos de antibióticos, que por influência das águas da chuva sofrem fenómenos de escorrência e infiltração, contaminando as águas profundas e de superfície (Fig.3.1) (Giger *et al.*, 2003). Adicionalmente, alimentos de origem vegetal, cultivados em terrenos agrícolas e fertilizados com estrume animal, podem absorver estes agentes antibacterianos. Kumar *et al.* (2005) observaram, nos Estados Unidos, vários antibióticos em estrume animal proveniente de suiniculturas, em concentrações que oscilavam entre 4,03 mg/L para a tilosina e 7,73 mg/L para a clorotetraciclina. Adicionalmente, esta última foi ainda detectada nos vegetais estudados. Como por hectare foram aplicados cerca de 50 000L de estrume, este valor equivaleria a 387g de clorotetraciclina e 202g de tilosina aplicadas por hectare de terreno agrícola. Os autores questionaram-se sobre o possível efeito do consumo de alimentos vegetais contaminados com antibióticos na população humana, enfatizando possíveis reacções alérgicas e a selecção de microrganismos resistentes a estas moléculas. Num estudo realizado por Shoemaker *et al.* (2001) foi ainda provado que quantidades mínimas de tetraciclinas podem funcionar como catalisadores, para a transferência horizontal de genes entre bactérias pertencentes a géneros diferentes, facilitando, assim, a emergência de microrganismos resistentes.

Tendo em conta a problemática associada ao consumo de antibióticos no ambiente de produção animal, a União Europeia proibiu, a partir de 1 de Janeiro de 2006, o uso destas moléculas como promotores de crescimento animal, sendo apenas permitidas como agentes profiláticos e terapêuticos (Regulamento 1831/2003/EC, Decreto-Lei nº. 289/99 de 29 de Julho). Em outros países, como o Japão, os promotores de crescimento só podem ser utilizados como aditivos na alimentação animal com prévia autorização do governo. Na China e Rússia são permitidos desde que não sejam administrados na terapêutica humana. No entanto, existem países sem regulamentação nesta matéria, como sejam a Índia, Tailândia, Indonésia, Uganda e Tanzânia, sendo fácil a sua utilização devido ao pouco, ou inexistente controlo por parte das entidades governamentais (WHO, 2001).

Além dos factos enunciados, anteriormente, não pode deixar de ser referido o contributo da indústria farmacêutica na contaminação ambiental com moléculas de antibióticos e outros fármacos. Esta situação ocorre em alguns pontos do globo devido às facilidades concedidas por algumas entidades governamentais, no que concerne ao tratamento de resíduos de produção de fármacos. Larsson *et al.* (2007) realizaram um estudo no Sul da Índia, onde se encontram sediadas várias indústrias de produção de medicamentos genéricos, fazendo desta região o maior local de produção a nível mundial. A estação de tratamento de águas residuais recebe, diariamente, descargas de cerca de noventa indústrias farmacêuticas, tendo sido detectados vários fármacos em concentrações muito superiores às observadas em efluentes domésticos e até mesmo hospitalares. Por exemplo, a ciprofloxacina foi detectada em concentração de 31,000µg/L (Tabela 3.3), o que corresponde a uma descarga diária de cerca de 45Kg desta substância activa.

**Tabela 3.3** – Antibióticos detectados, em µg/L, na estação de tratamento de águas de Pantcheru Enviro Tech Lda. na Índia (Tabela adaptada de Larsson *et al.*, 2007).

| Antibióticos (Fluoroquinolonas) | Concentração em µg/L |
|---------------------------------|----------------------|
| Ciprofloxacina                  | 28,000 – 31,000      |
| Enrofloxacin                    | 780 – 900            |
| Norfloxacin                     | 390 – 420            |
| Lomefloxacin                    | 150 – 300            |
| Enoxacin                        | 150 – 300            |
| Ofloxacin                       | 150 – 160            |

É fundamental que a população, em geral, tenha conhecimento que a rejeição de fármacos como desperdícios domésticos, ou na produção animal, pode levar à sua acumulação nos diversos ecossistemas, com possíveis consequências para a saúde pública, nomeadamente, na selecção de bactérias resistentes a estas moléculas. É ainda importante a presença de regulamentação e fiscalização eficazes, relativamente, à libertação de fármacos para o ambiente no que respeita à Indústria Farmacêutica, explorações de animais de consumo humano, efluentes de esgotos e eficácia das ETARs.

### **3 – Emergência de bactérias resistentes a antibióticos fora do ambiente hospitalar**

Vários estudos, realizados pela comunidade científica mundial, revelaram a presença de bactérias resistentes a antibióticos fora do ambiente hospitalar, nomeadamente, nos alimentos, ambiente de produção animal, águas residuais, águas de consumo e recreativas, solos e ar (Zanetti *et al.*, 2001; Iversen *et al.*, 2002; Kümmerer, 2004; Chapin *et al.*, 2005; Kühn *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2005; Sapkota *et al.*, 2006). Muitas das bactérias encontradas possuíam resistência múltipla aos antibióticos, pertenciam a clones persistentes com interesse clínico e tinham elementos genéticos móveis facilitadores da dispersão da resistência (por vezes similares àqueles observados nas unidades hospitalares) (Kümmerer, 2004; Chapin *et al.*, 2005). Estes estudos envolveram quer bactérias de Gram positivo, quer bactérias de Gram negativo,

incluindo as tipicamente ambientais e agentes patogénicos de contaminação fecal e não fecal. Nestes grupos estão incluídas famílias/géneros como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp, *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp, *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp, etc.

### 3.1 – O ambiente aquático

Os hospitais são excelentes contaminadores do ambiente com bactérias resistentes aos antibióticos caso os seus esgotos sejam deficientemente tratados. Esta situação é preocupante, se pensarmos que estas bactérias podem atingir águas superficiais e, conseqüentemente, colonizar/infectar humanos e animais.

Há algumas décadas atrás, bactérias com certos determinantes de resistência e virulência estavam, maioritariamente, confinadas ao ambiente hospitalar, no entanto, a sua disseminação para o nicho aquático, nomeadamente, em águas residuais hospitalares, tem vindo a ser reportada em vários países como a seguir se exemplifica (Guillaume *et al.*, FEMS-2000; Iveresen *et al.*, 2002; Reinthaler *et al.*, 2003; Caplin *et al.*, 2008). Na Suécia e em Inglaterra, detectaram-se *Enterococcus* spp resistentes aos glicopéptidos, pertencendo, no segundo caso, ao complexo clonal CC17, classificado como de elevado risco epidémico. Na Bélgica, detectou-se a presença do gene *tetA* em *Salmonella enterica* serótipo Hadar, isolada de pacientes e lamas activadas hospitalares. Na Áustria, foi detectada *Escherichia coli* multi-resistente a antibióticos (ampicilina, piperacilina, cefalosporinas, ácido nalidíxico, trimetoprim, sufametoxazol e tetraciclina).

Portugal também apresenta situações semelhantes. Novais *et al.* (2005) e Costa *et al.* (2006) observaram *Enterococcus* spp, resistentes aos glicopéptidos, em efluentes de esgotos hospitalares, tendo alguns dos clones genes e factores de virulência iguais aos dos microrganismos observados dentro do hospital. *Pseudomonas aeruginosa*, ou *Enterobacteriaceae* produtoras de metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs) e  $\beta$ -lactamases de espectro alargado, respectivamente, foram, igualmente, isoladas das mesmas amostras (Quinteira *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2009). É de destacar que os exemplos acima

referidos dizem respeito a bactérias com um papel significativo em infecções comunitárias, ou em epidemias associadas a infecções nosocomiais.

O aparecimento de bactérias resistentes foi também observado em esgotos urbanos sem influência hospitalar (Iversen *et al.*, 2004; Kün *et al.*, 2005; Quinteira *et al.*, 2006). Kün *et al.* (2005) detectaram em Espanha, Suécia e Reino Unido estirpes de *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina. Em Portugal, Quinteira *et al.* (2006) observaram a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, em esgotos urbanos, produtoras de MBLs que, com excepção do azetreonamo, conferem resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos incluindo aos carbapenemos. O aparecimento deste tipo de bactérias a montantes das unidades hospitalares, sugere que outros sectores podem ser responsáveis pela libertação de microrganismos resistentes nas águas residuais.

Não se pode deixar de referir o impacto das descargas da indústria farmacêutica. Guardabassi *et al.* (1998) recolheram duzentas e cinco amostras de efluentes de esgotos de uma Indústria Farmacêutica, tendo-se observado a presença de *Acinetobacter* spp resistentes a um, dois e mais de três antibióticos, nomeadamente, ao cloranfenicol, amoxicilina e/ou oxitetraciclina.

Embora seja natural encontrar bactérias resistentes e genes de resistência a antibióticos em águas residuais, torna-se preocupante quando tais elementos passam para águas superficiais e profundas, utilizadas para consumo e fins recreativos. Num estudo realizado nos Estados Unidos e Canadá, com o objectivo de pesquisar, nos rios de St. Clair e Detroit, *Escherichia coli* resistente aos antibióticos, observou-se que os locais mais próximos das descargas de efluentes de esgotos municipais eram os que apresentavam maior percentagem de bactérias resistentes, comparativamente, aos locais mais afastados (Hamelin *et al.*, 2006). Laroche *et al.* (FEMS-2009) pesquisaram, no estuário do rio Sena (França) e efluentes de ETARs, *E. coli* portadoras de genes de resistência a antibióticos, verificando que o fenótipo mais comum incluía moléculas como a tetraciclina, amoxicilina e ticarcilina. Detectaram ainda nas mesmas amostras elementos genéticos como integrões de classe I e II, com cassetes de genes portadoras de *aadA* (confere resistência aos aminoglicosídeos) e *dfr* (confere resistência ao

trimetoprim). Num outro estudo realizado em 5 ETARs, em Hong Kong, foram identificados isolados de *Enterobacteriaceae* contendo integrões de classe I com cassetes de genes de *sulI* (resistência a sulfonamidas), *quacEA* (resistência a sais de amónio quaternário) e *aadA5* (adeniltransferase que medeia a resistência à estreptomicina) (Zhang *et al.*, 2008). O transposição Tn1546 (confere resistência aos glicopéptidos), com estrutura semelhante aos detectados no ambiente hospitalar, foi observado em *Enterococcus* spp oriundos do estuário do rio Douro (Novais *et al.*, 2005). No mesmo rio, Quinteira *et al.* (2006) detectaram isolados de *Pseudomonas aeruginosa* portadoras do integrão In58, que por sua vez transportava os genes *bla<sub>VIM-2</sub>* (resistência aos carbapenemos), assim como genes que conferiam resistência à ciprofloxacina, tobramicina, gentamicina, ampicacina e netilmicina.

Também em águas e sedimentos do mar, foram detectadas bactérias portadoras de resistência a alguns agentes antibacterianos. Neela *et al.* (2007), no Japão, observaram isolados de *Vibrio* spp resistentes à tetraciclina e ampicilina e isolados de *Shewanella* spp e *Aeromonas* spp resistentes à tetraciclina e co-resistentes à tetraciclina e ampicilina. Foi ainda observado que as estirpes de *Vibrio* spp, oriundas de água do mar, apresentavam um nível de resistência superior às detectadas no sedimento, sendo sugerido que esta situação pode ter como causa a transferência de genes resistentes, veiculados por estirpes pertencentes a outros ecossistemas. Na Grécia, foram detectados *Enterococcus* spp em águas recreativas (praias) resistentes à eritromicina, rifampicina, ciprofloxacina, trimetoprim, canamicina e estreptomicina (Arvanitidou *et al.*, 2001).

Outra fonte de contaminação do ambiente aquático são as actividades de produção animal (ver ponto 3.2), onde se utiliza uma elevada quantidade de antibióticos. Uma das grandes preocupações da OMS (Organização Mundial de Saúde) e da FAO é o possível impacto, que as aquaculturas exercem em rios e mares (Smith, 2008). Vários estudos detectaram a emergência de bactérias resistentes neste nicho ecológico, nomeadamente, *Aeromonas* spp resistentes às sulfonamidas, aminoglicosídeos e tetraciclinas (Schmidt *et al.*, 2001). Na Dinamarca, Agersø *et al.* (2005) detectaram, em ambiente de aquacultura, o gene *tet39* (confere resistência às tetraciclinas por activação de sistemas de efluxo) em estirpes de *Acinetobacter* spp. Saavedra *et al.* (2004) observaram, em

explorações de trutas, no Norte de Portugal, estirpes de *Aeromonas hydrophila* resistentes a vários antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina e imipenemo), sugerindo que este tipo de explorações pode funcionar como reservatório de disseminação da resistência bacteriana a antibióticos com uso clínico humano.

Outro exemplo de contaminação do ambiente aquático é o das águas residuais oriundas de matadouros. Costa *et al.* (2006) observaram em matadouros de aves portuguesas (produtos residuais de frangos, afluentes, efluentes e lamas de ETARs) uma elevada percentagem de estirpes de *Enterococcus* spp com resistência a antibióticos como tetraciclina, eritromicina e nitrofurantoína.

A água não é só um meio de disseminação de microrganismos resistentes aos antibióticos, mas também o veículo de transferência de genes que conferem resistência a estes agentes. De facto, Soda *et al.* (2008), no Japão, verificaram, em lamas de ETARS activadas, a transferência *in situ* de plasmídeos. Os autores experimentaram, numa estirpe C600 de *Escherichia coli*, a transferência do plasmídeo RP4 para bactérias presentes nas lamas activadas. Em isolados de *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Ochrobactrum anthropi* foi detectado um plasmídeo de tamanho similar ao RP4, associado à resistência a 3 antibióticos (ampicilina, canamicina e tetraciclina).

Vários factores locais podem estimular esta transferência, nomeadamente, a presença de antibióticos e antisépticos (selecção de microrganismos resistentes). O *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* (SCENIHR, 2009) revela a sua preocupação quanto à utilização massiva de triclosan e outros antisépticos, no que respeita à selecção de estirpes bacterianas resistentes a estes e aos antibióticos. O triclosan é utilizado, quer a nível hospitalar (como desinfectante), quer comunitário em produtos de higiene pessoal (pasta de dentes, sabonetes), tintas, têxteis e plásticos, quer ainda ao nível da produção animal, ou desinfecção de superfícies em indústrias alimentares. Randall *et al.* (2003) realizaram um estudo com isolados de *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli* recolhidos de amostras de aves e suínos, os quais foram expostos a triclosan. Os isolados menos susceptíveis a este desinfectante apresentavam

maior grau de resistência à ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina, ácido nalidíxico e tetraciclina.

A presença de biofilmes em tanques, canalizações e sedimentos foi também descrita como promotora do aumento da resistência aos antibióticos. Estes estão associados a uma elevada densidade bacteriana, favorecendo o contacto entre os microrganismos dadores e receptores e a transferência de diferentes elementos genéticos (Kümmerer, 2009).

Para além das bactérias patogénicas libertadas no ambiente, os microrganismos autóctones podem também ser envolvidos nestes eventos genéticos e funcionar como reservatório e amplificadores destes genes e/ou elementos genéticos (Baquero *et al.*, 2008).

### **3.2 – O ambiente de produção animal**

Como referido em capítulos anteriores, a utilização de antibióticos com fins profiláticos, terapêuticos e como promotores de crescimento no ambiente de produção animal seleccionou bactérias resistentes aos antibióticos em várias regiões geográficas do globo (Schwarz *et al.*, 2001). O aumento de infecções humanas, de origem zoonótica, com microrganismos já resistentes aos antibióticos e o aparecimento de genes comuns entre bactérias do nicho animal e o hospital, tornou esta situação tão preocupante que regiões como a Comunidade Europeia baniram a utilização de todos os antibióticos como promotores de crescimento animal. No entanto, grandes quantidades destas moléculas ainda são usadas com fins terapêuticos. Como tal, bactérias e vários genes de resistência continuam a ser encontrados em alimentos, animais para consumo humano e seu ambiente de produção, produtos hortícolas, fertilizantes naturais, *etc.* São várias as descrições de bactérias comensais e patogénicas resistentes aos antibióticos. Dentro do grupo das patogénicas podemos destacar *Salmonella enterica* resistente e multi-resistente aos agentes antibacterianos. Este microrganismo é considerado uma das causas mais comuns de gastroenterite humana em todo o mundo, tendo como

reservatório principal os alimentos de origem animal (Antunes *et al.*, 2006; Hasman *et al.*, 2006). Num estudo realizado em Espanha, em 1998, Cruchaga *et al.* (2001) observaram em humanos, alimentos de origem animal, aves, suínos e bovinos a presença de *Salmonella* Thyphimurium resistente à ampicilina, cloranfenicol, sulfonamidas, gentamicina, canamicina, estreptomicina, tetraciclina, ácido nalidíxico e ciprofloxacina. O mesmo verificaram em isolados de produtos derivados de suínos e de leite. Os fenótipos de resistência dos isolados oriundos de humanos e alimentos eram semelhantes, embora a resistência ao cloranfenicol fosse mais significativa nos últimos. Este mesmo serótipo foi detectado numa suinicultura (carcaças e fezes) belga. Os isolados eram portadores de genes que conferiam resistência à ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, estreptomicina, trimetoprim e ácido nalidíxico (Korsak *et al.*, 2003). O mesmo foi verificado na Islândia com o mesmo tipo de amostras e no reino Unido em gado bovino (Jones *et al.*, 2002; Thorsteinsdottir *et al.*, 2007).

*Escherichia coli* de origem bovina, produtoras de toxinas e responsáveis por colites enterohemorrágicas foram detectadas em várias regiões geográficas como sendo resistentes aos antibióticos. Lee *et al.* (2009) verificaram no seu estudo que 98% de *E. coli*, com as características anteriormente referidas, apresentaram resistência a pelo menos dois antibióticos, que podiam incluir ampicilina, tetraciclina, estreptomicina, cefalotina, sulfisoxazole, ticarcilina, canamicina, minociclina, piperacilina e cloranfenicol. Na Irlanda, em isolados com verotoxina (VTEC) foram detectados o gene bla-TEM e a presença de um integrão de classe I portador dos genes *qacDE1* (confere resistência aos compostos de amónio quaternário) e *sul1* (confere resistência às sulfonamidas) (Scott *et al.*, 2008). Na Suíça, Stannarius *et al.* (2009) observaram em fezes de leitões e porcas, de várias suiniculturas, isolados de *Escherichia coli* portadoras de genes de resistência à estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclina e trimetoprim. Um estudo realizado em diversos países Europeus por Hendriksen *et al.* (2008), entre os anos de 2002-2004, revelou a elevada prevalência de isolados de *E. coli* resistentes a vários antimicrobianos em suínos doentes (tabela 3.4).

**Tabela 3.4** – Percentagem de resistência em *E. coli* isolada de suínos doentes em 11 países europeus no ano de 2004 (adaptada de Hendriksen *et al.*, 2008).

| Antibióticos                    | B        | DK               | UK       | FI<br>N  | F        | N<br>L | N        | P                | ES               | S        | CH       |
|---------------------------------|----------|------------------|----------|----------|----------|--------|----------|------------------|------------------|----------|----------|
| Ampicilina                      | 72,<br>3 | 45,<br>8         | 47,<br>0 | 16,<br>0 | 53,<br>2 | -      | 7,0      | -                | 72,<br>2         | 22       | 4,2      |
| Amoxicilina + Ácido Clavulânico | 0,7      | 0,6              | -        | -        | 2,0      | -      | -        | <b>36,<br/>0</b> | 1,8              | -        | 0,0      |
| Cloranfenicol                   | 38,<br>7 | 41,<br>8         | -        | 7,0      | -        | -      | 4,0      | <b>45,<br/>0</b> | 40,<br>8         | -        | 38,<br>3 |
| Ciprofloxacina                  | 2,9      | 0,0              | 2,0      | 0,0      | 5,5      | -      | 0,0      | <b>30,<br/>0</b> | 14,<br>2         | 6,0      | 0,0      |
| Gentamicina                     | 3,6      | 12,<br>0         | -        | 0,0      | 5,5      | -      | 0,0      | <b>45,<br/>0</b> | 19,<br>5         | 0,0      | 12,<br>7 |
| Ácido nalidíxico                | 34,<br>3 | 32,<br>0         | -        | 13,<br>0 | -        | -      | 2,0      | -                | 33,<br>7         | -        | -        |
| Estreptomicina                  | -        | <b>77,<br/>4</b> | -        | 54,<br>0 | -        | -      | 47,<br>0 | <b>64,<br/>0</b> | <b>74,<br/>0</b> | 28,<br>0 | -        |
| Sulfonamidas                    | -        | 82,<br>0         | -        | 51,<br>0 | -        | -      | 7,0      | -                | 76,<br>3         | -        | -        |
| Tetraciclina                    | 77,<br>4 | 91,<br>0         | 82,<br>0 | 51,<br>0 | 82,<br>6 | -      | 24,<br>0 | <b>98,<br/>0</b> | 87,<br>0         | 27,<br>0 | 57,<br>4 |
| Trimetoprim                     | -        | -                | -        | 44,<br>0 | -        | -      | 7,0      | -                | 66,<br>9         | 27,<br>0 | -        |
| Trimetoprim+sulfametoxazo<br>1  | 70,<br>8 | 48,<br>6         | 55,<br>0 | -        | 66,<br>4 | -      | -        | -                | -                | -        | -        |

B – Bélgica; DK – Dinamarca; UK – Reino Unido; FIN – Finlândia; F – França; NL – Holanda; N – Noruega; P – Portugal; ES – Espanha; S – Suécia; CH – Suíça; - Países que não reportaram dados.

Em Portugal, foram detectadas bactérias com resistência múltipla aos antibióticos em produtos de origem animal para consumo humano, nomeadamente, *Enterococcus* spp resistentes aos glicopéptidos oriundos de carcaças de aves, *Salmonella* resistente à tetraciclina, estreptomicina, ampicilina, sulfametoxazol, trimetoprim, gentamicina, canamicina e cloranfenicol de amostras de humanos, produtos de origem animal para consumo e ambiente. Foram ainda observadas *Enterobacteriaceae* com  $\beta$ -lactamases de espectro alargado em carcaças de frangos (Novais *et al.*, 2005; Antunes *et al.*, 2006;

Machado *et al.*, 2008). Novais *et al.* (2005) observaram que um clone de *Enterococcus* spp, resistente aos glicopéptidos, estava disseminado em suiniculturas de Portugal, Espanha, Suíça e Dinamarca, sugerindo que as trocas comerciais poderiam estar na base desta distribuição alargada de bactérias resistentes. Adicionalmente, esta estirpe foi também descrita em humanos saudáveis e em hospitalizados dinamarqueses e portugueses (Freitas *et al.*, 2009, dados submetidos para publicação). Antunes *et al.* (2006) observaram em amostras clínicas de animais, produtos alimentares e ambiente de Portugal, isolados de *Salmonella* multi-resistente portadores de integrons com genes que conferiam resistência aos aminoglicosídeos (*aadA*), sulfonamidas (*sul*), trimetoprim (*dfr*) e  $\beta$ -lactâmicos (*bla*<sub>PSE-I</sub> e *bla*<sub>OXA-30</sub>). É sugerido pelos autores que os produtos de origem animal funcionam como reservatório de clones e integrons portadores de genes de resistência, capazes de contaminarem a população humana uma vez que, a distribuição destes elementos é similar nas diferentes amostras.

Outra situação bastante preocupante é a disseminação clonal entre humanos e animais de estirpes MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina) (Huijsdens *et al.*, 2006). Em estudos realizados em vários países da Europa (Alemanha, Áustria, Dinamarca, Itália, França, Holanda, Hungria), Coreia e nos Estados Unidos da América foi detectada a presença de estirpes MRSA em humanos, suínos, gado bovino, frangos e em produtos de origem animal para consumo humano (Lee *et al.*, 2003; Armand-Lefevre *et al.*, 2005; Huijsdens *et al.*, 2006; Peles *et al.*, 2007; van Loo *et al.*, 2007; Witte *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2008; Simeoni *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008). Alguns estudos realizados na Europa (Dinamarca, Holanda, França) e Canadá detectaram o complexo clonal CC398 em suínos e humanos, sendo considerado que os suínos funcionam como reservatório destas estirpes (Armand-Lefevre *et al.*, 2005; Huijsdens *et al.*, 2006; Khanna *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2008; van Rijen *et al.*, 2008).

Algumas práticas agrícolas (utilização de fertilizantes naturais, ou de biopesticidas) também podem contribuir para a disseminação de genes de resistência aos agentes antibacterianos. (Kümmerer, 2004; Binh *et al.*, FEMS-2008; Scott *et al.*, 2009). Num estudo realizado na Alemanha, em amostras de solos fertilizados com resíduos orgânicos de suínos e dos próprios resíduos, Binh *et al.* (FEMS-2008) observaram

plasmídeos portadores dos genes *bla*-TEM (confere resistência à amoxicilina), *sul1*, *sul2* e/ou *sul3* (conferem resistência às sulfonamidas). No Reino Unido foram identificados, nos solos e resíduos orgânicos de gado bovino, 7 serótipos de VTEC (*E. coli* produtora de verotoxina) que apresentavam resistência a mais de 5 agentes antibacterianos (Scott *et al.*, 2009). Na Dinamarca, Agersø *et al.* (2005) observaram isolados de *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Arthrobacter* spp (fezes de frangos) *Alcaligenes* spp, *Arthrobacter* spp, *Pseudomonas* spp e *Corynebacterium glutamicum* (solos estrumados com os resíduos orgânicos de frangos) portadores de integrons de classe I com cassetes de genes *tet* (resistência à tetraciclina) e *aadA11* (resistência à estreptomicina). Em todos estes estudos é sugerido que os fertilizantes naturais são um reservatório de genes de resistência aos antibióticos e que os microrganismos se disseminam, facilmente, entre ecossistemas diferentes – de humanos e animais para solos e água e vice-versa (Nwosu, 2001).

Tem sido sugerido que o uso de microrganismos como biopesticidas pode também contribuir para a disseminação da resistência aos antibióticos (Patel *et al.*, 2000; Kühn *et al.*, 2004). Patel *et al.* (2000) observaram, numa estirpe de *Paenibacillus popilliae*, a presença de genes de resistência similares aos genes *vanA* e *vanB* encontrados em isolados clínicos de *Enterococcus* spp, tendo sido sugerida a presença de um gene ancestral comum, ou que aqueles pertencentes a *Paenibacillus popilliae* constituíam variantes precursoras de *vanA* e *vanB* (Patel *et al.*, 2000; Guardabassi *et al.*, 2005).

Não podemos ainda esquecer que algumas bactérias podem ser usadas como probióticos e como tal deveriam estar isentas de resistência a antibióticos. No entanto, Rizzotti *et al.* (2005) detectaram *Enterococcus* spp, usados para a fermentação de queijos e salsichas, portadores dos genes *tetK*, *tetM* (conferem resistência às tetraciclinas) e *ermB* (confere resistência aos macrólidos). Peters *et al.* (2003), num estudo idêntico, detectaram, no mesmo tipo de amostras, estirpes de *Enterococcus* spp resistentes ao cloranfenicol, enrofloxacina, eritromicina, quinupristina/dalfopristina e tetraciclinas.

A informação aqui explanada torna claro que actividades associadas à produção animal, agricultura e a contaminação de águas superficiais podem ser promotoras da dispersão

de bactérias e genes de resistência a antibióticos em vários nichos ecológicos, que entram em contacto com o homem, pondo em risco a saúde pública.

### **3.3 – O ar como veículo de transmissão de bactérias resistentes**

Embora o ar não funcione como reservatório de bactérias resistentes a antibióticos, pode constituir um veículo da sua dispersão. Num estudo realizado em ar de suiniculturas, Gibbs *et al.* (2006) detectaram bactérias multi-resistentes a antibióticos a montante e, em maior concentração, a jusante do local de produção. As bactérias mais prevalentes no ar foram *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* do Grupo A, que incluíam isolados resistentes às tetraciclinas, ampicilina, eritromicina, lincomicina e penicilina. Chapin *et al.* (2005) detectaram, em amostras idênticas, bactérias resistentes (*Enterococcus* spp, *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* Grupo *viridans*) a pelo menos dois dos antibióticos utilizados na suinicultura em estudo. Sapkota *et al.* (2006) detectaram, no ar interior de suiniculturas, *Enterococcus* spp e *Streptococcus* spp portadores de genes *tet*(M, L e K), *erm*(A, B e F) e *mef*(A). É sugerido, nestes estudos, que o ambiente aéreo de produção animal funciona como veículo de disseminação de bactérias e genes de resistência a antibióticos, podendo contaminar os humanos através da inalação.

## **4 – Prevenção da disseminação da resistência aos antibióticos no ambiente**

Tal como referido no início deste capítulo, os antibióticos são utilizados de forma massiva, tanto nas medicinas humana como veterinária, seja com fins terapêuticos, profiláticos, ou como promotores de crescimento animal e contaminam os diversos compartimentos ambientais através da excreção humana e animal. Tendo esta informação em consideração, é fácil de perceber que ambientes aquáticos e terrestres podem constituir um verdadeiro *cocktail* de compostos activos, que contribuem para a selecção, manutenção e disseminação de bactérias resistentes fora do ambiente hospitalar.

O uso racional destes agentes, quer ao nível hospitalar, ou da comunidade parece ser um dos caminhos para diminuir a disseminação de bactérias resistentes no ambiente. A proibição da utilização destes agentes pela União Europeia como promotores de crescimento animal, certamente, vai contribuir para minimizar este efeito a longo prazo. Esta diminuição tem sido verificada em países que adoptaram este procedimento muito antes de 2006, como é o caso da Suécia. Indirectamente, a administração de vacinas em animais de consumo humano e a adopção de rigorosas medidas de higiene e sanitárias contribuirá para a diminuição de infecções e, conseqüentemente, para um menor consumo de antibióticos e selecção de bactérias a eles resistentes (Kümmerer *et al.*, 2004).

Será necessário ainda implementar métodos eficazes de tratamento de águas residuais, de modo a não permitirem a passagem de moléculas de antibióticos, ou bactérias resistentes, ou multi-resistentes para o ambiente. Juntamente com as práticas atrás referidas deverá proceder-se à sensibilização das populações rurais, de forma a fomentar o abandono da fertilização de solos com estrume animal de grandes explorações, ou com lamas das ETARs.

Como todos os profissionais de saúde o farmacêutico também pode intervir neste tema ao sensibilizar e educar a população. Informações que incluem a toma de antibióticos apenas quando necessário e de forma correcta e a importância de não serem rejeitados para o lixo doméstico serão essenciais. A dinamização deste tipo de informação junto da comunidade pode passar ainda por acções de sensibilização junto das escolas. O farmacêutico e a farmácia comunitária ao intervirem na sociedade de forma activa, contribuirão, certamente, para que ocorra um decréscimo na disseminação de bactérias resistentes nos vários compartimentos ambientais, podendo dar um contributo para a inversão da situação actual, a qual se encontra classificada como um problema emergente de saúde pública a nível mundial.

## Bibliografia

- Agersø, Y., Guardabassi, L. (2005). Identification of *tet39*, a novel class of tetracycline resistance determinant in *Acinetobacter* spp of environmental and clinical origin. *J. Antimicrob. Chemother.*, 55 (4), pp. 566-569.
- Agersø, Y., Sandvang, D. (2005). Class 1 Integrons and Tetracycline Resistance Genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp Isolated from Pigsties and Manured Soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (12), pp. 7941-7947.
- Alekshun, M. N., Levy, S. B. (2007). Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*, 128, pp. 1037-1050.
- Amit, G., Cohen, P., Ackerman, Z. (2002). Nitrofurantoin-Induced Chronic Active Hepatitis. *IMAJ*, 4 (3), pp. 184-186.
- Antunes, P., Machado, J., Peixe, L. (2006). Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *Jornal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, pp. 297-304.
- Armand-Lefevre, L., Ruimy, R., Andremont, A. (2005). Clonal Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Healthy Pig Farmers, Human Controls, and Pigs. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (5), pp. 711-714.
- Arvanitidou, M., Katsouyannopoulos, V., Tsakris, A. (2001). Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing waters. *J. Med. Microbiol.*, 50 (11), pp. 1001-1005.
- Baker, J. J. (2006). Antibacterial drug discovery and structure-based design. *Drug Discovery Today*, 11 (9-10), pp. 391-404.

- Baquero, F., Martínez, J. L., Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, pp. 260-265.
- Bassler, B. L., Losick, R. (2006). Bacterially Speaking. *Cell*, 125, pp. 237-246.
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153, pp. S347-S357.
- Bjarnsholt, T., Givskov, M. (2007). Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defences against bacterial pathogens. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 362, pp. 1213-1222.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Clarke, N. D. (2002). *Biochemistry*. U.S.A, Fifth Edition, W. H. Freeman and Company. [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=aminoglycosides%2Caction&rid=stryer%2Etable%2E4207>>. [Consultado em 2009/03/23].
- Binh, C.T., Heuer, H., Kaupenjohann, M., Smalla, K. (2008). Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. [Abstract]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 66 (1), pp. 25-37.
- Bound, J. P., Voulvoulis, N. (2005). Household disposal of Pharmaceuticals as a Pathway for Aquatic Contamination in United Kingdom. *Environ. Health Perspectives*, 113 (12), pp. 1705-1710.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microb. Reviews*, 14 (4), pp. 933-951.

- Brakhage, A. A. (1998). Molecular Regulation of  $\beta$ -Lactam Biosynthesis in Filamentous Fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3), pp. 547-585.
- Bryskier, A. (2005). *Antimicrobial Agents: Antibacterial and Antifungals*. ASM Press.
- Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., Kjelleberg, S. (2006). Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (6), pp. 3916-3923.
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.*, 8 (7), pp. 1137-1144.
- Calatayud, L., Ardanuy, C., Cercenado, E., Fenoll, A., Bouza, E., Pallares, R., Martín, R., Liñares, J. (2007). Serotypes, Clones, and Mechanisms of Resistance of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates Collected in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (9), pp. 3240-3246.
- Caplin, J. L., Hanlon, G. W., Taylor, H. D. (2008). Presence of vancomycin and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England. *Environ. Microbiol.*, 10 (4), pp. 885-892.
- Castiglioni, S., Fanelli, R., Calamari, D., Bagnati, R., Zuccato, E. (2004). Methodological approaches for studying pharmaceuticals in the environment by comparing predicted and measured concentrations in River Po, Italy. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39, pp. 25-32.
- Chapin, A., Rule, A., Gibson, K., Buckley, T., Schwab, K. (2005). Airborne Multidrug-

- Resistant Bacteria Isolated from a Concentrated Swine Feeding Operation. *Environmental Health Perspectives*, 113 (2), pp. 137-142.
- Chopra, I., Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65 (2), pp. 232-260.
- Cochetti, I., Tili, E., Mingoia, M., Varaldo, P. E., Montanari, M. P. (2008). *erm*(B)-carrying elements in tetracycline-resistant pneumococci and correspondence between Tn1545 and Tn6003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (4), pp. 1285-1290.
- Costa, P. M., Vaz-Pires, P. M., Bernardo, F. M. (2006). Antibiotic resistance in *Enterococcus* spp isolated in inflow, affluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water research*, 40, pp. 1735-1740.
- Costa, P. M., Vaz-Pires, P. M., Bernardo, F. M. (2006). Antibiotic resistance of *Enterococcus* spp isolated from wastewater and sludge of poultry slaughterhouses. *J. of Environ. Science and Health, Part B*, 41, pp. 1393-1403.
- Cottagnoud, P. (2008). Daptomycin: a new treatment for insidious infections due to gram-positive pathogens. *Swiss Med. Wkly*, 138 (7-8), pp. 93-99.
- Cruchaga, S., Echeita, A., Aladueña, A., García-Peña, J., Frias, N., Usera, M. A. (2001). Antimicrobial resistance in *salmonellae* from humans, food and animals in Spain in 1998. *J. Antimicrob. Chemother.*, 47 (3), pp. 315-321.
- Cundliffe, E. (2006). Antibiotic production by *actinomycetes*: the Janus faces of regulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33 (7), pp. 500-506.

- Dalsgaard, A., Forslund, A., Petersen, A., Brown, D. J., Dias, F., Monteiro, S., Molbak, K., Aaby, P., Rodrigues, A., Sandström, A. (2000). Class 1 Integron-Borne, Multiple-Antibiotic Resistance Encoded by a 150-Kilobase Conjugative Plasmid in Epidemic *Vibrio cholerae* O1 Strains Isolated in Guinea-Bissau. *J. Clin. Microbiol.*, 38 (10), pp. 3774-3779.
- Dancer, S. J., Shears, P., Platt, D. J. (1997). Isolation and characterization of coliforms from glacial ice and water in Canada's High Arctic. *J. Appl. Microbiol.*, 82 (5), pp. 597-609.
- Davies, J. (1995). The vicious circle: looking back on resistance plasmids. *Genetics*, 139, pp. 1465-1468.
- Davies, J. E. (1997). Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance genes. *Ciba. Found. Symp.*, 207, pp. 15-35.
- Decreto-Lei nº. 289/99 de 29 de Julho, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Diário da República – I Série-A, Nº. 175.
- Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., Courvalin, P. (2007). Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. *Clinical Microbiology Reviews*, 20 (1), pp. 79-114.
- Doi, Y., Arakawa, Y. (2007). 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*, 45, pp. 88-94.
- Donadio, S., Sosio, M., Lancini, G. (2002). Impact of the first *Streptomyces* genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60 (4), pp. 377-380.

- Dupont, M., James, C. E., Chevalier, J., Pagès, J. M. (2007). An early response to environmental stress involves regulation of OmpX and OmpF, two enterobacterial outer membrane pore-forming proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 (9), pp. 3190-3198.
- EMEA. (1999). Antibiotic Resistance in European Union Associated with Therapeutic use of Veterinary Medicines. [Em linha]. Disponível em < <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/regaffair/034299en.pdf> >. [Consulta em 2007/12/09].
- Esposito, A., Fabrizi, L., Lucchetti, D., Marvasi, L., Coni, E., Guandalini, E. (2007). Orally Administered Erythromycin in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): residues in edible tissues and withdrawal time. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, pp. 1043-1047.
- Essack, S. Y. (2001). The Development of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Response to the Evolution of  $\beta$ -Lactamases. *Pharmaceutical Research*, 18 (10), pp. 1391-1399.
- European Commission. Regulation 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official JL* 268, pp. 29-43.
- Finch, R. G., Eliopoulos, G. M. (2005). Safety and efficacy of glycopeptide antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55 (S2), pp. ii5-ii13.
- Flaherty, C. M., Dodson, S. I. (2005). Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth and reproduction. *Chemosphere*, 61 (2), pp. 200-207.
- Freitas, A. R., Novais, C., Ruiz-Garbajosa, P., Coque, T. M., Peixe, L. (2009). Clonal expansion within clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids

among different genetic lineages of *Enterococcus faecalis* from Portugal. [Abstract]. *J. Antimicrob. Chemother.*

Fuda, C., Suvorov, M., Vakulenko, S. B., Mobashery, S. (2004). The Basis for Resistance to  $\beta$ -Lactam Antibiotics by Penicillinbinding Protein 2a of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (39), pp. 40802-40806.

Galan, J. C., Baquero, M. R., Baquero, F., Gomez-Gomez, J. M. (2000). Modulation of Aminoglycoside-Resistance *aph(3)I* Gene Expression in *Escherichia coli*. [Abstract]. *Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 pp. 129.

Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P., Lambert, T. (2005). Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon *Tn1548*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 (7), pp. 2949-2953.

Georgopapadakou, N. H. (1993). Penicillin-Binding Proteins and Bacterial Resistance to,  $\beta$ -Lactams. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 37 (10), pp. 2045-2053.

Geske, G. D., O'Neill, J. C., Miller, D. M., Mattmann, M. E., Blackwell, H. E. (2007). Modulation of Bacterial *Quorum Sensing* with Synthetic Ligands: Systematic Evaluation of *N*-Acylated Homoserine Lactones in Multiple Species and New Insights into Their Mechanisms of Action. *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (44), pp. 13613-13625.

Gibbs, S. G., Green, C. F., Tarwater, P. M., Mota, L. C., Mena, K. D., Scarpino, P. V. (2006). Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a

- swine confined or concentrated animal feeding operation. *Environ. Health Perspect.*, 114 (7), pp. 1032-1037.
- Giger, W., Alder, A. C., Golet, E. M., Kohler, H. E., McArdell, C. S., Molnar, E., Siegrist, H., Suter, J. F. (2003). Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage, sludges, and surface waters. *Chimia*, 57, pp. 485-491.
- Goemaere, N., Grijm, N., van Hal, P. T., den Bakker, M. A. (2008). Nitrofurantoin-induced pulmonary fibrosis: a case report. *J. Med. Case Reports*, 2 (169), pp.1-5.
- Goffin, C., Ghuysen, J. M. (1998). Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (4), pp. 1079-1093.
- Golet, E. M., Alder, A. C., Hartmann, A., Ternes, T. A., Giger, W. (2001). Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Chem.*, 73 (15), pp. 3632-3638.
- Golet, E. M., Alder, A. C., Giger, W. (2002). Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environ. Sci. Technol.*, 36 (17), pp. 3645-3651.
- Goossens, H., Ferech, M., Stichele, R. V., Elseviers, M. (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. [Em linha]. Disponível em < [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com) >. [Consulta 2008/03/09].
- Griffiths, A. J. F., Gelbart, W. M., Miller, J. H., Lewontin, R. C. (1999). *Modern Genetic Analysis*. New York, Ed. W. H. Freeman and Company, Seventh Edition.

- Guardabassi, L., Petersen, A., Olsen, J. E., Dalsgaard, A. (1998). Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp isolated from sewage receiving waste effluent from a Hospital and a Pharmaceutical Plant. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 64 (9), pp. 3499-3502.
- Guardabassi, L., Dalsgaard, A. (2004). Occurrence, Structure, and Mobility of Tn1546-Like Elements in Environmental Isolates of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (2), pp. 984-990.
- Guardabassi, L., Perichon, B., van Heijenoort, J., Blanot, D., Courvalin, P. (2005). Glycopeptide Resistance *vanA* Operons in *Paenibacillus* Strains Isolated from Soil. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 49 (10), pp. 4227-4233.
- Guardabassi, L., Agersø, Y. (2006). Genes homologous to glycopeptide resistance *vanA* are widespread in soil microbial communities. *FEMS Microbiol. Lett.*, 259 (2), pp. 221-225.
- Guillaume, G., Verbrugge, D., Chasseur-Libotte, M. L., Moens, W., Collard, J. M. (2000). PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 32 (1), pp. 77-85.
- Hamelin, K., Bruant, G., El-Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T. A., Fairbrother, J., Harel, J., Maynard, C., Masson, L., Brousseau, R. (2006). Occurrence of Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Different Aquatic Ecosystems within the St. Clair River and Detroit River Areas. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (2), pp. 477-484.
- Harbottle, H., Thakur, S., Zhao, S., White, D. G. (2006). Genetics of Antimicrobial Resistance. *Animal Biotechnology*, 17 (2), pp. 111-124.

- Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I., Aarestrup, F. M. (2005).  $\beta$ -Lactamases among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in the Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, pp. 115-121.
- Heberer, T. (2001). Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*, 266, pp.175-189.
- Henderson-Begg, S. K., Roberts, A. P., Hall, L. M. (2008). Diversity of putative Tn5253-like elements in *Streptococcus pneumoniae*. [Abstract]. *Int. J. Antimicrob. Agents*.
- Hendriksen, R. S., Mevius, D. J., Schroeter, A., Teale, C., Jouy, E., Butaye, P., Franco, A., Utinane, A., Amado, A., Moreno, M., Greko, C., Stärk, K. D. C., Berghold, C., Myllyniemi, A. L., Hoszowski, A., Sunde, M., Aarestrup, F. M. (2008). Occurrence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator bacteria in pigs in different European countries from year 2002-2004: the ARBAO-II study. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50 (1), pp. 19.
- Hirsh, R., Ternes, T., Haberer, K., Mehlich, A., Ballwanz, F., Kratz, K. (1998). Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 815, pp. 213-223.
- Hirsh, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of Total Environment*, 225, pp.109-118.
- Hughes, D., Andersson, D. I. (2001). *Antibiotic and Resistance*. CRC Press.
- Huijsdens, X. W., van Dijke, B. J., Spalburg, E., van Santen-Verheuevel, M. G., Heck, M. E. O. C., Pluister, G. N., Voss, A., Wannet, W. J. B., de Neeling, A. J. (2006).

- Community-acquired MRSA and pig-farming. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5 (26), pp. 1-4.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *The Science of Total Environment*, 346, pp. 87-98.
- Iversen, A., Kühn, I., Franklin, A., Möllby, R. (2002). High prevalence of Vancomycin-Resistance Enterococci in Swedish sewage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (6), pp. 2838-2842.
- Iversen, A., Kühn, I., Rahman, M., Franklin, A., Burman, L. G., Olsson-Liljequist, B., Torell, E., Möllby, R. (2004). Evidence for transmission between humans and the environment of a nosocomial strain of *Enterococcus faecium*. *Environ. Microbiol.*, 6 (1), pp. 55-59.
- Jain, R., Danziger, L. H. (2004). The macrolide antibiotics: a pharmacokinetic and pharmacodynamic overview. *Curr. Pharm. Des.*, 10 (25), pp. 3045-3053.
- Jones, O. A., Voulvoulis, N., Lester, J. N. (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research*, 36, pp. 5013-5022.
- Jones, Y. E., Chappell, S., McLaren, I. M., Davies, R. H., Wray, C. (2002). Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals and their environment in England and Wales from 1988 to 1999. *Vet. Rec.*, 150 (21), pp. 649-654.
- Khanna, T., Friendship, R., Dewey, C., Weese, J. S. (2008). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet. Microbiol.*, 128 (3-4), pp. 298-303.

- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.*, 36 (6), pp. 1202-1211.
- Korsak, N., Jacob, B., Groven, B., Etienne, G., China, B., Ghafir, Y., Daube, G. (2003). *Salmonella* contamination of pigs and pork in an integrated pig production system. *J. Food. Prot.*, 66 (7), pp. 1126-1133.
- Kühn, I., Iversen, A., Finn, M., Greko, C., Burman, L. G., Blanche, A. R., Vilanova, X., Manero, A., Taylor, H., Caplin, J., Domínguez, L., Herrero, I. A., Moreno, M. A., Möllby, R. (2005). Occurrence and relatedness of Vancomycin-Resistance Enterococci in Animals, Humans, and the environment in different European regions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (9), pp. 5383-5390.
- Kumar, K., Gupta, S. C., Baidoo, S. K., Chander, Y., Rosen, C. J. (2005). Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J. Environ.*, 34, pp. 2082-2085.
- Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.*, 54, pp. 311-320.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment - a review Parte - I. *Chemosphere*, 75 (4), pp. 417-434.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment - a review Parte - II. *Chemosphere*, 75 (4), pp. 435-441.
- Lalumera, G. M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., Fanelli, R. (2004). Preliminary investigation on the environment occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere*, 54, pp. 661-668.

- Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., Petit, F. (2009). Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 68 (1), pp. 118-130.
- Larsson, J. D. G., Pedro, C., Paxeus, N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 148, pp. 751-755.
- Lee, J. H. (2003). Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from major Food Animals and Their Potencial Transmition to Humans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (11), pp. 6489-6494.
- Lee, J. H. (2009). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26 and O111 isolates from cattle and their characteristics. *Veterinary Microbiology*, 135, pp. 401-405.
- Lesic B., Lépine, F., Déziel, E., Zhang, J., Zhang, Q., Padfield, K., Castonguay, M. H., Milot, S., Stachel, S., Tzika, A. A., Tompkins, R. G., Rahme, L. G. (2007). Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. *PLoS Pathog.*, 3 (9), pp. 1229-1239.
- Lewis, H. C., Mølbak, K., Reese, K., Aarestrup, F. M., Selchau, M., Sørum, M., Skov, R. L. (2008). Pigs as Source of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 Infections in Humans, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (9), pp. 1383-1389.
- Liang, H., Li, L., Dong, Z., Surette, M. G., Duan, K. (2008). The YebC Family Protein PA0964 Negatively Regulates the *Pseudomonas aeruginosa* Quinolone Signal System and Pyocyanin Production. *Journal of Bacteriology*, 190 (18), pp. 6217-6227.

- Ligon, B. (2004). Sir Alexander Fleming: Scottish researcher who discovered penicillin. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15 (1), pp. 58-64.
- Linares, J. F., Gustafsson, I., Baquero, F., Martinez, J. L. (2006). Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *PNAS*, 103 (51), pp. 19484-19489.
- Lyras, D., Storie, C., Huggins, A. S., Crellin, P. K., Bannam, T. L., Rood, J. I. (1998). Chloramphenicol Resistance in *Clostridium difficile* Is Encoded on Tn4453 Transposons That Are Closely Related to Tn4451 from *Clostridium perfringens*. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 42 (7), pp. 1563-1567.
- Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Sousa, J. C., Peixe, L. (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum {beta}-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62 (2), pp. 296-302.
- Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Sousa, J. C., Silva, D., Ramos, M., Rocha, J., Ferreira, H., Peixe, L. (2009). Leakage into Portuguese aquatic environments of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 63 (3), pp. 616-618.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P. (2009). *Brock Biology of Microorganisms*. San Francisco, Pearson Benjamin Cummings, 12<sup>a</sup> Edition.
- Malouin, F., Bryan, L. E. (1986). Modification of Penicillin-Binding Proteins as Mechanisms of  $\beta$ -Lactam Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemother.*, 30 (1), pp. 1-5.

- Martínez-Martínez, L., Eliecer Cano, M., Rodríguez-Martínez, M. J., Calvo, J., Pascual, A. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 6 (5), pp. 685-711.
- Mascaretti, O. A. (2003). *Bacteria Versus Antibacterial Agents: An Integrated Approach*. ASM Press.
- Migliore, L., Civitarella, C., Brambilla, G., Delupis, G. D. (1996). Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. *Wat. Res.*, 31 (7), pp. 1801-1806.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. (2005). *Medical Microbiology*. Elsevier Mosby, Fifth Edition.
- Nakata, H., Kannan, K., Jones, P. D., Giesy, J. P. (2005). Determination of fluoroquinolone antibiotics in wastewater effluents by liquid chromatography-mass spectrometry and fluorescence detection. *Chemosphere*, 58 (6), pp. 759-766.
- Neela, F. A., Nonaka, L., Suzuki, S. (2007). The Diversity of Multi-drug Resistance Profiles in Tetracycline-Resistant *Vibrio* Species Isolated from Coastal Sediments and Seawater. *The Journal of Microbiology*, 45 (1), pp. 64-68.
- Novais, C., Coque, T. M., Ferreira, H., Sousa, J. C., Peixe, L. (2005). Environmental contamination with Vancomycin-Resistant Enterococci from hospital sewage in Portugal. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (6), pp. 3364-3368.
- Novais, C., Coque, T. M., Costa, M. J., Sousa, J. C., Baquero, F., Peixe, L. V. (2005). High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 (6), pp. 1139-1143.
- Nwosu, V. C. (2001). Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Res. Microbiol.*, 152, pp. 421-430.

- Ochman, H., Lawrence, J. G., Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405, pp. 299-304.
- Patel, R., Piper, K., Cockerill, F. R., Steckelberg, J. M., Yousten, A. A. (2000). The Biopesticide *Paenibacillus popilliae* Has a Vancomycin Resistance Gene Cluster Homologous to the Enterococcal *VanA* Vancomycin Resistance Gene Cluster. *Antimicrob. Agents And Chemother.*, 44 (3), pp. 705-709.
- Paterson, D. L., Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microb. Reviews*, 18 (4), pp. 657-686.
- Peall, A. F., Hodges, A. (2007). Concomitant pulmonary and hepatic toxicity secondary to nitrofurantoin: a case report. *J. Med. Case Reports*, 1 (59), pp. 1-3.
- Peles, F., Wagner, M., Varga, L., Hein, I., Rieck, P., Gutser, K., Keresztúri, P., Kardos, G., Turcsányi, I., Béri, B., Szabó, A. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *Int. J. Food Microbiol.*, 118 (2), pp. 186-193.
- Peng, Z., Bang-Ce, Y. (2006). Small molecule microrrays for drug residue detection in foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 54, pp. 6978-6983.
- Pereira, A. L., Pita, J. R. (2005). Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da Penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). *Revista da faculdade de Letras, História*, Porto, III Série, Vol. VI, pp. 129-151.
- Peters, J., Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Klein, G., Ellerbroek, L. (2003). Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated in food animal origin in Germany. *Int. J. Food Microbiol.*, 88, pp. 311-314.

- Piddock, L. J. V. (2006). Clinically Relevant Chromosomally Encoded multidrug Resistance Efflux Pumps in bacteria. *Clinical Microb. Reviews*, 19 (2), pp. 382-402.
- Poirel, L., Kämpfer, P., Nordmann, P. (2002). Chromosome-Encoded Ambler Class A  $\beta$ -Lactamase of *Kluyvera georgiana*, a Probable Progenitor of a Subgroup of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (12), pp. 4038-4040.
- Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. of Antimicrob. Chemother.*, 56, pp. 20-51.
- Quinteira, S., Peixe, L. (2006). Multiniche Screening Reveals the Clinically Relevant Metallo- $\beta$ -Lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Far from the Hospital Setting: an Ongoing Dispersion Process? *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (5), pp. 3743-3745.
- Randall, L. P., Ridley, A. M., Cooles, S. W., Sharma, M., Sayers, A. R., Pumbwe, L., Newell, D. G., Piddock, L. J., Woodward, M. J. (2003). Prevalence of multiple antibiotic resistance in 443 *Campylobacter* spp isolated from humans and animals. *J. Antimicrob. Chemother.*, 52 (3), pp. 507-510.
- Randall, L. P., Cooles, S. W., Osborn, M. K., Piddock, L. J., Woodward, M. J. (2004). Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.*, 53 (2), pp. 208-216.
- Rasmussen, T. B., Givskov, M. (2006). Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology*, 152, pp. 895-904.

- Reinthal, F. F., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckebauer, G., Mascher, F., Marth, E. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res.*, 37 (8), pp. 1685-1690.
- Rizzotti, L., Simeoni, D., Cocconcelli, P., Gazzola, S., Dellaglio, F., Torriani, S. (2005). Contribution of Enterococci to the spread of antibiotic resistance in the production chain of swine meat commodities. *J. Food Prot.*, 68, pp. 955-965.
- Robles, M., Andrade, R. J. (2008). Hepatotoxicidad por antibióticos: actualización en 2008. *Rev. Esp. Quimioter*, 21 (4), pp. 224-233.
- Rolinson, G. N. (1998). Forty years of  $\beta$ -lactam research. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41 (6), pp. 589-603.
- Rolinson, G. N., Geddes, A. M. (2007). The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, pp. 3-8.
- Rowe-Magnus, D. A., Guerout, A. M., Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J., Mazel, M. (2000). The evolutionary history of chromosomal super-integrins provides an ancestry for multiresistant integrins. *PNAS*, 98 (2), pp. 652-657.
- Saavedra, M. J., Guedes-Novais, S., Alves, A., Rema, P., Tacão, M., Correia, A., Martínez-Murcia, A. (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. Microbiol.*, 7 (3), pp. 207-211.
- Sabtcheva, S., Kaku, M., Saga, T., Ishii, Y., Kantardjiev, T. (2009). High Prevalence of the *aac(6)-Ib-cr* Gene and Its Dissemination among *Enterobacteriaceae* Isolates by CTX-M-15 Plasmids in Bulgaria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53 (1), pp. 335-336.

- Sanderson, H., Johnson, D. J., Wilson, C. J., Brain, R. A., Solomon, K. R. (2003). Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicology Letters*, 144, pp. 383-395.
- Sapkota, A. R., Ojo, K. K., Roberts, M. C., Schwab, K. J. (2006). Antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Enterococcus* spp and *Streptococcus* spp recovered from the indoor air of a large-scale swine-feeding operation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43 (5), pp. 534-540.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., Boxall, A. B. A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in environment. *Chemosphere*, 65, pp. 725-759.
- SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks). (2009). *Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides*. [Em linha]. Disponível em < [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/scenihr\\_o\\_021.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/scenihr_o_021.pdf) >. [Consulta em 2009/04/22].
- Schmidt, A. S., Bruun, M. S., Larsen, J. L., Dalsgaard, I. (2001). Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. *J. of Antimicrob. Chemother.*, 47, pp. 735-743.
- Shoemaker, N. B., Vlamakis, H., Hayes, K., Salyers, A. A. (2001). Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, pp. 561-568.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Walsh, T. R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents.*, 17 (6), pp. 431-437.

- Scott, L., McGee, P., Walsh, C., Fanning, S., Sweeney, T., Blanco, J., Karczmarczyk, M., Earley, B., Leonard, N., Sheridan, J. J. (2009). Detection of numerous verotoxigenic *E. coli* serotypes, with multiple antibiotic resistance from cattle faeces and soil. *Vet. Microbiol.*, 134 (3-4), pp. 288-293.
- Seifrtová, M., Pena, A., Lino, C. M., Solich, P. (2008). Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem. Springer-Verlag*, 391 (3), pp. 799-805.
- Simeoni, D., Rizzotti, L., Cocconcelli, P., Gazzola, S., Dellaglio, F., Torriani, S. (2008). Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. *Food Microbiology*, 25, pp. 196-201.
- Smith, P. (2008). Aquaculture and florfenicol resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *Emerg. Infect. Dis.*, 14 (8), pp. 1327-1328.
- Smith, T. C., Male, M. J., Harper, A. L., Kroeger, J. S., Tinkler, G. P., Moritz, E. D., Capuano, A. D., Herwaldt, L. A., Diekema, D. J. (2008). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strain ST398 Is Present in Midwestern U.S. Swine and Swine Workers. *PLoS ONE*, 4 (1), pp. e4258.
- Soda, S., Otsuki, H., Inoue, D., Tsutsui, H., Sei, K., Ike, M. (2008). Transfer of Antibiotic Multiresistant Plasmid RP4 from *Escherichia coli* to Activated Sludge Bacteria. *J. Biosci. Bioeng.*, 106 (3), pp. 292-296.
- Sousa, J. C. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Porto, II Edição, Ed. Universidade Fernando Pessoa.

- Speer, B. S., Shoemaker, N. B., Salyers, A. A. (1992). Bacterial Resistance to Tetracycline: Mechanisms, Transfer, and Clinical Significance. *Clinical Microb. Reviews*, 5 (4), pp. 387-399.
- Spellberg, B., Powers, J. H., Brass, E. P., Miller, L. G., Edwards, J. E. (2004). Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future. *Clinical Infectious Diseases*, 38, pp. 1279-1286.
- Stannarius, C., Bürgi, E., Regula, G., Zychowska, M. A., Zweifel, C., Stephan, R. (2009). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from Swiss weaned pigs and sows. [Abstract]. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 151 (3), pp. 119-125.
- Swaney, S. M., Aoki, H., Ganoza, M. C., Shinabarger, D. L. (1998). The Oxazolidinone Linezolid Inhibits Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 42 (12), pp. 3251-3255.
- Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Tuc Dinh, Q., Clément, M., Chevreuil, M. (2008). Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Sci. Total Environ.*, 393 (1), pp. 84-95.
- Thompson, C. J., Fink, D., Nguyen, L. D. (2002). Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biology*, 3 (7), pp. 1-4.
- Thorsteinsdottir, T. R., Kristinsson, K. G., Gunnarsson, E. (2007). Antimicrobial resistance and serotype distribution among *Salmonella* spp in pigs and poultry in Iceland, 2001-2005. *Microb. Drug. Resist.*, 13 (4), pp. 295-300.
- van Loo, I. H., Diederer, B. M., Savelkoul, P. H., Woudenberg, J. H., Roosendaal, R., van Belkum, A., Lemmens-den, T. N., Verhulst, C., van Keulen, P. H., Kluytmans,

- J. A. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.*, 13 (11), pp. 1753-1755.
- van Rijen, M. M., van Keulen, P. H., Kluytmans, J. A. (2008). Increase in a Dutch hospital of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to animal farming. *Clin. Infect. Dis.*, 46 (2), pp. 261-263.
- Webb, S., Ternes, T., Gibert, M., Olejniczak, K. (2003). Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. *Toxicology Letters*, 142, pp. 157-167.
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., Cámara, M. (2007). Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 362, pp. 1119-1134.
- Wilson, D. N., Schluenzen, F., Harms, J. M., Starosta, A. L., Connell, S. R., Fucini, P. (2008). The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105 (36), pp. 13339-13344.
- Witte, W., Strommenger, B., Stanek, C., Cuny, C. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 13 (2), pp. 255-258.
- WHO. (2001). Monitoring antimicrobial usage in food of animals for the protection of human health. [Em linha]. Disponível em <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002.11.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.11.pdf)>. [Consulta em 2008/03/23].
- Wright, D. J., Thompson, P. R. (1999). Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front Biosci.*, 4 (D), pp. 9-21.

- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T., Arakawa, Y. (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 (9), pp. 3354-3360.
- Zanetti, S., Spanu, T., Deriu, A., Romano, L., Sechi, L. A., Fadda, G. (2001). In vitro susceptibility of *Vibrio* spp isolated from the environment. *International J. of Antimicrobial Agents*, 17 (5), pp. 407-409.
- Zhang, X. X., Zhang, T., Zhang, M., Fang, H. H. P., Cheng, X. P. (2008). Characterization and quantification of class 1 integrons and associated gene cassettes in sewage treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82 (6), pp. 1169-1177.









