

V. Discussão dos Resultados

Com este trabalho pretendeu-se pesquisar uma variedade de genes *qac* que codificam para a resistência a Compostos de Amónio Quaternário em *Enterococcus* de várias espécies, provenientes de diferentes nichos ecológicos e resistentes a diversas famílias de antibióticos.

Embora *Enterococcus* spp adquiram e troquem facilmente genes com bactérias de diferentes géneros, só um isolado de uma água residual hospitalar era portador de um gene *qac* com homologia nucleotídica com *qacH* de *Staphylococcus haemolyticus* e *S. saprophyticus*. A análise *in silico* também revelou a presença deste gene em *Enterococcus faecalis* V583 mas com a designação de *multidrug resistance protein*. O número reduzido de *Enterococcus* spp com genes *qac* observado neste estudo sugere que este género bacteriano não constitui um reservatório dos diversos genes *qac* previamente descritos em bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. No sentido de compreender se estes dados tinham apenas uma importância regional, procedeu-se a uma pesquisa *in silico* dos vários genes *qac* estudados nos genomas de *Enterococcus* spp recentemente disponibilizados. Esta análise veio corroborar os dados obtidos neste estudo, revelando que nos genomas de *Enterococcus* spp de várias espécies, nichos e regiões geográficas estes genes também não se encontravam presentes (excepção: *E. faecalis* V583, anteriormente mencionado e *smr* em *E. faecalis* TX0104). Na literatura, são raras as descrições de genes que codificam para a resistência a Compostos de Amónio Quaternário descritos em *Enterococcus* spp. Entre eles estão descritos o *qacZ*, presente em *E. faecalis* V583 (Braga *et al*, 2011), mas cuja sequência não está disponível no GenBank. Desta forma, não é possível avaliar se este gene corresponde a um gene novo ou se corresponde ao *multidrug resistance protein/qacH* referido acima para *E. faecalis* V583. Foi também descrito o gene *qacEΔ1* em isolados clínicos de *Enterococcus* (Kazama, 1998). Também pelo facto de esta sequência não estar disponível no GenBank, não foi possível confirmar a sua homologia com *qacEΔ1* frequentemente presentes em integrons de classe 1 de bactérias de Gram negativo. Recentemente foi detectado o *qacA/B* num isolado de gado e num isolado clínico

humano e o gene *smr* num isolado de fezes humanas e num de queijo (Bischoff, 2011) mostrando a existência de trocas genéticas entre *Enterococcus* e o gênero que normalmente é portador destes genes: *Staphylococcus*.

A ausência dos genes *qac* estudados em *Enterococcus* spp pode estar relacionada com os elementos genéticos que habitualmente os transportam. Por exemplo, *qacEΔ1* está associado a integrões de classe 1, raramente descritos em bactérias de Gram positivo (Bjorland *et al*, 2003). Os plasmídeos pST94 (*qacG*), pNVH01 (*qacJ*), pSK41/pSW174/ pSP187 (*smr*) só foram descritos em *Staphylococcus* spp (Bjorland *et al*, 2005; Bjorland *et al*, 2007). Se estes ou outros elementos genéticos portadores dos genes *qac* estudados tiverem dificuldade em se transferirem para *Enterococcus* spp ou se após a transferência não forem estáveis nestas bactérias, pode justificar os resultados obtidos. No entanto, a análise *in silico* de *E. faecalis* V583 mostrou que *qacH* está localizado num plasmídeo conjugativo pTEF1 e está flanqueado por duas sequências de inserção IS1216. Estas sequências de inserção têm sido descritas em abundância em *Enterococcus* spp (Hegstad *et al*, 2010) e têm um papel importante na evolução de diversos elementos genéticos, nomeadamente plasmídeos e transposões (Novais *et al*, Freitas *et al*; comunicação pessoal). Neste sentido, com a continuação do uso intensivo de Compostos de Amônio Quaternário, estas IS podem futuramente ajudar a dispersar os genes *qac*, nomeadamente *qacH*, através de elementos genéticos comuns na população de *Enterococcus* spp que consigam captar o conjunto IS-*qac*. Muitos destas unidades de captura genética poderão possuir genes de resistência aos antibióticos, tal como pTEF1 de *E. faecalis* V583 que tem genes que codificam para a resistência a aminoglicosídeos. A presença de genes *qac* e de resistência a antibióticos também se verifica em pST94, pNVH01 e pSK41/pSW174/ pSP187 de *Staphylococcus* ou em integões de classe 1 de bacilos de Gram negativo (Bjorland *et al*, 2005 Bjorland *et al*, 2007). Assim, o consumo intensivo de Compostos de Amônio Quaternário pode ajudar a seleccionar e a manter estes elementos genéticos com capacidade de conferir multi-resistência às bactérias que os adquirem.

Estes estudos também revelaram que uma análise genética cuidada é fundamental para compreender melhor a dispersão de vários genes. Muitos dos genes que codificam para resistência aos Compostos de Amônio Quaternário estão anotados com nomes

diferentes nas bases de dados genéticas. Por exemplo é o caso de *qacEΔ1*, *qacI* e *qacF*, todos com sequências iguais ou de *qacC* e *smr* de *Staphylococcus* que também representam o mesmo gene, entre outros exemplos referenciados na Tabela 4 dos resultados.

Apesar da ausência de genes *qac* na população de *Enterococcus* spp estudada, continua a ser fundamental a realização de mais estudos epidemiológicos ao longo do tempo que nos permitam avaliar a evolução e mobilização destes genes entre bactérias de géneros diferentes. Também é fundamental a realização de ensaios fenotípicos que permitam avaliar o comportamento de *Enterococcus* spp face a Compostos de Amônio Quaternário. Estes estudos poderão corroborar a ausência de genes encontrados neste trabalho através da inibição da bactérias a baixas concentrações. Pelo contrário, se se verificar a sobrevivência dos isolados a elevadas concentrações destes biocidas ou poderemos estar perante a presença de outros determinantes genéticos não procurados neste estudo. A recente disponibilidade de genomas completos de *Enterococcus* spp constitui uma oportunidade de procurar novos determinantes genéticos que codifiquem para resistência a Compostos de Amônio Quaternário em *Enterococcus* spp.

VI. Bibliografia

Adair FW, Geftic SG, Gelzer J. (1971). Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds. *Applied Microbiology*, 21, pp1058-63.

Aiello AE, Larson E. (2003). Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community. *Lancet Infectious Disease*, (3), pp 501-6.

A.I.S.E. (Association Internationale de la Savonnerie, de la Détergence et des Produits d'Entretien International Association for Soaps, Detergents and Maintenance Products). [Em linha]. Disponível em <<http://www.aise.eu/downloads/biocid-PT.pdf>>. [Consultado em 11.02.11]

Alam M. M., Kobayashi N., Uehara N., Watanabe N., *Microbiology*. (2003) Drug Resist, 9, pp 109—121.

Antunes, P, Machado J, Peixe, L. (2007). Dissemination of *sul3*-Containing Elements Linked to Class 1 Integrons with an Unusual 3' Conserved Sequence Region among *Salmonella* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (51)4, pp1545-1548

Ayres, H.M., Furr, J.R. and Russell, A.D. (1999) Effect of permeabilizers on antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology* 28, 13–16.

Bischoff, K.M., White, D.G., Hume, M.E., Poole, T.L., Nisbet, D.J. (2005). The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that

confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letter*, 243 (1), pp 285-291

Bjorland, J., Steinum, T., Sunde, M., Waage, S., Heir, E. (2003). Novel Plasmid-Borne Gene *qacJ* Mediates Resistance to Quaternary Ammonium Compounds in Equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), pp 3046–3052

Björn A. Espedido, Sally R. Partridge, and Jonathan R. Iredell. (2008). *bla*_{IMP-4} in Different Genetic Contexts in *Enterobacteriaceae* Isolates from Australia. *American Society for Microbiology*, 52(8), pp 2984-2987

Braga, T., Marujo, P., Pomba, C., Lopes, F. (2011) Involvement, and dissemination, of the enterococcal small multidrug resistance transporter *QacZ* in resistance to quaternary ammonium compounds. *Journal Antimicrobiology Chemotherapy*, pp 1-4.

Broadley, S. J., P. A. Jenkins, J. R. Furr, and A. D. Russell. (1991). Antimycobacterial activity of biocides. *Letter Applied Microbiology*, 13, pp118-122.

Broadley, S.J., Jenkins, P.A., Furr, J.R. and Russell, A.D. (1995). Potentiation of the effects of chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride on mycobacteria by ethambutol. *Journal of Medical Microbiology* 43, 458–460.

Brown, M. R. W., and P. Gilbert. 1993. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *Journal Applied Bacteriology*, 74, pp87S-97S.

Centers for Disease Control. (1974). Disinfectant or infectant: the label doesn't always say. *National Nosocomial Infections Study, Fourth Quarter, 1973*, pp18-23.

Chapman, S. (2003). Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Internacional Biodeterioration and Biodegradation*, 51, pp 271-6.

Chopra, I. (1991). Bacterial resistance to disinfectants, antiseptics and toxic metal ions,. In S. P. Denyer and W. B. Hugo (ed.), Mechanisms of action of chemical biocides: their study and exploitation. *Blackwell Scientific Publications, London, England*. pp 45–65

Ciak, J. and Hahn, F.E. (1967). Quinacrine (Atebrin): mode of action. *Science*, 156, pp 655–656

Cloete TE. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Internacional Biodeterioration and Biodegradation*, 51, pp 277-82

Cooksey, D. A. (1987). Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistant strains of *Pseudomonas syringae pv. tomato*. *Applied Environmental Microbiology*, 53, pp 454–456.

Costerton, J.W., Irwin, R.T., Cheng, K.J., (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, 35, pp 299-324.

Denyer, S. P. (1995). Mechanisms of action of antibacterial biocides. *International Biodeterioration Biodegradation*, 36, pp 227-245

Denyer, S. P., and Stewart G. S. A. B. (1998). Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, pp. 261–268

Dong Li, Tao Yu, Yu Zhang, Min Yang, Zhen Li, Miaomiao Liu, Rong Qi. (2010). Antibiotic Resistance Characteristics of Environmental Bacteria from an Oxytetracycline Production Wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), pp 3444-3451

Dukan S, Touati D. (1996). Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *Journal Bacteriology*, 178, pp 6145-50.

El-Falaha, B.M.A., Rogers, D.T., Russell, A.D. and Furr, J.R. (1985a). Effect of some antibacterial agents on the hydrophobicity of wild type and envelope mutant of *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 12, pp 187–190.

El-Falaha, B.M.A., Russell, A.D. and Furr, J.R. (1985b) Effects of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride on the viability of wild type and envelope mutant of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology* 1, 21–24.

Elizabeth T. S. Houang, Yiu-Wai Chu, Wai-Sing Lo, *et al.* (2003). Epidemiology of Rifampin ADP-Ribosyltransferase (*arr-2*) and Metallo- β -Lactamase (*bla*_{IMP-4}) Gene Cassettes in Class 1 Integrons in *Acinetobacter* Strains Isolated from Blood Cultures in 1997 to 2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), pp 1382-1390

Even Heir, Gunhild Sundheim, Askild L Holck. (1998) Treatment Plant and the Receiving River The Staphylococcus qacH gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. *FEMS Microbiology Letters*, 163(1), pp 49-56

Fitzgerald, K.A., Davies, A. and Russell, A.D. (1992) Effect of chlorhexidine and phenoxyethanol on cell surface hydrophobicity of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 14, pp 91–95.

Flemming, H-C. e Schaule, G. 1996. Measures against biofouling. In: Heitz, E., Flemming, H-C e Sand, W. eds. *Microbially Influenced Corrosion of Materials*, Heidelberg, Springer – Verlag, 121-139.

Frier, M. 1971. Derivatives of 4-amino-quinaldinium and 8-hydroxyquino-line, p. 107±120. In W. B. Hugo (ed.), *Inhibition and destruction of the microbial cell*. Academic Press, Ltd., London, England.

Gilbert, P., Moore, L.E. (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal Applied. Microbiology*, 99, pp703–715.

Gilbert P, McBain A.J. (2001). Biocide usage in the domestic setting and concern about antibacterial and antibiotic resistance. *Journal Infectious*; 43, pp 85-91.

Gillespie M.T, May J.W, Skurray R.A. (1986) Plasmid-encoded resistance to acriflavine and quaternary ammonium compounds in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letter*; 34:47-51.

Hasman, H; Aarestrup, F. (2002). tcrB, a Gene Conferring Transferable Copper Resistance in *Enterococcus faecium*: Occurrence, Transferability, and Linkage to Macrolide and Glycopeptide Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp 1410-1416.

Heath RJ, Yu YT, Shapiro MA, Olson E, Rock CO. (1998). Broad spectrum antimicrobial biocides target the FabI component of fatty acid synthesis. *Journal Biology Chemical*, 273, pp 30316-20.

Heir, E., G. Sundheim, and A. L. Holck. (1999). The qacG gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *Journal Applied Microbiology*, 86, pp378–388.

Hegstad, K., Langsrud, S., Scheie, A. (2010). Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health?. *Microbial Drug Resistance*, 16(2), pp 91-103

Hegstad, K; Mikalsen, T; Coque, T; Werner, G; Sundsfjord, A. (2010). Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, *Clinical Microbiology Infectious*, 16, pp 541-554

Heir, E., G. Sundheim, and A. L. Holck. (1998). The *Staphylococcus* qacH gene product: a new member of the SMR family of multidrug resistance. *FEMS Microbiology Letter*, 163, pp 49–56

Hoffman, R.K. (1971) Toxic gases. In *Inhibition and Destruction of the Microbial Cell* ed. Hugo, W.B. pp. 225–258.

Howden, B., Seemann, P, Harrison, P, *et al.* (2010). Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Strain JKD6008, an ST239 Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Intermediate-Level Vancomycin Resistance. *Journal of Bacteriology*, 192 (21), pp 5848-5849

Klemperer, R. M. M., N. T. Ismail, and M. R. W. Brown. 1980. Effect of R-plasmid RP1 and nutrient depletion on the resistance of *Escherichia coli* to cetrimide, chlorhexidine and phenol. *Journal Applied Bacteriology*, 48, pp 349–357.

Kummerle, N., Feucht, H.H., Kaulfers, P.M., (1996). Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: characterization of resistance gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, pp 2276-2279.

Levy, S. B. 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Journal Applied Microbiology Supplement*, 92, pp 65s-71s.

Littlejohn TG, Paulsen IT, Gillespie MT. (1992) Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Letter*; 95, pp 259-266.

Liau, S.Y., Read, D.C., Pugh, W.J., Furr, J.R. and Russell, A.D. (1997) Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in Applied Microbiology*, 25, pp 279–283.

Lutey, R.W. 1995. Process cooling water. *In*: Rossmore, H. W. ed. *Handbook of Biocide and Preservative Use*. Blakie Academic & Professional, Glasgow, UK, 51-82

McDonnell, G., and A. D. Russell. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:147–179.

Ma, D., D. N. Cook, M. Aiberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst. (1995). Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 16, pp 45–55

Ma, D., D. N. Cook, J. E. Hearst, and H. Nikaido. (1994). Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. *Trends Microbiology*, 2, pp 489–493

Nikaido, R., M. Basina, V. Nguyen, and E. Y. Rosenberg. (1998). Multidrug efflux pump *acrAB* of *Salmonella typhimurium* excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *Journal Bacteriology*, 180, pp4686–4692.

Okusu, H., D. Ma, and H. Nikaido. (1996). *acrAB* efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple antibiotic-resistance (Mar) mutants. *Journal Bacteriology*, 178, pp 306–308.

Maillard, J.Y. (2002). Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92, pp. 16S-27S

McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. (1998a), Overexpression of marA, soxS, or acrAB produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letter*, 166, pp 305-9.

Mitchell, P. (1972) Chemiosmotic coupling in energy transduction: a logical development of biochemical knowledge. *Journal of Bioenergetics*, 3, 5–24.

Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type of mechanism. *Nature, London*, 191, 144–148

Moken MC, McMurry LM, Levy SB. (1997). Selection of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: Roles of the mar and acrAB loci. *Antimicrobiology Agents Chemother*, 41, pp 2770-2.

Nakamura, K. and Tamaoki, T. (1968). Reversible dissociation of *Escherichia coli* ribosomes by hydrogen peroxide. *Biochemica and Biophysica Acta*, 161, pp 368–376.

Nikaido, H., S.-H. Kim, and E. Y. Rosenberg. (1993). Physical organization of lipids in the cell wall of *Mycobacterium chelonae*. *Molecular Microbiology*, 8, pp 1025-1030.

Novais, C; Coque, T; Sousa, J; Peixe, L. (2006). Antimicrobial resistance among faecal enterococci from healthy individuals in Portugal, *Clinica Microbiology and Infectious Diseases*, 12(11), pp 1131- 1134

Paulsen IT, Littlejohn TG, Radstrom P. (1993). The 3´conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrobioly Agents Chemotherapy*; 37: 761-68.

Paulsen, I.T., M.H. Brown, T.G. Littlejohn, B.A. Mitchell, and R.A. Skurray. (1996). Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. *Proceeding of the Nacional Academy of Science USA*, 93, pp 3630–3635

Piddock, L.J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nature Review Microbiology*, 4, pp 629–636.

Poole, K. 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal Applied Microbiology*, 92, pp55S–64S.

Poxton, I. R. (1993). Prokaryote envelope diversity. *Journal Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 70, pp 1S-11S.

Romao CM, de Faria YN, Pereira LR, Asensi MD. (2005). Susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, pp 541-8.

Rossouw, F. T., and R. J. Rowbury. 1984. Effects of the resistance plasmid R124 on the level of the OmpF outer membrane protein and on the response of *Escherichia coli* to environmental agents. *Journal Applied Bacteriology*, 56, pp 63–79.

Russell, A. D. (1995). Mechanisms of bacterial resistance to biocides. *Internacional [Biodeterioration and Biodegradation](#)*, 36, pp 247-265.

Russell, A. D. (1996). Activity of biocides against mycobacteria. *Journal Applied Bacteriology Symposium*. Supplement, 81, 87S-101S.

Russell AD. (2002b). Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Journal Applied Microbiology*, 92, pp 121-35.

Russel A.D., Furr J.R. and Maillard J.Y. (2009). Microbial Susceptibility and Resistance to Biocides. *ASM News Features*, 63, pp. 481-487

Russell, A.D., Furr, J.R., Maillard, J.-Y. (1997) Microbial susceptibility and resistance to biocides: an understanding. *ASM News*, 63, pp 481–487.

Russell, A.D. and Hugo, W.B. (1994) Antimicrobial activity and action of silver. *Progress in Medical Chemistry*, 31, pp 351–371.

Russell, A. D., and N. J. Russell. (1999). Biocides: activity, action and resistance. *Symposium Society of General Microbiollogy*, 53, pp 327-365.

Russell, A. D., and J. R. Furr. (1986). Susceptibility of porin and lipopolysaccharid deficient strain of *Escherichia coli* to some antiseptics and disinfectants. *Journal Hospital Infectious*, 8, pp 47–56.

Seligman, M.L. and Mandel, H.G. (1971) Inhibition of growth and RNA biosynthesis of *Bacillus cereus* by quinacrine. *Journal of General Microbiology* 68, 135–148.

Russell, A.D. and Furr, J.R. (1977) The antimicrobial activity of a new chloroxylenol preparation containing ethylenediamine tetraacetic acid. *Journal of Applied Bacteriology*, 43, 253–260.

Schweizer, H. P. (1998). Intrinsic resistance to inhibitors of fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is due to efflux: application of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems. *Antimicrobiology Agents Chemotherapy*, 42, pp 394–398

SCENIHR, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, SCENIHR. (2009). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides, pp 1-87

Stickler DJ. (1974). Chlorhexidine resistance in *Proteus mirabilis*. *Journal Clinical Pathology*, 27, pp 284-7.

Thomas L. Maillard J-Y, Lambert RJ, Russell AD. (2000). Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of 'residual' concentration. *Journal Hospital Infectiouses*, 46, 297-303.

Thorrold CA, Letsoalo ME, Dusé AG, Marais E. (2007). Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. *International Journal Food Microbiololy*, 113, pp 315-20.

Wheeler, P. R., G. S. Besra, D. E. Minnikin, and C. Ratledge. (1993). Inhibition of mycolic acid biosynthesis in a cell-wall preparation from *Mycobacterium smegmatis* by methyl 4-(2-octadecylcyclopropen-1-yl)butanoate, a structural analogue of a key precursor. *Letter Applied Microbiology*, 17, pp 33-36.

Winder CL, Al-Adham IS, Abdel Malek SM, Buultjens TE, Horrocks AJ, Collier PJ. (2000). Outer membrane protein shifts in biocide-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal Applied Microbiology*; 89, pp 289-95.

Yum, J.H., D. Yong, K. Lee, H.S. Kim, and Y. Chong. (2002). A new integron carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagnosis Microbiology Infectious Disease*, 42, pp 217–219.