

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Ciências Biológicas

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas

**PADRÃO DE SUSCEPTIBILIDADE A GLICOPEPTÍDICOS E BETA-LACTÂMICOS
EM *PAENIBACILLUS* spp. ISOLADOS DE ÁGUA E SOLO**

Raisa Gasiorowski Billodre

Porto Alegre, novembro de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Ciências Biológicas
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas

**PADRÃO DE SUSCEPTIBILIDADE A GLICOPEPTÍDICOS E BETA-LACTÂMICOS
EM *PAENIBACILLUS* spp. ISOLADOS DE ÁGUA E SOLO**

Acadêmica: Raisa Gasiorowski Billodre
Orientadora: Gertrudes Corção

Porto Alegre, novembro de 2010

*Só se vê bem
com o coração.*

O essencial

é invisível

aos olhos.

Saint- Exupéry

ARTIGO:

O presente artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Brazilian Journal of Microbiology, apresentadas em anexo no final do trabalho.

PADRÃO DE SUSCEPTIBILIDADE A GLICOPEPTÍDICOS E BETA-LACTÂMICOS EM *PAENIBACILLUS* spp. ISOLADOS DE ÁGUA E SOLO

Raisa Gasiorowski Billodre ¹, Gertrudes Corção ²

¹ Acadêmica em Ciências Biológicas, UFRGS.

² Professor Associado II do Departamento de Microbiologia e membro do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Endereço para correspondência: Sarmento Leite, 500

Porto Alegre, RS, Brasil

Cep: 90050-170

Tel/Fax: 55 51 33083445

Contato por: raisagb@hotmail.com; corcao@ufrgs.br

1. Resumo

A transferência da resistência a antimicrobianos mediada por elementos móveis é uma das causas de disseminação de genes de resistência para outras espécies bacterianas. Antimicrobianos da classe dos glicopeptídicos e dos β -lactâmicos atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana, a resistência aos primeiros já foi reportada em isolados de *Paenibacillus sp.*, todavia ainda não existem dados em relação aos β -lactâmicos. Estas bactérias são bacilos Gram-positivos capazes de produzir esporos, são encontrados em diversos ambientes como solo, água, rizosfera, materiais vegetais e muitas das suas espécies apresentam resistência a antimicrobianos e podem atuar como reservatório destas características. Sessenta e um isolados do solo e água foram analisados frente a nove antimicrobianos: dois glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) e sete β -lactâmicos (piperacilina-tazobactam, aztreonam, ceftazidima, meropenem, cefotaxima, ceftriaxona e amoxicilina + ác. clavulânico) pelo método de disco-difusão. Para detecção de produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), foi utilizada a técnica de disco-aproximação. Todos os isolados foram suscetíveis a meropenem e piperacilina-tazobactam. Foram obtidos 98,36% dos isolados sensíveis a teicoplanina, 96,72% a vancomicina, 85,25% a amoxicilina + ác. clavulânico, 54,1% a ceftriaxona, 22,95% a cefotaxima, 4,92% a ceftazidima e 1,64% a aztreonam. Um total de 36 (59,02%) isolados foram considerados produtores de ESBL, 16 (26,23%) isolados foram resistentes a três ou mais antimicrobianos. Os resultados obtidos revelam a possível presença β -lactamases tipo AmpC e derivadas de TEM.

PALAVRAS-CHAVE: *Paenibacillus*, resistência a antimicrobianos, glicopeptídeos, β -lactâmicos.

2. Introdução

Membros do gênero *Paenibacillus* são organismos em forma de bastonetes, aeróbios ou anaeróbios facultativos que produzem esporos elípticos e reagem fracamente a coloração de Gram, apesar de ter a estrutura de Gram-positiva. A principal característica do grupo é a secreção de enzimas extracelulares, polissacarídeos, aminoácidos e metabólitos secundários¹.

Paenibacillus possuem ampla distribuição, sendo encontrado nas mais variadas fontes, incluindo solo, água, rizosfera de plantas, materiais vegetais, forragem, fezes². Esses ambientes apresentam forte pressão seletiva, sendo os antimicrobianos presentes no solo, predominantemente, de origem microbiana e altamente relacionadas com a abundância e/ou atividade microbiana³, logo, os micro-organismos que possuem mecanismo de resistência a esses, prevalecem. A evidência de resistência a antimicrobianos mediada por elementos móveis como plasmídeos e transposons é motivo de grande preocupação por causa do risco potencial de disseminação dessa resistência para outras espécies de bactérias Gram-positivas, inclusive patogênicas⁴.

Antimicrobianos da classe dos glicopeptídeos atuam principalmente através da inibição da síntese da parede celular⁵. O alvo molecular destes antimicrobianos é o terminal D-Ala-D-Ala do peptidoglicano em crescimento, um polímero rígido que protege a célula contra a lise osmótica. Ao se ligar nesse dipeptídeo terminal, o antimicrobiano interfere na adequada formação da parede celular, o que resulta na eventual morte da célula. Organismos resistentes aos glicopeptídicos evitam que isso ocorra modificando o alvo molecular do antimicrobiano de D-Ala-D-Ala para D-Ala-D-Lac ou para D-Ala-D-Ser⁶.

Essa alteração na síntese da parede celular torna as bactérias resistentes aos glicopeptídicos, uma vez que não há mais afinidade por esse novo dipeptídeo. A resistência

aos glicopeptídeos é codificada pelos genes *van*, sendo que vários genes já foram encontrados entre os *Paenibacillus*, sendo os mais comuns o *vanA* e o *vanB*⁷.

Antibióticos β -lactâmicos possuem mecanismo de atuação similar ao dos glicopeptídeos, inibindo a síntese da parede celular, no entanto, os β -lactâmicos ligam-se as enzimas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), bloqueando a ligação cruzada entre as unidades de peptidoglicano ao inibir a formação da ligação do peptídeo que é catalisado pelas PBPs⁸. Um dos modos de resistência mais efetivos e conhecidos a esse tipo de antimicrobiano é pela produção de β -lactamases, que são enzimas que lisam o anel β -lactâmico por hidroxilação irreversível da ligação amida, inativando o antimicrobiano e impedindo, assim que ele apresente atividade contra as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana⁹. Estas enzimas são codificadas pelos genes *bla*, que estão amplamente distribuídos entre as bactérias Gram-negativas, nas quais mais de 75 diferentes β -lactamases mediadas por plasmídeos já foram documentadas¹⁰. Todavia a resistência à β -lactâmicos já foi observada entre bactérias do gênero *Bacillus*¹¹, logo ela também pode estar presente entre os *Paenibacillus*, no entanto, não há nenhum relato na literatura.

As betalactamases de amplo espectro (ESBLs) são capazes de hidrolisar um amplo espectro de antibióticos β -lactâmicos¹². Estas enzimas são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração (exceto as cefamicinas) e os monobactâmicos, não inativando, entretanto os carbapenêmicos. A ação hidrolítica destas enzimas é bloqueada pelos inibidores de β -lactamase como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam¹³.

A transferência de fragmentos de DNA cromossômico, de plasmídeos e transposons é muito disseminada nos procariotos, sendo uma das causas da notável diversidade genética observada nas bactérias⁴. O gênero *Paenibacillus* pode apresentar resistência a

antimicrobianos e é possível que estas se encontrem em elementos móveis. Como este gênero está presente nos mais diversos ambientes e em contato com variados grupos de organismos, ele pode favorecer a transferência destes genes de resistências a outros micro-organismos, inclusive patogênicos, presentes no solo e na água, criando reservatórios de genes de resistência.

A resistência a antimicrobianos está presente entre bactérias do meio ambiente quando estas habitam ambientes com forte pressão seletiva. Vários microrganismos que se desenvolvem no solo são capazes de produzir β -lactâmicos e glicopeptídicos e desta forma criam um ambiente seletivo. Por outro lado bactérias do ambiente aquático geralmente sobrevivem em um ambiente oligotrófico, com pouca pressão seletiva, e portanto apresentam pouca resistência a antimicrobianos. Desse modo, o objetivo do estudo foi investigar o padrão de suscetibilidade em isolados desse gênero provenientes de amostras de água e de solo permitirá a expansão de conhecimentos referentes à disseminação desta resistência nestes ambientes e futuramente auxiliar na solução desse problema.

3. Materiais e métodos

3.1. Isolados Bacterianos

Foram analisados 61 isolados (28 de solo e 33 de água) de *Paenibacillus* spp. pertencentes à coleção do laboratório 166 do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFRGS. Estes isolados foram coletados entre 1997 - 2002 e foram analisadas e identificadas em estudos anteriores, através de provas bioquímicas e amplificação do 16S rRNA (primer específico para o gênero)¹⁴.

Os isolados foram mantidos em glicerol 15% a -20°C, para recuperá-los, 200 μ l desse estoque foi incubado em 3ml de caldo tripticaseína de soja (TSB) a 30°C overnight. Após 200 μ l do caldo TSB contendo o isolado já crescido foi inoculado, através da técnica de

semeadura, em ágar tripticaseína de soja (TSA) e incubado por 24h a 30°C. Colônias com suspeitas de contaminação foram submetidas a um segundo ou terceiro isolamento em TSA. Quando obtivemos certeza do isolamento da cepa de interesse, foram analisadas quanto à morfologia celular e formação de esporos através da coloração de Gram para confirmação do gênero *Paenibacillus*.

3.2 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

A susceptibilidade dos isolados foi testada através do método de disco-difusão frente a nove antimicrobianos, sendo dois glicopeptídicos: vancomicina (30µg) e teicoplanina (30µg) e sete β-lactâmicos: piperacilina-tazobactam (100/10µg), aztreonam (30µg), ceftazidima (30µg), meropenem (10µg), cefotaxima (30µg), ceftriaxona (30µg), amoxicilina + ác. clavulânico (20/10µg).

Os isolados foram crescidos em placas de TSA, a partir deste crescimento foi feito uma suspensão de células, na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, em salina. Esta suspensão foi semeada em ágar Müeller Hinton e os discos dos antimicrobianos colocados sobre a placa semeada, que foi incubada a 35 °C por 18 horas e a leitura e interpretação dos halos realizada conforme as normas do CLSI (2007)¹⁵.

3.3 Ensaio por disco-difusão de aproximação para detecção de β-lactamases de espectro estendido (ESBLs)

Os isolados foram testados quanto à presença de β-lactamases de espectro estendido através da metodologia de disco-difusão dupla. Uma suspensão de células do isolado a ser analisado, na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, foi semeado em ágar Müeller Hinton. No centro da placa, colocou-se um disco contendo amoxicilina + ác. clavulânico e outros quatro

discos antimicrobianos marcadores: aztreonam, ceftazidima, ceftriaxona e cefotaxima a uma distância de 20mm do disco central.

A deformação do halo de inibição ou o aparecimento de uma zona fantasma entre o substrato (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxoma e aztreonam) e o inibidor (amoxicilina - ácido clavulânico) caracteriza fenotipicamente o isolado como produtor de ESBL¹⁶.

3.4 Ensaio Etest

Os isolados que no teste de susceptibilidade a antimicrobianos apresentaram um halo de inibição a vancomicina próximo ao de intermediário (17mm) foram submetidos ao ensaio Etest. Essa metodologia consiste em semear em ágar Müller Hinton o isolado a ser testado, na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, na qual é incorporada uma fita de Etest, que apresenta um gradiente exponencial pré-definido do antimicrobiano seco e estabilizado, que varia de 0,016 a 256 mcg/ml.

3.5 Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo software BioEstat 5.0, utilizando o aplicativo *Kruskal-Wallis* para análise estatísticas comparativa das amostras sensíveis, intermediárias e resistentes do solo e água, e o aplicativo *Mann-Whitney* para os resultados obtidos no ensaio Etest com os isolados de solo e água.

4. Resultados

Os resultados obtidos quanto ao perfil de susceptibilidade frente aos nove antimicrobianos testados nesse estudo apresentou padrão semelhante entre os isolados provenientes de amostras do solo e da água ($p > 0,01$) (Tabela 1). Dos 61 isolados analisados, todos se mostraram sensíveis frente aos antimicrobianos meropenem e piperacilina-

tazobactam, e uma parcela significativa apresentou resistência ao aztreonam. Dentre os β -lactâmicos testados, os antimicrobianos mais efetivos foram meropenem e piperacilina-tazobactam, ambos com 100% dos isolados sensíveis, seguidos de amoxicilina + ác. clavulânico com 85,25%, ceftriaxona com 54,1%, cefotaxima com 22,95%, ceftazidima com 4,92% e aztreonam com 1,64% de isolados sensíveis. Frente aos glicopeptídicos, obtivemos apenas dois (3,28%) isolados intermediários para vancomicina, e um (1,64%) para teicoplanina, sendo esses obtidos de amostras de água.

Quanto à produção de ESBL, entre os isolados da água, 63,63% mostraram-se positivas para a produção de ESBL. Um valor um pouco menor foi encontrado nos isolados do solo, com 53,57% de produtores de ESBL (Figura 1).

Foram submetidos ao Etest treze isolados do solo e doze da água. Entre estes a maior Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi 4 mcg/ml, obtida em um isolado do solo, e dois da água.

5. Discussão:

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,01$) no perfil de resistência entre os isolados de *Paenibacillus* da água e do solo, a resistência a maioria dos β -lactâmicos e a sensibilidade aos glicopeptídicos foram comuns entre eles.

Nenhum isolado resistente ou intermediário ao meropenem foi encontrado, o que pode ser explicado em parte devido ao seu alto grau de estabilidade deste antimicrobiano frente às β -lactamases¹⁷. Até mesmo bactérias produtoras de ESBL, o que demonstra resistência à 3ª geração de cefalosporinas e também à combinação de β -lactâmico + inibidor de β -lactamase, são normalmente sensíveis à carbapenems¹⁸, o que pôde ser confirmado nesse estudo, uma vez

que foram obtidos alguns isolados resistentes a amoxicilina + ác. clavulânico (n=9), e vários positivos para ESBL (n=36).

Apenas um isolado se mostrou intermediário e outro sensível frente ao aztreonam, ambos do solo. O aztreonam é um β -lactâmico com anel monocíclico (monobactâmico), que possui atividade somente contra bactérias Gram-negativas, por se ligar muito fracamente às PBPs das bactérias Gram-positivas e anaeróbicas, esse antimicrobiano é inativo contra esses micro-organismos¹⁹. Este é um resultado esperado, mas como o aztreonam faz parte do teste de disco aproximação para detecção de ESBLs, resolvemos deixá-lo na análise.

Outros estudos^{20, 21, 22} apresentaram padrão de suscetibilidade às cefalosporinas semelhantes às obtidas neste. Uma fração de 54,10% dos isolados apresentaram resistência frente à cefalosporina de 3ª geração ceftazidima, porém sensíveis ou intermediárias à cefotaxima e ceftriaxoma, assim como à meropenem. Alguns mecanismos que conferem resistência à cefalosporinas de 3ª geração são alterações nas proteínas exteriores da membrana (OMPs) ou hiperprodução cromossômicas das cefalosporinases de classe I. Ambos, tipicamente conferem ampla resistência para numerosos componentes β -lactâmicos. Em contraste, a hidrólise preferencial a β -lactâmicos exibida pela maior parte de β -lactamases derivadas de TEM frequentemente confere resistência apenas a β -lactâmicos específicos²³. Esse padrão apresentando resistência a ceftazidima, mas suscetibilidade à cefotaxima e ceftriaxoma indica que a cepa apresente uma ESBL com preferência a ceftazidima, possivelmente TEM-10 ou TEM-26^{10,20}.

β -lactamases do tipo AmpC são capazes de hidrolisar cefalosporinas de 3ª geração e monobactâmicos, mas não são inibidos por ác. clavulânico, ao contrário de β -lactamases do tipo OXA, que também são capazes de hidrolisar esses antimicrobianos, mas são inibidas pelo

ác. clavulânico²⁴. Oito isolados apresentaram perfil de resistência que se encaixa no perfil das β -lactamases do tipo AmpC, mostrando resistência frente à ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima, aztreonam e amoxicilina + ác. clavulânico.

O antimicrobiano glicopeptídico vancomicina e o estruturalmente relacionado teicoplanina são considerados as últimas linhas de defesa contra uma variedade de sérias infecções causadas por bactérias Gram-positivas, como os enterococcus, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Clostridium difficile*²⁵, possivelmente devido ao seu baixo uso na medicina obtivemos os resultados com alta sensibilidade dos isolados frente a esses antimicrobianos.

Como dito anteriormente, o solo apresenta uma quantidade de micro-organismos maior que ambientes aquáticos, era esperado que as bactérias presentes neste local apresentassem maior resistência a antimicrobianos. A ausência de diferença significativa entre as amostras de diferentes origens provavelmente seja causada por uma grande quantidade de micro-organismos encontradas na água possivelmente serem oriundas de outros ambientes, com pressão seletiva mais intensa, e terem sido carregados até o local de coleta, estando lá apenas momentaneamente.

6. Conclusão

Os *Paenibacillus sp.* do presente estudo mostraram-se sensíveis aos glicopeptídeos analisados, todavia foram na sua maioria resistentes a quase todos β -lactâmicos analisados. Mais que a metade dos isolados apresentou fenótipo de produtora de ESBL, e portanto podem estar atuando como reservatórios destes genes e contribuindo para sua disseminação no ambiente estudado. Estudos futuros serão realizados para caracterizar as possíveis ESBL destes isolados.

Referências:

1. Shida, O.; Takagi, H.; Kodowaki, K.; Nakamura, L. K.; Komagata, K. – Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdolanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *B. kobensis* and *Bacillus thiaminolyticus* to the Genus *Paenibacillus* and Emended Description of the Genus *Paenibacillus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Spencers Wood, vol. 47, n.2, 1997, p. 289-298.
2. Daane, L. L.; Harjono, I.; Barns, S. M.; Launen, L. A.; Palleroni, N. J.; Häggblom, M. M. – PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salta marsh plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Spencers Wood, vol. 52, 2002, p. 131-139.
3. Insam, H. - Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma*, 2001, 100: 389-402.
4. Barbosa HM, Torres BB, Furlaneto MC. *Microbiologia Básica*. Ed. Atheneu, São Paulo, 1998.
5. Barna, J. C., Willians, D. H. – The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Ann. Rev. Microbiol*, 38, 1984, p. 339 - 357.
6. Marshall, C. G.; Lessard, I. A. D.; Park, I.-S.; Wright, G. D. - Glycopeptide Antibiotic Resistance Genes in Glycopeptide-Producing Organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 9, Set. 1998, p. 2215 – 2220.
7. Guardabassi, L.; Perichon, B.; Heijenoort, J. V.; Blanot, D.; Courvalin, P. - Glycopeptide Resistance *vanA* Operons in *Paenibacillus* Strains Isolated from Soil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 10, Out. 2005, p. 4227 – 4233.
8. Kohanski, M. A., Dwyer, D.J., Collins, J.J. – How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, Jun 2010, p. 423 – 433.

9. Bertoncheli, C. M.; Hörner, R. - Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 44, n. 4, out./dez., 2008.
10. Livermore, D. M. - β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Clinical Microbiology Reviews, v. 8, n 4, out 1995, p. 557 – 584.
11. Luna, V. A., King, D. S., Gullledge, J., Cannons, A. C., Amuso, P. T., Cattani, J. – Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititre® automated microbroth dilution and Etest® Agar gradient diffusion methods. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60, 2007, p. 555 – 567.
12. Brdford, P. A. – Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. Clinical Microbiology Reviews, vol. 14, n. 4, Out. 2001, p. 933–951.
13. Junior, M. A. S., Ferreira, E. S., Conceição, G. C. – Beta-lactamases de Espectro Ampliado (ESBL): Um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. NewsLab, Ed. 63, 2004, p. 152 – 164.
14. Shida, O., Takagi, H., Kiyoshi, K., Komagata, K. – Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, Spencers Wood, v. 46, n.4, 1996, p. 939 – 946.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2007.
16. PICÃO, R.C.; GALES, A.C. β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação? Prática Hospitalar, n.49, 2007, p. 79-84.

17. Blumer, J. L. – Meropenem: evaluation of a new generation carbapenem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 8, 1997, p. 73 – 92.
18. Geiss, H. K., Beck, G. – Comparative in vitro activity of meropenem versus other routinely used antimicrobials against 18632 aerobic bacteria tested in 92 German centers. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 10, 1998, p. 237 – 243.
19. Orlicek, S. L. – Aztreonam. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, v. 10, Ab 1, Jan 1999, p. 45-50
20. Quinn, J. P., Miyashiro, D., Sahm, D., Flamm, R., Bush, K. – Novel plasmid-mediated β -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 33, n. 9, Set. 1989, p. 1451-1456.
21. Bradford, P. A., Cherubin, C. E., Idemyour, V., Rasmussen, B. A., Bush, K. – Multiply resistance *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago Hospitals: identification of the Extended-Spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime hydrolyzing β -lactamases in a single isolated. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, n. 4, Apr. 1994, p. 761 – 766.
22. Claris, C. C., Sirot, D., Bret, L., Chatron, P., Labia, R., Sirot, J. – Novel Extended-Spectrum TEM-type β -lactamase from an *Escherichia coli* isolate resistant to ceftazidime and susceptible to cephalothin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, n 3, Mar 1997, p. 715 – 716.
23. Weber, D. A., Sanders, C. C., Bakken, J. S., Quinn, J. P. - A novel chromosomal TEM derivative and alterations in outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 162, 1990, p. 460 – 465.

24. Peterson, D. L., Bonomo, R. A. – Extended-Spectrum β -lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, n. 4, Oct. 2005, p. 657 – 686.

25. Marshall, C. G., Lessard, I. A. D., Wright, G. D. – Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, v. 42, n. 9, set 1998, p. 2215 – 2220.

ANEXO I:

Tabela 1: Comparação dos resultados obtidos frente aos antimicrobianos com os isolados do solo e água

Antibiótico	Número de isolados (%)					
	Resistentes		Intermediários		Sensíveis	
	Água	Solo	Água	Solo	Água	Solo
Amoxicilina + ác. clavulânico	5 (15,15)	4 (14,29)	0 (0)	0 (0)	28 (84,85)	24 (85,71)
Aztreonam	33 (100)	26 (92,86)	0 (0)	1 (3,57)	0 (0)	1 (3,57)
Cefotaxima	8 (24,24)	7 (25)	18 (54,55)	14 (50)	7 (21,21)	7 (25)
Ceftazidima	26 (78,79)	26 (92,86)	4 (12,12)	2 (7,14)	3 (9,09)	0 (0)
Ceftriaxona	6 (18,18)	4 (14,29)	11 (33,33)	7 (25)	16 (48,48)	17 (60,71)
Meropenem	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	33 (100)	28 (100)
Piperacilina-tazobactam	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	33 (100)	28 (100)
Teicoplanina	0 (0)	0 (0)	1 (3,03)	0 (0)	32 (96,97)	28 (100)
Vancomicina	0 (0)	0 (0)	2 (6,06)	0 (0)	31 (93,94)	28 (100)

ANEXO II:

Figura 1: Resultado positivo no ensaio de disco-difusão de aproximação para detecção de β -lactamases de espectro estendido, utilizando os antimicrobianos aztreonam (ATM), amoxicilina + ác. clavulânico (AMC), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CRO) e ceftriaxona (CTX).



ANEXO III:

Normas para publicação:

PREPARATION OF A MANUSCRIPT

The manuscript should be submitted as one single PDF file. This single file should include: the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For research papers, the PDF file should contain:

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract (up to 250 words)
- Three to five key-words
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgements (optional)
- References

For short communications, the PDF file should contain:

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract (up to 50 words)
- Three to five key-words

- Text not divided in topics
- Acknowledgements (optional)
- References

For mini-reviews, the PDF file should contain:

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract (up to 250 words)
- Three to five key-words
- Text
- Acknowledgements (optional)
- References

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission.

Manuscripts written in poor English will not be accepted.

Research papers and mini-reviews consist of 20 pages, including references, tables and figures.

Short Communications should be restricted to 10 pages. Figures and tables should be restricted to a maximum of two figures or two tables, or one table and one figure.

Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission (Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections) and the units are to be used according to SI (International Systems of Units).

The lines in each page of the manuscript should be numbered too.

As a rule, the references in the text should be cited by their numbers. When authors are mentioned in the text, the mention should be done according to the following examples: Bergdoll (number) reported that..., Bailey and Cox (number) observed that..., or Smith et al. (number) mentioned that...Do not use capital letters.

Authors may need, or wish, to use professional language editing services to improve papers in English and, therefore, overall quality. This assistance is suggested either before an article is submitted for peer review or before it is accepted for publication.

Non-native English speakers and international authors who would like assistance with their writing, may likely consider the following options:

- American Journal Experts:

<http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>">English editing service

- Joanne Roberts: joroberts@uol.com.br
- ATO Traduções: www.atotraining.com.br
- Prof. Dr. Laudénir Maria Prioli: lprioli@uol.com.br
- Evanir Brunelli: ive.brunelli@gmail.com

ORGANIZATION

The Title should be as brief as possible, contain no abbreviations and be truly indicative of the subject of the paper.

Expressions like “Effects of”, “Influence of”, “Study on”, etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems.

The Abstract should summarize the basic content of the paper. The abstract should be

meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper.

The Introduction should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

The Materials and Methods section should provide enough information for other investigators to repeat the work.

Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

The Results section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments. If a Discussion section is to be included, avoid extensive interpretation of results but do so in the Discussion section. If Results and Discussion are combined, then results should be discussed where, in the text, is the more appropriate. Tables and figures should be numbered using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text.

The approximate location of tables and figures in the text should be indicated.

The Discussion section should discuss the results in relation to the literature cited.

The References should be numbered consecutively and in alphabetical order, by last name of the first author. All authors must be cited. References should be cited in the text by their numbers, with a space between the number of the references (3, 7, 22).

Journal names should be abbreviated according to the style of BIOSIS. All references given in the list should be cited in the text and all references mentioned in the text should be included in the list.

Examples:

a. Journal article

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S.; Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

b. Paper or chapter in a book

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003). Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

c. Book

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology – an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

d. Patent

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. Thesis and Dissertations

Santos, M.V.B. (2005). O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Communications in events (Symposia, Conferences, etc)

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. Publication in the web

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. BMC Biochemistry. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of Salmonella Infection.

Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

References citing “personal communication” or “unpublished data” are discouraged, although it is recognized that sometimes they must be used. In these cases, they should be cited in the text and not in the list of references. References consisting of papers that are “accepted for publication” or “in press” are acceptable. However, references of papers that are “submitted” or “in preparation” are not acceptable.

ACKNOWLEDGMENTS: This section is optional. It acknowledges financial and personal assistance.

TABLES: Each table must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be concise with columns and rows of data carefully centered below them.

FIGURES: Each figure must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom.

PHOTOGRAPHS: Photoprints should be of sufficient quality to ensure good reproduction (at least 150dpi).