

Samuel de Alcântara Silva Júnior¹
Letícia Baraúna¹
Geiza Almeida Louredo dos Santos¹
Elaine Pagung²
Pascua Leonardi Carvalho³
Sigrid Costa Valbão Freire¹
Rodrigo Moraes¹
Rodrigo Pratte Santos¹

Resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa* from surface water and hospital sewage: test of antimicrobial sensitivity and detection of metallo- β -lactamase

| Perfil de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de água superficial e efluente hospitalar: teste de sensibilidade a antimicrobianos e detecção de metallo- β -lactamase

ABSTRACT | Introduction: *Closely linked to a number of nosocomial infections, Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa) causes a range of diseases of high mortality rates. P. aeruginosa is a very ubiquitous microorganism, found even in disinfectants dumped into hospital sewers. Overwhelmed sewers release sewage into rivers and streams and may contaminate drinking water. The Jucu River accounts for 70 % of water supply of the Greater Vitória and 42 % of the total population of the state of Espírito Santo. Objective:* This study aimed to evaluate the susceptibility profile of samples collected from hospital sewage and surface water, by isolating *P. aeruginosa*. **Methods:** Two samples were collected at five sampling points: 1 – upstream from hospital effluent discharge, 2 - water tank from the hospital, 3 - hospital effluents, 4 - treated hospital effluents, 5 - downstream from the hospital effluent discharge, totaling ten samples. Physicochemical parameters (dissolved oxygen, hydrogen potential and turbidity) were analyzed. Automated tests were undertaken for identification and antimicrobial susceptibility, and phenotypic detection of metallo- β -lactamase (MBLs). **Results:** Collection points 3 and 4 presented higher turbidity and lower levels of dissolved oxygen, suggesting the presence of debris in suspension and intense process of decomposition of organic matter. Multidrug-resistant strains were found in the points 3 and 4 of the second collection. Points 1, 3 and 4 were MBL positive. **Conclusion:** These findings further strengthens the hypothesis that environments under strong selective pressure promote the emergence of resistance genes.

Keywords | Surface Waters. *Pseudomonas aeruginosa*. Drug Resistance, Multiple.

RESUMO | Introdução: Posicionando-se entre as principais bactérias causadoras de infecções hospitalares, a *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) é um patógeno oportunista, podendo estar presente em soluções desinfetantes que, de forma inevitável, são lançadas no esgoto hospitalar e, se não eliminadas durante o tratamento do esgoto, se incorporam ao ambiente aquático e alcançam, a água potável. O Rio Jucu é o principal manancial de abastecimento de água da Grande Vitória por representar 70% do atendimento dessa região que concentra 42% da população total do estado do Espírito Santo. **Objetivo:** O presente estudo buscou avaliar o perfil de susceptibilidade entre amostras de efluente hospitalar e água superficial através do isolamento de *P. aeruginosa*. **Métodos:** Foram realizadas duas coletas em cinco pontos de amostragem: 1 - na montante do descarte do efluente hospitalar; 2 - na caixa d'água do hospital; 3 - no efluente hospitalar; 4 - no efluente hospitalar tratado; 5 - na jusante do descarte do efluente hospitalar. Foram analisados parâmetros físico-químicos (oxigênio dissolvido, potencial hidrogeniônico e turbidez). Realizaram-se testes automatizados de identificação e susceptibilidade a antimicrobianos e detecção fenotípica de metallo- β -lactamase (MBLs). **Resultados:** Os valores dos parâmetros físico-químicos mostraram que os pontos de coleta 3 e 4 apresentaram maior turbidez e menores teores de OD, sugerindo a presença de detritos em suspensão e intenso processo de decomposição da matéria orgânica. Cepas multirresistentes foram encontradas nos pontos 3 e 4 da segunda coleta. As análises de MBLs mostraram positividade para os pontos 1, 3 e 4. **Conclusão:** Ambientes submetidos a forte pressão seletiva induzem o aparecimento de genes de resistência, os quais poderão ser transferidos para outras bactérias de mesma espécie, indicando que essas, se lançadas em ambientes aquáticos, se tornam um problema de saúde pública.

Palavras-chave | Águas de superfície; *Pseudomonas aeruginosa*; Resistência a Múltiplos Medicamentos.

¹Faculdade Pio XII, Cariacica, ES

²Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES

³Laboratório Tommasi de Análises Clínicas, Vitória, ES

INTRODUÇÃO |

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) é frequentemente associada a infecções hospitalares e acomete principalmente pacientes imunossuprimidos. Esta espécie bacteriana tem sido considerada um patógeno humano oportunista¹, que pode causar infecções nosocomiais graves e letais². É um bacilo Gram-negativo e apresenta em seu espaço periplásmico enzimas denominadas β-lactamases, que degradam as penicilinas e outras drogas β-lactâmicas³.

Essa espécie bacteriana se posiciona entre as principais bactérias causadoras de infecções hospitalares⁴. Observações de isolamentos de *P. aeruginosa* que apresentam um amplo espectro de resistência têm sido frequentes. Exibem principalmente baixa sensibilidade a diferentes classes de agentes antimicrobianos, inclusive cefalosporinas de terceira e quarta gerações e carbapenêmicos (como imipeném e meropeném)⁵⁻⁸.

Dentre os principais microrganismos recuperados de efluentes hospitalares, a *P. aeruginosa* é responsável por infecções em diversos sítios do corpo humano, particularmente em pacientes imunocomprometidos. Está amplamente distribuída no ambiente e tem sido capaz de persistir por longos períodos em ambientes adversos por desenvolver resistência a agentes antimicrobianos⁴.

A resistência cruzada a antimicrobianos é uma das características marcantes e preocupantes dessa espécie. Trata-se da presença de múltiplos mecanismos de resistência presentes num único hospedeiro que resiste a diversos fármacos⁹. Alguns exemplos desses mecanismos têm sido identificados em *P. aeruginosa*, como a hiperexpressão de bombas de efluxo, a perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa¹⁰, a resistência aos β-lactâmicos – decorrente da produção de β-lactamases, que são enzimas que catalisam a hidrólise do anel β-lactâmico, impossibilitando, assim, a atividade antimicrobiana. Qualquer antimicrobiano do grupo dos β-lactâmicos pode ser inativado por essas enzimas¹¹. É relevante destacar que quando esses mecanismos de resistência são detectados num isolamento de *P. aeruginosa*, o tratamento torna-se muito limitado, com poucas opções terapêuticas efetivas¹².

Estudos têm demonstrado que efluentes hospitalares apresentam níveis mais elevados de bactérias resistentes aos antimicrobianos do que efluentes derivados de outras fontes. A concentração de antimicrobianos na água que recebe o esgoto hospitalar também é superior, e, por essa razão, cria um ambiente com forte pressão seletiva.

Além disso, as precárias condições de saneamento básico e a falta de tratamento dos efluentes hospitalares podem estabelecer rotas de disseminação das principais espécies de bactérias que vêm desenvolvendo alto grau de resistência a antimicrobianos, como é o caso da *P. aeruginosa*^{5,7,13}.

Um importante aspecto relacionado aos principais rios brasileiros – principais fontes de água para abastecimento – é a carga de poluentes recebida de seus afluentes, principalmente os que atravessam perímetros urbanos¹⁴. O Rio Jucu, que em sua totalidade pertence ao estado do Espírito Santo, é responsável pelo abastecimento hídrico da região da Grande Vitória, que abriga quase 50% da população do estado do Espírito Santo. Por essas razões, as infecções causadas por cepas de *P. aeruginosa* multiresistentes estabelecem um substancial desafio para a terapia antimicrobiana e trazem ao cenário atual a necessidade de identificar essas bactérias no efluente hospitalar e avaliar – por meio de amostras de água superficial – a contribuição delas para a disseminação da resistência⁵. Este estudo propõe-se – por meio do teste de sensibilidade aos antimicrobianos e da detecção de metalo-β-lactamase (MBL) – a avaliar o perfil de resistência de *P. aeruginosa* provenientes de água superficial e de efluente hospitalar.

MÉTODOS |

Foi realizada pesquisa de campo com coletas em cinco pontos de amostragem nos meses de maio e junho do ano de 2013, totalizando as dez amostras descritas a seguir:

Ponto 1 – Montante do descarte do efluente hospitalar, localizado no Rio Jucu, bairro Caçaroca, no município de Cariacica, ES. Nesse local ocorre a captação de água do Rio Jucu para a ETA de Caçaroca (Figura 1).

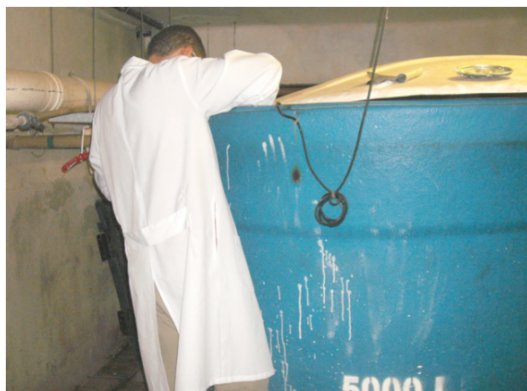
Figura 1 - Rio Jucu: Local de coleta (seta verde); Curso do rio (seta amarela); ETA de Caçaroca (seta vermelha)



Fonte: Google Maps, 2013.

Ponto 2 – Caixa d'água do hospital localizado em Vitória, Espírito Santo, e abastecido pela ETA de Caçaroca (Figura 2).

Figura 2 - Coleta em caixa d'água do hospital



Ponto 3 – Efluente hospitalar, onde todo esgoto do hospital é lançado (Figura 3).

Figura 3 - Coleta em efluente hospitalar



Ponto 4 – Efluente hospitalar tratado. O hospital estudado realiza tratamento anaeróbico do efluente antes de lançá-lo na rede de esgoto atendida pela Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Mulembá, localizada em Vitória, ES (Figura 4).

Ponto 5 – Jusante do descarte de efluente hospitalar, localizada no Canal da Passagem, onde é lançado o esgoto tratado pela ETE de Mulembá (Figura 5).

Coleta

Foram utilizadas as orientações do Manual técnico para coleta de amostra de água¹⁵.

Figura 4 - Coleta em efluente hospitalar tratado



Figura 5 - Canal da Passagem é local de coleta (seta verde); Curso do Canal (seta amarela); ETE de Mulembá (seta vermelha)



Fonte: Google Maps, 2013.

Análise das amostras

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Saneamento Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo (LABSAM/UFES), anexo ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, para filtração e análise físico-química.

Aliquotas de 100 ml foram filtradas em membranas de ésteres mistos de 0,45 μm de porosidade em circuito de filtração. Após as filtrações, a membrana foi depositada na superfície do meio de cultura com ágar cetrimide. As análises físico-químicas realizadas foram: turbidez, pH (potencial hidrogeniônico) e oxigênio dissolvido.

Isolamento bacteriano

Para o isolamento bacteriano foi utilizado ágar cetrimide – que consiste em um meio de isolamento seletivo para a identificação de *P. aeruginosa* e verificação da produção de pirocianina – distribuído em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, incubado a 35 ± 2 °C durante 24 horas após o inóculo.

Identificação fenotípica e teste de susceptibilidade e a antimicrobianos (TSA)

Após o crescimento das colônias suspeitas de *P. aeruginosa* em ágar cetrimide, foi realizado o teste fenotípico confirmatório em uma placa de cada amostra de coleta. Para isso, foi utilizado o equipamento MicroScan Walk-Away® 96SI do setor de microbiologia do Laboratório Tommasi de Análises Clínicas.

Além disso, por meio do mesmo aparelho, realizou-se o teste de susceptibilidade aos seguintes antimicrobianos: Amicacina 30 µg, Aztreonam 30 µg, Cefepime 30 µg, Cefotaxima 30 µg, Ceftazidima 30 µg, Ceftriaxona 30 µg, Ciprofloxacina 5 µg, Gentamicina 10 µg, Imipenem 10 µg, Levofloxacina 5 µg, Meropenem 10 µg, Piperaciclina/Tazobactam 110 µg, Ticarcilina/K Clavulanato 85 µg e Tobramicina 10 µg. Para o controle de qualidade do teste de susceptibilidade foi utilizada a cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (American Type Culture Collection) 27853.

Os isolados que apresentaram resistência a quatro ou mais classes diferentes de antimicrobianos foram considerados multirresistentes⁵.

Detecção fenotípica de metalo-β-lactamase (MBL)

As amostras de *P. aeruginosa* multirresistentes foram submetidas à avaliação da produção de metalo-β-lactamase através da

técnica de sinergismo com duplo disco¹⁶. A solução de EDTA foi o inibidor utilizado. Já os discos de Imipeném (10 µg) e Ceftazidima (30 µg) foram usados como indicadores. As amostras eram cultivadas em ágar cetrimide, por 24 horas, a 35 ± 2 °C. Em seguida, passaram a ser suspensas em solução salina 0,9% estéril até atingirem a turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland; depois eram semeadas em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton – meio de cultura utilizado para realização de teste de avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos – para obterem um crescimento conflúente. Os discos de antimicrobianos foram acrescentados nas placas a uma distância de 10 mm de um disco de papel-filtro esterilizados e embebidos com EDTA (100 mm). Após a incubação a 35 ± 2 °C, por 24 horas, as amostras que apresentaram distorção e ampliação do halo de inibição de crescimento da bactéria na região do ágar onde houve a difusão do agente quelante foram consideradas positivas. As amostras negativas não exibiam alteração no halo de inibição de crescimento. A cepa controle utilizada foi a *P. aeruginosa* ATCC 27853 (para controle negativo).

Análise estatística

Foram utilizadas frequência, média e desvio padrão, respectivamente, para a análise das variáveis categóricas e das variáveis contínuas presentes nos valores das análises físico-químicas.

RESULTADOS |

Para o resultado das análises físico-químicas, calculou-se a média e o desvio padrão dos valores das duas coletas, conforme a Tabela 1.

Em ambos os dias de coleta, houve presença de *P. aeruginosa* em quatro dos cinco pontos de coleta: no montante do descarte do efluente hospitalar (1), no efluente hospitalar

Tabela 1 - Resultados das análises físico-químicas (média desvio padrão). Vitória-ES, 2014

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
OD	6,9	5,7	4,3	0	2,9
pH	6,59	6,03	6,87	6,57	7,38
Turb.	33,35	1,11	91,3	118,5	7,12

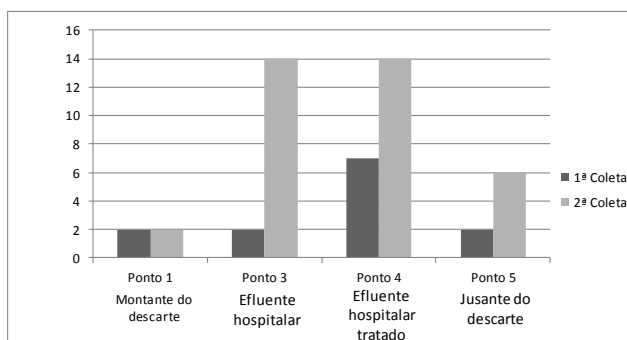
Ponto 1: Montante do descarte; **Ponto 2:** Caixa d'água; **Ponto 3:** Efluente hospitalar; **Ponto 4:** Efluente hospitalar tratado; **Ponto 5:** Jusante do descarte. **OD:** oxigênio dissolvido (mg/l); **pH:** potencial hidrogeniônico; **Turb:** turbidez (UNT).

(3), no efluente hospitalar tratado (4) e na jusante do descarte do efluente hospitalar (5).

Por apresentarem resistência a quatro ou mais classes de antimicrobianos, as cepas de *P. aeruginosa* isoladas dos pontos 3 e 4 da segunda coleta foram consideradas multirresistentes (Tabela 2). As demais cepas de *P. aeruginosa* dos outros pontos de coleta não apresentaram resistência múltipla às classes de antimicrobianos testadas.

O perfil de resistência de cada ponto de coleta está representado a seguir, no Gráfico 1, o qual indica a elevação desse perfil nos pontos 3 e 4 da segunda coleta.

Figura 1 - Gráfico demonstrando o perfil de resistência aos antimicrobianos em cada ponto de coleta, Vitória-ES, 2014



Por apresentarem distorção e ampliação no halo de inibição de crescimento da bactéria durante o teste de disco de aproximação, as cepas isoladas dos pontos 1 da primeira coleta e dos pontos 3 e 4 da segunda coleta foram consideradas positivas.

DISCUSSÃO |

Análise físico-química

Os valores obtidos pelas análises físico-químicas (pH, turbidez e OD) permitiram identificar as condições propícias e adversas para o crescimento e desenvolvimento de *P. aeruginosa* nos pontos de coleta.

O pH é uma grandeza que indica a intensidade de acidez¹⁷ (pH < 7,0), neutralidade (pH = 7,0) e alcalinidade (pH > 7,0). Verificou-se que os valores da Tabela 1 encontram-se em torno do neutro. No entanto, foram observadas diferenças entre os desvios padrões dos pontos de coleta. Vale ressaltar que os cinco pontos estão próximos do limite de valores estipulados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)¹⁸, o qual fixa os valores entre 6 e 9 para todas as classes de água doce. No entanto, o ponto 2 obteve um pH mais ácido devido à reatividade da água com

Tabela 2 - Resultado do Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (ISA) em cada ponto de coleta. Vitória-ES, 2014

Antimicrobianos	Ctrl*	1ª Coleta				2ª Coleta			
		Ponto 1	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 1	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Amicacina	S	S	S	S	S	S	R	R	S
Aztreonam	S	S	S	R	S	S	R	R	R
Cefepime	S	S	S	R	S	S	R	R	S
Cefotaxima	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftazidima	S	S	S	R	S	S	R	R	R
Ceftriaxona	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	S	R	R	S
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	R	R	S
Imipenem	S	S	S	S	S	S	R	R	S
Levofloxacina	S	S	S	S	S	S	R	R	S
Meropenem	S	S	S	S	S	S	R	R	S
Piperacilina/Tazobactam	S	S	S	R	S	S	R	R	R
Ticarcilina/K Clavulanato	S	S	S	R	S	S	R	R	R
Tobramicina	S	S	S	S	S	S	R	R	S

Ponto 1: Montante do descarte; Ponto 3: Efluente hospitalar; Ponto 4: Efluente hospitalar tratado; Ponto 5: Jusante do descarte. R (resistente); S (sensível). *Controle.

o cloro proveniente do tratamento realizado pela ETE. Isso retarda o aumento do pH¹⁹ e contribui para a inativação de organismos patogênicos, justificando a ausência de crescimento bacteriano.

A turbidez consiste na medida indireta de quantidade de sólidos em suspensão para obter a dispersão da luz na água. O limite máximo de turbidez é de 100 Unidades Nefelométricas de Turbidez (UNT)¹⁸. Ao observar a Tabela 1, nota-se que os 3^o e 4^o pontos de coleta apresentaram maior turbidez e menores teores de OD, sugerindo a presença de detritos em suspensão e um intenso processo de decomposição da matéria orgânica.

Usualmente, efluentes sanitários não apresentam oxigênio dissolvido²⁰. Porém, como os reatores para tratamento anaeróbio estão localizados nas proximidades do efluente hospitalar (ponto 3), é provável que não tenha havido tempo hábil para os microrganismos utilizarem o oxigênio para a degradação do material orgânico, o que explica os valores de OD no ponto 3.

O crescimento bacteriano encontrado no ponto 4, mesmo sem a presença de OD, pode ser explicado pelo fluxo contínuo de recebimento de efluente nesse ponto, fazendo com que a bactéria não permaneça em ambiente anaeróbio durante longo período de tempo.

Teste de susceptibilidade a antimicrobianos e detecção de MBLs

Observou-se a presença de resistência em todos os pontos de coleta aos antimicrobianos Cefotaxima e Ceftriaxona. Mas esse fato já era esperado, visto que a *P. aeruginosa* tem apresentado perfil de resistência a esses antibióticos por causa, provavelmente, de mecanismos intrínsecos, como a destruição enzimática do anel β-lactâmico por enzimas β-lactamases – principal mecanismo de resistência às cefalosporinas²¹.

Os isolados do ponto 1 apresentaram o mesmo perfil de susceptibilidade nas duas coletas. Entretanto, nos testes de identificação fenotípica de MBLs, apenas o isolado do ponto 1 da primeira coleta se mostrou positivo, demonstrando mecanismo de resistência adquirida. Esse fato pode ser explicado pela presença de indústrias e esgoto doméstico, por exemplo, que possibilitam a proliferação de bactérias e suas enzimas.

Nas amostras de ambiente hospitalar, foram observados, na primeira coleta, isolados resistentes a cefens de 3^a geração no ponto 3 e a cefens de 3^a e 4^a gerações, monobactâmicos e β-lactâmicos + inibidores de β-lactamases no ponto 4. Contudo, na segunda coleta, em ambos os pontos, verificou-se a presença de resistência a todos os antimicrobianos testados e positividade para o teste fenotípico de MBLs.

Esse perfil de resistência pode ser justificado pela elevada quantidade de antimicrobianos utilizados e descartados no ambiente hospitalar e pela rotatividade de cepas nesse ambiente. Isso permite crer que a origem dos isolados resistentes e multirresistentes em esgoto hospitalar seja o próprio hospital.

A presença de isolados multirresistentes no ponto 4 da segunda coleta sugere seletividade, visto que esse ponto recebeu tratamento anaeróbio no hospital em estudo.

Com os resultados obtidos através do TSA, verificou-se diferenças entre o perfil de resistência das duas coletas do ponto 5, que indica a presença de cepas com características distintas. Não é possível afirmar que tais cepas são advindas de ambiente hospitalar, visto que a contaminação por cepas não é proveniente apenas da ETE. O lugar recebe esgoto doméstico e influência ambiental também. Por isso, é possível perceber que os isolados encontrados na segunda coleta se mostraram resistentes a uma quantidade maior de antimicrobianos quando comparados com a primeira.

Esse dado é preocupante, pois a presença de tais microrganismos pode fortalecer, em nível ambiental, a disseminação de genes de resistência e o estabelecimento de focos de contaminação, trazendo prejuízos à saúde humana. Vale ressaltar que, o descarte de esgoto não tratado se torna um problema de saúde pública, pois a contaminação por tais patógenos pode influenciar o uso de drogas β-lactâmicas no controle de doenças infecciosas⁵.

Uma vez que as MBLs têm a capacidade de hidrolisar uma grande variedade de agentes β-lactâmicos de amplo espectro, as linhagens produtoras de MBLs demonstram resistência a múltiplos agentes β-lactâmicos²², o que pode ser observado no presente estudo. Por isso a produção de MBLs tem um papel importante no perfil de susceptibilidade de *P. aeruginosa*.

Vários estudos têm sido realizados com o propósito de desenvolver um método prático, viável economicamente e que facilite a detecção de MBLs na rotina laboratorial²³⁻²⁶.

Os métodos de tipagem são fundamentais para o entendimento da epidemiologia das infecções, pois estabelecem o grau de similaridade entre diferentes isolados clínicos e, assim, auxiliam a detecção de surtos, a identificação de transmissão cruzada e das fontes de infecção e o monitoramento e controle da infecção hospitalar⁴. De um modo geral e especificamente para *P. aeruginosa*, os métodos fenotípicos são menos adequados na tipagem bacteriana devido à capacidade que possuem de expressar características diferentes mesmo quando se trata de um único clone. Logo, os métodos genotípicos são melhores porque apresentam maior poder discriminatório²⁷.

CONCLUSÃO |

O atributo ubiqüitário da *P. aeruginosa* facilita o contato com antimicrobianos de diversas classes. Porém esse fato é preocupante, uma vez que genes de resistência podem ser disseminados, lançados em esgoto hospitalar e, conseqüentemente, alcançar corpos d'água, trazendo riscos de contaminação à população e tornando necessário o uso de antimicrobianos β-lactâmicos.

A constatação de isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes apenas em ambiente hospitalar sugere eficácia no tratamento realizado pelas estações de tratamento de água e esgoto, visto que os isolados encontrados em ambiente hospitalar não apresentaram os mesmos perfis de resistência dos isolados encontrados no corpo receptor. Os resultados positivos para produção de MBLs confirmam a ideia de que ambientes que sofrem forte pressão seletiva induzem o aparecimento de genes de resistência, os quais, conseqüentemente, poderão ser transferidos para outras bactérias de mesma espécie. Esse achado se torna um problema de saúde pública principalmente para o estado do Espírito Santo, pois atualmente não existem outros estudos relacionados à produção de MBLs em cepas de *P. aeruginosa*.

Desse modo, estudos relacionados à caracterização molecular de genes de resistência cepas de *P. aeruginosa* se fazem necessários para revelar se existe ou não relação genética entre os isolados resistentes recuperados das amostras de água superficial e os isolados de efluente hospitalar, para indicar possíveis rotas de contaminação no ambiente.

REFERÊNCIAS |

1. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of Pseudomonas aeruginosa Infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes infect.* 2000; 2(9):1051-60.
2. Pellegrino FL, Teixeira LM, Carvalho MGS, Nouér AS, Oliveira MP, Sampaio JLM, et al. Occurrence of a multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(7):2420-4.
3. Levinson W, Jawetz E. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
4. Sader HS, Gales AC, Pffaler MA, Mender RE, Zoccoli C, Barth A, et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J. Infect. Dis.* 2001; 5(4):200-14.
5. Fuentefria DB, Ferreira AE, Graf T, Corcao G. Pseudomonas aeruginosa: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 4(5):470-3.
6. Li XZ, Barre N, Poole K. Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in Pseudomonas aeruginosa. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46(6):885-93.
7. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: our worst nightmare? *CID.* 2002; 34(5):634-40.
8. Masuda N, Ohya S. Cross-resistance to meropenem, cepheims, and quinolones in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(9):1847-51.
9. McGowan JE Jr - Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am. J. Infect. Control.* 2006; (6 Suppl 1):S29-S36.
10. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: Our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* 2002; 34(5):539-48.
11. Mortari AP, Saucedo EM, Pereira RS, Duarte M, Vizzotto BS, Santos RCV. Prevalência de Pseudomonas aeruginosa

produtoras de β-lactamases do tipo AMP-C em isolados clínicos de Santa Maria – RS. RBAC. 2008; 40(2):147-9.

12. Picoli, SU. Metalo-β-lactamase e Pseudomonas aeruginosa. RBAC. 2008; 40(4):273-7.

13. Baquero F. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. Nature Rev Microbiol. 2004; 2(6):510-8.

14. Madruga FV, Reis FAGV, Giordano LC. Avaliação da influência do córrego dos Macacos, na qualidade da água do rio Mogi Guaçu, no município de Mogi Guaçu - SP. Engenharia Ambiental. 2008; 5(2):152-68.

15. Ministério Público de Santa Catarina (MPSC). Manual técnico para coleta de amostras de água. Florianópolis: MPSC; 2009.

16. Mendes RE, Castanheira M, Pignatari ACC, Gales AC. Metalo-β-lactamases. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2006; 42(2):103-13.

17. Piveli, RP, Kato MT. Qualidade das águas e poluição: aspectos físico-químicos. 1 ed. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2005; p.285.

18. Resolução Conama nº 357/2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União; 2005; p. 58-63.

19. Meyer ST. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. Cad Saúde Públ. 1994; 10(1):99-110.

20. Silveira WB. Produção de etanol em permeado de queijo por kluyveromyces marxianus. 2004. UFV- 3. [Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2004.

21. Dias RCS, Borges Neto AA, Ferraiuoli GID, Oliveira MP, Riley LW, Moreira BM. Prevalence of Amp C and other beta-lactamases in enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 60(1):79-87.

22. Shibata N. PCR Typing of genetics determinats for metallo-b-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the Class 3 Integron. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(12):5407-13.

23. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient test for screening metallo-β-lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. J. Clin. Microbiol. 2000; 38(1):40-43.

24. Chu YW, Cheung TK, Ngan JYW, Kam KM. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo-β-lactamase in Pseudomonas aeruginosa by Etest and an imipinem-EDTA disk method. Internat J Antimicrob Agents. 2005; 26(4):340-1.

25. Dong F, Xu X, Song W, Lu P, Yu S, Yang Y, et al. Characterization of multidrug-resistance and metallo-beta-lactamase-proucing Pseudomonas aeruginosa isolates from a paediatric clinic in China. Chines Medic J. 2008; 121(17):340-1.

26. Gupta V. Metallo beta lactamase in Pseudomonas aeruginosa and acinetobacter species. Expert Opin Investing Drugs. 2008; 17(2):131-43.

27. The International Pseudomonas aeruginosa Typing Study Group. A multicenter comparison of methods for typing strains of Pseudomonas aeruginosa predominantly from patients with cystic fibrosis. J Infect Dis. 1994; 169(1):134-42.

Correspondência para/ Reprint request to:

À coordenação do curso de Biomedicina

Rua Bolívar de Abreu, 48

Campo Grande, Cariacica - ES, Brasil

CEP 29146-330

Tel.: (27) 3421.2563

E-mail: coord.biomedicina@pioxxi-es.com.br

Submetido em: 08/06/2014

Aceito em: 03/10/2014