JORGE ISAAC GARCIA PAEZ

**Caracterização de mecanismos de resistência as
quinolonas e sulfametoxazol/trimetoprima de isolados
clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Dra Silvia Figueiredo Costa

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Paez, Jorge Isaac Garcia

Caracterização de mecanismos de resistência as quinolonas e
sulfametoxazol/trimetoprima de isolados clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia* /
Jorge Isaac Garcia Paez. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Silvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.*Stenotrophomonas maltophilia* 2.Infecções bacterianas
3.Resistência a trimetoprima 4.Sulfametoxazol 5.Fatores de resistência
6.Quinolonas

USP/FM/DBD-301/11

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmãos, na distancia sempre juntos.

A minhas meninas lindas Gabriela e Clara.

A minha luz e inspiração Lorena.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Silvia Figueiredo Costa, pela paciência, apoio e orientação exemplar.

A Juliana Ferraz Rosa, pela dedicação a este projeto.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Investigação Médica (LIM-54) da FMUSP, Inneke van der Heijden , Liang Fung , Anna Mostachio , Mauro Giudice, Andréia Alcaia, Camila Risek , Anne Vasquez, Ana Paula Marchi, Maria Cursino, Denise Rodrigues, Gabriela Ferreira, Jessika Zerbini, Camila Campi, Bruno Stuart.

A Monica Pavez do Laboratório de microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

A Dr. Antonio Nicodemo, Dr. Antonio Pignatari e Dr. Nilton Lincopan pela colaboração e sugestões propostas na qualificação.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia Freddi, Maria F. Crestana, et al 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1	Taxonomia	5
2.2	Microbiologia	5
2.3	Epidemiologia.....	6
2.4	Infecções causadas por <i>S. maltophilia</i>	8
2.5	Sensibilidade.....	9
2.6	Tratamento.....	14
2.7	Sinergismo	21
2.8	Mecanismos de resistência da <i>S. maltophilia</i>	23
2.9	Justificativa.....	31
3	OBJETIVOS.....	32
4	MÉTODOS	34
4.1	Local.....	35
4.2	Amostras bacterianas.....	35
4.3	Teste de Sensibilidade	36
4.4	Teste fenotípico para avaliação de efluxo	39
4.5	Caracterização de genes de resistência	40
4.6.	Avaliação do Integron.....	43
4.7	Sequenciamento	44
4.8	Transferencia plasmidial por choque térmico.....	44
4.9	Tipagem molecular – Protocolo para caracterização molecular por eletroforese de campo pulsado (PFGE).....	47

5	RESULTADOS	51
5.1	Identificação das cepas de <i>S. maltophilia</i>	52
5.2	Dados demograficos	54
5.3	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	55
5.4	Teste de sensibilidade com inibidores de bomba de efluxo	60
5.5	Reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção dos genes de resistência ao sulfametoxazol/ trimetoprima	61
5.6	Sequenciamento dos genes relacionados à resistência para SMX/TMP	62
5.7	Análise dos elementos genéticos móveis.....	64
5.8	Reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção dos genes de resistência as quinolonas	66
5.9	Avaliação de mutações genéticas de genes relacionados à resistência as quinolonas	67
5.10	Avaliação da sequencia genética dos genes <i>qnr</i>	72
5.11	Avaliação da sequencia genética dos genes da enzima N-acetil transferase <i>aac(6')-ib-cr</i>	83
5.12	Avaliação da sequencia genética dos genes <i>smeD</i> e <i>smeT</i>	87
5.13	Análise plasmidial de amostra positiva para o gene <i>aaac(6')-ib-cr</i> ..	87
5.14	Análise da clonalidade dos isolados resistentes ao sulfametoxazol/trimetoprima	88
5.15	Análise da clonalidade dos isolados resistentes ao levofloxacino....	90
6	DISCUSSÃO.....	92
7	CONCLUSÕES.....	105
8	REFERÊNCIAS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de PCR para detecção do gene <i>iscr2</i> em isolados resistentes a SMX/TMP de <i>S. maltophilia</i>	62
Figura 2. Representação esquemática da sequência <i>iscr2</i> e genes adjacentes de uma amostra positiva para o gene <i>sul2</i> de <i>S. maltophilia</i>	64
Figura 3. Representação esquemática do integron classe 1 em amostra de <i>S. maltophilia</i> resistente a SMX/TMP com CIM de >125 µg/mL.....	65
Figura 4. Representação esquemática do integron classe 1 em amostra de <i>S. maltophilia</i> resistente a SMX/TMP com CIM de 8 µg/mL.....	65
Figura 5. Reação de PCR para detecção do gene <i>smeT</i> em isolados de <i>S. maltophilia</i> resistentes ao levofloxacino.....	66
Figura 6. Reação de PCR para detecção do gene <i>smeT</i> em isolados resistentes a levofloxacino de <i>S. maltophilia</i>	88
Figura 7. Representação do perfil de clonalidade obtido a partir do método de PFGE com a enzima <i>SpeI</i> , de 13 amostras positivas para o gene <i>sul1</i> de <i>S. maltophilia</i> com resistência a sulfametoxazol/trimetoprima.	89
Figura 8. Representação do perfil de clonalidade obtido a partir do método de PFGE com a enzima <i>SpeI</i> , de 18 amostras de <i>S. maltophilia</i> com resistência ao levofloxacino	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estudos de sensibilidade utilizando a metodologia de microdiluição em caldo.	12
Tabela 2.	Estudos de sensibilidade utilizando a metodologia de microdiluição em Agar.	13
Tabela 3.	Oligonucleotídeos iniciadores	42
Tabela 4.	Oligonucleotídeos iniciadores para determinação da posição do gene <i>su1</i> no integron de classe 1	43
Tabela 5.	Critérios interpretativos para análise de tipagem molecular	50
Tabela 6.	Distribuição dos 106 isolados de <i>S. maltophilia</i> por sítio de isolamento	53
Tabela 7.	Distribuição das infecções por <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ..	54
Tabela 8.	Diagnóstico de base dos pacientes com infecção por <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	54
Tabela 9.	Sensibilidade de oito antimicrobianos pelo método de microdiluição de 106 isolados de <i>S. maltophilia</i>	55
Tabela 10.	Concentrações inibitórias mínimas (CIM ₅₀ e CIM ₉₀) pelo método de microdiluição de 106 isolados de <i>S. maltophilia</i>	55
Tabela 11.	Características das 23 amostras resistentes a SMX/TMP	57
Tabela 12.	Perfil de resistência das 23 amostras de <i>S. maltophilia</i> resistentes a SMX/TMP	58
Tabela 13.	Características das 19 amostras resistentes ao levofloxacino ...	59
Tabela 14.	Concentração inibitória mínima (CIM) com a presença ou ausência dos inibidores de efluxo reserpina e CCCP em amostras sensíveis ou resistentes a levofloxacino.	60
Tabela 15.	Avaliação das sequências genéticas da girase A em 17 amostras de <i>S. maltophilia</i>	72
Tabela 16.	Avaliação das sequências genéticas dos genes <i>qnr</i> de 13 amostras de <i>S. maltophilia</i>	82

RESUMO

Paez JI. *Caracterização de mecanismos de resistência as quinolonas e sulfametoxazol/trimetoprima em isolados clínicos de Stenotrophomonas maltophilia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 121p.

Stenotrophomonas maltophilia é um bacilo Gram-negativo, não fermentador, considerado um microorganismo pouco virulento, relacionado principalmente a infecções associadas à assistência a saúde. A *S. maltophilia* apresenta um padrão de resistência intrínseca à maioria das classes de antibióticos. A droga de escolha para o tratamento das infecções por *S. maltophilia* é a sulfametoxazol/ trimetoprima (SMX/TMP). Entretanto, estudos atuais relatam o aumento da resistência a esse antibiótico, o que limita assim as opções para terapia efetiva. Outras opções de tratamento são o levofloxacino e a tigeciclina, porém, faltam estudos clínicos e *in vitro* dessas drogas. A proposta deste estudo foi avaliar os possíveis mecanismos de resistência a SMX/TMP e as quinolonas em isolados clínicos de pacientes internados no Instituto Central do Hospital das Clínicas e do Hospital A.C. Camargo. Foram avaliadas 106 amostras de *S. maltophilia* isoladas de pacientes adultos com infecção relacionada à assistência a saúde, internados no Instituto Central do Hospital das Clínicas da FMUSP e no Hospital de Câncer A.C Camargo durante o período de dezembro de 2008 a dezembro de 2010. A sensibilidade à SMX/TMP foi de 78,3%, para levofloxacino de 82% e 14,2% para ciprofloxacino, para minociclina de 100% e tigeciclina 91,6%. Foi realizado PCR para detecção dos genes *sul1*, *sul2* e *dfrA1* para avaliar a resistência à SMX/TMP, os genes *int1* e *iscr2* para avaliação da presença de elementos genéticos móveis e os genes *gyrA*, *qnr*, *smeD*, *smeT* e *aac(6')-Ib-cr* para avaliação da resistência as quinolonas. Quatorze amostras (13,2%) foram positivas para o gene *sul1*. Desses isolados, nove amostras apresentavam resistência ao SMX/TMP com CIM₅₀ de 8 µg/mL e CIM₉₀ de 128 µg/mL. Cinco amostras positivas para o gene *sul1* foram sensíveis a SMX/TMP com CIM₅₀ de 1 µg/mL e CIM₉₀ de 1 µg/mL. A sequência do integron1 da amostra com CIM >125 µg/mL mostrou um tamanho aproximado de 4000 pb contendo os genes cassetes *aac4* e *aadA1* e a região *qac/sul1*. Uma amostra resistente a SMX/TMP foi positiva para o gene *sul2* localizado na transposase-like ISCR 2. Observamos a presença de quatro novos *qnr* em cepas de *S. maltophilia* e a presença da enzima *aac(6')-Ib-cr* em 4 amostras. 100% das cepas foram positivas para o gene do sistema de efluxo *smeDEF* e 12/38 amostras tiveram o gene *smeT* do sistema de efluxo *smeDEF*, porém não foi observada mutação nesse gene. Na sequência de aminoácidos da girase A de 15 amostras resistentes a levofloxacino não observamos mutações relacionadas à resistência a quinolonas. As cepas resistentes a SMX/TMP apresentaram um padrão policlonal. Dezoito amostras resistentes ao levofloxacino apresentaram 14 perfis clonais, distribuídos em 10 *clusters*. *S. maltophilia* exibe múltiplos mecanismos de resistência, nesse estudo observamos um grande número de cepas com elementos genéticos móveis carregando o gene *sul1* e outros

genes de resistência. A *S. maltophilia* pode ser um importante reservatório de transmissão de genes de resistência.

Descritores: 1.*Stenotrophomonas maltophilia* 2.Infecções bacterianas
3.Resistência a trimetoprima 4.Sulfametoxazol 5.Fatores de resistência
6.Quinolonas

SUMMARY

Paez JIG. *Characterization of mechanisms of resistance to quinolones and sulfamethoxazole/trimethoprim in clinical isolates of Stenotrophomonas maltophilia* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 121p.

Stenotrophomonas maltophilia is a gram-negative, non-fermenter, considered a low virulent organism, mainly related to healthcare associated infections. *S. maltophilia* shows a pattern of intrinsic resistance to many classes of antibiotics. The drug of choice for the treatment of infections caused by *S. maltophilia* is SMX/TMP, however, current studies have reported increased resistance to this antibiotic, thus limiting the options for effective therapy. Among the treatment options appear tigecycline and levofloxacin, but clinical trials and studies *in vitro* to such drugs are lacking. The purpose of this study was to evaluate the possible mechanisms of resistance to SMX/TMP and quinolones in clinical isolates from patients admitted to the Institute's Central Clinical Hospital and the Hospital A.C Camargo. We evaluated 106 strains of *S. maltophilia* isolated from adult patients with healthcare associated infections, at the Instituto Central do Hospital das Clínicas and the Cancer Hospital AC Camargo in the period of December 2008 to December 2010. The sensitivity to SMX/TMP was 78.3%, 82% for levofloxacin, 14,2% for ciprofloxacin, minocycline 100% and for tigecycline 91.6%. PCR was performed for detection of gene *sul1*, *sul2* and *dfrA1* to evaluate the resistance to SMX/TMP, genes *iscr2* *int1* was performed to evaluate the presence of mobile genetic elements and genes *gyrA*, *qnr*, *smeD*, *smeT* and *aac (6')-Ib-cr* for evaluation of resistance to quinolones. Fourteen samples (13.2%) were positive for the gene *sul1*. In these isolates, nine samples showed resistance to SMX/TMP with MIC₅₀ of 8 µg/ml and MIC₉₀ of 128 µg/mL. Five strains were positive for *sul1* gene and were susceptible to SMX/TMP with MIC₅₀ of 1 µg/ml and MIC₉₀ of 1 µg/mL. The sequence of the integron class 1 strain with an MIC > 125 µg/mL showed an approximate size of 4000 bp containing the gene cassettes *aadA1*, *aac4* and *qac/sul1*. A strain resistant to SMX/TMP was positive for the gene *sul2* located on ISCR2 a transposase-like. We observed the presence of four new *qnr* in strains of *S. maltophilia* and the presence of the enzyme *aac (6')-Ib-cr* in 4 samples. 100% of the strains were positive for the gene of the efflux system *smeDEF* and 12/38 samples had the gene *smeT* repressor of *smeDEF* efflux system, however there was no mutation in this gene. In the amino acid sequence of gyrase A of 15 strains resistant to levofloxacin did not observe mutations related to resistance to quinolones. Strains resistant to SMX/TMP had a polyclonal PFGE pattern. Eighteen strains resistant to

levofloxacin showed 14 clonal profiles 14 divided into 10 clusters *S. maltophilia* displays multiple mechanisms of resistance. In this study, we observed a large number of strains with mobile genetic elements carrying the *sul1* gene and other resistance genes. *S. maltophilia* is may be an important source for transmission of genes of resistance.

Descriptors: 1-*Stenotrophomonas maltophilia* 2-Bacterial infections 3-Trimethoprim resistance 4-Sulfamethoxazol 5-Resistencial factors 6-Quinolones

1 INTRODUÇÃO

Stenotrophomonas maltophilia é um bacilo Gram-negativo, não fermentador, considerado um microorganismo pouco virulento, relacionado principalmente a infecções associadas à assistência a saúde em populações de alto risco, como pacientes imunodeprimidos e pacientes internados em unidades de terapia intensiva.

Os principais quadros clínicos descritos em infecções por *S. maltophilia* são pneumonia, infecção de corrente sanguínea, infecção de trato urinário e infecção de tecidos moles. A incidência de colonização/infecção por *S. maltophilia* varia em diversos hospitais de 2 a 37,7 casos por 10.000 altas.

Os fatores de risco para colonização ou infecção por *S. maltophilia* descritos na literatura são o uso prévio de antimicrobianos de amplo espectro, uso de cateter venoso central, neutropenia, quimioterapia, corticoterapia, internações prolongadas, internações em unidade de cuidado intensivo, internações em unidades de neonatologia, ventilação mecânica, presença de traqueostomia e doença respiratória crônica de base.

A *S. maltophilia* apresenta um padrão de resistência intrínseca à maioria das classes de antibióticos, mediada por produção de enzimas como β -lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, expressão de sistemas de efluxo, mutações cromossômicas e expressão de genes de resistência adquiridos por elementos genéticos moveis, entre outros. A droga de escolha para o tratamento das infecções por *S. maltophilia* é a sulfametoxazol/ trimetoprima (SMX/TMP), entretanto, estudos atuais relatam

o aumento da resistência a este antibiótico, o que limita as opções para terapia efetiva. Entre as opções de tratamento aparecem as fluoroquinolonas, como o levofloxacino e a tigeciclina, porém, faltam estudos clínicos e de resistência para essas drogas, o que limita a utilização das mesmas no tratamento das infecções por *S. maltophilia*.

A proposta deste estudo foi avaliar os possíveis mecanismos de resistência a SMX/TMP e as quinolonas em isolados clínicos de pacientes internados no Instituto Central do Hospital das Clínicas e do Hospital A.C. Camargo no período de dezembro de 2008 a dezembro de 2010

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia

Stenotrophomonas maltophilia foi descrita inicialmente como *Pseudomonas maltophilia* (Hung e Ryschenkow, 1960). E posteriormente como membro do gênero *Stenotrophomonas*, proposto por Palleroni e Bradbury em 1993. Estudos combinando análise fenotípica e genotípica demonstraram uma grande diversidade genética nesse gênero, são descritas atualmente oito espécies (*S. maltophilia*, *S. rhizophila*, *S. Koreensis*, *S. acidaminiphila*, *S. nitritireducens*, *S. terrae*, *S. humi*, *S. chelatiphaga*) (Vsileuskaya-Schulz et al., 2011). Entretanto, apenas a *S. maltophilia*, até o momento, foi associada à infecção em humanos.

2.2 Microbiologia

S. maltophilia é um bacilo Gram-negativo, móvel, não fermentador de glicose, que possui flagelos polares. Reto ou ligeiramente curvo, mede entre 0,5 a 1,5 μm de comprimento. As colônias são lisas, de cor amarela pálida brilhante ou cinza-lavanda com bordas bem definidas em meio de ágar sangue, o crescimento é ótimo a 35°C. *S. maltophilia* é considerada uma bactéria com pequena atividade metabólica, embora possa metabolizar alguns substratos como os aminoglicosídeos (Denton e Kerr, 1998).

No ambiente hospitalar *S. maltophilia* pode ser isolada de diversos materiais e superfícies, como circuitos ventilatórios, reservatórios de água de umidificadores de oxigênio, equipamentos para nebulização, máquinas de diálise, piscinas de hidroterapia, dispensadores de água deionizada, cateteres venosos, monitores de pressão arterial, máquinas de gelo e soluções desinfetantes (Denton e Kerr, 1998).

2.3 Epidemiologia

A frequência das infecções por este agente aumentou nos últimos anos como consequência do maior número de pacientes em risco, devido ao avanço da terapêutica médica e do uso rotineiro de antibióticos de amplo espectro (Tan et al., 2008; Falagas et al., 2008).

A incidência de *S. maltophilia* descrita em diferentes hospitais, incluindo pacientes colonizados e infectados varia de dois a 37,7 casos por 10.000 altas (Del Toro et al., 2002; Denton e Kerr, 1998; Morrison et al., 1986). Tan et al., (2008) em um hospital terciário em Taiwan, descreveram que a taxa de infecção por 10.000 admissões aumento de 5,3 em 1999 para 9,8 em 2004. Del Toro et al., (2002), como parte de um estudo multicêntrico na Espanha, mostraram taxas de incidência de infecção por *S. maltophilia* entre 3,4 e 12,1 casos por 10.000 altas. No Hospital das Clínicas da FMUSP a incidência de infecção de corrente sanguínea por *S. maltophilia* entre 1999 e 2006 variou de 0,12 a 1,0 (média de 0,55) por 1.000 pacientes-dia (Girão et al., 2008).

2.3.1 Fatores de risco para infecção ou colonização por *S. maltophilia*

Os principais fatores de risco para infecção ou colonização por *S. maltophilia* descritos são: o uso prévio de antimicrobianos de amplo espectro (imipenem, ceftazidima, cefepima, metronidazol, ampicilina e gentamicina), número de dias de uso de antimicrobianos, uso de cateter vascular, uso prévio de corticóides, ventilação mecânica, presença de traqueostomia, pontuação alta em avaliação de gravidade de trauma, contusão pulmonar, transporte médico aéreo, mucosite grave e diarreia (Garcia Paez e Costa, 2008).

2.3.2 Clonalidade

S. maltophilia pode ser isolada em diferentes superfícies no ambiente hospitalar. A maioria das infecções por esse agente são policlonais e o relato de surtos por *S. maltophilia* é raro (Souza Dias et al., 2008; Triptkovic et al., 2001). *S. maltophilia* é uma bactéria que apresenta uma diversidade genética grande, demonstrada por estudos de tipagem molecular que utilizaram a metodologia de eletroforese em campo pulsado (PFGE) (Lin, CW et al., 2008; Gulmez et al., 2005; Jumaa et al., 2006; Barbolla et al., 2004; Valdezate et al., 2001). Schaumann et al., 2008, estudaram 96 cepas clínicas isoladas em 1998, e observaram 17 clones possivelmente relacionados e 45 cepas com padrão genotípico diferente. Em outro estudo, Valdezate et al., 2001, analisaram 139 isolados de pacientes sem fibrose cística obtidos no mesmo hospital em um período de quatro anos e

mostraram que a maioria das cepas testadas (71,7%) apresentaram diferentes perfis cromossômicos através da PFGE e que um padrão genotípico idêntico foi obtido apenas de 15 pacientes (14,3%), diferente de achados em populações de pacientes com fibrose cística, os quais apresentam perfis semelhantes. Estudo de diversidade genética da *S. maltophilia* por tipagem de sequência de múltiplos locos (MLST) revela que existem atualmente sete genogrupos, sendo o principal o genótipo número 6, (Kaiser et al., 2009). Esses estudos mostram a grande variedade de perfis genéticos que a *S. maltophilia* exibe reforçando assim a ideia da ampla distribuição da espécie no ambiente. Estudos de caracterização molecular das cepas de *S. maltophilia* são importantes para desenvolver estratégias de controle e para tentar diminuir a frequência de infecções por este agente.

2.4 Infecções causadas por *S. maltophilia*

As principais infecções causadas por *S. maltophilia* são pneumonia, infecção de corrente sanguínea e infecções de pele e anexos. Outras infecções como infecções de trato urinário, meningites, endocardite, endoftalmite, conjuntivites, infecções abdominais e artrite séptica também são descritas. A maioria dessas infecções é relacionada à assistência a saúde. A descrição de infecções comunitárias é rara (Dignani et al., 2003).

2.5 Sensibilidade

A escolha do melhor antimicrobiano para o tratamento de infecções por *S. maltophilia* é um desafio para médicos, devido ao padrão de resistência intrínseca dessa bactéria e da falta de um consenso global para determinar a melhor metodologia para a análise da sua sensibilidade (Nicodemo e Paez, 2008).

Diferentes métodos já foram utilizados, tais como, disco-difusão, agar-diluição, diluição em caldo e E-test (Denton e Kerr, 1998). O “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) recomenda a técnica de diluição em Agar ou diluição em caldo para determinar a sensibilidade de *S. maltophilia* para sulfametoxazol/trimetoprima (SMX/TMP), levofloxacino, ticarcilina/clavulanato, minociclina, ceftazidima e cloranfenicol e a metodologia de disco-difusão apenas para testar SMX/TMP, levofloxacino e minociclina (CLSI, 2009).

O E-test tem sido utilizado como uma boa opção para avaliar a sensibilidade de outros Gram-negativos e em alguns estudos que testaram cepas de *S. maltophilia*, esta metodologia também mostrou ótimos resultado quando comparada com métodos diluicionais, considerados o padrão-ouro (Gülmez et al., 2010, Nicodemo et al., 2004, Conh e Waites, 2001, Yao et al., 1995). Em contrapartida, vários estudos mostram discrepâncias nos resultados da sensibilidade por disco-difusão para colistina, ticarcilina/clavulanato e ciprofloxacino (Gülmez et al., 2010; Nicodemo et al., 2004,). Nicodemo et al., (2004) demonstraram excelente

correlação entre os métodos diluicionais e o método de difusão em disco para a avaliação da sensibilidade de isolados de *S. maltophilia* a diferentes antibióticos como SMX/TMP, cloranfenicol, doxiciclina, gatifloxacino e ticarcilina/clavulanato. Entretanto, testes não diluicionais mostraram uma baixa acurácia para polimixinas. Gülmez et al., 2010, descreveram uma baixa acurácia do método de disco-difusão para colistina, com mais de 32% de erros muito graves quando comparado ao método de diluição em ágar considerado o padrão-ouro.

A sensibilidade de isolados clínicos de *S. maltophilia* determinada em diversos estudos que utilizaram a metodologia diluicional em caldo (Tabela 1) ou em ágar (Tabela 2), mostraram porcentagem de sensibilidade ao SMX/TMP entre 16% e 98,5%, entretanto, quando excluídas amostras de pacientes com fibrose cística (San Gabriel et al., 2004, Fadda et al., 2004) a porcentagem de sensibilidade aumenta para 60,6% a 98,5%. Levofloxacino apresenta uma sensibilidade por métodos diluicionais entre 60,6% e 86,9% (Tabela 1). São poucos os estudos que avaliam a sensibilidade de isolados clínicos de *S. maltophilia* para minociclina, no entanto, esses estudos mostram uma alta porcentagem de sensibilidade a essa droga, variando entre 97% e 100% (Milatovic et al., 2003; Betriu et al., 2002; Valdezate et al., 2001; Vartivarian et al., 1994). Estudos que avaliam a sensibilidade por métodos diluicionais da *S. maltophilia* para tigeciclina demonstram porcentagens de sensibilidade entre 87,7% e 100%, porém, falta uma padronização na metodologia e nos pontos de corte para

determinar a sensibilidade da droga, dificultando assim, o emprego da mesma para o tratamento de infecções causadas por este agente (Insa et al.,2007; Fritsche et al., 2005; Milatovic et al.,2003; Sader et al.,2005(II); Sader et al.,2005 (III)).

Na tabela 1 e tabela 2, mostramos estudos que avaliaram a sensibilidade por métodos diluicionais, das principais drogas empregadas no tratamento de infecções por *S. maltophilia*.

Tabela 1. Estudos de sensibilidade utilizando a metodologia de microdiluição em caldo.

Referência	Farrell et al., 2010			Gales et al., 2006			Sader et al., 2005III			Jones et al., 2003			Vartivarian et al., 1994			Sader et al., 2005 II		
Amostras	N°1586			N°1256			N°2076			N°1488			N°130			N°203		
Antimicrobiano	CIM ₅₀	CIM ₉₀	%S	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% S	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% S	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% S	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% S	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% S
SMX/TMP	≤0,5	1	96	≤0,5	1	97	≤0,5	≤0,5	95,3	≤0,5	≤0,5	92	1	4	75	≤0,5	1	98
Levofloxacino	1	4	83,4	1	4	86,9	1	4	86,1	1	4	86						
Ticarcilina/C	32	>128	39,1	32	128	47,6	16	128	55,7	16	128	86	32	128	43			
Ceftazidima	16	>16	4,8	8	>16	52,4	8	>16	52,9	8	>16	54	64	256	15	8	>16	56,9
Minociclina	-	-	-							-	-	-	1	4	97			
Ciprofloxacino							2	>2	30,9	-	-	-	4	32	16	2	>4	29,6
Cloranfenicol																		
Tigeciclina	0,5	2	95,5													1	2	93,1
PolimixinaB	≤1	>4	64,6	1	8	72,4	2	8	67,6							≤1	4	84,6
Colistina																		

Nº: número de amostras; CIM: valor em Mg/L; %S: porcentagem de sensibilidade; SMX/TMP: sulfametoxazol-trimetoprima; T/C: ticarcilina/ e ácido clavulânico.

Tabela 2. Estudos de sensibilidade utilizando a metodologia de microdiluição em Agar.

Referência	Betriu et al., 2002			Betriu et al., 2002I			Gulmez 2005			Nicodemo et al., 2004			Travassos et al., 2004			Weiss et al., 2000			Hu et al., 2011		
Amostras	N° 195			N°52			N°205			N°70			N°39			N°326			N° 34		
Antimicrobiano	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% S	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% S	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% S	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% S	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% S	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% S	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% S
SMX/TMP	0,06	0,12	98	0,125	0,5	98	2	8	64,4	0,06	0,12	100	≤0,25	≤0,25	100	0,5	0,5	98,5	9,5	608	66,7
Levofloxacino																1	8	73	0,5	16	68,6
Ticarcilina/C	4	32	85,1	8	64	100				16	128	59,1	2	32	94,8	8	128		128	256	46,1
Ceftazidima	16	>128	54	64	256	27	32	>16	52,9				16	64	26,3				4	256	60,9
Minociclina	0,25	1	100																10,5	16	74,5
Ciprofloxacino	-	-	-				2	>2	30,9				0,5	2	81,6	4	16	40			
Cloranfenicol										4	16	80,3							8	128	45,1
Tigeciclina	1	4	-	1	4	-															
PolimixinaB							2	8	67,6	2	4	77,3									
Colistina										2	4	75,7									

N°:número de amostras; MIC:valor em Mg/L; %S: porcentagem de sensibilidade; SMX/TMP:sulfametoxazol-trimetoprima; T/C:ticarcilina/ e ácido clavulanico.

2.6 Tratamento

O tratamento de infecções por *S. maltophilia* é difícil devido à resistência intrínseca a diversas classes de antimicrobianos, além, da falta de ensaios clínicos randomizados que avaliem as opções terapêuticas para o tratamento das infecções por esse agente (Nicodemo e Paez., 2008). Sulfametoxazol/trimetoprima é considerada a droga de escolha para o tratamento dessas infecções, outros antibióticos com ação contra *S. maltophilia* são ticarcilina-clavulanato, levofloxacino, moxifloxacino, minociclina, ceftazidima, cloranfenicol, polimixina, colistina e tigeciclina como monoterapia ou em associação.

Falagas et al., 2008, realizaram uma revisão sistemática de tratamento em pacientes com infecções por *S. maltophilia* que não receberam SMX/TMP. Os autores avaliaram 31 relatos de casos e 5 séries de casos, somando 49 pacientes. Os autores concluíram que o uso de ciprofloxacino, ceftazidima ou ticarcilina-clavulanato como monoterapia ou em associação a outros antimicrobianos são boas opções para o tratamento destas infecções, com taxa de sucesso entre 66,7 a 85%. Esse resultado, entretanto, deve ser considerado com muito critério, já que existe um aumento de resistência a ciprofloxacino na última década. *S. maltophilia* apresenta resistência intrínseca a ceftazidima, além da baixa sensibilidade a essas drogas descrita em diferentes estudos no mundo (Sander et al (III)., 2005I; Gales et al., 2006).

2.6.1 Sulfametoxazol/trimetoprima

Sulfametoxazol/trimetoprima é considerado o tratamento de primeira escolha das infecções por *S. maltophilia*. Entretanto, não existem estudos clínicos randomizados controlados que avaliem a real eficácia dessa combinação de antimicrobianos no tratamento das infecções por esse agente. Um problema recente é o aumento da presença de elementos genéticos móveis carregando genes de resistência para SMX/TMP em cepas de *S. maltophilia* (Hu et al., 2011, Toleman et al., 2007, Barbolla et al., 2004). Esses achados, entretanto, ainda são controversos. Os quatro maiores estudos que avaliaram a sensibilidade a SMX/TMP pelo método de microdiluição em caldo contabilizaram, 6406 amostras, e mostram sensibilidade entre 92 e 97%, sem um aumento de resistência nos últimos anos (Farrel et al., 2010, Gales et al., 2006, Sader et al., 2005II, Jones et al., 2003). Todavia, a resistência a esta combinação é descrita em outras séries. San Gabriel et al., (2004), analisaram 673 cepas isoladas em pacientes com fibrose cística nos EUA e evidenciaram resistência de 84%. Previamente, Valdezate et al., (2001), observaram porcentagem de resistência de 26,2% e Micozzi et al., (2000), estudaram pacientes oncológicos com bacteremia e mostraram resistência de 58%. Esses estudos avaliaram população específica de pacientes, o que pode explicar resultados tão diferentes.

A dose recomendada de SMX/TMP é de 10 a 20 mg/kg por dia do componente trimetoprim para obter níveis séricos máximos, ideais para o tratamento dessas infecções, embora, esta prática limite seu uso devido à

toxicidade do componente trimetoprim, principalmente em pacientes imunodeprimidos (Falagas et al., 2008).

2.6.2 Quinolonas

As quinolonas, principalmente levofloxacin, moxifloxacin e ciprofloxacin são opções para o tratamento de infecções por *S. maltophilia*. Levofloxacin exibe uma atividade superior a ciprofloxacin com CIM 4 a 8 vezes menores do que a CIM para ciprofloxacin (Sader et al., 2005(III); Nicodemo et al., 2004; Cantón et al., 2003; Gesu et al., 2003; Gales et al., 2001).

Farrel et al., 2010, avaliaram a sensibilidade de levofloxacin pelo método de microdiluição em caldo de 1584 cepas de *S. maltophilia* isoladas ao redor do mundo, observaram uma sensibilidade de 83,4%. Gesu et al., (2003), compararam a atividade de levofloxacin e ciprofloxacin, e obtiveram sensibilidade de 124 cepas estudadas de 85,5% e 58,9% respectivamente. Não existem estudos que avaliem a resistência ao levofloxacin, entretanto, especialistas relatam o surgimento de resistência durante o tratamento (Gulmez et al., 2010). Garrison et al., (1996), em um modelo farmacodinâmico avaliaram ciprofloxacin e levofloxacin e observaram o aparecimento de mutantes resistentes por pressão seletiva. Ba et al., (2004) demonstraram que moxifloxacin tem maior poder bactericida que ciprofloxacin, entretanto, também observaram o aparecimento de mutantes resistentes a ambas quinolonas. Giamarellos-

Bourboulis et al., (2002 (I)) comprovaram o efeito bactericida de moxifloxacino contra cepas geneticamente distintas resistentes a SMX/TMP. Entretanto, para infecções de trato respiratório causadas por cepas com CIM >2 µg/ml a atividade clínica pode ser limitada devido ao acúmulo de moxifloxacino no muco do epitélio brônquico e nos macrófagos alveolares. Neste último caso, monoterapia com moxifloxacino poderia selecionar mutantes resistentes.

Faltam estudos *in vivo* que confirmem a eficácia das quinolonas para o tratamento de infecções por *S. maltophilia*.

2.6.3 Tigeciclina

A giciliclina tigeciclina derivada da minociclina, apresenta boa sensibilidade em estudos *in vitro* contra cepas de *S. maltophilia*. Farrel et al., 2010, avaliaram a sensibilidade pelo método de microdiluição em caldo de 1584 cepas de *S. maltophilia* de diferentes países, observaram sensibilidade de 95,5%. Entretanto, seu uso para o tratamento de infecções por *S. maltophilia* deve ser muito criterioso, já que não existem estudos clínicos que confirmem a eficácia da tigeciclina no tratamento de infecções por *S. maltophilia*. Petersen et al., 2006 em estudo *in vitro* de sinergismo, demonstraram que a tigeciclina apresentou atividade sinérgica com rifampicina ou SMX/TMP contra cepas de *S. maltophilia*. Na literatura, foram descritos dois relatos de casos de pacientes com infecção de tecidos moles e pneumonia por *S. maltophilia* tratados com sucesso com tigeciclina,

porém, nenhum dos pacientes recebeu a tigeciclina como monoterapia (Belvisi et al., 2009, Blanquer et al., 2008). Até o momento não foi descrita a presença de sistemas de efluxo associados com resistência para tigeciclina na *S. maltophilia*, como o sistema de efluxo AcrAB descrito em *Enterobactérias* ou o sistema MexXY-OprM descrito na *P. aeruginosa*. Gulmez et al., 2010, em estudo *in vitro* não observaram sinergismo com a associação de tigeciclina e ticarcilina/clavulanato ou tigeciclina e colistina contra cepas de *S. maltophilia*.

Este antibiótico poderá no futuro ser usado em terapia combinada no tratamento de infecções por esse agente.

2.6.4 Beta-lactâmicos

Antibióticos β -lactâmicos em geral têm pequena atividade contra *S. maltophilia*, apresentam taxas de resistência invariavelmente altas (Farrel et al., 2009; Nicodemo et al., 2004). A *S. maltophilia* exibe resistência intrínseca aos β -lactâmicos. Inibidores de β -lactamase, como ácido clavulânico e, em menor proporção, outros inibidores de β -lactamase, aumentam a sensibilidade da *S. maltophilia* aos β -lactâmicos (Muñoz Bellido et al., 1997). A combinação mais ativa contra *S. maltophilia* é a associação ticarcilina-clavulanato, a qual tem sido recomendada como droga alternativa, principalmente no tratamento de infecções em pacientes com contraindicação de uso do SMX/TMP (Falagas et al., 2008; Denton e Kerr, 1998). Vários estudos, entretanto, mostraram uma sensibilidade inferior a

70% para ticarciclina/clavulanato (Farrel et al., 2008; Nicodemo et al., 2004; Canton et al., 2003). Estudo recente de Farrel et al., 2010, mostrou sensibilidade pelo método de microdiluição em caldo para ticarciclina/clavulanato de 34% para 1584 cepas de *S. maltophilia* isoladas de diferentes países. Lecso-Bornet e Bergogne-Berezin, (1997), demonstraram que a única combinação de β -lactâmico e inibidor de β -lactamase que inibiu mais de 80% das cepas testadas e apresentou efeito sinérgico em mais de 50% das cepas, foi à associação de ticarciclina-clavulanato, pelo efeito inibidor maior de ácido clavulânico sobre a enzima L2. Outros estudos demonstraram a possibilidade de aparecimento de fenótipos multirresistentes após exposição a essa combinação, dificultando assim a predição de eficácia clínica (San Gabriel et al., 2004; Carroll et al., 1998; Vartivarian et al., 1994). E finalmente, Garrison et al., (1996), demonstraram que cepas de *S. maltophilia* tratadas com ticarciclina-clavulanato apresentaram inibição parcial de crescimento seguida de recrescimento num modelo farmacodinâmico. Ausência de estudos clínicos randomizados, problemas na interpretação dos testes de difusão, proporções dos componentes e diferença na farmacocinética dessas drogas limitam seu uso em infecções por *S. maltophilia* (Nicodemo e Paez., 2008); Associações como ticarciclina-sulbactam, piperacilina-tazobactam e ampicilina-sulbactam não apresentam uma boa atividade *in vitro* contra *S. maltophilia* (Del Toro et al., 2002; Micozzi et al., 2000; Tsiodras et al., 2000; Traub et al., 1998; Muñoz Bellido et al., 1997; Vartivarian et al., 1994; Pankuch et al., 1994; García Rodríguez et al., 1991).

A ceftazidima é a cefalosporina mais ativa contra cepas de *S. maltophilia*. Entretanto, as taxas de resistência são altas, como descritas por diferentes autores (Farrel et al., 2008; Nicodemo et al., 2007; Lanzafame et al., 2006; Gulmez et al., 2005; Jones et al., 2003; Betriu et al., 2002(II); Del Toro et al., 2002).

Vários especialistas não recomendam o uso de β -lactâmicos isoladamente no tratamento de infecções por *S. maltophilia*, devido ao risco de indução de resistência por produção de β -lactamases cromossômicas (Nicodemo e Paez., 2008; Del Toro et al., 2002)

2.6.5 Tetraciclinas

A minociclina apresenta uma alta atividade *in vitro* contra cepas de *S. maltophilia*. Estudos de sensibilidade mostram resistência menores de 10% (Farrel et al., 2008; Valdezate et al., 2004; Betriu et al., 2002(II)). Cantón et al., (2003) estudaram 47 cepas de *S. maltophilia* em pacientes com fibrose cística e mostraram percentagem de resistência menor de 1% para dicloxacilina e minociclina. Os relatos de uso de minociclina, entretanto, são escassos. Harada et al., 2008, descreveram o relato de caso de um paciente submetido a transplante de fígado que evoluiu com choque séptico secundário a infecção de corrente sanguínea de origem biliar por *S. maltophilia*. O paciente recebeu SMX/TMP e minociclina associados à terapia de absorção de endotoxina com “toraymyxin” com boa resposta após 17 dias de tratamento. Carroll et al., (1998) sugerem que SMX/TMP ou minociclina

deveriam ser associados a qualquer outro esquema terapêutico no tratamento de infecções graves por *S. maltophilia*.

2.6.6 Polimixinas

O uso de polimixinas para o tratamento de infecções por *S. maltophilia* também é limitado. Os principais problemas para o uso das polimixinas são a falta de estudos clínicos controlados, além da falta de recomendações para a interpretação dos testes de sensibilidade *in vitro*. Gales et al., (2001) e Nicodemo et al., (2004), recomendam a utilização de métodos diluicionais, por considerarem o método de disco-difusão como não confiável. Wood et al., 2008, descreveram um caso clínico de paciente com pneumonia associada à ventilação mecânica sem resposta ao uso de SMX/TMP após 48 dias de tratamento, sendo então iniciada doxiciclina endovenosa e colistina por nebulização com boa resposta clínica e laboratorial após 14 dias de tratamento.

2.7 Sinergismo

S. maltophilia exibe alta resistência intrínseca à maioria dos agentes antimicrobianos. Alguns autores justificam a combinação de antimicrobianos principalmente para o tratamento de infecções graves causadas por esse agente (Falagas et al., 2008, Nicodemo e Paez., 2008; Zelenitsky et al., 2005;

Carrol et al.,1998). Muder et al. 1996, demonstraram em um estudo de coorte prospectivo que avaliou 91 pacientes com infecção de corrente sanguínea por *S. maltophilia* que pacientes que receberam tratamento com associação de antibióticos tiveram mortalidade menor que aqueles que receberam monoterapia. Os autores sugerem que o uso de SMX/TMP associado à ticarcilina/clavulanato ou a uma cefalosporina de terceira geração pode ser mais eficaz que monoterapia. Zelenitsky et al., (2005) avaliaram a atividade de SMX/TMP isoladamente ou em associação com ceftazidima, ciprofloxacino e gentamicina. Todas as associações de antimicrobianos foram superiores a monoterapia com SMX/TMP na redução da carga bacteriana ($P<0,0001$). Traub et al., (1998), mostraram que as associações de rifampicina e polimixina B com SMX/TMP ou ceftazidima foram altamente bactericidas contra cepas de *S. maltophilia*. Guimarells-Bourboulis et al., (2002(II)), estudaram o sinergismo de colistina-rifampicina e colistina-SMX/TMP em 24 cepas resistentes a SMX/TMP e mostraram que em 24 horas o sinergismo para colistina-rifampicina foi de 62,5% e para colistina-SMX/TMP foi de 41,7%. Segundo os autores a polimixina facilitaria a entrada de rifampicina ou SMX/TMP na parede bacteriana. Muñoz Bellido et al., (1996) mostraram atividade da combinação SMX/TMP-polimixina B, tanto para cepas resistentes a SMX/TMP quanto para cepas sensíveis. Muñoz Bellido et al., (1997), observaram que a associação aztreonam-clavulanato-ticarcilina foi duas a quatro vezes mais ativa que aztreonam-clavulanato. Gould e Milne, (1997), demonstraram que a combinação de piperacilina-tazobactam e ciprofloxacino mostrava-se amplamente variável

na resposta contra cepas de *S. maltophilia*. Combinações de antimicrobianos parecem ser superiores a monoterapia no tratamento de infecções por *S. maltophilia*, principalmente por cepas multiresistentes e infecções em pacientes graves. Entretanto, a falta de estudos clínicos que comprovem a eficácia clínica dessa estratégia limita seu uso na prática clínica.

2.8 Mecanismos de resistência da *S. maltophilia*

S. maltophilia exibe um padrão intrínseco de multirresistência a várias classes de antibióticos como β -lactâmicos, carbapenêmicos, quinolonas, aminoglicosídeos e tetraciclina (Looney et al., 2009).

Os principais mecanismos de resistência intrínseca da *S. maltophilia* são a expressão de sistemas de efluxo e de β -lactamases. A *S. maltophilia* também tem a capacidade de apresentar resistência horizontal por aquisição de genes cassetes de resistência através da aquisição de integrons, transposons e plasmídios (Hu et al. 2011).

Crossman et al., 2008, descreveram o genoma completo de uma cepa clínica de *S. maltophilia* K279 com tamanho de 4,851.126 pb, a qual contém nove sistemas de efluxo e múltiplos genes de resistência para antimicrobianos e metais pesados. Os sistemas de efluxo descritos nesse estudo foram, o SmeABC, SmeDEF, SmeVWX (50% de identidade com o sistema MexEF-OprN da *Pseudomonas aeruginosa*), SmeYZ (59% de identidade com o sistema AdeAB do *Acinetobacter baumannii*), SmeGH (49% de identidade com

o sistema AcrAB da *Morganella morganii*), SmeLJK (50% de identidade com o sistema MtdABC da *E. coli* e os sistemas SmeMN e SmeOP com menos de 30% de similaridade com proteínas de efluxo descritas na literatura em enterobactérias, entretanto só a atividade dos sistemas SmeDEF e SmeABC foi até o momento avaliada em isolados de *S. maltophilia*.

2.8.1 Resistência a SMX/TMP

A droga de escolha para o tratamento de infecções por *S. maltophilia* é a SMX/TMP, entretanto, estudos recentes descreveram um aumento da presença de elementos genéticos móveis que carregam genes de resistência para a SMX/TMP em cepas de *S. maltophilia* (Hu et al., 2011, Toleman et al., 2007).

Os mecanismos de resistência a SMX/TMP na *S. maltophilia* são pouco conhecidos. Até o momento é descrito que o principal mecanismo de resistência é a aquisição de genes que interferem na atividade do sulfametoxazol (Barbolla et al., 2004).

A aquisição e expressão do gene *sul1* é o principal mecanismo de resistência a sulfametoxazol descrito até o momento. Esse gene está localizado na região conservada 3' de integrons de classe 1, os quais estão localizados em plasmídios com tamanho entre 2,1KB a 54,2 KB (Hu et al., 2011, Toleman., 2007). O gene *sul2* presente em *transposases-like*, chamadas sequencias de inserção da região comum (ISCR) localizadas em plasmídios ou no cromossomo da bactéria também pode diminuir a

sensibilidade da *S. maltophilia* a SMX, porém, faltam estudos que confirmem que a aquisição desse gene pode ser um mecanismo de resistência a SMX na *S. maltophilia*. Outro mecanismo de resistência descrito recentemente na *S. maltophilia* é a presença de genes da enzima dehidrofolato redutase (*dfrA*), *dfrA12*, *dfrA13*, *dfr17* que conferem resistência ao trimetoprim, localizados nos integrons de classe 1 e carregados por plasmídios (Hu et al., 2011). Entretanto, não existem estudos que demonstrem que a transferência desses genes altere a CIM para a TMP na *S. maltophilia*. Até o momento foram descritos junto ao gene *sul1* em cepas com resistência a SMX/TMP os gene cassettes, *qac/sul1*, *aacA4-qac/sul*, *aacA7-orf1-aadA5-qac/sul*, *dfrA12-aadA2*, *aacA4-catB8-aadA1*, *aadB-aadA4*, *aacA4*, *aadA5*, *aadA5*, *aadA1*, *aadB-aac* (6')-II-*bla*_{CARB-8}, *arr3-dfrA*. A presença desses genes pode também conferir resistência para aminoglicósídeos, quinolonas, cloranfenicol e quaternário de amônio. Entretanto, nos estudos que descrevem os elementos genéticos citados acima, faltam dados em relação à associação da alteração da CIM em cepas que sofreram transformação. Toleman et al, (2007) estudaram 55 cepas clínicas, geneticamente não relacionadas, das quais 25 eram resistentes a SMX/TMP. Dezesete possuíam o gene *sul1* localizado na região 3' do integron de classe 1. O autor descreveu que cepas sensíveis não continham o gene *sul1*. Em sete cepas positivas para o gene *sul1* o integron foi analisado, duas amostras (Brasil e Alemanha) apresentavam a integrase 1 e o gene *qac/sul*. Duas amostras (Chile e EUA) continham integrase 1, o gene cassette *aacA4* e o complexo *qac/sul*. Duas amostras do México continham os genes das enzimas modificadoras de aminoglicósídeos

aacA5 e *aadA7*, uma ORF com atividade desconhecida e o complexo *qac/sul1*. O autor descreve que o gene *sul2* foi expresso em 9 amostras resistentes, localizado nas sequências de inserção ISCR2 e ISCR3. O seqüenciamento dos genes que sofreram a transformação na *E. coli* TOP10, mostrou que o gene *sul2* estava localizado, em cinco amostras na ISCR2 e em duas amostras na ISCR3, porém não foi descrito dados em relação a alterações na CIM nas cepas transformadas. Hu et al., 2011 no Taiwan, relatam a presença dos genes *dfrA17-aadA5*, *dfrA12-aadA2*, *aacA4-catB8*, *-aadA1*, *aadB-aadA4*, *aacA4*, *aadA5*, *aadA1*, *aadB-aac(6')II-bla_{carb-8}*, *arr-dfrA* em 30 amostras resistentes a SMX/TMP, entretanto não descrevem a alteração da CIM nas amostras estudadas.

2.8.2 Resistência a quinolonas

A resistência as quinolonas na *S. maltophilia* é determinada pela associação de múltiplos mecanismos de resistência, como a expressão de sistemas de efluxo, baixa permeabilidade da membrana e possivelmente mutações nas topoisomerasas. Entretanto, não existem estudos que avaliem a resistência ao levofloxacino, o qual é considerado uma boa opção terapêutica no tratamento de infecções por *S. maltophilia*. O principal mecanismo de resistência as quinolonas é a expressão do sistema de efluxo *smeDEF*. A expressão desse sistema leva ao aumento da CIM para norfloxacino, ofloxacino, ciprofloxacino e outros antimicrobianos, como tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina (Alonso e Martinez, 2000). Porém

não é descrito na literatura se esse sistema interfere com a atividade do levofloxacino. A alteração na expressão da proteína de membrana *smeC* aumenta a CIM para ácido nalidixico, norfloxacino e ciprofloxacino, aminoglicosídeos e alguns β -lactâmicos, fazendo parte do sistema *smeABC* ou como integrante de outro sistema de efluxo não identificado (Li et al., 2002). Al-Hamad et al., 2009, descreveram o sistema de efluxo *SmrA* na *S. maltophilia*, por meio de transferência genética, os autores mostraram que a expressão desse sistema diminui a sensibilidade para norfloxacino, ciprofloxacino e ofloxacino. Alterações nos sítios alvos da girase (*gyrA*) na topoisomerase IV têm sido investigadas, porém, o único estudo que avalia possíveis mutações na *gyrA* em cepas resistentes quando comparadas a cepas sensíveis não mostrou diferença nas sequências dessas regiões. O autor descreve, que cepas com CIM maiores para ciprofloxacino apresentaram aumento da sensibilidade quando expostas ao CCCP e reserpina, demonstrando assim, que a diminuição da entrada de droga por ação da bomba de efluxo pode evitar que a bactéria sofra mutação no sítio alvo, nesse caso na *gyrA*. (Valdezate et al., 2002).

Estudos recentes descreveram a presença de genes de resistência as quinolonas mediados por plasmídio (*qnr*) na *S. maltophilia*. Esses genes foram inicialmente descritos em 1998 na *Klebsiella pneumoniae* e foram classificados em 3 grupos (*qnr A*, *qnrB*, *qnrS*). Os genes *qnr* protegem a DNA girase e a topoisomerase da ação inibitória das quinolonas e estão localizados em plasmídios. Esses genes podem diminuir a sensibilidade as quinolonas, principalmente ao ácido nalidixico e ciprofloxacino. A importância

dos genes *qnr* na *S. maltophilia* ainda não está bem estabelecida, entretanto, os genes *qnr* podem ajudar a estabilizar ou selecionar mutações nas regiões determinantes de resistência a quinolonas (QRDR) da DNA gyrase e topoisomerase, além de, servir como reservatório para a disseminação de resistência mediada por plasmídio entre as enterobactérias (Gordon et al., 2010). Existem na atualidade 27 genes *qnr* descritos na *S. maltophilia*, porém são associados à diminuição da sensibilidade do ciprofloxacino, sem afetar o levofloxacino (Gordon et al., 2010; Shimizu et al., 2008, Sanchez et al., 2008). Ainda faltam estudos que determinem a verdadeira importância dos genes *qnr* na disseminação da resistência entre isolados de *S. maltophilia*.

2.8.3 Resistência aos β -lactâmicos

O principal mecanismo de resistência intrínseca aos β -lactâmicos é mediado pela produção de duas β -lactamases cromossômicas induzíveis, a metalo- β -lactamase L1 pertencente à classe B de Ambler e a serina-beta-lactamase L2 da classe A de Ambler (Saino et al., 1982; Crowder et al., 1998). A metalo- β -lactamase L1 hidrolisa todos os β -lactâmicos excluindo monobactams, não sendo inibida pelo inibidor de β -lactamase ácido clavulânico. (Walsh et al., 1994). A serino- β -lactamase L2 é uma cefalosporinase que hidrolisa aztreonam e é inibida pelo ácido clavulânico e parcialmente por outros inibidores de β -lactamase (Walsh et al., 1997).

As β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) já foram identificadas em cepas de *S. maltophilia*. Avison et al., 2000, identificaram o primeiro caso de uma cepa de *S. maltophilia* com o gene *bla*_{TEM}. Al Naiemi et al., 2006, avaliaram uma cepa de *S. maltophilia* de um paciente com fibrose cística cujo sequenciamento identificou a presença do gene *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{SHV-1} e *bla*_{TEM-116}. Confirmando assim, que cepas dessa espécie podem trocar determinantes de resistência a β -lactâmicos com outras espécies, tornando a *S. maltophilia* um reservatório de genes de resistência para antimicrobianos β -lactâmicos no ambiente hospitalar. É importante ressaltar que os testes fenotípicos para detecção de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) de *S. maltophilia* podem apresentar resultados falsos positivos pela inibição da serino- β -lactamase L2.

A resistência aos carbapenêmicos é mediada principalmente pela indução da metalo- β -lactamase L1 cromossômica, entretanto, outros mecanismos podem estar presentes, como alterações em proteínas ligadoras de penicilina como sugerido por Akova et al., (1991). Esses autores descreveram que cepas mutantes com expressão basal de β -lactamase L1 foram oito a 16 vezes mais sensível a meropenem que ao imipenem, possivelmente por aumento da permeabilidade ao meropenem e possíveis diferenças nos alvos de membrana.

2.8.4 Resistência aos aminoglicosídeos

A *S. maltophilia* é intrinsecamente resistente aos aminoglicosídeos. A expressão de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos é o principal

mecanismo de resistência a essa classe de antimicrobianos. O genoma da *S. maltophilia* K279a, por exemplo, contem os genes das enzimas *aacA2*, *aacA3*, *aacA6* e de dois genes de fosfotransferases que conferem resistência à estreptomicina. As enzimas modificadoras de aminoglicosídeos são principalmente cromossômicas, entretanto, estudos recentes relatam a presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos em genes cassetes de integrons da classe 1. Li et al., (2002), demonstraram que cepas que expressam a enzima acetiltransferase *aac(6')-Iz* têm sensibilidade de 4 a 16 vezes menores para amicacina, tobramicina, netilmicina e sisomicina. Lambert et al., (1999), em um estudo prévio, determinaram que cepas produtoras da enzima *aac(6')-Iz* apresentavam CIM para gentamicina menor quando comparada a amicacina, netilmicina e tobramicina. Okasaki et al., (2004), caracterizaram a enzima *aph (3')-IIa*, em estudos de transformação em cepas de *E. Coli*, os autores demonstraram a transferência de resistência para amicacina, neomicina, paramomicina, porém não observaram diminuição da sensibilidade para gentamicina. Vários estudos demonstram a capacidade da *S. maltophilia* de alterar o tamanho do polissacarídeo-O e o conteúdo de fosfatos do lipopolissacarídeo (LPS) a diferentes temperaturas, dificultando assim a ligação e/ou entrada dos aminoglicosídeos através da membrana externa (Rahmati-Bahram et al., 1995; Vanhoof et al., 1995; Rahmati-Bahram et al., 1997).

2.9 Justificativa

A *S. maltophilia* é uma bactéria que expressa múltiplos mecanismos de resistência cromossômicos e adquiridos a varias classes de antimicrobianos. Esses mecanismos são pouco conhecidos e estudados no Brasil. O principal problema dos estudos de resistência dessa bactéria é a dificuldade de correlacionar a expressão dos genes de resistência com a alteração da sensibilidade.

A importância de conhecer os mecanismos de resistência para SMX/TMP e quinolonas, além da falta de estudos específicos na literatura, levaram-nos a propor este estudo.

3 OBJETIVOS

Avaliar os mecanismos de resistência a sulfametoxazol/trimetoprima e as quinolonas

Descrever o padrão de resistência das cepas estudadas

Descrever a clonalidade das cepas resistentes a sulfametoxazol/trimetoprima e as quinolonas

4 MÉTODOS

4.1 Local

O estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica LIM-54 do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICHC-FMUSP).

4.2 Amostras bacterianas

Foram avaliadas 106 amostras de *S. maltophilia* isoladas de pacientes adultos com infecção relacionada à assistência a saúde, internados no Instituto Central do Hospital das Clínicas da FMUSP e no Hospital de Câncer A.C Camargo durante o período de dezembro de 2009 a dezembro de 2011.

Dados demográficos e clínicos dos pacientes como idade, sexo, doença de base, internação em unidade de terapia intensiva, uso prévio de SMX/TMP e quinolonas e óbito foram avaliados.

4.2.1 Identificação bacteriana

Todas as cepas foram identificadas no laboratório do hospital de origem e encaminhadas para o LIM-54. As amostras foram reidentificadas no LIM-54 pelo método manual API20 NE (bioMérieux, França), Com leitura em 24 e 48 horas.

4.3 Teste de Sensibilidade

O teste de sensibilidade *in vitro* para *S. maltophilia* foi realizado pelo método de microdiluição em caldo de acordo com as recomendações do manual M100-S19 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009). Foram calculadas as CIM₅₀ e CIM₉₀ dos antibióticos testados.

4.3.1 Antimicrobianos

Os seguintes antimicrobianos foram testados: Sulfametoxazol/trimetoprima (Sigma, EUA), Levofloxacino (Fluka, Alemanha), ticarcilina-ácido clavulânico (Sigma, EUA), cloranfenicol (Fluka, EUA), minociclina (Sigma, EUA), tigeciclina “tygacil®” (Wyatt, EUA), ceftazidima (Sigma, EUA) e ciprofloxacino (Sigma, EUA)

4.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo.

A determinação da CIM foi realizada seguindo a metodologia recomendada pelo CLSI os seguintes passos foram seguidos:

4.3.2.1 Preparo da solução estoque do antimicrobiano

Os antimicrobianos testados apresentavam em seu rótulo as seguintes informações: número do lote, prazo de validade e a potência expressa em UI/mg ou µg/mg. A solução estoque de antimicrobiano foi

preparada a uma concentração final de 10mg/mL. Para cada antimicrobiano foi empregado o solvente adequado, conforme os procedimentos padronizados pelo CLSI. Para calcular a quantidade necessária do antimicrobiano utilizamos a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência } (\mu\text{g/mg)}}$$

4.3.2.2 Número de diluições

As concentrações testadas abrangem os cortes descritos na Tabela 2B-4 do documento M100-S19 do CLSI, de 0,125 μ g/mL a 256,0 μ g/mL. A solução inicial de 256,0 μ g/mL foi obtida a partir da solução estoque de concentração igual a 10.000 μ g/mL. Foram realizadas diluições do antimicrobiano com o diluente adequado para cada antimicrobiano seguindo a recomendação do CLSI. Para Tigeciclina a solução inicial utilizada foi de 32 μ g/mL seguindo a recomendação da “United States Food and Drug Administration” (USFDA).

4.3.2.3 Preparo das diluições na microplaca de 96 poços

Um volume de 50 μ L de meio de cultura caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado (CMHCA) foi aplicado em todos os poços da microplaca, exceto na coluna 1. Foi acrescentado 100 μ L da diluição a 256,0 μ g/mL ou 32 μ g/mL (tigeciclina) em todos os poços da coluna 1. Com uma pipeta multicanal foi feita a diluição seriada do antimicrobiano pipetando 50 μ L do primeiro poço

da linha A (A_1) para o segundo poço da linha A (A_2). A mistura foi bem homogeneizada e em seguida foi pipetado 50 μ L do poço A_2 para o A_3 . Este procedimento foi realizado até o poço A_{11} , tendo este um volume final de 100 μ L, o qual foi designado como controle de esterilidade (não foram acrescentadas células bacterianas neste poço, com a finalidade de verificar a possível ocorrência de contaminação durante a diluição do antimicrobiano). O último poço de cada linha (A_{12} - H_{12}) foi utilizado como controle de crescimento bacteriano, ou seja, foram inoculados 50 μ L de meio de cultura MHCA mais 50 μ L da suspensão bacteriana (diluída 1:100).

4.3.2.4 Preparo da suspensão bacteriana

Foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) por espectrofotometria, com densidade óptica de 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625nm. Esta suspensão foi diluída 1:100 em solução fisiológica ou CMHCA ($\sim 1,5 \times 10^6$ UFC/mL).

4.3.2.5 Inoculação da suspensão bacteriana

Foi adicionado 50 μ L da suspensão bacteriana diluída nos poços 1 a 10 e no poço 12 de todas as colunas (A a H). Após o preparo das diluições, a inoculação foi realizada num intervalo máximo de 30 minutos. Após semeadura, as placas foram homogeneizadas por movimento rotatório. Foram incubadas a $35^\circ \pm 2^\circ$ C por 20 a 24 horas (CSLI., 2009).

4.3.2.6 Controle de qualidade

De acordo com os critérios do CLSI, foram utilizadas como cepas controle, as cepas *E. coli* ATCC® 25922 e *P.aeruginosa* ATCC® 27853.

4.3.2.7 Leitura das CIMs

A leitura das placas foi realizada em local iluminado, com auxílio de um espelho para leitura de microplacas e de uma luminária. A CIM foi determinada de acordo com a observação macroscópica de crescimento bacteriano nos poços da microplaca por dois pesquisadores e por espectrofotometria utilizando um comprimento de onda de 625nm nos casos de dúvida.

4.4 Teste fenotípico para avaliação de efluxo

Para investigar a presença de mecanismo de efluxo foi realizada a CIM de ciprofloxacino e levofloxacino adicionando 0,5 µg/mL de carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma, EUA) ou 10 µg/mL de reserpina (Sigma, EUA). O teste foi considerado positivo se a CIM para a quinolona avaliada na presença do inibidor, reserpina ou CCCP apresentasse uma diminuição de 4 vezes em relação a CIM sem o inibidor.

4.5 Caracterização de genes de resistência

Para investigar a presença de genes relacionados a resistência para SMX/TMP e quinolonas foram realizadas as amplificações desses genes pela técnica de PCR qualitativa com primers específicos para os genes *sul1*, *sul2*, *dfrA1* para TMP/SMX e *smeD*, *smeT*, *aac6'-lb-cr*, *qnrMR*, *qnrM*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *gyrA* para quinolonas. Para os genes *qnr A*, *qnrB*, *qnrS* foi realizado PCR multiplex. Para a detecção de elementos genéticos moveis foram realizados os PCR para os genes da integrase 1 (*int1*) e da sequencia de inserção (ISCR1).

4.5.1 Extração do DNA

Foi utilizando o Kit de extração Illustra bactéria “Genomicprep mini spin KIT” (General Electric, Buckinghamshire, UK) seguindo as recomendações do fabricante.

4.5.2 Preparo da mistura da reação

O Mix foi composto por 5 µL de tampão taq 10X, 1,5Mm de MgCl₂ a 50mM, 200µM de dNTP mix, 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA) e 10nM de primer.(reverse e forward).

4.5.3 Parâmetros da amplificação em cadeia da polimerase dos genes de resistência

Sul1: TA: 64°C com 33 ciclos (45 seg-94°C/45 seg-64°C/2 min-72°C);

Sul2: TA: 64°C com 30 ciclos (45 seg-94°C/45 seg-64°C/2 min-72°C);

GyrA: TA: 54°C com 30 ciclos (1 min-94°C/1min-64°C/1 min-72°C);

QnrMR: TA: 54°C com 30 ciclos (1 min-94°C/1min-54°C/1 min-72°C);

QnrM: TA: 54°C com 30 ciclos (1 min-94°C/1min-64°C/1 min-72°C);

Int1: TA: 55°C com 30 ciclos (1 min-94°C/1min-55°C/1:30 min-72°C);

Aac-6': TA: 55°C com 34 ciclos (45 seg-94°C/45 seg-55°C/45 seg-72°C);

dfrA1: TA: 52°C com 30 ciclos (45 seg-94°C/45 seg-52°C/1 min-72°C);

smeD: TA: 58°C com 35 ciclos (30 seg-94°C/1min-58°C/1:30 min-72°C);

smeT: TA: 58°C com 35 ciclos (30 seg-94°C/1min-58°C/1:30 min-72°C);

qnrA,B,S multiplex: TA: 54°C com 30 ciclos (1 min-94°C/1min-54°C/1 min-72°C).

4.5.4 Preparo do gel e análise do DNA

O produto amplificado foi analisado por gel de eletroforese (1,5% de agarose e 5uL de corante Syber green) a 70V por 60 minutos. Para cada gel foi utilizado um peso molecular de 100 pb para determinar o peso molecular dos produtos da PCR. Após a corrida o gel foi fotografado em câmera de UV.

4.5.5 Oligonucleotídeos iniciadores (“Primers”)

Os primers utilizados e seus respectivos produtos amplificados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores

Mecanismo de Resistência	Gene	Sequência de oligonucleotídeos Iniciadores (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referência/ Nº GenBank
Sulfametoxazol	<i>Sul1</i>	ATGGTGACGGTGTTGCGCATTCTGA	840	Toleman et al., 2006 AJ313522
Sulfametoxazol	<i>Sul2</i>	CTAGGCATGATCTTAACCCTCGGTCT GAATAAATCGCTCATCATTTTCGG	810	Toleman et al., 2006 AJ313522,
Integron	<i>Int1</i>	CGAATTCTTGCGGTTTCTTTTCAGC TTCGAATGTCGTAACCGC	457	Toleman et al., 2006 AF318072
ISCR	<i>Iscr2</i>	CGAGGCATAGAC TGT AC CACTGGCTGGCAATGTCTAG CTTTGGACCGCAGTTGACTC		Toleman et al., 2006 AJ313522
Trimetoprima	<i>dfrA1</i>	AGC TGT TCA CCT TTG GC	425	Toleman et al., 2006 AF455254
Quinolonas	<i>smeD</i>	CCT GAA ATC CCC AGC AA CCAAGAGCCTTTCCGTCAT	150	Alonso et al., 2004 AJ252200
Quinolonas	<i>gyrA</i>	CTCGGACTTCAGCGTGAC CGCGACGGCCTGAAGCCGGTGCA	335	Valdezate et al., 2004 AF302140
Quinolonas	<i>smeT</i>	TAGTTGGGCTGGAAATCGAC GCAGCCTCGTTCACGCCTC ATGGCCCGCAAGACCAAAGAG	940	Sanchez et al., 2002 AJ316010
Quinolonas	<i>Aac(6')-ib-cr</i>	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	Park et al., 2006 EU597467
Quinolonas	<i>qnrA</i>	CTCGAATGCCTGGCGCGTGTTT AGAGGATTTCTCAGCCAGG	580	Robicsek et al., 2006 DQ303920
Quinolonas	<i>qnrB</i>	TGCCAGGCACAGATCTTGAC GGMATHGAAATTCGCCACTG	264	Robicsek et al., 2006 DQ303921
Quinolonas	<i>qnrS</i>	TTTGCYGYCGCCAGTCGAA GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	Robicsek et al., 2006 DQ303920
Quinolonas	<i>qnrMR</i>	TCTAAACCGTCGAGTTTCGGCG CATGGCATGGAATCCCGAT	660	Sanchez et al., 2008 EU681383
Quinolonas	<i>qnrM</i>	TGATGTCTAGGCACCAC CTTGGCATGGAATCCCTGAT	660	Sanchez et al., 2008 AM743169
		TGATGCCTACGGCACCAC		

4.6 Avaliação do Integron

Para determinar a posição do gene *sul1* dentro do integron foi realizada a determinação da configuração do integron pela técnica “Step by Step”. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram, *int1*, *aad1*, *qac*, *sul1*. A metodologia de PCR quantitativa descrita anteriormente foi utilizada para a avaliação do posicionamento do gene *sul1*.

4.6.1 Parâmetros da amplificação em cadeia da polimerase do integron

Int1/qac: TA:56°C com 32 ciclos (45 seg-94°C /30 seg-56°C/ 1:30 min-72°C);

Int1/sul1: TA:56°C com 32 ciclos (45 seg-94°C /30 seg-56°C/ 1:30 min-72°C);

Int1/aad1: TA:54°C com 32 ciclos (45 seg-94°C /30 seg-56°C/ 1:30 min-72°C);

aad1/sul1: TA:56°C com 32 ciclos (45 seg-94°C /30 seg-56°C/ 1:30 min-72°C);

4.6.2 Oligonucleotídeos iniciadores (“Primers”) (Tabela 4)

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores para determinação da posição do gene *sul1* no integron de classe 1

Gene	Sequência de oligonucleotídeos Iniciadores (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referência/ Nº GenBank
<i>sul1</i>	ATGGTGACGGTGTTTCGGCATTCTGA CTAGGCATGATCTTAACCCCTCGGTCT	840	Toleman et al., 2006 AJ313522
<i>int1</i>	CCGTAGAAGAACAGC	457	Toleman et al., 2006 AF318072
<i>qac</i>	GTTGCGATTACTTCG	320	Levesque et al., 1996 AJ313522
<i>aad1</i>	CGCCGAAGTATCGACTCAAC GACTACCTTGGTGATCTCGC	450	Toleman et al., 2006 AJ313522

4.7 Sequenciamento

Após a amplificação do gene por meio da PCR, pelo menos um dos produtos gerados para cada reação foi submetido a uma nova reação de PCR com os oligonucleotídeos de interesse para seqüenciamento do gene. O gene amplificado foi purificado usando o kit “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification” (GE healthcare, EUA) conforme instruções do fabricante. A quantificação do DNA foi estimada através de uma corrida de eletroforese em gel de agarose a 2% com peso Low DNA Mass Ladder (invitrogen, EUA).

O sequenciamento foi realizado no setor de sequenciamento do genoma humano da USP utilizando o sistema de análise de DNA ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystem, EUA). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As sequências foram analisadas pelo software BioEdit v7.0.9. A sequencia genética foi comparada com banco de dados disponível na internet (BLAST – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

4.8 Transferencia plasmidial por choque térmico

4.8.1 Produção da cepa receptora *E. coli* DH10B e *E. coli* TOP10

As amostras foram semeadas em caldo Luria bertonni (LB) ou caldo Muller Hinton e incubadas “overnight”. Posteriormente foram aliquotados 100µL da amostra em 100mL do caldo LB e incubado por 3 horas a 37°C

em agitação constante. Foi transferido o caldo com bactéria para tubo estéril de 50mL e mantido no gelo por 10 min. A cultura foi centrifugada a 2700g por 10min a 4°C e descartado o sobrenadante. O pellet foi suspenso em 30mL de $MgCl_2$ - $CaCl_2$ gelado. E novamente foi centrifugado a 2700g por 10min a 4°C. Foi descartado o sobrenadante e suspenso de novo em 2mL de $CaCl_2$ 0,1M gelado para cada 50mL. A amostra da célula receptora pronta foi aliquotada e estocada a -70° C.

4.8.2 Extração de plasmideo por lise alcalina para transformação

As seguintes soluções foram utilizadas:

4.8.2.1 Soluções utilizadas

Solução I : 2mg/mL de lisozima, 50mM de glicose, 10mM de CDTA ou EDTA e 25mM Tris-HCL.

Solução II: 0,2 M de NaOH e 1% de SDS.

Solução III: 3 M de acetato de sódio com pH de 4,8 corrigido com ácido acético glacial.

4.8.2.2 Procedimento

As amostras foram incubadas em caldo LB por 18 horas. Foi transferido 0,5mL da amostra para tubo eppendorf e centrifugada por 15 seg a 10.000g. Após, o sobrenadante foi removido. Ao pellet foi adicionado 100µL da solução I

por cada eppendorf misturando lentamente. A amostra foi incubada a 0° C por 30 min. Após foi adicionado rapidamente 200µL da solução II e misturado no vortex. Foram Adicionados 150µL da solução III e misturado por inversão. Posteriormente a amostra foi incubada a 0° C por 60 minutos e centrifugada por 5 minutos a 10.000g. Posteriormente, foram transferidos para outro tubo 400 µL do sobrenadante e adicionado 1mL de etanol gelado incubando a -20°C por 30 min. O precipitado coletado foi centrifugado por 2 minutos. O sobrenadante foi removido por aspiração. O pellet foi dissolvido em 100 µL do 0,1M de acetato de Sódio e 0,05 TRIS e novamente precipitado com 200 µL de etanol gelado e incubação a -20°C por 10 minutos. Posteriormente foi centrifugado por 2 min e o sobrenadante removido por aspiração. Novamente o pellet foi dissolvido em 100ul do 0,1M acetato/0,05TRIS e novamente precipitado com 200ul de etanol. O produto da transformação foi suspenso em 40 ul de água Milli-Q.

4.8.3 Transformação da bactéria competente *E.coli* DH10B ou *E. coli* TOP 10

Foram aliqotados 50 µL do caldo de suspensão da *E. coli* competente + 10µL do DNA plasmidial (50ng). Após, foram incubados no gelo por 20-30 minutos. Foram transferidos para o banho-maria a 42°C por 90 segundos e levado no gelo por 2 minutos. Após foram Adicionados 950µL do caldo LB para cada tubo. As amostras foram incubadas por 10 min a 37°C sob agitação contínua. Foram Transnsferidos 100-300-500 µL para cada placa com antibiótico adequado (Levofloxacino) + 20mM MgSO₄ e

incubar por 24-48 horas. A leitura das placas foi realizada por observação direta. Uma colônia de crescimento foi semeada em caldo LB “overnight” para realizar a CIM da amostra transformada.

4.9 Tipagem molecular – Protocolo para caracterização molecular por eletroforese de campo pulsado (PFGE)

A análise molecular foi feita pela técnica de eletroforese de campo pulsado, de acordo com os protocolos descritos por Kaufmann et al, (1998).

4.9.1 Preparo da suspensão bacteriana

As bactérias foram repicadas em meio ágar sangue de carneiro 5% (AS) e incubadas por 18 a 24h, em temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Três a cinco colônias foram transferidas para tubos contendo 3mL de caldo e incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, “overnight”. Foram transferidos aos microtubos, previamente pesados e identificados, cerca de 2mL do caldo com crescimento bacteriano. Os microtubos foram centrifugados por 20 minutos a 11.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e, em seguida, o sedimento foi lavado três vezes com 1 mL de solução fisiológica estéril. Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o microtubo foi pesado em balança analítica. A massa bacteriana foi calculada e, em seguida, foi adicionado um volume adequado de solução de EDTA 25mM pH 8,0, para obter uma suspensão bacteriana de concentração final de $100\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.9.2 Preparo dos blocos de agarose

O banho-maria foi ajustado para temperatura de 56°C. Após a fundição da agarose low melting (2% em TBE 0,5X) esta foi deixada no banho-maria a 56°C. Os microtubos foram identificados com os números das amostras e foi adicionado 300µL de tampão TEM. A esse tampão foram adicionados 5µL da suspensão bacteriana a 100µg/µL. Os microtubos foram homogeneizados e colocados no banho-maria a 56°C. Foi adicionado 30µL de lizosima (20mg/mL). E após, foi adicionado 340µL de agarose e homogeneizado. Essa mistura foi distribuída nos moldes e deixada por 15 minutos a 4°C.

4.9.3 Etapa de extração do DNA bacteriano

Foram distribuídos 2 mL de tampão EC nos pocinhos de uma placa de cultura de células (24 poços). Os bloquinhos de agarose foram removidos dos moldes e colocados nos pocinhos contendo tampão EC. Foram incubados por 5h a 37°C, sob agitação suave. O tampão EC foi retirado e em cada pocinho foi adicionado 2 mL de tampão CHEF-TE. Retirado o tampão CHEF-TE e novamente adicionado 2 mL deste tampão. Foi deixada a temperatura ambiente, sob agitação suave por 30 minutos. E após, retirado o tampão CHEF-TE. Os bloquinhos foram cobertos com 2mL de tampão ES e foi adicionado 100µL de proteinase K (20mg/mL) por pocinho e homogeneizado. Foi realizada uma incubação a 50°C “overnight”. Retirado o

tampão ES, foram realizadas cinco lavagens com 2 mL de tampão CHEF-TE. A primeira lavagem não tem incubação e as demais foram feitas em intervalos de 1 hora. Após a última lavagem, o tampão CHEF-TE foi trocado e a placa foi guardada sob refrigeração.

4.9.4 Etapa de restrição enzimática

Foram adicionados 300µL de tampão DNS nos pocinhos que foram usados, em uma placa de cultura de 96 pocinhos. Com auxílio de uma espátula e bisturi, o bloquinho de agarose foi pego e cortado ao meio. Os pedaços foram colocados no pocinho contendo DNS. Retirado o tampão DNS, foram realizadas 5 lavagens com tampão DNS, com incubações de 1 hora por lavagem em temperatura ambiente. Retirado o tampão DNS foi adicionada 1U da enzima *Spe1*-fast (Fermentas-EUA) por amostra, adicionado o tampão da enzima. Incubando por 7 minutos a 37°C e posteriormente inativada com solução CHEF-TE gelado.

4.9.4 Preparo do gel

Os blocos tratados foram aplicados em gel de agarose a 1% (em TBE 0,5X). A eletroforese foi realizada no sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) e o tampão de corrida utilizado (2 litros de TBE 0,5X) acrescido de 200µL de tiouréa 0,5M.

4.9.5 Condição da corrida

As condições de corrida foram de 5 a 90 segundos (*switch time* inicial-final), 6 V/cm (corrente elétrica) e período de corrida de 19 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (1 µg/mL) por 30 minutos, descorado em água destilada por mais 30 minutos e fotografado sob luz ultravioleta.

4.9.6 Interpretação dos resultados

O polimorfismo molecular dos perfis gerados pela PFGE foi analisado de acordo com critérios propostos por Tenover et al, 1997, para caracterização molecular de bactérias (Tabela 5).

Tabela 5. Critérios interpretativos para análise de tipagem molecular

Interpretação microbiológica baseada nos resultados de tipagem	Número de diferenças genéticas comparadas com um determinado isolado	Número de fragmentos diferentes comparados ao padrão de determinado isolado	Correlação epidemiológica
Indistinguíveis	0	0	Isolado faz parte do surto isolado
Estreitamente relacionados	1	2-3	Provavelmente faz parte do surto
Possivelmente relacionados	2	4-6	Possivelmente faz parte do surto
Diferentes	3	≥7	Isolado não faz parte do surto

5 RESULTADOS

Foram identificados por meio dos registros de infecção hospitalar da CCIH do Instituto Central do HC-FMUSP, do registro de culturas do laboratório central do Instituto Central do HC, da CCIH do Hospital A.C. Camargo um total de 118 culturas positivas para *S. maltophilia* no período de dezembro de 2008 a dezembro de 2010. Cento e duas amostras do IC-HC e quinze amostras do Hospital AC Camargo.

Doze culturas foram excluídas do estudo, nove amostras foram excluídas por não serem *S. maltophilia* na reidentificação, duas amostras não apresentaram crescimento e uma amostra foi isolada de criança.

5.1 Identificação das cepas de *S. maltophilia*

Na reidentificação pela metodologia API-20 NE (bioMiéurex-França), nove amostras não foram confirmadas como *S. maltophilia*, sendo três amostras identificadas como *Bulkhorderia cepacia*, duas amostras identificadas como *Aeromonas hydrophila*, dois amostras identificadas como *Pseudomonas luteola*, uma amostra identificada como *Acinetobacter baumannii*, uma cepa identificada como *Delftia acidovorans* e uma amostra identificada como *Pseudomonas aeruginosa*. Essas amostras foram excluídas do estudo.

A tabela 6 mostra a distribuição dos isolados de *S. maltophilia* de acordo ao sítio de infecção.

Tabela 6. Distribuição dos 106 isolados de *S. maltophilia* por sítio de isolamento

Amostras	Número de amostras	Porcentagem
Sangue periférico	28	26,4%
Sangue CVC	21	19,8%
Ponta de cateter	3	2,8%
Secreção traqueal	28	26,4%
LBA	3	2,8%
Líquido pleural	1	0,9%
Urina	11	10,3%
Osso	2	1,8%
Líquido ascítico	1	0,9%
Líquido biliar	1	0,9%
Outros	7	6,6%
Total	106	100%

CVC:cateter venoso centra; LBA:lavado broncoalveolar.

5.2 Dados demograficos

A idade média dos pacientes foi de 57 anos. Sesenta e dois (58%) dos pacientes com infecção por *S. maltophilia* foram do sexo masculino.

Tabela 7. Distribuição das infecções por *Stenotrophomonas maltophilia*

Infecção	n=106	(%)
ICS Primária	15	14,1
ICS relacionada ao CVC	32	30,1
ITR	37	34,9
ITU	11	10,3
Osteomielite	2	1,8
Sinusite	1	0,9
Outras	8	7,5

ICS:infecção de corrente sanguínea; CVC:cateter venoso central; ITR:infecção de trato respiratório, ITU:infecção de trato urinário.

Os pacientes apresentavam diversos diagnósticos de base (Tabela 8).

Tabela 8. Diagnóstico de base dos pacientes com infecção por *Stenotrophomonas maltophilia*

Diagnóstico	n=106	%
Tumor órgão sólido	11	10,3
Neoplasia hematológica	15	14,1
Doença respiratória crônica	40	37,7
Aids	1	0,9
Insuficiência renal crônica	10	9,4
Doença cardiovascular	7	6,6
Trauma	6	5,6
Outros	16	15,6

5.3 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Foram determinadas as CIM dos antimicrobianos, pelo método de microdiluição em caldo, para 106 isolados de *S. maltophilia* (Tabela 9).

Tabela 9. Sensibilidade de oito antimicrobianos pelo método de microdiluição de 106 isolados de *S. maltophilia*.

Antimicrobiano	R	S	I
Sulfametoxazol /trimetoprima	23(21,6%)	83 (78,3%)	-
Levofloxacino	14 (13,3%)	87 (82%)	5 (4,7%)
Ceftazidima	72 (68%)	22 (20,7%)	12(11,3%)
Minociclina	0 (0,0%)	105 (99%)	1 (1%)
Ciprofloxacino	62 (58,5%)	15(14,2%)	29 (27,3%)
Cloranfenicol	33 (31,1%)	33 (31,1%)	40 (37,8%)
Ticarcilina-Ácido. Clavulanato	25 (23,6%)	29 (27,4%)	52 (49%)
Tigeciclina	2 (1,8%)	97 (91,6%)	7 (6,6%)

Foram determinadas as CIM₅₀ e CIM₉₀ dos antimicrobianos, pelo método de microdiluição em caldo, para 106 isolados de *S. maltophilia* (Tabela 10).

Tabela 10. Concentrações inibitórias mínimas (CIM₅₀ e CIM₉₀) pelo método de microdiluição de 106 isolados de *S. maltophilia*

Antimicrobianos	CIM ₅₀ µg/µL	CIM ₉₀ µg/µL
Sulfametoxazol/ trimetoprima	1	32
Levofloxacino	1	4
Ceftazidima	64	≥128
Minociclina	≤0,25	2
Ciprofloxacino	4	32
Cloranfenicol	16	64
Ticarcilina- Ácido clavulanato	32	128
Tigeciclina	1	2

As 23 amostras resistentes a SMX/TMP foram isoladas de 21 pacientes (91,3%) do Hospital das Clínicas e 2 (8,6%) pacientes do Hospital A.C Camargo (Tabela 11). Nove (17,4%) amostras foram isoladas em secreção traqueal, seis (26%) foram isoladas de amostra de sangue periférica, quatro (17,4%) amostras de cateter venoso central, uma (4,3%) amostra de osso, uma amostra de lavado bronco alveolar, uma amostra de urina e uma amostra de bile. Dezenove (82,6%) das amostras foram isoladas em pacientes com uso prévio de SMX/TMP, 9 (39,1%) pacientes tinham doença oncológica, 7 (22,5%) pacientes eram de unidade de terapia intensiva e 7 (22,5%) pacientes estavam internados na enfermaria no momento da infecção, porém tinham passagem prévia por unidade de terapia intensiva. As 23 amostras apresentaram, resistência a outros antimicrobianos (Tabela 12). Das amostras resistentes a SMX/TMP nenhuma amostra apresentou resistência a minociclina. Duas (8,6%) amostras apresentaram resistência intermediária para tigeciclina. Doze (52%) amostras apresentaram resistência para levofloxacino. Uma (4,3%) amostra apresentou resistência para sete antimicrobianos testados exceto minociclina. Essa amostra foi isolada de secreção traqueal de um paciente com infecção de trato respiratório e que recebeu vários antimicrobianos antes do isolamento da *S. maltophilia*, entretanto, o paciente não evoluiu para óbito.

Tabela 11. Características das 23 amostras resistentes a SMX/TMP

Cepa	Hospital	Amostra	SMX/TMP prévio	Integron	Sul-1	R/SMX/TM P
1	HC	LBA	+	-	-	8
2	A.C Camargo	Cateter	+	+	+	8
3	A.C Camargo	Cateter	+	+	+	>128
4	HC	Sangue	+	-	-	8
5	HC	Osso	-	+	-	16
6	HC	Sangue	+	+	-	8
7	HC	Sangue	-	-	-	16
8	HC	S. traqueal	+	+	-	32
9	HC	S. traqueal	+	+	-	8
10	HC	S. traqueal	+	-	-	8
11	HC	Sangue	+	-	-	4
12	HC	Cateter	+	+	+	32
13	HC	Cateter	+	-	-	32
14	HC	bile	-	-	-	16
15	HC	S. traqueal	+	+	-	16
16	HC	S. traqueal	+	-	-	4
17	HC	S. traqueal	+	-	-	16
18	HC	Sangue	+	-	+	32
19	HC	Urina	-	-	+	8
20	HC	S. traqueal	+	-	+	4
21	HC	Sangue	+	-	+	128
22	HC	S. traqueal	+	+	+	8
23	HC	S. traqueal	+	-	+	128

R/SMX/TMP: CIM da sulfametoxazol/trimetoprima, HC:Hospital das Clínicas da FMUSP, LBA:lavado bronco alveolar, S. traqueal:secreção traqueal.

Tabela 12. Perfil de resistência das 23 amostras de *S. maltophilia* resistentes a SMX/TMP

Amostra	Resistência						
	S/T	Levo	CAZ	CIP	CLO	TIG	T/C
1	+	+	+	+	+		+
2	+		+	+	+		+
3	+		+	+	+		+
4	+	+	+	+	+	+	
5	+		+	+	+		+
6	+		+	+	+		+
7	+		+	+	+		+
8	+		+	+			+
9	+	+	+	+	+		+
10	+		+	+	+		+
11	+	+	+	+			+
12	+	+	+	+			
13	+		+	+	+		+
14	+	+	+	+	+		+
15	+	+	+	+			+
16	+		+	+			+
17	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+		+
19	+	+	+	+			+
20	+	+	+	+	+		+
21	+	+	+	+	+		+
22	+		+	+	+		
23	+		+	+			+

S/T:Sulfametoxazol/trimetoprima; Levo:levofloxacino; CAZ:ceftazidima;
CLO:cloranfenicol; TIG:tigeciclina; T/C:ticarcilina/clavulanato.

A resistência ao levofloxacino foi observada em 19 amostras (Tabela 13), sendo 14 (13,3%) resistentes e cinco (4,7%) intermediárias. Seis (33,3%) amostras resistentes foram isoladas em pacientes com uso prévio

de levofloxacino. Seis (33,3%) das amostras foram isoladas em sangue, seis (33,3%) amostras foram de secreção traqueal, três (16,6%) amostras de cateter, duas (11,1%) amostras de lavado bronco alveolar e uma amostra (5,5%) amostra de urina. Oito (42,1%) pacientes tinham doença oncológica, 11 (58%) pacientes eram de unidade de terapia intensiva e 7 (22,5%) pacientes estavam internados na enfermaria no momento da infecção, porém tinham passagem prévia por unidade de terapia intensiva.

Tabela 13. Características das 19 amostras resistentes ao levofloxacino

Cepa	Hospital	Amostra	Levo prévio	R/Levo
1	HC	LBA	-	4
2	HC	LBA	-	8
3	HC	Sangue	+	32
4	HC	S. Traqueal	-	8
5	HC	Cateter	+	16
6	HC	Cateter	-	4
7	HC	S. Traqueal	+	8
8	HC	Sangue	-	16
9	HC	Sangue	-	4
10	HC	Urina	+	64
11	HC	Cateter	+	16
12	HC	S. traqueal	-	8
13	HC	S, traqueal	-	8
14	HC	Sangue	-	4
15	HC	Sangue	-	8
16	HC	S. traqueal	-	4
17	HC	S. traqueal	-	16
18	HC	Sangue	+	32
19	HC	Urina	-	8

Levo prévio: uso de levofloxacino previamente, R/levo: CIM de levofloxacino, HC: Hospital das Clínicas da FMUSP, LBA: lavado bronco alveolar, S. traqueal: secreção traqueal.

5.4 Teste de sensibilidade com inibidores de bomba de efluxo

A CIM para levofloxacino e ciprofloxacino em 15 cepas resistentes ao levofloxacino não foi alterada na presença de reserpina ou carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona. Para levofloxacino a CIM₉₀ sem a presença do inibidor foi de 16 µg/mL e a CIM₅₀ foi de 8 µg/mL e para ciprofloxacino CIM₉₀ foi de 64 µg/mL e CIM₅₀ de 32 µg/mL. Na presença do inibidor a CIM₉₀ foi de 16 µg/mL e CIM₅₀ foi de 8 µg/mL e para ciprofloxacino CIM₉₀ de 32 µg/mL e CIM₅₀ de 16 µg/mL.

Entre essas cepas, foram testados dois isolados sensíveis ao levofloxacino (amostra 15 e 32) que ficaram resistentes na vigência do tratamento com esse antimicrobiano (amostra 16 e 33) (Tabela 14).

Tabela 14. Concentração inibitória mínima (CIM) com a presença ou ausência dos inibidores de efluxo reserpina e CCCP em amostras sensíveis ou resistentes a levofloxacino.

Amostra	CIM µg/mL					
	cipro	cipro/ reserpina	cipro/ CCCP	Levo	levo/ reserpina	levo/ CCCP
15	16	8	4	1	0,5	1
16	>128	128	64	32	16	8
32	32	32	16	1	0,5	0,5
33	64	32	8	16	16	8

Cipro:ciprofloxacino; levo:levofloxacino, CCCP: carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona

5.5 Reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção dos genes de resistência ao sulfametoxazol/trimetoprima

Foi realizado PCR para detecção dos genes *sul1*, *sul2* e *dfrA1* para avaliar a resistência a SMX/TMP das 106 amostras e os genes *int1* e *iscr2* para avaliação da presença de elementos genéticos móveis nas amostras resistentes.

Quatorze amostras (13,2%) foram positivas para o gene *sul1*. Desses isolados, nove amostras apresentavam resistência a SMX/TMP com CIM₅₀ de 8 µg/mL e CIM₉₀ de 128 µg/mL. Cinco amostras positivas para o gene *sul1* foram sensíveis a SMX/TMP com CIM₅₀ de 1 µg/mL e CIM₉₀ de 1 µg/mL.

Entre as cepas negativas para o gene *sul1*, 14/96 (15,2%) amostras apresentaram resistência a SMX/TMP com CIM₅₀ de 8 µg/mL e CIM₉₀ de 32 µg/mL.

Das amostras negativas para o gene *sul1* com resistência a SMX/TMP foi observada a presença do gene *sul2* em uma amostra (0,9%), que apresentou CIM de 16 µg/mL, nenhuma cepa sensível a SMX/TMP foi positiva para o gene *sul2*.

Em relação ao gene *dfrA1*, das 106 cepas testadas, apenas uma amostra sensível a SMX/TMP foi positiva, exibindo CIM de 0,25 µg/mL.

Vinte e uma amostras (19,8%) foram positivas para o gene da integrase 1 (*int1*). Sete amostras positivas para o gene *sul1* foram positivas para o gene da *int1* com CIM₅₀ de 8 µg/mL e CIM₉₀ de 128 µg/mL. Quatorze

amostras positivas para o gene *int1* foram negativas para o gene *sul1*, exibindo CIM₅₀ de 2 µg/mL e CIM₉₀ de 16 µg/mL.

A sequência de inserção da região comum (ISCR2) foi avaliada nas amostras resistentes a SMX/TMP, sendo identificada apenas na cepa positiva para o gene do *sul2* (Figura 1).

pm – peso molecular; coluna 1, 2 e 19 – controles de esterilidade; coluna 3 – amostra positiva; colunas 4 a 18 – amostras negativas.

Figura 1. Reação de PCR para detecção do gene iscr2 em isolados resistentes a SMX/TMP de *S. maltophilia*

5.6 Sequenciamento dos genes relacionados à resistência para SMX/TMP

Para cada gene estudado pelo menos uma amostra positiva foi seqüenciada e após confirmação do gene, essa amostra foi usada como controle positivo para reação de PCR do gene em questão.

Para confirmar a presença do gene *sul1*, foi realizado o seqüenciamento de uma amostra resistente e outra cepa sensível ao SMX/TMP, com CIM de 8 µg/mL e 0,5 µg/mL respectivamente.

As sequencias obtidas apresentaram, tamanho de 755 pb e o alinhamento realizado no programa ClustaW mostrou que as sequencias foram idênticas a sequencia do gene *sul1* de *P. aeruginosa* depositada no GenBank nº HQ634775.2.

Na análise do alinhamento das sequencias de aminoácidos não observamos diferenças nas amostras avaliadas.

Em relação ao gene *sul2*, a amostra positiva para o gene *sul2* foi seqüenciada obtendo uma sequencia de 730 pb. Na comparação com a sequencia do gene *sul2* de *A. baumannii* depositada no GenBank nºFN293019.1 a amostra mostrou identidade de 100% com a sequencia controle. Na amostra *sul2* positiva foi realizada PCR para o gene *iscr2* cujo produto amplificado foi posteriormente foi seqüenciado. O alinhamento da sequencia foi realizado pelo programa ClustaW. Obtivemos uma sequencia de 1713pb da sequencia de inserção ISCR2 (IS-92-like). O alinhamento das sequencias mostrou identidade de 100% com a sequencia do plasmídio pMTSm4 de uma amostra de *S. maltophilia* depositada no GenBank nºAM182030. Essa sequencia de inserção esta localizada a 190pb de distância do gene *sul2*.

A cepa positiva para a enzima *dfrA1* pela técnica de PCR também foi seqüenciada. A análise da sequencia mostrou 100% de identidade com a sequencia da *dfrA1* localizada no integron de classe I de uma cepa de

Proteus mirabilis NF915770 depositada no GenBank nºHQ880252. Não foi observada a presença de *int1* ou *iscr2* nessa amostra.

5.7 Análise dos elementos genéticos móveis

A esquematização dos genes sequenciados da cepa positiva para o gene *sul2* e *iscr2*, mostrou uma sequência de 1713pb correspondente ao gene *iscr2*, seguida de uma região de 184pb que representa o pseudogene da mutase fosfoglicosamina (*glmM*) e adjacente se localizou o gene *sul2* de 730pb (Figura 2)

Figura 2. Representação esquemática da sequência *iscr2* e genes adjacentes de uma amostra positiva para o gene *sul2* de *S. maltophilia*

A pesquisa da conformação de integrons em cepas positivas para o gene *sul1* foi realizada em duas amostras positivas para o gene *sul1* e *int1*. Amostra 1 com CIM para SMX/TMP de >125 µg/mL e a amostra 2 com CIM de 8 µg/mL.

A sequencia do integron1 da amostra com CIM >125 µg/mL mostrou um tamanho aproximado de 4000 pb contendo os genes cassetes *aac4* e *aadA1* e a região *qac/sul1* (Figura 3).

Figura 3. Representação esquemática do integron classe 1 em amostra de *S. maltophilia* resistente a SMX/TMP com CIM de >125 µg/mL

A sequencia da amostra com CIM de 8 µg/mL teve um tamanho aproximado de 2000 pb (Figura 4) e contem o gene cassete *aadA1* e a região terminal *qac/sul1*.

Figura 4. Representação esquemática do integron classe 1 em amostra de *S. maltophilia* resistente a SMX/TMP com CIM de 8 µg/mL

5.8 Reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção dos genes de resistência as quinolonas

A detecção de genes de resistência do sistema de efluxo *smeDEF* e de seu promotor foi realizado pela detecção dos genes *smeD* e *smeT* em 106 isolados de *S. maltophilia*. Noventa e seis (90,5%) amostras apresentaram o gene *smeD*. O gene do promotor *smeT* foi pesquisado em 38 amostras, 12 (31,5%) foram amostras sensíveis ao levofloxacino. Apenas quatro amostras foram negativas, todas resistentes ao levofloxacino, porém não houve correlação entre o perfil de resistência e a presença do gene *smeT* (Figura 5).

pm – peso molecular; coluna 1 e 2 – controles de esterilidade; coluna 3 – controle positivo; colunas 4 a 10 – amostras positivas; coluna 11 amostra negativa.

Figura 5. Reação de PCR para detecção do gene *smeT* em isolados de *S. maltophilia* resistentes ao levofloxacino

A pesquisa do gene codificador da enzima *aac(6')-ib-cr* foi realizada por PCR em 106 amostras. Sessenta e sete (63,2%) foram positivas. Para as amostras positivas a CIM₅₀ foi de 1 µg/mL e a CIM₉₀ foi de 8 µg/mL e para as amostras negativas as CIM₅₀ foi 1 µg/mL de e a CIM₉₀ foi de 4 µg/mL.

Em relação aos genes *qnr*, das 106 amostras testadas não foi observada a presença dos genes *qnrA*, *qnrB* ou *qnrS*. O mesmo aconteceu com o gene específico para *S. maltophilia* *qnrM*. Entretanto, o gene *qnrSM* foi positivo em 83 (78,3%) das cepas estudadas.

5.9 Avaliação de mutações genéticas de genes relacionados à resistência as quinolonas

Foram avaliadas sequencias genéticas dos genes *gyrase A*, da enzima *aac(6')-ib-cr* e dos genes *qnr*.

5.9.1 Avaliação de mutações genéticas de gene da girase A (*gyrA*)

Foi realizado o seqüenciamento de 17 amostras, 15 resistentes a levofloxacino e duas amostras sensíveis que posteriormente apresentaram resistência após o inicio do tratamento com levofloxacino. O seqüenciamento das 17 amostras foi comparada com a sequencia do gene *gyrA* de *S. maltophilia* sensível ao levofloxacino depositada no *GenBank* nº AJ409325. Na análise comparativa da sequencia de nucleotídeos observamos mutações pontuais nas posições: 106, 129, 144, 159, 162, 165, 171, 183,

189, 204, 225 (Tabela 15). As amostras com CIM de 16 µg/mL apresentaram um número maior de mutações pontuais, porém, não observamos alteração na sequência de aminoácidos. As sequências das duas amostras sensíveis foram 100% idênticas com a sequência controle.

A seguir a descrição das sequências da *gyrA* em 15 amostras resistentes a levofloxacino em comparação com a cepa controle (cont), As mutações pontuais aparecem em vermelho,

Cont -	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A8	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A10	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	L	P	T	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A12	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A14	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A16	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A18	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A20	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A22	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A24	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A26	1	GCG	CAC	AGC	AAC	aAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A28	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A30	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A32	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A34	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15
A36	1	GCG	CAC	AGC	AAC	AAG	CCC	TAC	TTC	AAG	TCG	GCG	CGT	ATC	GTC	GGT	45
	1	A	H	S	N	K	P	Y	F	K	S	A	R	I	V	G	15

Cont	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTC	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A8	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTG	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A10	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTG	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	T	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A12	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTG	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A14	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTG	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A16	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTG	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A18	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTG	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A20	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTG	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A22	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTG	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A24	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTG	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A26	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTG	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A28	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTG	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A30	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTA	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A32	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTG	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A34	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTG	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
A36	46	GAC	GTC	ATC	GGT	AAG	TAC	CAC	CCG	CAT	GGC	GAT	CAG	TCG	GTG	TAC	90
	16	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	Q	S	V	Y	30
Cont	91	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	CTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGT	TAC	ATG	135
	31	D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	45
A8	91	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	CTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGT	TAC	ATG	135
	31	D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	45
A10	91	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	CTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGT	TAC	ATG	135
	31	A	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	45
A12	91	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	TTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGC	TAC	ATG	135
	31	D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	45
A14	91	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	CTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGT	TAC	ATG	135
	31	D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	45
A16	91	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	CTC	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGT	TAC	ATG	135
	31	D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	45

A18	91 31	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	TTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGC	TAC	ATG	135 45
		D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	
A20	91 31	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	CTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGT	TAC	ATG	135 45
		D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	
A22	91 31	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	CTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGT	TAC	ATG	135 45
		D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	
A24	91 31	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	TTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGC	TAC	ATG	135 45
		D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	
A26	91 31	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	CTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGC	TAC	ATG	135 45
		D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	
A28	91 31	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	CTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGC	TAC	ATG	135 45
		D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	
A30	91 31	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	CTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGT	TAC	ATG	135 45
		D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	
A32	91 31	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	CTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGC	TAC	ATG	135 45
		D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	
A34	91 31	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	CTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGT	TAC	ATG	135 45
		D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	
A36	91 31	GAC	ACG	CTG	GTG	CGC	CTG	GCA	CAG	CCG	TTC	TCG	CTG	CGC	TAC	ATG	135 45
		D	T	L	V	R	L	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	
Cont	136 46	CTG	GTC	GAT	GGC	CAG	GGT	AAC	TTC	GGC	TCC	ATC	GAT	GGC	GAC	TCC	180 60
		L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	I	D	G	D	S	
A8	136 46	CTG	GTC	GAT	GGC	CAG	GGT	AAC	TTC	GGC	TCC	ATC	GAT	GGC	GAC	TCC	180 60
		L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	I	D	G	D	S	
A10	136 46	CTG	GTC	GAT	GGC	CAG	GGT	AAC	TTC	GGC	TCC	ATC	GAT	GGC	GAC	TCC	180 60
		L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	I	D	G	D	S	
A12	136 46	CTG	GTC	GAC	GGC	CAG	GGT	AAC	TTC	GGT	TCG	ATC	GAC	GGC	GAC	TCC	180 60
		L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	I	D	G	D	S	
A14	136 46	CTG	GTC	GAT	GGC	CAG	GGT	AAC	TTC	GGC	TCC	ATC	GAT	GGC	GAC	TCC	180 60
		L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	I	D	G	D	S	
A16	136 46	CTG	GTC	GAT	GGC	CAG	GGT	AAC	TTC	GGC	TCC	ATC	GAT	GGC	GAC	TCC	180 60
		L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	I	D	G	D	S	
A18	136 46	CTG	GTC	GAC	GGC	CAG	GGT	AAC	TTC	GGT	TCG	ATC	GAC	GGC	GAC	TCC	180 60
		L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	I	D	G	D	S	
A20	136 46	CTG	GTC	GAT	GGC	CAG	GGT	AAC	TTC	GGC	TCC	ATC	GAT	GGC	GAC	TCC	180 60
		L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	I	D	G	D	S	
A22	136 46	CTG	GTC	GAT	GGC	CAG	GGT	AAC	TTC	GGC	TCC	ATC	GAT	GGC	GAC	TCC	180 60
		L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	I	D	G	D	S	
A24	136 46	CTG	GTC	GAC	GGC	CAG	GGT	AAC	TTT	GGT	TCG	ATC	GAC	GGC	GAC	TCC	180 60
		L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	I	D	G	D	S	
A26	136 46	CTG	GTC	GAC	GGC	CAG	GGT	AAC	TTT	GGT	TCG	ATC	GAC	GGC	GAC	TCC	180 60
		L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	I	D	G	D	S	

A28	136 46	CTG L	GTC V	GAC D	GGC G	CAG Q	GGT G	AAC N	TTT F	GGT G	TCG S	ATC I	GAC D	GGC G	GAC D	TCC S	180 60
A30	136 46	CTG L	GTC V	GAT D	GGC G	CAG Q	GGT G	AAC N	TTC F	GGC G	TCC S	ATC I	GAT D	GGC G	GAC D	TCC S	180 60
A32	136 46	CTG L	GTC V	GAT D	GGC G	CAG Q	GGT G	AAC N	TTC F	GGC G	TCC S	ATC I	GAT D	GGC G	GAC D	TCC S	180 60
A34	136 46	CTG L	GTC V	GAT D	GGC G	CAG Q	GGT G	AAC N	TTC F	GGT G	TCG S	ATC I	GAC D	GGC G	GAC D	TCC S	180 60
A36	136 46	CTG L	GTC V	GAC D	GGC G	CAG Q	GGT G	AAC N	TTT F	GGT G	TCG S	ATC I	GAC D	GGC G	GAC D	TCC S	180 60
Cont	181 61	GCC A	GCG A	GCA A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAA E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R	CTG L	GCG A	225 75
A8	181 61	GCC A	GCA A	GCA A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAA E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R	CTG L	GCG A	225 75
A10	181 61	GCC A	GCG A	GCA A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAA E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R	CTG L	GCG A	225 75
A12	181 61	GCT A	GCA A	GCA A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAG E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R			219
A14	181 61	GCC A	GCG A	GCA A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAA E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R	CTG L	GCG A	225 75
A16	181 61	GCC A	GCG A	GCA A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAA E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGT R	CTG L	GCG A	225 75
A18	181 61	GCT A	GCA A	GCA A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAG E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R			219
A20	181 61	GCC A	GCG A	GCA A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAA E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R	CTG L	GCG A	225 75
A22	181 61	GCC A	GCG A	GCA A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAA E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R	CTG L	GCG A	225 75
A24	181 61	GCT A	GCA A	GCA A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAG E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R	CCT P	GGC G	225 75
A26	181 61	GCT A	GCG A	GCG A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAG E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R	CTG L	GCG A	225 75
A28	181 61	GCT A	GCG A	GCG A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAG E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R	CTG L	GCG A	225 75
A30	181 61	GCC A	GCG A	GCA A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAA E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R	CTG L	GCG A	225 75
A32	181 61	GCC A	GCG A	GCG A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAA E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R	CTC L	GCG A	225 75
A34	181 61	GCC A	GCG A	GCG A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAG E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R	CTG L	GCG A	225 75
A36	181 61	GCT A	GCG A	GCG A	ATG M	CGA R	TAC Y	ACC T	GAG E	GCG A	CGC R	ATG M	TCG S	CGC R	CTG L	GCG A	225 75

Na tabela 15, mostramos o número e posição da alteração de nucleotídeos e a CIM da amostra avaliada.

Tabela 15. Avaliação das sequencias genéticas da girase A em 17 amostras de *S. maltophilia*

Amostra	CIM levo	Posição da mutação											
8	8											G189A	
10	4												
12	4	T106C	T129C			C162T	C165T	T171C	C183T	G189A	A204G		
14	4												
16	4												
18	4	T106C	T129C			C162T	C165T	T171C	C183T	G189A	A204G		
20	4												
22	8												
24	16	T106C	T129C	T144C	C159T	C162T	C165T	T171C	C183T	G189A	A204G	G225C	
26	16		T129C	T144C	C159T	C162T	C165T	T171C	C183T		A204G		
28	16		T129C	T144C	C159T	C162T	C165T	T171C	C183T		A204G		
30	8												
32	8												
34	16					C162T	C165T	T171C	C183T	G189A	A204G		
36	8		T129C	T144C		C162T	C165T	T171C	C183T	G189A	A204G		
38	2												
40	1												

CIM em µg/mL

5.10 Avaliação da sequencia genética dos genes *qnr*

Para avaliação dos genes *qnr* foi realizado o seqüenciamento de 13 cepas positivas para o gene *qnrMR*. Seis amostras foram sensíveis ao levofloxacino (amostras 7, 9, 11, 14, 31, 39) e sete amostras resistentes ao

levofloxacino (amostras 33, 35, 37, 41, 45, 47, 49). As mutações na sequência de aminoácidos são apresentadas na tabela 9.

A seguir a descrição das sequências das amostras estudadas comparadas com as sequências controle do gene *Smqnr1* (sensível a levofloxacino) GenBank nºAB430839 e a sequência controle do gene *Smqnr13* (resistente a levofloxacino) GenBank nºFJ596753. As diferenças de aminoácido aparecem em vermelho.

<i>Smqnr1</i>	G	A	D	Q	Y	T	G	Q	K	V	V	D	Q	Q	F	15
<i>Smqnr13</i>	G	A	D	Q	Y	T	G	Q	K	V	V	D	Q	Q	F	15
Smqnr9	G	A	D	Q	Y	T	G	Q	K	V	V	D	Q	Q	F	15
Smqnr11	G	A	D	Q	Y	T	R	P	E	S	G	R	P	A	V	15
Smqnr14	G	A	D	Q	Y	T	G	Q	K	V	V	D	Q	Q	F	15
Smqnr7	G	V	D	Q	Y	T	G	Q	K	V	V	D	Q	Q	F	15
Smqnr31	G	A	D	Q	Y	T	G	Q	K	V	V	D	Q	Q	F	15
Smqnr33	G	A	D	Q	Y	T	G	Q	K	V	V	D	Q	Q	F	15
Smqnr35	G	A	D	Q	Y	T	G	Q	K	V	V	D	Q	Q	F	15
Smqnr37	G	V	D	Q	Y	T	G	Q	K	V	V	D	Q	Q	F	15
Smqnr39	G	A	D	Q	Y	T	G	H	K	V	V	E	Q	Q	F	15
Smqnr41	G	V	D	Q	Y	T	G	Q	K	V	V	D	Q	Q	F	15
Smqnr45	S	A	D	Q	Y	T	G	Q	K	V	V	D	Q	Q	F	15
Smqnr47	G	V	D	Q	Y	T	G	Q	K	V	V	D	Q	Q	F	15
Smqnr49	G	V	D	Q	Y	T	G	Q	K	V	V	D	Q	Q	F	15

Smqnr1	H	E	C	D	F	S	G	A	D	L	T	G	T	E	F	30
Smqnr13	H	E	C	D	F	S	G	V	D	L	T	G	T	E	F	30
Smqnr9	H	K	C	D	F	S	G	A	D	L	T	G	T	E	F	30
Smqnr11	P	*	V	R	F	F	R	C	R	P	D	R	H	R	V	30
Smqnr14	H	E	C	D	F	S	G	A	D	L	T	A	T	E	F	30
Smqnr7	H	E	C	D	F	S	G	A	D	L	T	G	T	E	F	30
Smqnr31	H	E	C	D	F	S	G	V	D	L	T	A	T	E	F	30
Smqnr33	H	E	C	D	F	S	G	A	D	L	T	G	T	E	F	30
Smqnr35	H	E	C	D	F	S	G	A	D	L	T	A	T	E	F	30
Smqnr37	H	E	C	D	F	S	G	A	D	L	T	G	T	E	F	30
Smqnr39	H	E	C	D	F	S	G	A	D	L	T	A	T	E	F	30
Smqnr41	H	E	C	D	F	S	G	A	D	L	T	G	T	E	F	30
Smqnr45	H	E	C	D	F	S	G	A	A	L	T	G	T	E	F	30
Smqnr47	H	E	C	D	F	S	G	A	D	L	T	G	T	E	F	30
Smqnr49	H	E	C	D	F	S	G	A	D	L	T	G	T	E	F	30

Smqnr1	I	N	C	S	F	Y	D	A	D	T	R	A	G	C	R	45
Smqnr13	I	N	C	S	F	Y	D	A	D	S	R	T	G	C	R	45
Smqnr9	I	N	C	S	F	Y	D	A	D	S	R	A	G	C	R	45
Smqnr11	H	Q	L	Q	L	L	R	C	R	Q	P	Q	R	L	P	45
Smqnr14	I	N	C	S	F	Y	D	A	D	S	R	S	G	C	R	45
Smqnr7	I	N	C	S	F	Y	D	A	D	S	R	A	G	C	R	45
Smqnr31	I	N	C	S	F	Y	D	A	D	S	R	A	G	C	R	45
Smqnr33	I	N	C	S	F	Y	D	A	D	T	R	A	G	C	R	45
Smqnr35	I	N	C	S	F	Y	D	A	D	S	R	S	G	C	R	45

Smqnr37	I	N	C	S	F	Y	D	T	D	S	R	A	G	C	R	45
Smqnr39	I	N	C	S	F	Y	D	A	D	S	R	S	G	C	R	45
Smqnr41	I	N	C	S	F	Y	D	A	D	S	R	A	G	C	R	45
Smqnr45	I	N	C	S	F	Y	D	A	N	S	R	A	G	C	R	45
Smqnr47	I	N	C	S	F	Y	D	A	D	S	R	A	G	C	R	45
Smqnr49	I	N	C	S	F	Y	D	A	D	S	R	A	G	C	R	45

Smqnr1	F	N	G	A	T	L	K	E	A	S	F	R	S	C	D	60
Smqnr13	F	N	G	A	T	L	K	E	A	S	F	R	S	C	D	60
Smqnr9	F	N	G	A	T	L	K	E	A	S	F	R	S	C	D	60
Smqnr11	L	Q	W	R	H	I	E	G	G	Q	L	P	Q	L	R	60
Smqnr14	F	N	G	A	T	L	K	E	A	S	F	R	S	C	D	60
Smqnr7	F	N	G	A	T	L	K	E	A	S	F	R	S	C	D	60
Smqnr31	F	N	G	A	T	L	K	E	A	S	F	R	S	C	D	60
Smqnr33	F	N	G	A	T	L	K	E	A	S	F	R	S	C	D	60
Smqnr35	F	N	G	A	T	L	K	E	A	S	F	R	S	C	D	60
Smqnr37	F	N	G	A	T	L	K	E	A	S	F	R	S	C	D	60
Smqnr39	F	N	G	A	T	L	K	E	A	S	F	R	S	C	D	60
Smqnr41	F	N	G	A	T	L	K	E	A	S	F	R	S	C	D	60
Smqnr45	F	N	G	A	T	L	K	E	A	S	F	R	S	C	D	60
Smqnr47	F	N	D	A	T	L	K	E	A	S	F	R	S	C	D	60
Smqnr49	F	N	G	A	T	L	K	E	A	S	F	R	S	C	D	60

Smqnr1	I	S	M	C	H	F	S	F	I	K	A	L	G	L	E	75
Smqnr13	I	S	M	C	H	F	N	F	V	K	A	L	G	L	E	90
Smqnr9	I	S	M	C	H	F	N	F	I	K	A	L	G	L	E	75
Smqnr11	H	Q	H	V	P	L	Q	L	H	Q	G	A	G	P	G	75
Smqnr14	I	S	M	C	H	F	N	F	I	K	A	L	G	L	E	75
Smqnr7	I	S	M	C	H	F	N	F	I	K	A	L	G	L	E	75
Smqnr31	I	S	M	C	H	F	N	F	V	K	A	L	G	L	E	75
Smqnr33	I	S	M	C	H	F	S	F	I	K	A	L	G	L	E	75
Smqnr35	I	S	M	C	H	F	N	F	I	K	A	L	G	L	E	75
Smqnr37	I	S	M	C	H	F	N	F	I	K	A	L	G	L	E	75
Smqnr39	I	S	M	C	H	F	N	F	I	K	A	L	G	L	E	75
Smqnr41	I	S	M	C	H	F	N	F	I	K	A	L	G	L	E	75
Smqnr45	I	S	M	C	H	F	N	F	I	K	A	L	G	L	E	75
Smqnr47	I	S	M	C	H	F	N	F	I	K	A	L	G	L	E	75
Smqnr49	I	S	M	C	H	F	N	F	I	K	A	L	G	L	E	75

Smqnr1	I	S	E	C	R	A	Q	G	A	D	F	S	N	A	S	90
Smqnr13	I	S	E	C	R	A	Q	G	A	D	F	S	G	A	S	90
Smqnr9	I	S	E	C	R	A	Q	G	A	D	F	S	N	A	S	90
Smqnr11	D	Q	R	V	P	R	A	G	C	G	F	Q	Q	R	Q	90
Smqnr14	I	S	E	C	R	A	Q	G	A	D	S	S	N	A	S	90
Smqnr7	I	S	E	C	R	A	Q	G	A	D	F	S	N	A	S	90
Smqnr31	I	S	E	C	R	A	Q	G	A	D	F	S	N	A	S	90
Smqnr33	I	S	E	C	R	A	Q	G	A	D	F	S	N	A	S	90
Smqnr35	I	S	E	C	R	A	Q	G	A	D	F	S	N	A	S	90

Smqnr37	I	S	E	C	R	A	Q	G	A	D	F	S	N	A	S	90
Smqnr39	I	S	E	C	R	A	Q	G	A	D	F	S	N	A	S	90
Smqnr41	I	S	E	C	R	A	Q	G	A	D	F	S	N	A	S	90
Smqnr45	I	S	E	C	R	A	Q	G	A	D	F	S	N	A	S	90
Smqnr47	I	S	E	C	R	A	Q	G	A	D	F	S	N	A	S	90
Smqnr49	I	S	E	C	R	A	Q	G	A	D	F	S	N	A	S	90

Smqnr1	F	M	N	Q	I	T	T	R	S	W	F	C	S	A	F	105
Smqnr13	F	M	N	Q	I	T	P	R	S	G	F	C	S	A	F	105
Smqnr9	F	M	N	Q	I	T	T	R	S	G	F	C	S	A	F	105
Smqnr11	L	H	E	P	D	H	H	A	Q	L	V	L	Q	R	L	105
Smqnr14	F	M	N	Q	I	T	T	R	S	W	F	C	S	A	F	105
Smqnr7	F	M	N	Q	I	T	T	R	S	W	F	C	S	A	F	105
Smqnr31	F	M	N	Q	I	T	P	R	S	G	F	C	S	A	F	105
Smqnr33	F	M	N	Q	I	T	T	R	S	W	F	C	S	A	F	105
Smqnr35	F	M	N	Q	I	T	T	R	S	W	F	C	S	A	F	105
Smqnr37	F	M	N	Q	I	T	T	R	S	W	F	C	S	A	F	105
Smqnr39	F	M	N	Q	I	T	T	R	S	W	F	C	S	A	F	105
Smqnr41	F	M	N	Q	I	T	T	R	S	W	F	C	S	A	F	105
Smqnr45	F	M	N	Q	I	T	K	R	S	W	F	C	S	A	F	105
Smqnr47	F	M	N	Q	I	T	T	R	S	W	F	C	S	A	F	105
Smqnr49	F	M	N	Q	I	T	T	R	S	W	F	C	S	A	F	105

Smqnr1	I	K	K	S	N	L	R	Y	A	N	F	S	R	V	T	120
Smqnr13	I	K	K	S	N	L	R	Y	A	N	F	S	R	V	T	120

Smqnr9	I K K S N L R Y A N F S R V T	120
Smqnr11	H Q E V E P A L C Q F L A G H	120
Smqnr14	I K K S N L R Y A N F S R V T	120
Smqnr7	I K K S N L R Y A N F S R V T	120
Smqnr31	I K K S N L R Y A N F S R A T	120
Smqnr33	I K K S N L R Y A N F S R V T	120
Smqnr35	I K K S N L R Y A N F S R V T	120
Smqnr37	I K K S N L R Y A N F S R V T	120
Smqnr39	I K K S N L R Y A N F S R V T	120
Smqnr41	I K K S N L R Y A N F S R V T	120
Smqnr45	I K K S N L R Y A N F S R V T	120
Smqnr45	I K K S N L R Y A N F S R V T	120
Smqnr49	I K K S N L R Y A N F S R V T	120

Smqnr1	L E K C E L W E N R W D G A N	135
Smqnr13	L E K C E L W E N R W D G A N	135
Smqnr9	L E K C E L W E N R W D G A N	135
Smqnr11	A G E M R T V G E P L G R C K	135
Smqnr14	L E K C E L W E N R W D G A N	135
Smqnr7	L E K C E L W E N R W D G A N	135
Smqnr31	L E K C E L W E N R W D G A N	135
Smqnr33	L E K C E L W E N R W D G A N	135
Smqnr35	L E K C E L W E N R W D G A N	135
Smqnr37	L E K C E L W E N R W D G A N	135
Smqnr39	L E K C E L W E N R W D G A N	135

Smqnr41	L E K C E L W E N R W D G A N	135
Smqnr45	L E K C E L W E N R W D G A N	135
Smqnr47	L E K C E L W E N R W D G A N	135
Smqnr49	L E K C E L W E N R W D G A N	135

Smqnr1	V S G A S F A G S D L S G G Q	150
Smqnr13	V S G A S F A G S D L S G G Q	165
Smqnr9	V S G A S F A G S D L S G G Q	150
Smqnr11	R Q R R Q L C R L G P V R W P	150
Smqnr14	V S G A S F A G S D L S G G Q	150
Smqnr7	V S G A S F A G S D L S G G Q	150
Smqnr31	V S G A S F A G S D L S G G Q	150
Smqnr33	V S G A S F A G S D L S G G Q	150
Smqnr35	V S G A S F A G S D L S G G Q	150
Smqnr37	V S G A S F A G S D L S G G Q	150
Smqnr39	V S G A S F A G S D L S G G Q	150
Smqnr41	V S G A S F A G S D L S G G Q	150
Smqnr45	V S G A S F A G S D L S G G Q	150
Smqnr49	V S G A S F A G S D L S G G Q	150

Smqnr1	F E G I D W N S A N F T D C D	165
Smqnr13	F E G V D W N S A N F T D C D	180
Smqnr9	F E G I D W N S A N F T D C D	165
Smqnr11	V R G N R L E Q R Q L H R L R	165
Smqnr14	F E G I D W N S A N F T D C D	165
Smqnr7	F E G V D W N S A N F T D C D	165

Smqnr31	F	E	G	V	D	W	N	S	A	N	F	T	D	C	D	165
Smqnr33	F	E	G	I	D	W	N	S	A	N	F	T	D	C	D	165
Smqnr35	F	E	G	I	D	W	N	S	A	N	F	T	D	C	D	165
Smqnr37	F	E	G	V	D	W	N	S	A	N	F	T	D	C	D	165
Smqnr39	F	E	G	I	D	W	N	S	A	N	F	T	D	C	D	165
Smqnr41	F	E	G	V	D	W	N	S	A	N	F	T	D	C	D	165
Smqnr45	F	E	G	I	D	W	N	S	A	N	F	T	D	C	D	165
Smqnr47	F	E	G	V	D	W	N	S	A	N	F	T	D	C	D	165
Smqnr49	F	E	G	V	D	W	N	S	A	N	F	T	D	C	D	165

Smqnr1	L	T	R	S	E	L	G	E	L	D	L	R	S	T	N	180
Smqnr13	L	T	H	S	E	L	G	E	L	D	L	R	S	T	N	195
Smqnr9	L	T	N	S	E	L	G	E	L	D	L	R	R	T	N	180
Smqnr11	P	D	Q	F	R	S	G	R	X	G	P	A	Q	H	Q	180
Smqnr14	L	T	N	S	D	L	G	E	L	D	L	R	S	T	N	180
Smqnr7	L	T	N	S	E	L	G	E	L	D	L	R	S	T	N	180
Smqnr31	L	T	H	S	E	L	G	A	L	D	L	R	S	T	N	180
Smqnr33	L	T	N	S	E	L	G	E	L	D	L	R	S	T	N	180
Smqnr35	L	T	N	S	D	L	G	E	L	D	L	R	S	T	N	180
Smqnr37	L	T	N	S	E	L	G	K	L	D	L	R	S	T	N	180
Smqnr39	L	T	N	S	D	L	G	E	L	D	L	R	S	T	N	180
Smqnr41	L	T	N	S	E	L	G	E	L	D	L	R	S	T	N	180
Smqnr45	L	T	N	S	E	L	G	E	L	D	L	R	S	T	N	180
Smqnr47	L	T	N	S	E	L	G	E	L	D	L	R	S	T	N	180
Smqnr49	L	T	N	S	E	L	G	E	L	D	L	R	S	T	N	180

<i>Smqnr1</i>	L R G A T L D V Q Q V A L L M	195
<i>Smqnr13</i>	L R G A T L D L Q Q V A L L M	195
<i>Smqnr9</i>	L R G A T L D V Q Q V	
<i>Smqnr11</i>	P A W R H A G C P A G A L *	
<i>Smqnr14</i>	L R G A T L D V Q Q V A L L M	195
<i>Smqnr7</i>	L R G A T L D V Q Q V A L L M	
<i>Smqnr31</i>	L R G A T L D V Q Q V	
<i>Smqnr33</i>	L R G A T L D V Q Q V A L	
<i>Smqnr35</i>	L R G A T L D V Q Q V A R	
<i>Smqnr37</i>	L R G A T L D V Q Q V	
<i>Smqnr39</i>	L R G A T L D V Q Q V A L	
<i>Smqnr41</i>	L R G A T L D V Q Q V A L * E	
<i>Smqnr45</i>	L R G A T L D V Q Q V A L	
<i>Smqnr47</i>	L R G A T L D V Q Q	
<i>Smqnr47</i>	L R G A T L D V Q Q V A L	

As sequencias foram alinhadas com 27 sequencias de genes *Smqnr* disponíveis no GenBank (Shimizu et al.,2010 e Gordon et al.,2010). As amostras 7, 37, 41, 47, 49 descritas acima, foram idênticas a sequencia do gene *Smqnr6* disponível no GenBank nºAB430849.1. A sequencia da amostra 9 foi idêntica a sequencia do gene *qnr* nºEU681372. A sequencia da amostra 14 foi idêntica a sequencia do gene *Smqnr4* disponível no GenBank nºAB430842. A sequencia da amostra 35 foi igual a sequencia do gene

Smqnr12 disponível no GenBank nºFJ596752. As amostras 11, 31, 33 e 45 foram diferentes as sequencias disponíveis no GenBank.

Tabela 16. Avaliação das sequencias genéticas dos genes *qnr* de 13 amostras de *S. maltophilia*

Amostra	CIM levo	CIM Cipro	Posição da mutação						
9	0,5	2				S67N	W100G	R168N	
11	1	32							R168N
14	<0,25	0,5			G27A G27A	A42S	S67N		R168N
7	1	8	A2V				S67N		R168N
31	1	16		A23V	G27A G27A		S67N	T97P W100G	R168N
33	16	64							R168N
35	16	64				A42S	S67N		R168N
37	8	32					S67N		R168N
39	0,5	2		Q8H D13E	G27A	A42S	S67N		R168N
41	8	16	A2V				S67N		R168N
45	8	2				D39N	S67N		R168N
47	8	32	A2V		D24A		S67N		R168N
49	4	32	A2V				S67N		R168N

Em relação a CIM das amostras seqüenciadas, não observamos uma associação entre mutações de aminoácidos e o perfil de resistência. Entretanto, observamos que cepas com CIM de levofloxacino de 16 µg/mL apresentaram um número menor de mutações.

As sequencias das amostras 11, 9, 14 e 7 foram depositadas no GenBank com número de acesso HQ711556.1, HQ711555.1, HQ711554.1, HQ711553.1 respetivamente.

5.11 Avaliação da sequência genética dos genes da enzima

N-acetil transferase *aac(6')-ib-cr*

Foram realizados quatro sequenciamentos de duas amostras com resistência ao ciprofloxacino e duas amostras sensíveis ao ciprofloxacino. Foi considerada positiva para a variante *cr* a amostra que apresentasse alteração no códon TRP102ARG. Nas quatro amostras testadas foi observada a mutação do aminoácido para arginina no códon 102.

A seguir a descrição das sequências de 4 amostras de *S. maltophilia* comparadas com as sequências controle para *aac(6')-ib-cr* (controle CR) (GenBank nº HQ438047.1) e sequência controle para *aac(6')-ib* (controle IB) (GenBank nº HQ170514).

Controle CR	ATG ACT GAG CAT GAC CTT GCG ATG CTC TAT GAG TGG CTA AAT CGA	45
1	Met Thr Glu His Asp Leu Ala Met Leu Tyr Glu Trp Leu Asn Arg	15
Controle IB	ATG ACT GAG CAT GAC CTT GCG ATG CTC TAT GAG TGG CTA AAT CGA	45
1	Met Thr Glu His Asp Leu Ala Met Leu Tyr Glu Trp Leu Asn Arg	15
Amostra7	ATG ACT GAG CAT GAC CTT GCG ATG CTC TAT GAG TGG CTA AAT CGA	45
1	Met Thr Glu His Asp Leu Ala Met Leu Tyr Glu Trp Leu Asn Arg	15
Amostra58	ATG ACT GAG CAT GAC ctt gcg atg ctc taT GAG TGG CTA AAT CGA	45
1	Met Thr Glu His Asp Leu Ala Met Leu Tyr Glu Trp Leu Asn Arg	15
Amostra56	ATG ACT GAG CAT GAC cTT GCG ATG CTC TAT GAG TGG CTA AAT CGA	45
1	Met Thr Glu His Asp Leu Ala Met Leu Tyr Glu Trp Leu Asn Arg	15
Amostra54	ATG ACT GAG CAT GAC ctt gcg atg ctc tat gag tgg cta aat cga	45
1	Met Thr Glu His Asp Leu Ala Met Leu Tyr Glu Trp Leu Asn Arg	15

Controle	CR	TCT	CAT	ATC	GTC	GAG	TGG	TGG	GGC	GGA	GAA	GAA	GCA	CGC	CCG	ACA	90
16		Ser	His	Ile	Val	Glu	Trp	Trp	Gly	Gly	Glu	Glu	Ala	Arg	Pro	Thr	30
Controle	IB	TCT	CAT	ATC	GTC	GAG	TGG	TGG	GGC	GGA	GAA	GAA	GCA	CGC	CCG	ACA	90
16		Ser	His	Ile	Val	Glu	Trp	Trp	Gly	Gly	Glu	Glu	Ala	Arg	Pro	Thr	30
Amostra	7	TCT	CAT	ATC	GTC	GAG	TGG	TGG	GGC	GGA	GAA	GAA	GCA	CGC	CCG	ACA	90
16		Ser	His	Ile	Val	Glu	Trp	Trp	Gly	Gly	Glu	Glu	Ala	Arg	Pro	Thr	30
Amostra	58	TCT	CAT	ATC	GTC	GAG	TGG	TGG	GGC	GGA	GAA	GAA	GCA	CGC	CCG	ACA	90
16		Ser	His	Ile	Val	Glu	Trp	Trp	Gly	Gly	Glu	Glu	Ala	Arg	Pro	Thr	30
Amostra	56	TCT	CAT	ATC	GTC	GAG	TGG	TGG	GGC	GGA	GAA	GAA	GCA	CGC	CCG	ACA	90
16		Ser	His	Ile	Val	Glu	Trp	Trp	Gly	Gly	Glu	Glu	Ala	Arg	Pro	Thr	30
Amostra	54	tct	cat	ATC	GTC	GAG	TGG	TGg	GGC	GGA	GAA	GAA	GCA	CGC	CCG	ACA	90
16		Ser	His	Ile	Val	Glu	Trp	Trp	Gly	Gly	Glu	Glu	Ala	Arg	Pro	Thr	30

Controle	CR	CTT	GCT	GAC	GTA	CAG	GAA	CAG	TAC	TTG	CCA	AGC	GTT	TTA	GCG	CAA	135
31		Leu	Ala	Asp	Val	Gln	Glu	Gln	Tyr	Leu	Pro	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	45
Controle	IB	CTT	GCT	GAC	GTA	CAG	GAA	CAG	TAC	TTG	CCA	AGC	GTT	TTA	GCG	CAA	135
31		Leu	Ala	Asp	Val	Gln	Glu	Gln	Tyr	Leu	Pro	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	45
Amostra	7	CTT	GCT	GAC	GTA	CAG	GAA	CAG	TAC	TTG	CCA	AGC	GTT	TTA	GCG	CAA	135
31		Leu	Ala	Asp	Val	Gln	Glu	Gln	Tyr	Leu	Pro	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	45
Amostra	58	CTT	GCT	GAC	GTA	CAG	GAA	CAG	TAC	TTG	CCA	AGC	GTT	TTA	GCG	CAA	135
31		Leu	Ala	Asp	Val	Gln	Glu	Gln	Tyr	Leu	Pro	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	45
Amostra	56	CTT	GCT	GAC	GTA	CAG	GAA	CAG	TAC	TTG	CCA	AGC	GTT	TTA	GCG	CAA	135
31		Leu	Ala	Asp	Val	Gln	Glu	Gln	Tyr	Leu	Pro	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	45
Amostra	54	CTT	GCT	GAC	GTA	CAG	GAA	CAG	TAC	TTG	CCA	AGC	GTT	TTA	GCG	CAA	135
31		Leu	Ala	Asp	Val	Gln	Glu	Gln	Tyr	Leu	Pro	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	45

Controle	CR	GAG	TCC	GTC	ACT	CCA	TAC	ATT	GCA	ATG	CTG	AAT	GGA	GAG	CCG	ATT	180
46		Glu	Ser	Val	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Met	Leu	Asn	Gly	Glu	Pro	Ile	60
Controle	IB	GAG	TCC	GTC	ACT	CCA	TAC	ATT	GCA	ATG	CTG	AAT	GGA	GAG	CCG	ATT	180
46		Glu	Ser	Val	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Met	Leu	Asn	Gly	Glu	Pro	Ile	60
Amostra	7	GAG	TCC	GTC	ACT	CCA	TAC	ATT	GCA	ATG	CTG	AAT	GGA	GAG	CCG	ATT	180
46		Glu	Ser	Val	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Met	Leu	Asn	Gly	Glu	Pro	Ile	60
Amostra	58	GAG	TCC	GTC	ACT	CCA	TAC	ATT	GCA	ATG	CTG	AAT	GGA	GAG	CCG	ATT	180
46		Glu	Ser	Val	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Met	Leu	Asn	Gly	Glu	Pro	Ile	60
Amostra	56	GAG	TCC	GTC	ACT	CCA	TAC	ATT	GCA	ATG	CTG	AAT	GGA	GAG	CCG	ATT	180
46		Glu	Ser	Val	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Met	Leu	Asn	Gly	Glu	Pro	Ile	60
Amostra	54	GAG	TCC	GTC	ACT	CCA	TAC	ATT	GCA	ATG	CTG	AAT	GGA	GAG	CCG	ATT	180
46		Glu	Ser	Val	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Met	Leu	Asn	Gly	Glu	Pro	Ile	60

ControleCR 61	GGG Gly	TAT Tyr	GCC Ala	CAG Gln	TCG Ser	TAC Tyr	GTT Val	GCT Ala	CTT Leu	GGA Gly	AGC Ser	GGG Gly	GAC Asp	GGA Gly	TGG Trp	225 75
ControleIB 61	GGG Gly	TAT Tyr	GCC Ala	CAG Gln	TCG Ser	TAC Tyr	GTT Val	GCT Ala	CTT Leu	GGA Gly	AGC Ser	GGG Gly	GAC Asp	GGA Gly	TGG Trp	225 75
Amostra7 61	GGG Gly	TAT Tyr	GCC Ala	CAG Gln	TCG Ser	TAC Tyr	GTT Val	GCT Ala	CTT Leu	GGA Gly	AGC Ser	GGG Gly	GAC Asp	GGA Gly	TGG Trp	225 75
Amostra58 61	GGG Gly	TAT Tyr	GCC Ala	CAG Gln	TCG Ser	TAC Tyr	GTT Val	GCT Ala	CTT Leu	GGA Gly	AGC Ser	GGG Gly	GAC Asp	GGA Gly	TGG Trp	225 75
Amostra56 61	GGG Gly	TAT Tyr	GCC Ala	CAG Gln	TCG Ser	TAC Tyr	GTT Val	GCT Ala	CTT Leu	GGA Gly	AGC Ser	GGG Gly	GAC Asp	GGA Gly	TGG Trp	225 75
Amostra54 61	GGG Gly	TAT Tyr	GCC Ala	CAG Gln	TCG Ser	TAC Tyr	GTT Val	GCT Ala	CTT Leu	GGA Gly	AGC Ser	GGG Gly	GAC Asp	GGA Gly	TGG Trp	225 75

ControleIC 76	TGG Trp	GAA Glu	GAA Glu	GAA Glu	ACC Thr	GAT Asp	CCA Pro	GGA Gly	GTA Val	CGC Arg	GGA Gly	ATA Ile	GAC Asp	CAG Gln	TTA Leu	270 90
ControleIB 76	TGG Trp	GAA Glu	GAA Glu	GAA Glu	ACC Thr	GAT Asp	CCA Pro	GGA Gly	GTA Val	CGC Arg	GGA Gly	ATA Ile	GAC Asp	CAG Gln	TCA Ser	270 90
Amostra7 76	TGG Trp	GAA Glu	GAA Glu	GAA Glu	ACC Thr	GAT Asp	CCA Pro	GGA Gly	GTA Val	CGC Arg	GGA Gly	ATA Ile	GAC Asp	CAG Gln	TTA Leu	270 90
Amostra58 76	TGG Trp	GAA Glu	GAA Glu	GAA Glu	ACC Thr	GAT Asp	CCA Pro	GGA Gly	GTA Val	CGC Arg	GGA Gly	ATA Ile	GAC Asp	CAG Gln	TTA Leu	270 90
Amostra56 76	TGG Trp	GAA Glu	GAA Glu	GAA Glu	ACC Thr	GAT Asp	CCA Pro	GGA Gly	GTA Val	CGC Arg	GGA Gly	ATA Ile	GAC Asp	CAG Gln	TCA Ser	270 90
Amostra54 76	TGG Trp	GAA Glu	GAA Glu	GAA Glu	ACC Thr	GAT Asp	CCA Pro	GGA Gly	GTA Val	CGC Arg	GGA Gly	ATA Ile	GAC Asp	CAG Gln	TTA Leu	270 90
ControleIC 91	CTG Leu	GCG Ala	AAT Asn	GCA Ala	TCA Ser	CAA Gln	CTG Leu	GGC Gly	AAA Lys	GGC Gly	TTG Leu	GGA Gly	CGA Arg	AAG Lys	CTG Leu	315 105
ControleIB 91	CTG Leu	GCG Ala	AAT Asn	GCA Ala	TCA Ser	CAA Gln	CTG Leu	GGC Gly	AAA Lys	GGC Gly	TTG Leu	GGA Gly	ACC Thr	AAG Lys	CTG Leu	315 105
Amostra7 91	CTG Leu	GCG Ala	AAT Asn	GCA Ala	TCA Ser	CAA Gln	CTG Leu	GGC Gly	AAA Lys	GGC Gly	TTG Leu	GGA Gly	CGA Arg	AAG Lys	CTG Leu	315 105
Amostra58 91	CTG Leu	GCG Ala	AAT Asn	GCA Ala	TCA Ser	CAA Gln	CTG Leu	GGC Gly	AAA Lys	GGC Gly	TTG Leu	GGA Gly	CGA Arg	AAG Lys	CTG Leu	315 105
Amostra56 91	CTG Leu	GCG Ala	AAT Asn	GCA Ala	TCA Ser	CAA Gln	CTG Leu	GGC Gly	AAA Lys	GGC Gly	TTG Leu	GGA Gly	CGA Arg	AAG Lys	CTG Leu	315 105
Amostra54 91	CTG Leu	GCG Ala	AAT Asn	GCA Ala	TCA Ser	CAA Gln	CTG Leu	GGC Gly	AAA Lys	GGC Gly	TTG Leu	GGA Gly	CGA Arg	AAG Lys	CTG Leu	315 105
ControleIC 106	GTT Val	CGA Arg	GCT Ala	CTG Leu	GTT Val	GAG Glu	TTG Leu	CTG Leu	TTC Phe	AAT Asn	GAT Asp	CCC Pro	GAG Glu	GTC Val	ACC Thr	360 120
ControleIB 106	GTT Val	CGA Arg	GCT Ala	CTG Leu	GTT Val	GAG Glu	TTG Leu	CTG Leu	TTC Phe	AAT Asn	GAT Asp	CCC Pro	GAG Glu	GTC Val	ACC Thr	360 120

Amostra7	GTC	CGA	GCT	CTG	GTT	GAG	TTG	CTG	TTC	AAT	GAT	CCC	GAG	GTC	ACC	360
106	Val	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	Pro	Glu	Val	Thr	120
Amostra58	GTT	CGA	GCT	CTG	GTT	GAG	TTG	CTG	TTC	AAT	GAT	CCC	GAG	GTC	ACC	360
106	Val	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	Pro	Glu	Val	Thr	120
Amostra56	GTT	CGA	GCT	CTG	GTT	GAG	TTG	CTG	TTC	AAT	GAT	CCC	GAG	GTC	ACC	360
106	Val	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	Pro	Glu	Val	Thr	120
Amostra54	GTT	CGA	GCT	CTG	GTT	GAG	TTG	CTG	TTC	AAT	GAT	CCC	GAG	GTC	ACC	360
106	Val	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	Pro	Glu	Val	Thr	120
ControleIC	AAG	ATC	CAA	ACG	GAC	CCG	TCG	CCG	AGC	AAC	TTG	CGA	GCG	ATC	CGA	405
121	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Pro	Ser	Pro	Ser	Asn	Leu	Arg	Ala	Ile	Arg	135
ControleIC	AAG	ATC	CAA	ACG	GAC	CCG	TCG	CCG	AGC	AAC	TTG	CGA	GCG	ATC	CGA	405
121	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Pro	Ser	Pro	Ser	Asn	Leu	Arg	Ala	Ile	Arg	135
Amostra7	AAG	ATC	CAA	ACG	GAC	CCG	TCG	CCG	AGC	AAC	TTG	CGA	GCG	ATC	CGA	405
121	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Pro	Ser	Pro	Ser	Asn	Leu	Arg	Ala	Ile	Arg	135
Amostra58	AAG	ATC	CAA	ACG	GAC	CCG	TCG	CCG	AGC	AAC	TTG	CGA	GCG	ATC	CGA	405
121	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Pro	Ser	Pro	Ser	Asn	Leu	Arg	Ala	Ile	Arg	135
Amostra56	AAG	ATC	CAA	ACG	GAC	CCG	TCG	CCG	AGC	AAC	TTG	cGa	GCG	ATC	CGA	405
121	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Pro	Ser	Pro	Ser	Asn	Leu	Arg	Ala	Ile	Arg	135
Amostra54	AAG	ATC	CAA	ACG	GAC	CCG	TCG	CCG	AGC	AAC	TTG	CGA	GCG	ATC	CgA	405
121	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Pro	Ser	Pro	Ser	Asn	Leu	Arg	Ala	Ile	Arg	135
ControleIC	TGC	TAC	GAG	AAA	GCG	GGG	TTT	GAG	AGG	CAA	GGT	ACC	GTA	ACC	ACC	450
136	Cys	Tyr	Glu	Lys	Ala	Gly	Phe	Glu	Arg	Gln	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	150
ControleIB	TGC	TAC	GAG	AAA	GCG	GGG	TTT	GAG	AGG	CAA	GGT	ACC	GTA	ACC	ACC	450
136	Cys	Tyr	Glu	Lys	Ala	Gly	Phe	Glu	Arg	Gln	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	150
Amostra7	TGC	TAC	GAG	AAA	GCG	GGG	TTT	GAG	AGG	CAA	GGT	ACC	GTA	ACC	ACC	450
136	Cys	Tyr	Glu	Lys	Ala	Gly	Phe	Glu	Arg	Gln	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	150
Amostra58	TGC	TAC	GAG	AAA	GCG	GGG	TTt	GAG	AGG	CAA	GGT	ACC	GTA	ACC	ACC	450
136	Cys	Tyr	Glu	Lys	Ala	Gly	Phe	Glu	Arg	Gln	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	150
Amostra56	TGC	TAC	GAG	AAA	GCG	GGG	TTt	GAG	AGG	CAA	GGT	ACC	GTA	ACC	ACC	450
136	Cys	Tyr	Glu	Lys	Ala	Gly	Phe	Glu	Arg	Gln	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	150
Amostra54	TGC	TAC	GAG	AAA	GCG	GGG	TTt	GAG	AGG	CAA	GGT	ACC	GTA	ACC	ACC	450
136	Cys	Tyr	Glu	Lys	Ala	Gly	Phe	Glu	Arg	Gln	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	150

5.12 Avaliação da sequência genética dos genes *smeD* e *smeT*

Para avaliação do gene do repressor *smeT* do sistema de efluxo *smeDEF*, foi realizado o sequenciamento de uma amostra positiva com CIM de 8µg/mL para levofloxacino. O resultado do seqüenciamento foi idêntico quando comparado com a sequência do gene *smeT* de *S. maltophilia* depositada no Genbank nºAJ316010. O gene *smeD* foi avaliado em duas amostras resistentes ao ciprofloxacino, a sequência obtida foi idêntica a sequência de *S. maltophilia smeD* positiva depositada no GenBank nº AJ252200.

5.13 Análise plasmidial de amostra positiva para o gene *aaac(6')-ib-cr*

Foram avaliadas 4 amostras positivas para o gene da enzima *aac(6')-ib-cr* para determinar a localização da enzima. A transferência plasmidial foi negativa para as amostras estudadas. Como controle positivo para a reação da transferência foi utilizada uma cepa de *K. pneumoniae* KPC positiva.

Coluna 01 – peso molecular; coluna 2 – controles de esterilidade; coluna 3, 4, 7, 8, 9 – controle positivos; colunas 5 e 6 – amostras de *S. maltophilia*; coluna 11.

Figura 6. Reação de PCR para detecção do gene *smeT* em isolados resistentes a levofloxacino de *S. maltophilia*

5.14 Análise da clonalidade dos isolados resistentes ao sulfametoxazol/trimetoprima

Utilizando os critérios estabelecidos por Tenover et al., (1997), na análise visual dos perfis de DNA gerados pela técnica de PFGE, foram avaliadas 13 amostras positivas para o gene *sul1*, sendo 9 cepas resistentes

a SMX/TMP e 4 amostras sensíveis. Foram observados 13 padrões clonais diferentes. Foi observada a presença de um mesmo clone em duas infecções diferentes no mesmo paciente. Todas as amostras apresentaram um perfil genético diferente independente da CIM para SMX/TMP.

Coluna 1- Peso molecular, colunas 1 até 14 amostras com clonalidade não relacionada. Coluna 11 e 12 amostras do mesmo paciente, isolada em datas diferentes.

Figura 7. Representação do perfil de clonalidade obtido a partir do método de PFGE com a enzima *SpeI*, de 13 amostras positivas para o gene *sul1* de *S. maltophilia* com resistência a sulfametoxazol/trimetoprima.

5.15 Análise da clonalidade dos isolados resistentes ao levofloxacino

Foram avaliadas 18 amostras resistentes ao levofloxacino. Utilizando os critérios estabelecidos por Tenover et al., (1997), na análise visual dos perfis de DNA gerados pela técnica de PFGE, foram obtidos 14 perfis distribuídos em dez clusters. O clone principal (16,6%) foi designado como a letra A e os demais com as consecutivas letras do alfabeto. Para os mesmos perfis relacionados ao clone, foram designados pela letra correspondente e um número.

Dos 18 isolados analisados, três (16,6%) foram agrupados no padrão A. Duas amostras foram idênticas (padrão A1) e uma amostra foi considerada possivelmente relacionada (padrão A2). Outras três (16,6%) amostras foram agrupadas no padrão B, sendo os três isolados provavelmente relacionados.

Duas amostras foram classificadas como padrão C1 e C2 (possivelmente relacionadas). Em relação a CIM não houve diferença de perfil de sensibilidade em relação a clonalidade. Todas as amostras foram provenientes do Hospital das Clínicas, exceto uma amostra do Hospital A.C Camargo (figura 8).

Coluna 1- Peso molecular, coluna 2 cepa padrão B1, coluna 3 e 5 cepa padrão A1, Coluna 4 e 13 cepa padrão C, coluna 6 cepa padrão B2, coluna 7 cepa padrão D, coluna 8 cepa padrão A2, coluna 9 cepa padrão E, coluna 10 cepa padrão F (A.C Camargo), coluna 11 cepa padrão G, coluna 12 cepa padrão H, coluna 14 cepa padrão I, coluna 16 cepa padrão J, coluna 17 cepa padrão K, coluna 18 cepa padrão L.

Figura 8. Representação do perfil de clonalidade obtido a partir do método de PFGE com a enzima *SpeI*, de 18 amostras de *S. maltophilia* com resistência ao levofloxacino

6 DISCUSSÃO

Stenotrophomonas maltophilia é considerada um patógeno oportunista que exibe resistência intrínseca a múltiplas classes de antimicrobianos o que dificulta a escolha do antibiótico para o tratamento das infecções causadas por este agente.

A associação de SMX/TMP ainda é a primeira escolha no tratamento das infecções por *S. maltophilia*. Entretanto, nos últimos anos tem sido descrito o aumento de cepas resistentes a SMX/TMP. Como já comentado previamente essa resistência esta associada à presença do gene *su1* em integrons da classe 1 e a presença de cepas com o gene *su2* em estruturas *transposase-like* e os genes de resistência ao trimetoprim como os genes da dehidrofolato redutase (Toleman et al. 2007; Hu et al., 2011). O real aumento da resistência a essa droga, entretanto, ainda é controverso. (Farrell et al., 2010, Sader et al., 2005(III)).

Nas 106 cepas estudadas observamos sensibilidade a SMX/TMP de 83,6% com CIM₅₀ 1µg/mL e CIM₉₀ de 32µg/mL. O estudo SENTRY, avaliou cepas na última década e mostrou que a sensibilidade apresentada nas diversas publicações sempre foi maior que 95% (Farrell et al., 2010; Sader et al., 2005 (III); Gales et al., 2004). Farrell et al., 2010, avaliaram 1,586 cepas coletadas entre 2003 e 2008, e mostraram sensibilidade aSMX/TMP de 96% com CIM₅₀ 0,5µg/mL e CIM₉₀ de 1µg/mL, sendo a sensibilidade das cepas isoladas na América Latina de 95,5%. Hu et al., 2011, em estudo multicêntrico na China, avaliaram 102 cepas. Os autores observaram uma

resistência a SMX/TMP de 30,4% com CIM₅₀ 9,5µg/mL e CIM₉₀ de 608µg/mL. Segundo o autor o SMX/TMP é a droga de escolha para o tratamento empírico de infecções por *S. maltophilia* nesses hospitais, podendo esse fato explicar a alta resistência a essa droga. A sensibilidade a SMX/TMP foi alta, entretanto, observamos uma sensibilidade ao SMX/TMP menor que para outros medicamentos como minociclina, tigeciclina e levofloxacino. Hu et al., 2011 em estudo multicêntrico também encontraram sensibilidade maior para minociclina e levofloxacino do que para SMX/TMP.

Também observamos que das 23 cepas resistentes a SMX/TMP, 19 cepas (82,6%) foram isoladas de pacientes com uso prévio de SMX/TMP. Não existem dados na literatura em relação ao uso prévio de SMX/TMP e desenvolvimento de resistência para esse antimicrobiano.

Levofloxacino é uma opção para o tratamento de infecções por *S. maltophilia*, principalmente em paciente com contraindicação de uso do SMX/TMP. No presente estudo a sensibilidade das 106 cepas ao levofloxacino foi de 82% com CIM₅₀ 1µg/mL e CIM₉₀ de 4µg/mL. Farrell et al., 2010 avaliaram 1586 cepas e observaram resistência ao levofloxacino de 83,4% com CIM₅₀ 1µg/mL e CIM₉₀ de 4µg/mL. Seis de 19 cepas foram isoladas em pacientes com uso prévio de levofloxacino, entretanto, não existem dados na literatura da importância desse achado. Carrol et al., 1998, sugerem que o levofloxacino não deve ser usado como monoterapia pelo risco de indução de mutantes, entretanto, os autores deixam claro que essa opinião é pessoal e que faltam estudos para esclarecer essa hipótese. Nós observamos dois casos de infecções por *S. maltophilia* que foram

tratadas com levofloxacino com dose de 500mg/dia e que desenvolveram resistência na vigência de tratamento.

A resistência para ciprofloxacino no presente estudo foi de 58,5% com CIM₅₀ 4µg/mL e CIM₉₀ de 32µg/mL. Travassos et al.,2004, estudaram 39 amostras de *S. maltophilia* e observaram uma sensibilidade ao ciprofloxacino de 81,6%. Sader et al., 2005I., analisaram 2076 amostras de *S. maltophilia* e observaram uma sensibilidade de 30,9%. Falagas et al., 2008, em uma revisão sistemática de tratamento de infecções por *S. maltophilia* sugere que ciprofloxacino poderia ser utilizado em associação com outras drogas para o tratamento dessas infecções. Entretanto, o aumento da CIM do ciprofloxacino nas últimas década contraindica a sua utilização no tratamento de infecções por *S. maltophilia* (Sader et al.,2005 (II); Sader et al., 2005(III); Gulmez et al.,2004; Weiss et al.,2000)

Curiosamente, observamos uma sensibilidade a minociclina de 100% com CIM₅₀ ≤0,5µg/mL e CIM₉₀ de 2µg/mL. Este achado pode ser decorrente do fato desta droga não ser comercializada no Brasil. Em diferentes estudos a sensibilidade para minociclina é superior a 92% (Valdezate et al.,2001; Betriu et al., 2002 (I); Vartivarian et al.,1994). Entretanto, Hu et al. 2011 avaliaram 102 cepas e mostraram uma sensibilidade menor a minociclina de 74,5% com CIM₅₀ 0,5µg/mL e CIM₉₀ de 16µg/mL. Apesar de a minociclina apresentar boa sensibilidade para cepas de *S. maltophilia*, por ser uma droga bacteriostática, não ser disponível por via intravenosa, não ser disponível no Brasil e também devido à falta de estudos clínicos com esse medicamento o seu uso na prática clínica é limitado.

Em relação à tigeciclina, observamos resistência de apenas 8,4% nas 106 cepas estudadas com CIM₅₀ 1µg/mL e CIM₉₀ de 2µg/mL. Farrell et al., 2011, avaliaram 1,586 cepas e observaram sensibilidade de 95,5% com CIM₅₀ 0,5µg/mL e CIM₉₀ de 2,0µg/mL. Não existe padronização de metodologia e ponto de corte para determinar a sensibilidade a essa droga. Atualmente, para avaliação de sensibilidade a tigeciclina é utilizado o ponto de corte para Enterobactérias recomendado pela USFDA (Farrell et al. 2010). Existe também a dificuldade da realização da CIM com tigeciclina devido à instabilidade da droga. Os estudos de tratamento de infecções causadas por *S. maltophilia* com tigeciclina são limitados a relatos de casos, nos quais, a tigeciclina foi associada a alguma das drogas preconizadas para o tratamento dessas infecções (Belvici et al. 2009). *S. maltophilia* apresenta boa sensibilidade a tigeciclina, porém, os poucos estudos com esse medicamento limitam seu uso no tratamento de infecções por esse agente.

A sensibilidade das 106 cepas estudadas a ticarcilina e ácido clavulânico foi de 27,4%. Farrell et al., 2010 estudaram 1586 cepas e observaram uma sensibilidade a esse medicamento de 39,1%. Hu et al., 2011, em 102 cepas estudadas observaram uma sensibilidade a ticarcilina/clavulanato de 46,1%. Esse medicamento não é utilizado nos hospitais de origem das cepas avaliadas. No Brasil, Nicodemo et al. 2004, avaliaram 74 cepas e observaram uma resistência para ticarcilina/clavulanato de 59,1%. Estudos atuais mostram um decréscimo da sensibilidade a ticarcilina/clavulanato de ±20 a 30% (Hu et al. 2011; Farrell et al., 2010; Fedler et al., 2006).

Principalmente, na literatura americana a ceftazidima é considerada como medicamento de escolha para o tratamento de infecções por *S. maltophilia*. No nosso estudo observamos uma resistência a ceftazidima de 79,3%. Farrell et al., em 1586 isolados observaram uma sensibilidade de 4,1%. No entanto, Falagas et al. 2008, realizaram uma revisão sistemática de tratamento para infecções por *S. maltophilia* excluindo a SMX/TMP. Os autores encontraram 31 relatos de casos e cinco séries clínicas e concluíram que a ceftazidima, o ciprofloxacino e a ticarcilina/clavulanato em uso isolado ou em associação com outros antimicrobianos seriam as principais opções para o tratamento de infecções em pacientes com contra indicação para o uso do SMX/TMP. Entretanto, os autores salientam que a revisão sistemática teve importantes limitações principalmente pela heterogeneidade da população estudada e ausência de padronização dos testes de sensibilidades dos estudos avaliados.

Nós observamos que uma amostra apresentou resistência as setes drogas testadas exceto a minociclina. Esta amostra era de origem respiratória de um paciente com doença pulmonar de base. É importante ressaltar que não existe relato na literatura de cepas exibindo esse perfil de multirresistência.

Em relação aos mecanismos de resistência a SMX/TMP, observamos que 14 (13,2%) das amostras foram positivas para o gene *su1* e desses isolados nove (8,4%) foram resistentes a SMX/TMP. Barbolla et al., 2004, estudaram 31 isolados clínicos não relacionados e observaram a presença do gene *su1* em 3 (9,6%) cepas resistentes a SMX/TMP. Toleman et al.

2007, analisaram 55 cepas resistente a SMX/TMP e observaram a presença do gene *sul1* em 17 (30%) cepas resistentes ao SMX/TMP. Hu et al., 2011., estudaram 102 cepas e mostraram a presença do gene *sul1* em 52 (50,9%) isolados. Os autores observaram que 27 (26,4%) amostras positivas para o gene *sul1* foram sensíveis a SMX/TMP. Na avaliação da presença do gene da integrase 1, observamos que 21 amostras (19,8%) foram positivas para esse gene, das quais sete apresentaram o gene *sul1* junto. Essas amostras apresentaram CIM₅₀ de 8 µg/mL e CIM₉₀ de 128 µg/mL, maior que as CIM das cepas sem essa associação de genes. Hu et al., em 102 cepas estudadas observaram a presença do gene da *int1* em 66 (64,7%) amostras, 48 (47%) dessas amostras foram positivas para o gene *sul1*, entretanto, o autor não descreve se as cepas positivas para os genes *sul1* e *int1* apresentaram CIM maiores do que cepas sem essa associação de genes.

Surpreendentemente, 14/96 das amostras (15,2%) foram resistentes a SMX/TMP e negativas para o gene *sul1*. Entre essas amostras, uma foi positiva para o gene *sul2* e nas restantes (13 amostras) nenhum dos três mecanismos estudados foi observado. Este é o primeiro estudo brasileiro que identifica a presença de genes *sul1* e *sul2* em isolados de *S. maltophilia* resistentes a SMX/TMP. Os genes *sul1*, *sul2* em integrons ou em regiões móveis do cromossomo da *S. maltophilia* parecem ser mecanismos importantes de resistência nesta bactéria, entretanto, a presença de cepas resistentes a SMX/TMP e negativas para os genes *sul* e cepas sensíveis a SMX/TMP e positivas para esses genes levantam a hipótese que outros mecanismos não estudados também sejam responsáveis pela resistência a

SMX/TMP. No nosso estudo, observamos ainda a presença do gene da enzima dehidrofolato redutase A1 (*dhfrA1*) em uma cepa sensível a SMX/TMP, exibindo CIM de 0,25 µg/mL. Hu et al., 2011, em 106 cepas estudadas observaram a presença de genes *dhfr* em 16 (15,8%) cepas. Os autores descrevem que todas as cepas foram resistentes e todas foram positivas para o gene da integrase 1. Em Enterobactérias, mutações cromossômicas na deidropteroato sintetase (DHP) alteram a sensibilidade a sulfametoxazol (Houvinem et al. 1995), porém, na *S. maltophilia* são necessários estudos que avaliem alterações cromossômicas da enzima deidropteroato sintetase que possam explicar a resistência a SMX/TMP sem a presença de genes de resistência carregados por elementos genéticos móveis.

Em relação aos elementos genéticos móveis, 21 amostras (19,8%) foram positivas para o gene da integrase 1, como dito anteriormente, as cepas que apresentaram este gene associado ao gene *sul1* apresentaram CIM maior que cepas que não tiveram esta associação. Nosso estudo investigou a localização do gene *sul1* em duas amostras. Na amostra com CIM >125 µg/mL para SMX/TMP observamos um integron de aproximadamente 4000pb contendo os genes cassetes *aac4* e *aadA1* e o complexo terminal *qac/sul1*. Em uma cepa com CIM de 8 µg/mL identificamos o integron de 2000 pb contendo o gene cassete *aadA1* e a região terminal *qac/sul1*. Os integrons foram semelhantes à integrons descritos por Toleman et al. 2007 e por Barbolla et al. 2004.

Toleman et al, (2007) estudaram 55 cepas clínicas de *S. maltophilia* geneticamente não relacionadas, 25 resistentes a SMX/TMP. Dezesete

possuíam o gene *sul1* localizado na região 3' do integron de classe 1. As cepas sensíveis não apresentaram o gene *sul1*. Em 7 cepas o integron foi analisado, 2 amostras (Brasil e Alemanha) apresentavam a integrase 1 e o gene *qac/sul1*. Duas amostras (Chile e EUA) continham entre a integrase 1 e o *qac/sul1* o gene cassette *aacA4*. Duas amostras do México continham antes do gene *qac/sul1*, 2 genes modificadores de aminoglicosídeos (*aacA5* e *aadA5*) e uma ORF com atividade desconhecida. Barbolla et al., 2004 estudaram 3 amostras na Argentina e obtiveram três integrons na seguinte conformação: a *int-1/catB2/qacE/sul1/orf5*, integron com *int1/aac(6')-ib/ant(3'')-la/qacE/sul1/orf5* e um integron composto pela *int1/aac(3)-1a/orfP/orfP/orfQ/ant(3'')-la/qacE/sul1/orf5*.

Nós identificamos uma amostra positiva para o gene *sul2* que foi positiva para o gene ISCR2. Para determinar se o *sul2* estava próximo a esse elemento genético móvel realizamos o seqüenciamento total da ISCR2, e observamos que adjacente ao ISCR2 estava localizado o pseudogene da fosfoglucomutase de 200pb e adjacente a este estava o gene *sul2*. Toleman et al. 2007 mostraram que o gene *sul2* foi expresso em 9 amostras resistentes a SMX/TMP, este gene estava localizado nas sequencias de inserção ISCR2 e ISCR3, com uma amostra com a mesma configuração de uma amostra descrita no nosso estudo.

Esses resultados confirmam a importância da presença de elementos genéticos móveis na disseminação da resistência em isolados de *S. maltophilia*.

Sistemas de efluxo são os mecanismos mais estudados de resistência a quinolonas na *S. maltophilia* (Alonzo e Martinez., 2000). Em nosso estudo, o teste fenotípico com reserpina e com CCCP foi negativo em todas as amostras testadas. Valdezate et al., 2002, estudaram 29 cepas de *S. maltophilia* e observaram que a CIM na presença de CCCP teve uma redução maior do que 4 vezes em apenas 6 amostras. Nosso estudo mostrou que todas as cepas de *S. maltophilia* estudadas possuem o gene *smeD* do sistema de efluxo *smeDEF* e em 12/38 (31,5%) o gene repressor *smeT* do sistema de efluxo *smeDEF* foi positivo. Sánchez et al., 2002 estudaram o gene repressor do sistema de efluxo *smeDEF*, denominado *smeT* o qual é homólogo do sistema AcrR descrito na *E. coli*. O repressor *smeT* está localizado a 210pb do sistema de efluxo. Os autores compararam a sequência do *smeT* da cepa sensível D457 e da cepa multirresistente D457R e observaram uma diferença na sequência que leva a substituição de Leu166Gln. Os autores observaram que em cepas com essa mutação o sistema de efluxo não é reprimido pelo *smeT*, levando a resistência para quinolonas. No estudo da sequência genética do *smeT* não observamos mutação na posição 166 da sequência de aminoácidos.

Outro mecanismo importante de resistência as quinolonas em bactérias gram-negativas são as mutações na girase A na posição 83 (Ser → Leu, Trp, Phe ou Tyr e Thr → Ile) e na posição 87 (Asp→Asn, Gly, His, Val ou Tyr) (Valdezate et al., 2002). Em nosso estudo avaliamos as mutações na girase A em 15 cepas resistentes ao levofloxacino, entretanto, não observamos alterações nas sequências de aminoácidos das amostras

estudadas. Na análise comparativa da sequência de nucleotídeos observamos mutações pontuais nas posições: 106, 129, 144, 159, 162, 165, 171, 183, 189, 204, 225. As amostras com CIM de 16 µg/mL apresentaram um número maior de mutações pontuais. Valdezate et al., 2002, estudaram 32 amostras de *S. maltophilia* e observaram mutações na sequência de aminoácidos nas posições 70, 113, 119 e 124 quando comparadas a sequências de enterobactérias, entretanto, o significado dessas mutações não foi esclarecido. Aparentemente existem mecanismos de resistência prévios ao contato das quinolonas com as regiões de resistências nas topoisomerasas que dificultariam a mutação das girases.

Os genes de resistência as quinolonas mediados por plasmídios (*qnr*) foram recentemente descritos na *S. maltophilia* (Shimizu et al., 2008). Em nosso estudo não observamos amostras positivas para os genes *qnr A*, *qnrB* e *qnrS* descritos em Enterobactérias (Jacoby et al., 2008). Entretanto, 83 (78,3%) amostras estudadas, foram positivas para o gene *qnrMR*. Esse gene tem similaridade maior de 70% com genes *qnr* do grupo B da classificação dos *qnr* descrita por Jacoby et al., 2008. Não observamos relação na presença de *qnr* e elevação da CIM para ciprofloxacino ou levofloxacino. Em 13 amostras seqüenciadas observamos que quatro amostras foram idênticas a sequência do *Smqnr6* descrita por Shimizu et al., 2008 no Japão. Uma amostra foi idêntica ao gene *Smqnr4* descrito pelo mesmo autor (Shimizu et al. 2008). Uma amostra foi idêntica a sequência de *qnr* ainda não classificada descrita na Espanha por Sanchez et al., 2008, uma amostra foi idêntica a sequência do gene *smqnr12* descrita por Gordon

et al. 2010. E finalmente, quatro amostras foram diferentes das sequências de *qnr* depositadas no GenBank até hoje, podendo ser novos *qnr* ainda não descritos. Aparentemente, os genes *qnr* não estão envolvidos na resistência as quinolonas na *S. maltophilia*, porém, a presença desses genes nessa bactéria alerta para a possibilidade de transmissão horizontal para outras bactérias, principalmente as Enterobactérias.

A enzima *aac(6')-ib-cr* é uma enzima *aac(6')-ib* com mutação na posição Trp102Arg que altera a sensibilidade as quinolonas, principalmente ciprofloxacino. Até o momento a enzima mais prevalente na *S. maltophilia* é a enzima *aac(4')-ib*. Não existem trabalhos que avaliem a presença da enzima *aac(6')-ib-cr* na *S. maltophilia*. Entretanto, no GenBank existe uma sequência descrita dessa enzima na *S. maltophilia* depositada com número HQ438047.1. Curiosamente, nas quatro amostras avaliadas observamos a mutação na posição 102, porém não conseguimos correlacionar a presença dessa mutação com a CIM para ciprofloxacino ou levofloxacino. No presente estudo, tentamos conferir se a presença dessa enzima era plasmidial ou não, porém, na transferência plasmidial não observamos a presença de plasmídios, levando a crer que essa enzima na *S. maltophilia* tem localização cromossômica.

O estudo de clonalidade das cepas resistentes a SMX/TMP e ao levofloxacino mostrou uma importante variabilidade genética, mesmo cepas do mesmo hospital com resistência as mesmas drogas exibiram perfis clonais diferentes. Este achado é compatível com estudos prévios descritos na literatura que relatam um padrão policlonal nas infecções por

S. maltophilia exceto em pacientes com fibrose cística (Gulmaz et al. 2010; Valdezate et al., 2004). Valdezate et al., 2004, na Espanha estudaram 112 casos de colonização/infecção por *S. maltophilia* e observaram que 99 cepas não foram relacionadas. Almeida et al., 2006, no Rio de Janeiro, avaliaram a clonalidade de 21 cepas de *S. maltophilia*, observando unicamente 5 pares de cepas com perfil clonal possivelmente relacionado. Travassos et al., 2006 avaliaram 39 cepas e mostraram um perfil clonal diferente em 34 cepas. Focos de colonização e infecção por *S. maltophilia* no ambiente hospitalar são diversos, dificultando assim a determinação da transmissão cruzada na colonização/infecção por esse agente. Esses resultados mostram a grande variedade de perfis genéticos que a *S. maltophilia* exibe reforçando assim a idéia da ampla distribuição da espécie no ambiente.

As limitações do presente estudo foram a não avaliação de todos os mecanismos possíveis de resistência as quinolonas, principalmente em relação às bombas de efluxo. Outra limitação foi a não avaliação de mecanismos cromossômicos de resistência a TMP/SMX.

7 CONCLUSÕES

- *S. maltophilia* exibe um padrão de multirresistencia intrínseca a várias classes de antimicrobianos.
- Minociclina e Tigeciclina foram as drogas que apresentaram a melhor sensibilidade e podem ser opções na terapia de infecções por *S. maltophilia*.
- *S. maltophilia* parece ser um importante reservatório de genes de transmissão plasmidial.
- Isolados resistentes ao levofloxocino e a SMX/TMP são policlonais.
- Os genes *sul1*, *sul2* em integrons ou em regiões móveis do cromossomo da *S. maltophilia* parecem ser importantes mecanismos de resistência a SMX/TMP.
- A mutação na girase A aparentemente não é um mecanismo importante na resistência as quinolonas na *S. maltophilia*.

8 REFERÊNCIAS

Akova M; Bonifiglio G; Livermore DM. Susceptibility to β -lactam antibiotics of mutants strains of *Xanthomonas maltophilia* with high and low-level constitutive expression of L1 and L2 β -lactamases. *J Med Microbiol.* 1991;35:208-13.

Al-Hamad A; Upton M; Burnie J. Molecular cloning and characterization of SmrA, a novel ABC multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:731-734.

Al Naiemi N; Duim B; Bart A. A CTX-M extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Med Microbiol.* 2006;55:1607-1608.

Almeida MG; Rubio F; Garcia DO; Pavarino-Bertelli EC; Rossit A; Bando SY; Silbert S; Golini-Bertollo EM; Soares MM; Martinez MB. Genetic relatedness among clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia* in tertiary care hospital settings in São Paulo state, Brazil. *Brazilian J Microbiol.* 2007; 38:278-284

Alonso A; Martínez JL. Cloning and charecterization of *SmeDEF*, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2000;44:3079-86.

Avison MB; Von Heldreich CJ; Higgins CS; Bennett PM; Walsh TR. A TEM-2 β -lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46:879-84.

Ba BB; Feghali H; Arpin C; Saux MC; Quentin C. Activities of ciprofloxacin and moxifloxacin against *Stenotrophomonas maltophilia* and emergence of resistant mutants in a in vitro pharmacokinetic-pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(3):946-53.

Barbolla R; Catalano M; Orman BE; Famiglietti A; Vay C; Smayevsky J; Centrón D; Piñeiro S. Class 1 Integrons Increase Trimethoprim-Sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(2):666-9.

Belvisi V; Fabietti P; Del Borgo C; Marocco R; Di Vincenzo E; Soscia F; Mastroianni CM. Successful treatment for *Stenotrophomonas maltophilia* soft tissue infection with tigecycline: a case report. *J Chemother.* 2009;21:367-368.

Betriu C; Sánchez A; Palau AL; Gómez M; Picazo JJ. Antibiotic resistance surveillance of *Stenotrophomonas maltophilia*, 1993-1999. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;48:141-56.

Betriu C; Rodríguez-Avial I; Sánchez BA; Gómez M; Picazo J I. Comparative in vitro activities of tigecycline (GAR-936) and other antimicrobial agents against *Stenotrophomona maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50:758-9. (I)

Betriu C; Rodríguez-Avial I; Sánchez BA; Gómez M; Picazo J I. In vitro activities of tigecycline (GAR-936) against recently isolated clinical bacteria in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:892-895 (II)

Blanquer D; De Otero J; Padilla E; Gómez F; Mayol A; Espejo P; Rada MA; Makrantoní G; Pérez AR. Tigecycline for treatment of nosocomial-acquired pneumonia possibly caused by multi-drug resistant strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Chemother.* 2008;20:761-763.

Cantón R; Valdezate S; Vindel A; Sánchez Del Salz B; Máiz L; Baquero F. Antimicrobial Susceptibility Profile of Molecular Typed Cystic Fibrosis *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates and Differences With Noncystic Fibrosis Isolates. *Pediatric Pulmonology*. 2003;35:99-107.

Carroll KC; Cohen S; Nelson R; Campbell DM; Claridge JD; Garrison MW; Kramp J; Malone C; Hoffman M; Anderson DE. Comparison of various In Vitro susceptibility methods for testing *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998;32(3):229-35.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth Informational Supplement*. M100-S19. CLSI. 2009;28(1)

Crossman LC; Gould VC; Maxwell Dow J; Vernikos GS; Okazaki A; Sebahia M; Saunders D; Arrowsmith C; Carver T; Peters N; Adlem E; Kerhornou A; Lord A; Murphy L; Seeger K; Squares R; Rutter S; Quail MA; Rajandream A; Harris D; Churcher C; Bentley SD; parkhill J; Thomson NR; Avison MB. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Gen Biol*. 2008;9:R74.

Crowder MW; Walsh TR; Banovic L; Pettit M; Spencer J. Overexpression, purification and characterization of the cloned metallo- β -lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:921-6.

Del Toro MD; Rodriguez-Baño J; Herrero M; Rivero A; García-Ordóñez MA; Corzo J; Pérez-Cano R. Clinical Epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* Colonization and Infection. *Medicine*. 2002;81:228-39.

Denton M; Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:57-80.

Dignani MC; Graziutti M; Anaissie E. *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Semin Resp Crit Care Med*. 2003;24(1):89-98.

Fadda G; Spanu T; Ardito F; Taddei C; Santangelo R; Siddu A; Ciccaglione D; The Italian Epidemiological Observatory. Antimicrobial resistance among non-fermentative Gram-Negative bacilli isolated from the respiratory tracts of Italian in patients: a 3-year surveillance study by the Italian Epidemiological survey. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;23:254-61.

Falagas ME; Valkimadi PE; Huang YT, Matthaiou DK; Hsueh PR. Therapeutic options for *Stenotrophomonas maltophilia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62:889-894.

Farrell DJ; Sader HS; Jones RN. Antimicrobial Susceptibilities of a Worldwide Collection of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates Tested against Tigecycline and Agents Commonly Used for *S. maltophilia* Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54:2735-2737.

Fass RJ; Barnishan J; Solomon MC; Ayers LW. In Vitro activities of quinolones, β -lactams, tobramycin, and trimethoprim-sulfamethoxazole against nonfermentative Gram-Negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(6):1412-8.

Fedler K; Biedenbach DJ; Jones RN. Assessment of pathogen frequency and resistance patterns among pediatric patient isolates: Report from 2004 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program on 3 continents. *Diagnostic Microbiol Infect Dis*. 2006; 56:427-436.

Fritsche TR; Sader HS; Stiwell MG; Dowzicky MJ; Jones RN. Antimicrobial activity of tigecycline tested against organisms causing community-acquired respiratory tract infection and nosocomial pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005; 52:187-193.

Gales AC; Jones RN; Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12:315-321

Gales AC; Jones RN; Forward KR; Liñares J; Verhoef J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-1999). *Clin Infect Dis.* 2001 ;32(2) :104-13.

Garcia Paez JI e Costa SF. Risk factors associated with mortality of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review. *J Hosp Infect.* 2008; 70:101-108.

García-Rodríguez JA; García Sanchez JE; García García E; García Sanchez E; Muñoz Bellido MM. Antibiotic susceptibility profile of *Xanthomonas maltophilia* In vitro activity of β -Lactam/ β -Lactamase inhibitor combinations. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1991;14:239-43.

Garrison MW; Anderson DE; Campbell DM; Carroll KC; Malone CL; Anderson JD; Hollis RJ; Pfaller MJ. *Stenotrophomonas maltophilia*: emergence of multidrug-resistant strains during therapy in an in vitro pharmacodynamic chamber model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:2859-64.

Gesu GP; Marchetti F; Piccoli L; Cavallero A. Levofloxacin and Ciprofloxacin In Vitro Activities against 4,003 Clinical Bacterial Isolates Collected in 24 Italian Laboratories. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(2):816-9.

Giamarellos-Bourboulis EJ; Karnesis L; Galani I; Giamarellou H. In Vitro killing effect of Moxifloxacin on clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(12):3997-9.(I)

Giamarellos-Bourboulis EJ; Karnesis L; Giamarellou H. Synergy of colistin with rifampin and trimethoprim/sulfamethoxazole on multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;44:259-63.(I)

Girão E; Levin AS; Basso M; Gobara S; Gomes LB; Medeiros EA; Costa S. Trends and outcome of 1121 nosocomial bloodstream infection in intensive care units in a Brazilian hospital, 1999-2003. *Int J Infect Dis*. 2008; 12:e146-146.

Gordon NC., Wareham DW. Novel variants of the Smqnr family of quinolone resistance genes in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:483-489.

Gould MI; Milne K. In-vitro pharmacodynamic studies of piperacilin/tazobactam with gentamicin and ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother*. 1997;39:53-61.

Gulmez D ; Hasçelik G. *Stenotrophomonas maltophilia* : antimicrobial and molecular typing of an emerging pathogen in a Turkish university hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2005 ;11 :880-886.

Gulmez D ; Çakar A ; Sener B ; Karakaya J, Hasçelik G. Comparison of different antimicrobial susceptibility testing methods for *Stenotrophomonas maltophilia* and results of synergy testing. *J Infect Chemother*. 2010 ; 16 :322-328.

Harada N ; Soejima Y ; taketomi A ; Yoshizumi T ; Uchiyama H ; Maehara Y. *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia after living donor liver transplantation : report of a case. *Surg today*. 2008 ;38 :496-472...

Hu LF; Chang X; Ye Y; Wang ZX; Shao YB; Shi W; Li X; Li JB. *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of sul and dfrA genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *Intern J Antimicrob Agents*. 2011; 37:230-234

Hugh R; Ryschenkow E. An Alcaligenes-like Pseudomonas species. *Bacteriol Proc.* 1960, p. 78.

Huovinen P; Sundstrom L; Swedberg G; Skold O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:279-289.

Insa R; Cercenado E; Goyanes MJ; Morente A; Bouza E; In vitro activity of tigecycline against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 583-585.

Jacoby G; Cattoir V; Hooper D; Martínez-Martínez L; Nordmann P; Pascual A; Poirel L; Wang M. qnr Gene Nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2297-2299.

Jones RN; Sader HS; Beach ML. Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22:551-6.

Jumaa PA; Sonnevend A; Pal T; El Haq M; Amith R; Trad O. The molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia in a tertiary referral hospital in the United Arab Emirates 2000-2004. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006;28:32

Kaiser S; Biehler K; Jonas D. A *Stenotrophomonas maltophilia* Multilocus sequencia Typing scheme for inferring population structure. *J Bacteriol.* 2009; 191;2934-2943.

Kaufmann M. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *In Molecular Bacteriology: protocols and Clinicals Applications* by Woodford, N. and Johnson, A.P. Ed. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA. 1998;15:33-50.

Lanzafame A; Bonfiglio G; Santini L; Mattina R. In vitro activity of levofloxacin against recent Gram-negative nosocomial pathogens. *Chemother.* 2005; 51:44-50.

Lambert T; Ploy MC; Denis F; Courvalin P. Characterization of the Chromosomal *aac(6')-Iz* Gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(10):2366-71.

Lecso-Bornet M; Bergogne-Berezin E. Susceptibility of 100 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* to three β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40:717-20.

Li XZ; Zhang L; Poole K. *SmeC*, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:333-43.

Li XZ; Zhang L, McKay GA; Poole K. Role of the acetyltransferase *AAC(6')-Iz* modifying enzyme in aminoglycoside resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:803-11.

Lin CW; Chiou CS; Chang; Yang TC. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and three rep-PCR methods for evaluating the genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Lett Appl Microbiol.* 2008;47:393-398.

Looney WJ; Narita M; Munhlemann K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2009;9:312-323.

Micozzi A; Venditti M; Monaco M; Friedrich A; Taglietti F; Santilli S; Martino P. Bacteremia due to *Stenotrophomonas maltophilia* in patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis.* 2000;31 :705-11.

Milatovic D; Schmitz FJ; Verhoef J; Fluit AC. Activities of the glycylcycline tigecycline (GAR-936) against 1,924 recent European clinical bacterial isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(1):400-4.

Morrison AJ; Hoffmann KK; Wenzel RP. Associated Mortality and Clinical Characteristics of Nosocomial *Pseudomonas maltophilia* in a University Hospital. *J Clin Microbiol.* 1986;24:52-5.

Muder RR; Harris AP; Muller S; Edmond M; Chow JW; Papadakis C; Wagener M W; Bodey G P; Steckelberg J M. Bacteremia due to *Stenotrophomonas (Xantomonas) maltophilia*: a Prospective multi-center study of 91 episodes. *Clin Infect Dis.* 1996;22:508-12.

Muñoz Bellido JL; García MI; Muñoz S; Leal S; Fajardo M; García-Rodríguez JA. Activity of trimethoprim/Sulfamethoxazole plus polymyxin B against multiresistant *Stenotrophomonas maltophilia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996;15:879-82.

Muñoz Bellido JL; Muñoz Criado S; García García I; Alonso Manzanares MA; Gutiérrez Zufiaurre MN; García-Rodríguez JA. In Vitro activities of β -Lactam- β -Lactamase inhibitor combinations against *Stenotrophomonas maltophilia*: Correlation between methods for testing inhibitory activity, Time-Kill curves, and bactericidal activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(12):2612-5.

Al Naiemi N; Duim B; Bart A. A CTX-M extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Med Microbiol.* 2006;55:1607-1608.

Nicodemo AC; Garcia Paez JI. Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007 ;90(1):35-8.

Nicodemo AC; Araujo MRE; Ruiz AS; Gales AC. In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution methods. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:604-8.

Okazaki A; Avison MB. Characterization of the Aph(3')-IIa determinant of *Stenotrophomonas maltophilia*. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Washington, D.C, EUA. Abstract C1-1497, p. 85. American society for microbiology, Washington, D.C. 2004.

Pankuch GA; Jacobs MR; Rittenhouse SF; Applebaum PC. Susceptibilities of 123 strains of *Xanthomonas maltophilia* to eight β -Lactams (including β -Lactam- β -Lactamase inhibitor combinations) and ciprofloxacin tested by five methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:2317-22.

Petersen PJ; Labthavikul P; Jones CH; Bradford PA. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by chequerboard and time-kill kinetic analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:573-576.

Rahmati-Bahram A; Magee JT; Jackson SK. Growth temperature-dependent variation of cell envelope lipids and antibiotic susceptibility in *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 1995;36:317-26.

Rahmati-Bahram A; Magee JT; Jackson SK. Effect of temperature on aminoglycoside binding sites in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 1997;39:19-24.

Sader HC; Jones RN. Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *Intern J Antimicrob Agents.* 2005I; 25:95-109.

Sader HS; Jones RN; Dowzicky MJ; Fritsche TR. Antimicrobial activity of tigecycline tested against nosocomial bacterial pathogens from patients hospitalized in the intensive care unit. *Diagnos Microbiol Infect Dis.* 2005 II; 52:203-208.

Sader HS; Jones RN; Stilwell MG; Dowzicky MJ; Fritsche TR. Tigecycline activity tested against 26,474 bloodstream infection isolates: a collection from 6 continents. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005 III; 52:181-186

Sader HS; Pignatari AC; Frei R; Hollis RJ; Jones RN. Pulsed-field gel electrophoresis of restriction-digested genomic DNA and antimicrobial susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* strains from Brazil, Switzerland and the USA. *J Antimicrob Chemother*. 1994;33:615-8.

Saino Y; Kobayashi F; Inoue M; Mitsuhashi S. Purification and properties of an inducible penicillin β -lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982;22:564-70.

San Gabriel P; Zhou J; Tabibi S; Chen Y; Trauzzi M; Saiman L. Antimicrobial Susceptibility and synergy Studies of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from Patients With Cystic Fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):168-71.

Sanchez MB; Martinez JL. Smqnr contributes to intrinsic resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:580-581.

Sanchez MB; Hernandez A; Rodriguez-Martinez JM; Martinez-Martinez L; Martinez JL. Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. *BMC Microbiol*. 2008;8:148

Sánchez P; Alonso A; Martinez JL. Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *Antimicrobial Agentes Chemother*. 2002;46:3386-3393.

Schaumann R; Laurin F; Rodloff AC. Molecular typing of clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* by pulsed-field gel electrophoresis and random primer PCR fingerprinting. *Int J Hyg Environ Health*. 2008;211:292-298.

Shimizu K; Kikushi K; Sasaki T; Takahashi N; Ohtuka M; Ono Y; Hiramatsu K. Smqnr, a new chromosome-carried quinolone resistance gene in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:3823-3825.

Souza Dias MB; Habert AB; Borrasca V; Stempliuk V; Ciolli A; Araújo MR; Costa SF; Levin AS. Salvage of long-term central venous catheters during an outbreak of *Pseudomonas putida* and *Stenotrophomonas maltophilia* infections associated with contaminated heparin catheter-lock solution. *Infect control Hosp epidemiol*. 2008;29:125-130.

Tan CK; Liaw SJ; YU CJ; Teng PR, Hsueh PR. Extensively drug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in a tertiary care hospital in Taiwan: microbiologic characteristics, clinical features, and outcomes. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2008; 60:205-10

Tenover FC; Arbeit RD; Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997;18(6):426-439.

Toleman MA; Bennett PM; Bennett DMC; Jones RN, Walsh T. Global emergence of Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:559-565.

Traub WH; Leonhard B; Bauer D. Antibiotic susceptibility of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*: comparative (NCCLS Criteria) evaluation of antimicrobial drugs with the agar dilution and the agar disk diffusion (Bauer-Kirby) Tests. *Chemotherapy*. 1998;44:164-73.

Travassos LH; Pinheiro MN; Coelho FS; Sampaio JLM; Merquior VLC; Marques EA. Phenotypic properties, drugs susceptibility and genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains from seven hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol*. 2004;96:1143-1150

Tripkovic V ; Muller-Premru M ; Kalenic S ; Plecko V ; I Jelic ; Filipovic-Grcic B ; Jandrlic M. Clustering of infections caused by different PFGE types of *Stenotrophomonas maltophilia* occurring simultaneously in a university hospital. *J Hospital Infect*. 2001 ;47 :333-335

Tsiodras S; Pittet D; Carmeli Y; Eliopoulos G; Boucher H; Harbarth S. Clinical implications of *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole: a study of 69 patients at 2 university hospitals. *Scand J Infect Dis*. 2000;32:651-6.

Valdezate S; Vindel A; Loza E; Baquero F; Canton R. Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(5):1581-4.

Valdezate S; Vindel A; Echeita A; Baquero F; Canton R. Topoisomerase II and IV Quinolone Resistance-Determining Regions in *Stenotrophomonas maltophilia* Clinical Isolates With Different Levels of Quinolone Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(3):665-71.

Vanhoof R; Sonck P; Hannecart-Pokorni E. The role of lipopolysaccharide anionic binding sites in aminoglycoside uptake in *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 1995;35:167-71.

Vartivarian S; Anaissie E; Bodey G; Sprigg H; Rolston K. A changing pattern of susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to antimicrobial agents: implications for therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:624-7.

Vasileuskaya-Schulz Z; Kaiser S; Maier Thomas; Kostrzewa M; Jonas D. Delineation of *Stenotrophomonas* spp. By multi-locus sequences analysis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Systematic Applied Microbiol.* 2011; 34:35-39

Walsh TR; Macgowen AP; Bennett PM. Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(7):1460-4.

Walsh TR; Hall L; Assinder SJ; Nichols WW; Cartwright SJ; Macgowan AP; Bennett PM. Sequence analysis of the L1 metallo- β -lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim. Biophys Acta.* 1994;1218:199-201.

Weiss K; Restieri C; De Carolis E; Laverdière; Hélèn G. Comparative activity of new quinolones against 326 clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45:363-5.

Wood GC; Underwood EL; Croce MA; Swanson JM; Fabian TC. Treatment of recurrent *Stenotrophomonas maltophilia* ventilator-associated pneumonia with doxycycline and aerosolizes colistin. *Annals Pharmacother.* 2010;44:1665-1668.

Yao JDC; Louie M; Louie L. Comparison of E test and Agar Dilution for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1428-30.