Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Pesquisa de genes de resistência a quinolonas em bacilos
Gram negativos de origem clínica e ambiental

Rafaela Rogério Floriano de Sousa

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Serviço de Saúde Pública.

Orientador: Prof. Associado Dr. Glavur Rogério Matté.

São Paulo

2014

Pesquisa de genes de resistência a quinolonas em bacilos Gram negativos de origem clínica e ambiental

Rafaela Rogério Floriano de Sousa

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Serviço de Saúde Pública

Orientador: Prof. Associado Dr. Glavur Rogério Matté

São Paulo

2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e coragem, e por permitir que mesmo com medo eu sempre supere meus obstáculos.

À minha família, meu pai, minha mãe, e meus irmãos que da forma deles sempre estiveram do meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao professor Glavur Rogério Matté, pela orientação e apoio neste projeto.

À professora Maria Helena Matté, pelos ensinamentos, dedicação e compreensão ao longo deste trabalho.

Aos professores Nilton Lincopan, Rodrigo Cayô e Maria Inês Zanolli Sato, pelas correções na dissertação, contribuições e atenção despendida para finalização deste trabalho.

Ao Laboratório de Microbiologia Diagnóstica do Apoio à Saúde (LMDIAS) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, especialmente à professora Elsa Masae Mamizuka e à Mônica Pavez Aguilar, por cederem algumas das cepas utilizadas no estudo.

À professora Maria Tereza Pepe Razzolini e ao Flávio Krzyzanowski Júnior, do Laboratório de Análises Biológicas (LAB) da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, por cederem algumas das cepas utilizadas no estudo.

Às agências Capes e CNPq pelo auxílio financeiro.

À toda equipe do Laboratório de Prática de Saúde Pública, muito obrigada.

À Milena, por toda a contribuição técnica, sempre disposta a me ajudar e ensinar, nossa... como eu te perturbei nesses dois anos! Obrigada também por todas as conversas, incentivos e pela sua generosidade.

À Mirian, pelo apoio e ensinamentos, por toda ajuda durante este projeto.

À Marina, à Vanessa e ao Francisco, começamos juntos, cada um com o seu projeto, mas de alguma forma unidos por um vínculo maior, estou concluindo esta etapa, e em breve serão vocês, hein! Boa sorte!!

À Lívia e à Ronalda, pelo incentivo durante a minha carreira acadêmica e apoio nesses anos.

Às muitas pessoas que passaram pela minha vida nestes últimos anos, e que de alguma forma marcaram e me apoiaram.

À Pam, Paty, Luisa, Ana, Flavia, Samara, Mari e Bru, cada uma no seu tempo e da sua forma, mas todas, eu posso chamar de amiga. Muito obrigada a todas vocês, pelas conversas, distrações, incentivos, risadas, pela força, amizade e por me emprestarem coragem.

Muito Obrigada!!

EPÍGRAFE

*“Apesar de minha alma viver na escuridão, se erguerá em plena luz.
Amei demais as estrelas para temer a noite.”*

Sarah Willians – The Old Astronomer

Resumo

Sousa, R. Pesquisa de genes de resistência a quinolonas em bacilos Gram negativos de origem clínica e ambiental [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução. Quinolonas são antimicrobianos sintéticos que inibem as enzimas DNA-girase e topoisomerase IV resultando na morte bacteriana. São altamente eficazes no tratamento de infecções bacterianas, especialmente causadas por bactérias Gram negativas, e portanto amplamente utilizados na medicina humana e veterinária, na qual também são empregados como profiláticos. Porém, o uso indiscriminado e inadequado levou ao aumento de bactérias resistentes a estes compostos. Esta resistência pode ocorrer devido a mutações nas enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, e também por genes contidos em plasmídeos. Estes últimos são os principais responsáveis pela disseminação e circulação da resistência entre o meio ambiente e o ambiente hospitalar. **Objetivos.** Pesquisar genes de resistência a antimicrobianos do grupo das quinolonas em bactérias Gram negativas de origem clínica e ambiental que apresentam resistência fenotípica a este grupo. **Material e Métodos.** 73 cepas de *Enterobacteriaceae* e *Aeromonas* sp. de origem clínica e ambiental foram selecionadas para o estudo, e avaliadas quanto à sensibilidade aos antimicrobianos do grupo das quinolonas e à pesquisa de genes de resistência a este mesmo grupo e mutações no gene que codifica a enzima DNA-girase por meio de PCR e sequenciamento. **Resultados.** Das 73 cepas previamente selecionadas para compor o estudo, 65 foram utilizadas, devido à exclusão de perfis clonais similares. Nestas, foram observados os genes, *qnrS1* (1,5%), *qnrS2* (26,2%), *qnrB1* (3,1%), *qnrB19* (12,3%), *qnrD1* (1,5%), *aac(6')-Ib-cr* (10,8%), *oqxA* (43,1%) e *oqxB* (41,5%), e duas variantes determinadas *qnrB-like* (3,1%) e *qnrB69-like* (1,5%). Os genes *qnrA*, *qnrC* e *qepA* não foram identificados. Mutações na enzima DNA-girase foram observadas em 97,9% das cepas positivas para algum dos genes pesquisados. Em 4 cepas foi possível estabelecer a associação do gene *aac(6')-Ib-cr* com integron de classe 1. Foi realizado sequenciamento e caracterização do plasmídeo completo onde estava inserido o gene *qnrD1*. **Conclusões.** Este estudo relata pela primeira vez no Brasil a ocorrência dos genes *qnrS2*, *oqxA* e *oqxB*, a associação entre o elemento genético integron de classe 1 e o gene *aac(6')-Ib-cr*, e o gene *qnrD1* e a caracterização do plasmídeo completo onde este estava inserido. Os genes *qnrB1*, *qnrB19*, e *aac(6')-Ib-cr*, anteriormente apenas relatados em cepas clínicas, foram observados em cepas ambientais. Os resultados deste estudo mostram alta frequência de genes de resistência a quinolonas tanto em isolados clínicos quanto em isolados ambientais, alertando quanto à disseminação da resistência entre fontes diferentes, e possível manutenção destes genes por cepas ambientais.

Descritores: Resistência Bacteriana; Genes de Resistência a Quinolonas / Fluoroquinolonas; Plasmídeos Mediadores de Resistência a Quinolonas (PMQR).

Abstract

Sousa, R. Research for genes of quinolone resistance in Gram negative bacilli from clinical and environmental origin. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2014.

Introduction. Quinolones are synthetic antimicrobial agents that inhibit DNA gyrase and topoisomerase IV enzymes resulting in bacterial death. They are highly effective in the treatment of bacterial infections, especially the ones caused by Gram negative bacteria, as well as for prophylaxis. Therefore they are widely used in human and veterinary medicine. However, indiscriminate and improper use led to an increase of bacteria resistance to these compounds. This resistance can be due to mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV enzymes and also by genes contained in plasmids, which are mainly responsible for the spread and transmission of resistance between the environment and the hospital set. **Objectives.** To search for genes of resistance to quinolone antimicrobial agents in Gram-negative bacteria from clinical and environmental strains that present phenotypic resistance to this group. **Material and Methods.** 73 strains of *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp., from clinical and environmental origin, were selected for this study, and evaluated for antimicrobial susceptibility of quinolone and search of resistance genes in this same group and also for mutations in the gene encoding the enzyme DNA gyrase by PCR and sequencing. **Results.** Of the 73 strains previously selected to compose this study, 65 were used, due to the exclusion of similar clonal profiles. In these, genes *qnrS1* (1.5%), *qnrS2* (26.2%) *qnrB1* (3.1%), *qnrB19* (12.3%) *qnrD1* (1.5%) *aac(6')-Ib-cr* (10.8%) *oqxA* (43.1%) and *oqxB* (41.5%) were observed, and two variants were named as *qnrB-like* (3.1%) and *qnrB69-like* (1.5 %). The *qnrA*, *qnrC* and *qepA* genes were not identified. Mutations in DNA gyrase enzyme were observed in 97.9% of the positive strains for at least one of the genes studied. It was possible to establish the association of *aac(6')-Ib-cr* with class 1 integron gene in four strains. Complete sequencing and characterization of plasmid *qnrD1*, where the gene was inserted, was performed. **Conclusions.** This study reports, for the first time in Brazil, the occurrence of *qnrS2*, *oqxA* and *oqxB* genes, the association between genetic element integron class 1 gene and the *aac(6')-Ib-cr*, and *qnrD1* gene and the characterization of the complete plasmid where this was inserted. *qnrB1*, *qnrB19*, and *aac(6')-Ib-cr* genes, previously only reported in clinical strains, were observed in environmental strains. The results of this study show a high frequency of quinolone-resistance genes for both clinical and environmental isolates, warning about the spread of resistance through different sources, and the possible maintenance of these genes by environmental strains.

Keywords: Bacterial Resistance, Quinolone-Resistance Genes / fluoroquinolones; Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR).

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 SAÚDE PÚBLICA E A RESISTÊNCIA BACTERIANA	14
1.1.1 Disseminação da Resistência Bacteriana	15
1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS QUINOLONAS	18
1.3 MECANISMO DE AÇÃO DAS QUINOLONAS	20
1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS	22
1.4.1 Mutações na DNA-girase e Topoisomerase IV	22
1.4.2 Plasmídeos mediadores de resistência à quinolonas	23
1.4.2.1 Proteínas Qnr	24
1.4.2.2 Aminoglicosídeo Acetiltransferase – cr [Aac(6')-Ib-cr]	25
1.4.2.3 Sistemas de Efluxo	26
1.5 EPIDEMIOLOGIA DOS PLASMÍDEOS MEDIADORES DE RESISTÊNCIA À QUINOLONAS	27
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 SELEÇÃO DAS CEPAS	32
3.2 TESTE DE SENSIBILIDADE PARA CONFIRMAÇÃO DA RESISTÊNCIA A QUINOLONAS	35
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL	35
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	35
3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES	36
3.6 PESQUISA DE GENES POR PCR	37
3.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	38
3.8 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	38
3.9 LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>qnrD</i>	40
3.10 PESQUISA DE MUTAÇÕES NA REGIÃO DETERMINANTE DE RESISTÊNCIA À QUINOLONA	40
3.11 ASSOCIAÇÃO COM ELEMENTOS GENÉTICOS	41
3.12 SEQUENCIAMENTO	41
3.13 ANÁLISE DOS RESULTADOS	42
3.14 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)	42
3.14.1 Preparo do <i>plug</i>	42
3.14.2 Comparação do perfil genético entre cepas de mesma espécie (<i>Xba</i> I – PFGE)	43
3.14.2.1 <i>Xba</i> I – PFGE	43
3.14.3 Detecção e determinação do tamanho dos plasmídeos	44
3.14.3.1 <i>SI</i> – PFGE	45

4 RESULTADOS	46
4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES	46
4.2 PERFIL DE SENSIBILIDADE À QUINOLONAS	46
4.3 COMPARAÇÃO GENÉTICA ENTRE AS CEPAS DE ORIGEM AMBIENTAL	50
4.4 CEPAS SELECIONADAS PARA UTILIZAÇÃO NO ESTUDO	51
4.4.1 Cepas Clínicas	52
4.4.2 Cepas Ambientais	52
4.5 GENES DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS	53
4.5.1 <i>qnrS</i>	53
4.5.2 <i>qnrB</i>	54
4.5.3 <i>aac(6')-Ib-cr</i>	55
4.5.4 <i>oqxA</i> e <i>oqxB</i>	57
4.5.5 <i>qnrD</i>	57
4.6 DISTRIBUIÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS ENTRE AS CEPAS POSITIVAS	59
4.7 PRESENÇA DE MUTAÇÕES NO GENE <i>gyrA</i>	61
4.8 DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS PLASMÍDEOS	61
5 DISCUSSÃO	65
5.1 PERFIL DE SENSIBILIDADE ÀS QUINOLONAS	65
5.2 GENES DE RESISTÊNCIA À QUINOLONAS	66
5.2.1 <i>qnrS</i>	67
5.2.2 <i>qnrB</i>	68
5.2.3 <i>qnrD</i>	70
5.2.4 <i>aac(6')-Ib-cr</i>	72
5.2.5 <i>oqx</i>	74
5.2.6 Coexistência de genes de resistência à quinolonas	75
5.3 PRESENÇA DE MUTAÇÕES NO GENE <i>gyrA</i>	76
5.4 IMPORTÂNCIA DOS PLASMÍDEOS MEDIADORES DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS	77
5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
6 CONCLUSÕES	82
7 REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	98
Anexo 1 - Comparação entre sequências de associações dos genes <i>intI1</i> e <i>aac(6')-Ib-cr</i> .	98
Anexo 2 - Sequência completa do plasmídeo carreador do gene <i>qnrD1</i> .	100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação de algumas quinolonas de acordo com as suas gerações.	18
Quadro 2. Cepas bacterianas provenientes de amostras hospitalares selecionadas para este estudo.	33
Quadro 3. Cepas bacterianas de origem ambiental selecionadas para este estudo.	34
Quadro 4. Relação de cepas de origem ambiental utilizadas no estudo.	51
Quadro 5. Perfil de sensibilidade e características moleculares de resistência à quinolonas das cepas positivas aos genes de resistência às quinolonas.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de iniciadores utilizados para identificação das espécies.	37
Tabela 2. Sequência de iniciadores utilizados para pesquisa de genes de resistência à quinolonas.	38
Tabela 3. Sequência de iniciadores desenvolvidos para este estudo para genes de resistência a quinolonas, e condições para PCR.	39
Tabela 4. Sequência de iniciadores para localização do gene <i>qnrD</i> .	40
Tabela 5. Sequência de iniciadores para pesquisa de mutações no gene <i>gyrA</i> .	41
Tabela 6. Sequência de iniciadores para os genes <i>intI1</i> e <i>intI2</i> .	41
Tabela 7. Perfil de sensibilidade às quatro gerações de quinolonas, cepas de origem clínica.	48
Tabela 8. Perfil de sensibilidade às quatro gerações de quinolonas, cepas de origem ambiental.	49
Tabela 9. Porcentagem de cepas resistentes as quinolonas testadas em relação a origem.	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de algumas quinolonas.	19
Figura 2. Função das enzimas DNA-girase e Topoisomerase IV.	21
Figura 3. Mecanismo de ação das quinolonas.	22
Figura 4. Linha do tempo da descrição dos genes PMQR.	24
Figura 5. Distribuição dos genes <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrC</i> , <i>qnrD</i> , <i>qnrS</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qepA</i> e <i>oqxAB</i> .	28
Figura 6. Representação do sentido de amplificação, utilizando os iniciadores INVDF-R e INVR-F.	40
Figura 7. Árvore filogenética do gênero <i>Aeromonas</i> , com as cepas do gênero utilizadas neste estudo.	47
Figura 8. Distribuição de espécies bacterianas em relação a origem.	52
Figura 9. Gel de agarose com amplificação da associação entre os genes <i>intI1</i> e <i>aac(6')-Ib-cr</i> .	56
Figura 10. Esquema da associação entre os genes <i>intI1</i> e <i>aac(6')-Ib-cr</i> observada neste estudo.	56
Figura 11. Gel de agarose com amplificação do plasmídeo contendo o gene <i>qnrD1</i> , utilizando os iniciadores INVDF-R e INVDR-F.	58
Figura 12. Representação esquemática do plasmídeo contendo os genes <i>qnrD1</i> , <i>orf2</i> , <i>orf3</i> , e <i>orf4</i> .	59
Figura 13. Distribuição de genes de resistência a quinolonas em relação a origem de isolamento das cepas bacterianas hospedeiras.	60
Figura 14. Gel de agarose de eletroforese em campo pulsado após digestão com S1 nuclease.	62

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade a resistência bacteriana aos antimicrobianos é um sério problema mundial de saúde pública (COLLIGNON et al., 2009; ÉTIENNE et al., 2011; PAN et al., 2011).

Os antimicrobianos são essenciais para o tratamento de infecções, por isso seu uso se tornou de uso comum, e muitas vezes inadequado e abusivo. Os benefícios do uso dos antimicrobianos fizeram com que estes compostos fossem amplamente empregados em diferentes áreas: como terapêuticos na medicina humana e veterinária, como profiláticos e aditivos na criação de animais (pecuária e aquicultura), e no combate a pragas na agricultura (LEVY e MARSHALL, 2004; SILLEY et al., 2012; VAARTEN, 2012).

A ampla disponibilidade destes compostos propicia a evolução bacteriana, selecionando as cepas mais adaptadas e promovendo a recombinação de genes, que por sua vez geram o desenvolvimento de mutações genéticas e genes de resistência (LEVY e MARSHALL, 2004).

A disseminação destes genes é preocupante do ponto de vista da saúde pública, uma vez que tornam ineficientes os tratamentos existentes contra infecções bacterianas, aumentando a morbidade e mortalidade da população, comprometendo a saúde humana (COLLIGNON, 2012).

Os genes de resistência podem ser cromossômicos ou estar inseridos em elementos móveis com plasmídeos, integrons e transposons (BAQUERO et al., 2008). No segundo caso a disseminação pode ocorrer de forma mais rápida e facilitada entre diferentes espécies bacterianas (BURRUS e WALDOR, 2004; HAWKEY e JONES, 2009).

A pesquisa de genes de resistência é uma importante fonte de conhecimento para a Saúde Pública. A partir destes dados é possível obter informações sobre a resistência bacteriana que está circulando no meio e então fornecer subsídios para ações preventivas junto à população.

Um grupo de antimicrobianos que se enquadra nesta situação preocupante, de elevada resistência e disseminação de genes, é o das quinolonas.

1.1 SAÚDE PÚBLICA E A RESISTÊNCIA BACTERIANA

A descoberta dos antimicrobianos foi um grande avanço para a saúde da população mundial. Doenças foram controladas, mortes evitadas e ocorreu o aumento da qualidade de vida da população. Entretanto com o uso dos antimicrobianos também surgiu a resistência bacteriana, e este é um dos maiores problemas de saúde pública atualmente (ACAR e MOULIN, 2012).

A resistência bacteriana pode ser atribuída a vários fatores como: uso excessivo, indiscriminado e abusivo de antimicrobianos; facilidade de acesso ao composto antimicrobiano; antibioticoterapia empírica inadequada; uso errôneo em tratamentos não-infecciosos; entre outros fatores (COLLIGNON et al., 2009).

A elevada disponibilidade de compostos bactericidas propiciou o desenvolvimento, aquisição e disseminação de mecanismos de resistência pelas bactérias. Essa pressão seletiva é responsável pelo grande aumento de bactérias resistentes encontradas ultimamente (LEVY e MARSHALL, 2004).

O impacto da resistência bacteriana reflete diretamente na saúde da população e na saúde pública mundial. A ineficácia dos antimicrobianos frente a infecções tem se tornado recorrente, e medidas como utilização de antimicrobianos mais caros e tratamentos mais invasivos (administração intravenosa substituindo a oral), mais frequentes. Consequentemente, a morbidade e a mortalidade têm aumentado, junto a outros fatores como: complicações durante o tratamento, despesas médicas, duração da estadia do paciente no hospital, e toxicidade ao paciente (MCGOWAN, 2001; COLLINGON, 2012).

A preocupação com os danos que a resistência bacteriana pode causar cresce a cada dia, antimicrobianos usados no passado estão sendo descartados, compostos com alta toxicidade ao organismo humano retornam à rotina hospitalar, como por exemplo, a polimixina B, que está sendo utilizada no tratamento de infecções por *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp. multirresistentes, entretanto possui elevada toxicidade renal (COSGROVE e CARMELI, 2003).

No centro deste problema se encontra a população mais vulnerável, como imunodeprimidos, crianças, idosos e gestantes, que estão expostos e dependentes de medidas eficazes contra a resistência.

1.1.1 Disseminação da Resistência Bacteriana

A resistência bacteriana é um fenômeno evolutivo natural, ocorrendo devido a adaptações da bactéria e é um meio de sobrevivência em ambientes adversos (KELLY et al., 2009).

Os mecanismos de resistência bacteriana podem ser (i) naturais, devido à morfologia estrutural ou fisiologia bacteriana, por exemplo, anaeróbios são resistentes aos aminoglicosídeos, pois estes agem somente na presença de oxigênio, ou (ii) adquiridos, em que a bactéria recebe a capacidade de resistência a partir de mutações e movimentações genéticas, e não está relacionado a grupos bacterianos nem ocorre de forma previsível. Mutações cromossômicas espontâneas e aquisição de genes de resistência a partir de outro micro-organismo são exemplos deste tipo de resistência (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

A transferência horizontal de genes pode ocorrer através de conjugação, transformação ou transdução, e os elementos genéticos como plasmídeos, transposons e integrons tem sido os principais responsáveis por essa forma de disseminação da resistência bacteriana (KELLY et al., 2009).

Os plasmídeos são elementos extra cromossômicos com capacidade de replicação autônoma e controlada. Estes elementos podem armazenar diversos genes, incluindo genes de resistência, e podem ser móveis ou mobilizáveis, ou seja, capazes de se transferir ou serem transferidos para outras bactérias. Transposons são elementos genéticos móveis, capazes de se movimentar no cromossomo bacteriano e para plasmídeos, e podem flanquear genes de resistência e outros elementos genéticos. Os integrons são elementos genéticos que possuem regiões conservadas e variáveis, nas quais inserem e agrupam cassetes de genes de resistência. Podem ser encontrados inseridos em outros elementos genéticos, como plasmídeos e transposons, e assim podem ser transferidos para outras bactérias (LÉVESQUE et al., 1995; MAZEL, 2006; MARQUES, 2012).

Entretanto o uso dos antimicrobianos tem estimulado a seleção de bactérias resistentes e a dispersão dos genes de resistência, facilitada devido aos elementos genéticos móveis. Os antimicrobianos têm sido utilizados em diferentes áreas e para diferentes finalidades. Este fato levou à ampla distribuição destes compostos e de

bactérias resistentes na população, ambiente, animais e alimentos. Esta distribuição se deve principalmente às transferências genéticas entre as bactérias, e a fatores que predisõem essas transferências (BILA e DEZOTTI, 2003; BAQUERO et al., 2008; COLLIGNON et al., 2009; HAWKEY e JONES, 2009; WOOLDRIDGE, 2012).

Alguns destes fatores são, reaproveitamento de lodo de esgoto tratado na agricultura, ampla utilização dos antimicrobianos na medicina veterinária e na aquicultura, e à globalização.

O reaproveitamento de lodo de esgoto tratado na agricultura é uma prática sustentável e barata, que traz muitos benefícios tanto para a agricultura, através do reaproveitamento de nutrientes incorporados a ele, quanto para meio ambiente com a redução de resíduos poluentes (CUTOLO, 2009; CHEN et al., 2012). Porém, o tratamento do esgoto não elimina todos os patógenos, que podem causar infecções e estar carreando genes de resistência, e disseminar estes genes para bactérias ambientais. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), por meio da Resolução 375/06, estabeleceu normas e medidas que devem ser adotadas para a utilização do lodo de esgoto na agricultura, mas essa Resolução não prevê a transferência genética como fator de risco a população. A população exposta inclui desde os trabalhadores rurais ao consumidor final do produto, que pode não estar contaminado por bactérias patogênicas, mas com bactérias portadoras dos genes de resistência (DEVIRGILIIS et al. 2011).

A medicina veterinária tem aplicado os antimicrobianos para diferentes finalidades: terapêutica, profilática e para a promoção de crescimento dos animais. A utilização contínua de baixas doses de antimicrobianos na pecuária, como aditivos na alimentação dos animais, permite uma menor competição por nutrientes em relação a microbiota intestinal e redução da produção de metabólitos prejudiciais ao crescimento do animal. Sendo assim, o alimento é mais bem aproveitado e em decorrência é observado melhor desenvolvimento, desempenho, produtividade e diminuição da mortalidade dos animais (GONZALES et al., 2012). Os antimicrobianos promotores de crescimento trazem grandes benefícios para pecuária, entretanto também proporcionam maiores níveis de resistência bacteriana, e a diminuição da eficácia nos tratamentos infecciosos humanos. Devido a isso existem restrições de seu uso em diversos países, inclusive no Brasil onde os antimicrobianos

são proibidos como promotores de crescimento (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2009) e existem recomendações para evitar o uso de antimicrobianos exclusivamente humanos como medida terapêutica ou profilática. Apesar disso, o número de bactérias multirresistentes encontradas em alimentos tem aumentado. O consumo de alimentos mal preparados que contêm bactérias resistentes propiciam o aumento de doenças de âmbito alimentar e a transferência genética desta resistência para a microbiota residente do organismo humano, e permite que esta se torne reservatório, componha infecções de caráter oportunista e disperse estes genes ao serem eliminadas junto às fezes (KMET e PIATNICOVÁ, 2010; DEVIRGILIIS et al. 2011; MARSHALL e LEVY, 2011; BROADERS et al., 2013).

Na aquicultura os antimicrobianos são utilizados de forma profilática e terapêutica. Porém estes compostos ao serem incorporados a água, podem sedimentar-se, e permanecerem disponíveis por maiores períodos de tempo, e provocar a contaminação de outros ambientes (BILA e DEZOTTI, 2003). Bactérias ambientais são consideradas reservatórios de genes de resistência, segundo CABELLO (2006) micro-organismos do gênero *Aeromonas* podem armazenar e transferir genes de resistência para *Escherichia coli* e gerar doenças em humanos.

Com a globalização, a locomoção de pessoas entre diferentes países ficou muito facilitada, ocasionando maior dispersão dos genes de resistência pelo mundo. Viajantes podem ser portadores assintomáticos de bactérias multirresistentes, e tornarem-se vetores ao dispersarem estas cepas em diferentes lugares. Muitas doenças têm sido importadas através de viajantes. A enzima *New Dheli Metallo-beta-lactamase* (NDM), é um bom exemplo desta disseminação, tendo em vista que sua dispersão ocorreu principalmente através do trânsito humano (SCHITO, 2002; MACPHERSON et al., 2009; VAN DER BIJ e PITOUT, 2012).

Estes e outros fatores possibilitam a disseminação e a transferência de genes de resistência entre bactérias patogênicas e comensais, promovendo a permanência e a circulação destes genes no meio onde estão localizadas.

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS QUINOLONAS

Quinolona é um grupo constituído por antimicrobianos sintéticos, ou seja, quimioterápicos, descoberto durante o desenvolvimento de um agente antimalárico, a partir de um composto chamado quinina. Estes quimioterápicos possuem ação bactericida e de amplo espectro, abrangendo tanto Gram positivos quanto Gram negativos (ANDERSSON e MACGOWAN, 2003; VAN BAMBEKE et al., 2005).

As quinolonas são classificadas baseadas em suas gerações, entretanto esta classificação é controversa entre diversos autores, mas seguindo a utilizada por LEE e KANATANI (1999) e BOLON (2011), representantes das quatro gerações podem ser observados na Quadro 1.

Quadro 1. Classificação de algumas quinolonas de acordo com as suas respectivas gerações.

Primeira Geração	Segunda Geração	Terceira Geração	Quarta Geração
Ácido Nalidíxico	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Moxifloxacina
Ácido Pipemídico	Norfloxacina	Esparfloxacina	Trovafloxacina
	Ofloxacina	Grepafloxacina	Gemifloxacina
	Lomefloxacina		Gatifloxacina

Fonte: Adaptado de LEE e KANATANI (1999) e BOLON (2011).

O ácido nalidíxico foi a primeira quinolona a ser produzida e introduzida na clínica médica em 1962. Possui espectro de ação contra Gram negativos e baixa atividade contra Gram positivos, e é predominantemente utilizado nas infecções do trato urinário (BALL, 2000) (Figura 1).

Na década de 1980, foram introduzidas na clínica médica as fluoroquinolonas, assim chamadas devido ao acréscimo de uma molécula de flúor, na região do carbono -6, na fórmula química destes quimioterápicos. Estes por sua vez, adquiriram espectro de ação ampliado, com alta eficiência contra Gram positivos e Gram negativos, destacando a ciprofloxacina que possui ação contra *Pseudomonas aeruginosa* (BALL, 2000; EMMERSON e JONES, 2003; HAWKEY, 2003) (Figura 1).

Nos últimos quinze anos têm sido desenvolvidas e introduzidas as chamadas novas fluoroquinolonas, com amplo espectro de ação, abrangendo em especial Gram positivos como *Streptococcus pneumoniae*, e com diferente farmacocinética, como a moxifloxacina cuja eliminação ocorre via hepática, diferente das outras quinolonas que geralmente são eliminadas através dos rins (BOLON, 2011).

Figura 1. Estrutura química de algumas quinolonas. Adaptado: SOUZA e VASCONCELOS (2005). (Software ACD/ChemSketch).

As quinolonas são amplamente utilizadas no tratamento de infecções humanas, e na profilaxia e tratamento de infecções de animais (HEUER et al., 2009). Segundo FALCÃO et al. (2003), as fluoroquinolonas são o terceiro grupo de antimicrobianos mais prescritos no Brasil. ROTSCHAFER et al. (2011) destacam seu elevado uso e eficiência em infecções do trato urinário e gastrointestinais.

Na veterinária estes antimicrobianos são utilizados no tratamento de infecções diversas, principalmente causadas por *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* sp., e também como medida profilática ao serem incorporados à água de aquiculturas (HERNÁNDEZ et al., 2011; MILLANAO et al., 2011). As principais fluoroquinolonas utilizadas são enrofloxacin e sarafloxacin, exclusivas para o uso veterinário. Entretanto, já foi observada resistência cruzada entre estas e as fluoroquinolonas utilizadas para infecções humanas, em especial entre a

enrofloxacin e a ciprofloxacin que possuem a estrutura química similar (CRUZ et al., 2012).

Segundo levantamento realizado em 2004 no estado do Paraná, as quinolonas são os medicamentos mais utilizados, como medida profilática e terapêutica, na criação de frango de corte. Este relatório destaca também o uso inadequado de enrofloxacin e norfloxacin como promotores de crescimento (PARANÁ, 2005).

1.3 MECANISMO DE AÇÃO DAS QUINOLONAS

As células bacterianas possuem um cromossomo composto por uma molécula de DNA dupla fita. Este DNA geralmente encontra-se superenovelado dentro da célula, tanto para ocupar pouco espaço quanto para tornar funcionais as atividades da bactéria (HAWKEY, 2003).

Durante a replicação do DNA bacteriano, ocorre a chamada forquilha de replicação, a separação e abertura de um trecho da dupla fita (formando uma “bolha”) para replicação do mesmo, e conseqüentemente maior pressão sobre as torções existentes antes e depois desta forquilha. A enzima responsável por aliviar esta pressão, diminuindo o número de torções através de quebras do segmento e selando novamente ao remover um giro no DNA, é a DNA-girase ou topoisomerase II (PALUMBO et al., 1993; HAWKEY, 2003).

A DNA-girase é um tetrâmero, formado por duas subunidades A e duas subunidades B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* respectivamente, pertencente ao grupo de enzimas chamadas topoisomerasas. Esta enzima além de ser responsável por diminuir o número de torções durante a replicação do DNA, também tem a função de enovelar e superrelícoídar o DNA, portanto é essencial para controle e manutenção da célula bacteriana viva (PALUMBO et al., 1993; HAWKEY, 2003).

Além desta enzima as bactérias contam com outra topoisomerase, conhecida como topoisomerase IV, um tetrâmero formado por duas subunidades C e duas subunidades E, codificadas respectivamente pelos genes *parC* e *parE*. Esta enzima tem a função de separar a nova cópia de DNA do antigo cromossomo, para permitir a formação de uma célula-filha (Figura 2) (DRLICA et al., 2009; FALCONER et al., 2011).

Figura 2. Função das enzimas DNA-girase e Topoisomerase IV. A-E: Ação da DNA-girase. Subunidade A e subunidade B, clivando e acrescentando giros em uma dupla fita de DNA cromossômico bacteriano. F-G: Ação da Topoisomerase IV, separando a cópia do DNA cromossômico bacteriano para formação de uma célula-filha. Fonte: PALLO-ZIMMERMAN et al. (2010).

O mecanismo de ação das (fluoro)quinolonas consiste em se ligar às enzimas alvo, formando um complexo (quinolona – enzima – DNA), e impedir o desempenho da função das mesmas. Ao inibirem estas enzimas, não permitem que o processo de replicação continue e promovem rupturas nas cadeias de nucleotídeos, gerando pontas livres, e consequentemente a degradação da molécula de DNA. A captura destas enzimas ocorre quando o complexo enzima – DNA já está formado, e impede a reparação da cadeia de DNA, desencadeando a morte celular (DRLICA et al., 2008; DRLICA et al., 2009; KOHANSKI et al., 2010) (Figura 3).

Figura 3. Mecanismo de ação das quinolonas. Fonte: Adaptado de KOHANSKI et al. (2010).

1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS

Devido à ampla distribuição de quinolonas no ambiente e utilização pela população, são conhecidos alguns meios desenvolvidos e adquiridos pelas bactérias para tornar estes compostos ineficientes. Os mecanismos de resistência às quinolonas consistem em mutações nas enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, expressão de sistemas de efluxo, alterações ou ausência de porinas, proteção do sítio alvo, e modificação do antimicrobiano. A disseminação de alguns destes mecanismos de resistência ocorre principalmente por meio de genes carregados por plasmídeos (ALÓS, 2009; BOLON, 2011).

1.4.1 Mutações na DNA-girase e Topoisomerase IV

As mutações nas enzimas DNA-girase e topoisomerase IV são bem estudadas e são as principais formas de resistência a quinolonas encontradas. Estas mutações são espontâneas e alteram o sítio de ligação do antimicrobiano, reduzindo a afinidade e impedindo a ação do mesmo, devido a uma substituição de aminoácidos (DRLICA et al., 2009).

Na DNA-girase estas substituições acontecem mais frequentemente no gene *gyrA*, em que geralmente a serina localizada no códon 83 ou 87 é substituída por outro aminoácido, e com menor frequência no gene *gyrB*. A substituição de

aminoácidos que ocorre na topoisomerase IV é identificada nos genes *parC* e *parE*, com maior frequência no gene *parC* (JACOBY, 2005; BOLON, 2011).

Em geral essas mutações ocorrem em uma região bem definida, chamada de região determinante de resistência à quinolona (QRDR – *Quinolone-resistance determining region*). Em Gram negativos as mutações ocorrem geralmente no gene *gyrA* e em Gram positivos no gene *parC* (JACOBY, 2005).

1.4.2 Plasmídeos mediadores de resistência a quinolonas

A descoberta dos plasmídeos mediadores de resistência a quinolonas (PMQR - *Plasmid Mediated Quinolone Resistance*) sugerem a transferência horizontal dos genes de resistência a estes compostos, o que implica em sua maior circulação e disseminação. Outro fator importante relacionado aos PMQR é a possibilidade destes genes terem contribuído para aumento da ocorrência de mutações espontâneas nas regiões QRDR, pois permitem maior tempo de exposição da bactéria ao antimicrobiano, e baixos níveis de resistência que mascaram a sua presença *in vitro* (STRAHILEVITZ et al., 2009; RUIZ et al., 2012).

Desde a primeira ocorrência do gene *qnrA1* observado em plasmídeo de *Klebsiella pneumoniae* em 1998, os plasmídeos mediadores de resistência às quinolonas (PMQR) tem sido muito pesquisados (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 1998). Mesmo sendo observado pela primeira vez em 1998, estudos sugerem que estes plasmídeos estão circulando e disseminados pelo mundo há muitos anos (JACOBY et al., 2009).

Já são conhecidos até o momento três mecanismos de resistência a quinolonas mediados por plasmídeos: proteção do sítio alvo (proteínas Qnr), alteração do antimicrobiano (enzima aminoglicosídeo acetiltransferase – cr) e sistemas de efluxo (OqxAB e QepA) (RUIZ et al., 2012; POIREL et al., 2012) (Figura 4).

Figura 4. Linha do tempo da descrição dos genes PMQR. Fonte: Adaptado de RUIZ et al. (2012).

1.4.2.1 Proteínas Qnr

As proteínas Qnr, assim nomeadas devido à resistência que conferem às quinolonas (*quinolone resistance*), são formadas por pentapeptídeos repetidos e codificadas por genes *qnr* (RUIZ et al., 2012).

A ação exercida por estas proteínas é a de proteção da região alvo das quinolonas na enzima DNA-girase, impedindo a ligação da quinolona na enzima DNA-girase e consequentemente bloqueando a ação do antimicrobiano (STRAHILEVITZ et al., 2009), porém sua atividade natural dentro da célula bacteriana ainda é desconhecida.

As proteínas Qnr formam uma família subdividida em grupos de acordo com a similaridade dos aminoácidos: QnrA (QnrA1 – QnrA7); QnrB (QnrB1 – QnrB73); QnrC; QnrD (QnrD1 e QnrD2) e QnrS (QnrS1 – QnrS9) (JACOBY, 2005; CATTOIR et al., 2008a; ASAI et al., 2010; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al, 2011). Com base nos subtipos detectados foi desenvolvido um *website* para organizar as proteínas Qnr descobertas: <http://www.lahey.org/qnrStudies/> (JACOBY et al., 2008).

O gene *qnrA* foi o primeiro relatado em plasmídeo mediador de resistência à quinolona e a primeira proteína Qnr descrita. O gene *qnrA* foi descoberto em 1998 em um plasmídeo caracterizado como pMG252, localizado em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, e codificava uma proteína com 218 aminoácidos. Posteriormente este gene foi chamado de *qnrA1*, devido à descoberta de novas variantes *qnrA* (POIREL et al., 2012). POIREL et al. (2005) sugerem que o

gene *qnrA1* originou-se a partir de uma cepa de *Shewanella algae*, proveniente do ambiente aquático.

O gene *qnrS*, descrito pela primeira vez por HATA et al. (2005), foi o segundo gene *qnr* descrito. Este gene foi identificado em um plasmídeo (pAH0376) de *Shigella flexneri* 2b, e a proteína QnrS1 é constituída por 218 aminoácidos e apresenta 59% de identidade com a proteína QnrA1.

Em 2006, JACOBY et al. descrevem o gene *qnrB1*, em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* proveniente da Índia. Este gene codifica uma proteína de mesmo nome composta por 214 aminoácidos (WANG et al., 2009a) com similaridade em torno de 43% com a proteína QnrA1 e 44% com QnrS. Esta proteína possui o maior número de variantes dentre as proteínas Qnr, totalizando 73 até o momento (<http://www.lahey.org/qnrStudies/> - acesso: 19 jan. 2014).

A proteína QnrC, constituída por 221 aminoácidos, foi descrita por WANG et al. (2009b), codificada pelo gene *qnrC*, que foi detectado em um isolado de *Proteus mirabilis* proveniente da China. Esta proteína apresenta identidade de 64%, 41%, e 59% com as proteínas QnrA1, QnrB1, e QnrS1, respectivamente.

CAVACO et al. (2009) realizaram a primeira descrição da proteína QnrD, seu gene codificador foi detectado em um isolado de *Salmonella enterica*, proveniente da China. Esta proteína apresenta 214 aminoácidos e similaridade de 48%, 61%, 32%, e 43% com as proteínas QnrA1, QnrB1 e QnrS1 e QnrC, respectivamente.

1.4.2.2 Aminoglicosídeo Acetiltransferase – cr [Aac(6')-Ib-cr]

A enzima aminoglicosídeo acetiltransferase [Aac(6')-Ib], responsável por conferir resistência a aminoglicosídeos como amicacina, tobramicina e canamicina, adquiriu uma variante descoberta em 2006 por ROBICSEK et al. (2006a). Essa nova variante possui duas substituições de aminoácidos nas posições 102 (Trp por Arg) e 179 (Asp por Tyr) que lhe atribuíram a capacidade de conferir resistência às fluoroquinolonas (RUIZ et al., 2012; POIREL et al., 2012).

Essa nova enzima é conhecida como aminoglicosídeo acetiltransferase resistente a ciprofloxacina (- cr) [Aac(6')-Ib-cr], e possui o mesmo mecanismo de

ação da enzima anterior, promove a acetilação dos sítios de ação das fluoroquinolonas, e maior afinidade com os antimicrobianos ciprofloxacina e norfloxacina (PARK et al., 2006).

1.4.2.3 Sistemas de Efluxo

As bactérias são submetidas a diversos compostos adversos nos meios em que estão expostas. Para sobreviverem, desenvolveram um mecanismo baseado na sucção e expulsão de substâncias nocivas, chamado sistema de efluxo. Em bactérias Gram negativas, o mecanismo de expulsão é realizado por proteínas localizadas nas membranas interna e externa, e no espaço periplasmático (PAGÈS et al., 2011).

Os genes codificadores de sistemas de efluxo podem ser intrínsecos (cromossomo) ou adquiridos (plasmidiais). Existem diversos sistemas de efluxo conhecidos, entre eles duas grandes famílias: *resistance-nodulation-division* (RND) e *major facilitator superfamily* (MFS), às quais pertencem os dois principais sistemas de efluxo de quinolonas: QepA e OqxAB, respectivamente. QepA e OqxAB são dois sistemas de efluxo mediados por plasmídeos, responsáveis pela expulsão das quinolonas da célula bacteriana, impedindo a ação do quimioterápico e contribuindo para a resistência ao mesmo (CATTOIR et al., 2008b; LI e NIKAIDO, 2009; PAGES e AMARAL, 2009; KIM ES et al., 2009)

OqxAB é um sistema de efluxo composto por dois genes, *oqxA* e *oqxB*, que fazem parte de um mesmo operon. Este sistema de efluxo é capaz de conferir multirresistência à bactéria, incluindo fluoroquinolonas, ácido nalidíxico e cloranfenicol, e ao olaquinox, um promotor de crescimento utilizado na medicina veterinária, ao qual é atribuída a disseminação deste sistema de efluxo. A utilização do olaquinox como promotor de crescimento foi proibida em muitos países, inclusive no Brasil, em 2004 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2004; HANSEN et al., 2004; KIM HB et al., 2009).

O sistema de efluxo QepA (*quinolone efflux pump*) foi descrito pela primeira vez em um isolado de *Escherichia coli* no Japão, por YAMANE et al. (2007). Este sistema de efluxo é caracterizado pela redução da sensibilidade a quinolonas

hidrofílicas como ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacina, e baixa afinidade com quinolonas moderadamente hidrófilas e hidrofóbicas (esparfloxacina, levofloxacina, moxifloxacina e ácido nalidíxico) (PERICHON et al., 2007; YAMANE et al., 2007; POIREL et al., 2012).

1.5 EPIDEMIOLOGIA DOS PLASMÍDEOS MEDIADORES DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS

Os antimicrobianos pertencentes à classe das quinolonas possuem uma abordagem diversificada no tratamento de diferentes infecções. A ciprofloxacina, por exemplo, é recomendada desde o tratamento de infecções do trato urinário a infecções ósseas e respiratórias. Essa extensa eficácia e o amplo espectro de ação das quinolonas contribuíram para o aumento da sua utilização e recomendação médica, e também para o aumento da resistência bacteriana (BOLON, 2011).

Até 1998, acreditava-se que a resistência a quinolonas era devida somente às mutações nas enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, e não era cogitada a possibilidade de existir resistência transferida horizontalmente. Esta descoberta pode esclarecer o grande número de cepas resistentes a quinolonas dispersas pelo mundo atualmente (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

A ocorrência dos genes de resistência a quinolonas mediados por plasmídeos é cada vez mais frequente por todo o mundo, e traz o alerta de sua disseminação (Figura 5). Há relatos principalmente dos genes *qnr* e *aac(6')-Ib-cr* por vários países dos continentes Americano, Europeu, Asiático, Africano e Oceania (Austrália) (ROBICSEK et al., 2006b; STRAHILEVITZ et al., 2009).

O sistema de efluxo QepA tem sido detectado, porém com baixa frequência, principalmente em países da Europa e Ásia, e Estados Unidos e Canadá (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Figura 5. Distribuição dos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* e *oqxAB*. Adaptado de ROBICSEK et al., 2006; STRAHILEVITZ et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011.

Os plasmídeos mediadores de resistência a quinolonas (PMQR) têm sido observados com maior prevalência em cepas de origem clínica, em especial pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (STRAHILEVITZ et al., 2009; WANG et al., 2003; SCHULTSZ e GEERLINGS, 2012).

Na Arábia Saudita foi observada alta prevalência dos genes *qnr* e *aac(6')-Ib-cr* em cepas de *Enterobacteriaceae* produtoras da beta-lactamase CTX-M-15 isoladas de amostras hospitalares (SHIBL et al., 2012). Isolados clínicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* apresentaram genes *qnr* e *aac(6')-Ib-cr* e beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) do tipo SHV, CTX-M e TEM, na Espanha (BRIALES et al., 2012). LONGHI et al. (2012) observaram alta prevalência de resistência a quinolonas em isolados de *Escherichia coli* de amostras urinárias na Itália, e destacaram a presença do gene *aac(6')-Ib-cr* nestes isolados. Na Coreia do Sul, PARK et al. (2012) observaram em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL provenientes de amostras clínicas, a presença de genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *oqxAB*.

SILVA-SANCHEZ et al. (2011) detectaram, em isolados de *Enterobacteriaceae* positivos para ESBL, os genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, e *qepA*. DAHMEN et al. (2010) observaram o gene *qnr* em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, e CATTOIR et al. (2008b) relataram a presença do gene *qepA2* em plasmídeo de *Escherichia coli* isoladas na França.

Devido aos muitos relatos nos últimos anos, os genes de resistência a quinolonas têm sido associados a cepas produtoras de ESBL. Esta relação ainda não está esclarecida, mas é possível observar a grande frequência com a qual ocorre. CTX-M é o principal grupo de beta-lactamases relacionado aos PMQRs, em especial a CTX-M-15, disseminada mundialmente (POIREL et al., 2007; CATTOIR et al., 2008a; BRIALES et al., 2012; LONGHI et al., 2012; PARK et al., 2012; SHIBL et al., 2012; TAUSOVA et al., 2012).

Descrições dos genes de resistência a quinolonas mediados por plasmídeos em isolados provenientes de amostras ambientais são menos frequentes, porém atualmente este número está aumentando. LI et al. (2012) observaram a presença dos genes *qnrD*, *qnrB*, *qepA* e *OqxAB* em amostras de solo e água residual em uma criação de porcos, e analisaram a transferência destes genes para a produção agrícola,

estabelecendo uma forma de disseminação de resistência por meio da produção animal e agricultura. JIANG et al. (2012) observaram a presença dos genes *qnrD*, *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr* em *Escherichia coli* provenientes de peixes na China. Na Europa Central foram detectados genes *qnrS1* e *aac(6')-Ib-cr* provenientes de isolados de *Escherichia coli* produtoras de ESBL (prevalência de CTX-M-15 e -27) de amostras de fezes e *swabs* anais de pássaros aquáticos. Este estudo destaca a possível disseminação de genes de resistência através de animais silvestres e a caracterização destes animais como reservatórios e vetores de resistência bacteriana (LITERAK et al., 2010; TAUSOVA et al., 2012).

O gênero *Aeromonas* se destaca por estar frequentemente relacionado ao gene *qnrS*, que é o gene mais comumente encontrado no ambiente (HAN et al., 2012a; POIREL et al., 2012). FIGUEIRA et al. (2011) observaram a prevalência dos genes *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr* em diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas de amostras de água em Portugal.

No Brasil existem poucos relatos a respeito de genes de resistência a quinolonas. O primeiro relato ocorreu em 2007, por CASTANHEIRA et al. (2007), que detectaram o gene *qnrA1* em *Escherichia coli* de origem clínica. MINARINI et al. (2008) observaram predominância do gene *qnrB2* em isolados de *Enterobacteriaceae* de amostras hospitalares e de infecções comunitárias. FERRARI et al. (2011) observaram em *Salmonella* sp. a presença dos genes *qnrA* e *qnrB*. E o primeiro relato do gene *aac(6')Ib-cr* associado ao gene CTX-M-15 no Brasil foi descrito por PEIRANO et al. (2011) em isolados de *Escherichia coli*. PAIVA et al. (2012) detectaram os genes *qnrB19*, *qnrS1* e *aac(6')Ib-cr* em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras clínicas. VIANA et al. (2013) detectaram os genes *qnrB19*, *qnrB2*, *qnrS1* e *aac(6')Ib-cr* em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de amostras clínicas. Deve-se ressaltar que todos estes estudos brasileiros utilizaram isolados provenientes de amostras clínicas e hospitalares, e ainda não há dados sobre estes genes em isolados de origem ambiental no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar e identificar genes de resistência aos antimicrobianos do grupo das quinolonas em bacilos Gram negativos de origem clínica e ambiental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos do grupo das quinolonas;
- Verificar a presença de genes de resistência às quinolonas em cepas previamente triadas;
- Sequenciar e identificar os genes detectados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DAS CEPAS

As cepas selecionadas para o estudo fazem parte da coleção de cultura do Laboratório de Prática de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, todas previamente triadas frente às quinolonas e apresentando resistência fenotípica. O estudo incluiu cepas ambientais de *Enterobacteriaceae* e *Aeromonas* spp. e cepas hospitalares de *Enterobacteriaceae*. As cepas foram isoladas a partir de estudos anteriores e a resistência detectada por disco-difusão.

Isolados clínicos:

- 39 cepas de *Enterobacteriaceae* ESBL positivas utilizadas no estudo de DROPA et al. (2009), isoladas de amostras hospitalares durante o período de 2004 a 2005 de hospital 1, localizado em São Paulo.
- 4 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, isoladas de amostras hospitalares no período de 2008 a 2009 em hospital 2, localizado em São Paulo, cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Diagnóstica do Apoio à Saúde (LMDIAS) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Isolados Ambientais:

- 6 cepas pertencentes ao gênero *Aeromonas*, sendo 1 *Aeromonas sanarellii* e 5 *Aeromonas hydrophila*, obtidas dos estudos de MOURA (2010) e OLIVEIRA (2011) respectivamente, provenientes de lodo e esgoto tratados.
- 24 cepas de *Enterobacteriaceae*, provenientes de amostras de lodo e esgoto tratados coletadas em 2009 e 2011, obtidas do estudo de DROPA (2013) e em estudos em andamento.

Nos Quadros 2 e 3, estão relacionadas as cepas utilizadas neste estudo.

Quadro 2. Cepas bacterianas provenientes de amostras hospitalares, selecionadas para este projeto.

Número FSP-USP	Espécie	Amostra	Ano de Isolamento
FSP 201/05	<i>Proteus mirabilis</i>	Prega Inguinal	2004 ¹
FSP 202/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Prega Inguinal	2004 ¹
FSP 205/05	<i>Escherichia coli</i>	Escara	2004 ¹
FSP 211/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sangue	2004 ¹
FSP 212/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ponta de Cateter	2004 ¹
FSP 220/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	2004 ¹
FSP 234/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	2004 ¹
FSP 237/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	2004 ¹
FSP 253/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	2004 ¹
FSP 259/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Escara	2004 ¹
FSP 260/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	2004 ¹
FSP 264/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Prega Axilar	2004 ¹
FSP 269/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	2004 ¹
FSP 292/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	2005 ¹
FSP 294/05	<i>Morganella morganii</i>	Urina	2005 ¹
FSP 306/05	<i>Escherichia coli</i>	Urina	2005 ¹
FSP 307/05	<i>Escherichia coli</i>	Urina	2005 ¹
FSP 308/05	<i>Morganella morganii</i>	Urina	2005 ¹
FSP 309/05	<i>Providencia rettgeri</i>	Urina	2005 ¹
FSP 311/05	<i>Proteus mirabilis</i> (int.)	Prega Axilar	2005 ¹
FSP 312/05	<i>Morganella morganii</i>	Urina	2005 ¹
FSP 314/05	<i>Escherichia coli</i>	Urina	2005 ¹
FSP 316/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secreção Purulenta	2005 ¹
FSP 317/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sangue	2005 ¹
FSP 318/05	<i>Providencia stuartii</i>	Lavado Bronco-Alveolar	2005 ¹
FSP 320/05	<i>Providencia stuartii</i>	Ponta de Cateter	2005 ¹
FSP 324/05	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Líquido Ascítico	2005 ¹
FSP 325/05	<i>Morganella morganii</i>	Urina	2005 ¹
FSP 327/05	<i>Morganella morganii</i>	Urina	2005 ¹
FSP 329/05	<i>Morganella morganii</i>	Urina	2005 ¹
FSP 331/05	<i>Proteus mirabilis</i>	Urina	2005 ¹
FSP 332/05	<i>Morganella morganii</i>	Urina	2005 ¹
FSP 333/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	2005 ¹
FSP 335/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	2005 ¹
FSP 209/05	<i>Morganella morganii</i>	Urina	2004 ¹
FSP 236/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	2004 ¹
FSP 239/05	<i>Escherichia coli</i>	Urina	2004 ¹
FSP 241/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	2004 ¹
FSP 261/05	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Prega Axilar	2004 ¹
FSP 351/13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Escara	2009 ²
FSP 353/13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secreção Traqueal	2009 ²
FSP 355/13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ponta de Cateter	2008 ²
FSP 359/13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	2009 ²

*Cepas hospitalares provenientes de dois hospitais (1 e 2) da cidade de São Paulo.

Quadro 3. Cepas bacterianas de origem ambiental* selecionadas para este projeto.

Número FSP-USP	Espécie / Família	Local	Ano de Isolamento
FSP 760/11	<i>Aeromonas hydrophila</i>	A	2009
FSP 816/11	<i>Aeromonas hydrophila</i>	A	2009
FSP 836/11	<i>Aeromonas hydrophila</i>	B	2009
FSP 888/11	<i>Aeromonas hydrophila</i>	A	2009
FSP 893/11	<i>Aeromonas hydrophila</i>	A	2009
FSP 151/08	<i>Aeromonas sanarellii</i>	A	1994
FSP 1662/11	<i>Salmonella enterica</i> sorovar Agona	A	2011
FSP 325/12	<i>Escherichia coli</i>	C	2011
FSP 1263/09	<i>Citrobacter freundii</i>	A	2009
FSP 1271/09	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	C	2009
FSP 1315/09	<i>Escherichia coli</i>	C	2009
FSP 1380/09	<i>Morganella morganii</i>	B	2009
FSP 1332/09	<i>Escherichia coli</i>	A	2009
FSP 1355/09	<i>Escherichia coli</i>	D	2009
FSP 1266/09	<i>Enterobacteriaceae</i>	C	2009
FSP 1274/09	<i>Enterobacteriaceae</i>	C	2009
FSP 1278/09	<i>Enterobacteriaceae</i>	C	2009
FSP 1314/09	<i>Escherichia coli</i>	C	2009
FSP 1348/09	<i>Enterobacteriaceae</i>	D	2009
FSP 1349/09	<i>Enterobacteriaceae</i>	D	2009
FSP 1350/09	<i>Escherichia coli</i>	D	2009
FSP 1351/09	<i>Enterobacteriaceae</i>	D	2009
FSP 1353/09	<i>Enterobacteriaceae</i>	D	2009
FSP 1357/09	<i>Escherichia coli</i>	D	2009
FSP 1358/09	<i>Enterobacteriaceae</i>	D	2009
FSP 1360/09	<i>Escherichia coli</i>	D	2009
FSP 1361/09	<i>Enterobacteriaceae</i>	D	2009
FSP 1382/09	<i>Enterobacteriaceae</i>	B	2009
FSP 346/12	<i>Enterobacteriaceae</i>	A	2009
FSP 347/12	<i>Enterobacteriaceae</i>	D	2009

* Cepas ambientais provenientes de Estações de Tratamento de Esgoto de São Paulo (A, B, C e D) de amostras de esgoto e lodo de esgoto tratados.

3.2 TESTE DE SENSIBILIDADE PARA CONFIRMAÇÃO DA RESISTÊNCIA A QUINOLONAS

Foi realizado antibiograma pelo método de disco difusão estabelecido por BAUER et al. (1966), de acordo com o Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009) e os resultados interpretados de acordo com o CLSI (2012).

Para a confirmação de resistência ao grupo das quinolonas, foram utilizados discos de antimicrobianos (Cefar®) da primeira a quarta geração: ácido nalidíxico (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg) e moxifloxacina (5 µg).

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

A extração do DNA total foi realizada por meio de choque térmico, seguindo o método estabelecido por CHAPMAN et al. (2001), com modificações.

As cepas foram inoculadas em caldo Luria e incubadas a 37°C por 18 a 24 horas, 2 ml foram transferidos para microtubos e centrifugados a 14000 rpm (centrífuga 5804R Eppendorf®) a 24°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1 ml de água Milli-Q estéril, e centrifugado a 14000 rpm a 24°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 200 µl de água Milli-Q estéril e mantido em banho-maria a 95°C por 10 minutos, e em seguida os tubos foram colocados em freezer a -20°C por 30 minutos.

Após este período os tubos foram retirados do freezer e mantidos em temperatura ambiente até o descongelamento, e então centrifugados a 14000 rpm a 24°C por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e armazenado em freezer a -20°C até o momento do uso.

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o protocolo CTAB, estabelecido por MURRAY e THOMPSON (1980).

As cepas foram semeadas em 10 ml de caldo Luria, e incubadas a 35°C por 18-24 horas. Após a incubação os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos a 24°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão com 1 ml de água ultrapura (Milli Q[®]) estéril e transferido para microtubo de 1,5 ml. Os microtubos foram centrifugados a 10000 rpm (centrífuga 5804R Eppendorf[®]) por 5 minutos a 24°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão com 567 µl de solução tampão TEI estéril (Tris-HCL 10mM, pH 7,5; EDTA 1mM, pH 8,0), e adicionado 30 µl de SDS 10% e 5 µl de proteinase K 20mg/ml, e incubados por 1 hora em banho-maria a 37°C.

Após a incubação, foi adicionado 100 µl de solução NaCl 5M e 80 µl de CTAB pré-aquecido a 65°C, os microtubos foram homogeneizados e incubados por 20 minutos em banho-maria a 65°C. Após a incubação, foram adicionados 700 µl de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1 e agitado fortemente, seguido de centrifugação a 10000 rpm por 25 minutos a 24°C, a fase superior aquosa foi removida para um novo microtubo e neste foram adicionados 5 µl de RNase A, e incubados em banho-maria a 37°C por 1 hora.

Após esse período, foram adicionados 600 µl clorofórmio puro, homogeneizado vigorosamente e centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a 24°C. A fase superior aquosa foi transferida para um novo microtubo, e foram adicionados 700 µl de isopropanol gelado, em seguida os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1 ml de etanol 70% gelado, em seguida os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. Os tubos foram secos a vácuo, e a ressuspensão foi realizada com 50 µl de solução TE II (Tris-HCL 10mM, pH 7,8; EDTA 0,1mM, pH 8,0).

3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

As cepas de origem ambiental, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, não identificadas em estudos anteriores, foram submetidas à amplificação do gene

16S rDNA, utilizando a extração de DNA genômico e iniciadores universais descritos por THOMPSON et al. (2001) (Tabela 1).

As 5 cepas previamente identificadas como *Aeromonas hydrophila* (OLIVEIRA, 2011) foram submetidas à amplificação do gene *gyrB*, a partir da extração de DNA genômico, como descrito por SOLER et al. (2004) (Tabela 1). O sequenciamento foi utilizado para confirmação do posicionamento taxonômico dos isolados. As sequências resultantes foram alinhadas manualmente contra sequências disponíveis no banco de dados *GenBank* por meio do software *BLAST*. As distâncias filogenéticas para o gene *gyrB* foram computadas utilizando o método de máxima verossimilhança (TAMURA et al., 2007; TAMURA et al., 2011) e foram consideradas na forma de número de unidades de substituições utilizando o software Mega[®] 5.1 Beta 4.

Tabela 1. Sequência de iniciadores para identificação das espécies, produto de amplificação e temperatura de anelamento.

Gene		Iniciador (5' - 3')	Produto (pb)	Anelamento (°C)	Referência
<i>16S rDNA</i>	MH1	AGTTTGATCCTGGCTCAG	1500	55	THOMPSON et al. (2001)
	MH2	TACCTTGTTACGACTTCACCCCA			
<i>gyrB</i>	gyrB 3F	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	1500	55	SOLER et al. (2004)
	gyrB 14R	TTGTCCGGGTGTACTCGTC			

3.6 PESQUISA DE GENES POR PCR

A pesquisa por genes de resistência à quinolonas foi realizada por meio de PCR, utilizando o termociclador Martercycle[®] gradient Eppendorf, em todos os isolados descritos. Os genes pesquisados foram: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*; *aac(6')-Ib-cr*; *oqxAB* e *qepA*, a partir do DNA total extraído utilizando os iniciadores descritos nas Tabelas 2 e 3.

Os reagentes de PCR foram utilizados nas mesmas concentrações em todas as reações realizadas neste estudo. Cada microtubo continha um volume final de 25 µl, composto por 5 µl de DNA; 1,25U de enzima GO Taq-DNA-polimerase (Promega[®]); tampão de reação; 200 µM de dNTPs; e 0,2 µM de cada iniciador.

As condições para cada ciclo foram realizadas de acordo com os respectivos autores dos iniciadores, e para os iniciadores descritos por este estudo podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 2. Sequência de iniciadores para genes de resistência à quinolonas.

Gene		Iniciador (5' - 3')	Referência
<i>qnrA</i>	QnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	CATTOIR et al. (2007)
	QnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	
<i>qnrB</i>	QnrBm-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	
	QnrBm-R	TTTGCYGYTCGCCAGTCGAA	
<i>qnrS</i>	QnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Faa(+)	GCAACGCAAAAACAAAGTTAGGG	PAZHANI et al. (2011)
	Faa(-)	GTGTTTGAACCATGTACA	

3.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A detecção da presença dos produtos amplificados foi realizada a partir da eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, e visualizado sob luz ultravioleta. A captura da imagem foi realizada pelo sistema Epi Chemi II Darkroom (UVP) e software Labworks (UVP).

3.8 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Para determinação dos genes obtidos e detecção de mutações, foi realizado sequenciamento dos fragmentos amplificados, e para realização desta técnica os produtos de PCR foram purificados.

A purificação foi realizada com o kit comercial Illustra™ GFX™ PCR DNA (GE Healthcare – UK), seguindo protocolo do fabricante.

Tabela 3. Sequência de iniciadores desenvolvidos para este estudo para genes de resistência a quinolonas, e condições para PCR.

Gene	Iniciador	Sequência de Iniciadores	Condições de PCR						Produto (pb)
			DI	NC	D	A	E	EF	
<i>qnrS</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i>	QnrS-R	ATTTTGATACCTGATGTATCGACT							459
	AacR3	TTAGGCATCACTGCGTGTTT	95°C	30	95°C	54°C	72°C	72°C	572
	AacF1	CAAAGTTAGGCATCACAAAGTAC	5min		45seg	45seg	45seg	1min	
	AacF2	ATGAGTATTCAACATTTCCAAACA							606
	AacR2	TTAGGCAACACTGCGTGTTT							
<i>qnrC</i>	QnrCF	ATGGGTTGTACATTTATTGAATC	95°C	30	95°C	48°C	72°C	72°	537
	QnrCR	TCAAAACACTTTGTCTGGAAT	5min		45seg	45seg	45seg	1min	
<i>qnrD</i>	QnrDF	ATGGAAAAGCACTTTATCAATG							645
	QnrDR	TTATCGGTGAACAATAACACC							
<i>qepA</i>	QepAF2	ATGTCCGCCACGCTCCAC	95°C	30	95°C	52°C	72°C	72°	1536
	QepAR2	TCAACCAGATGCGAGCGCT	5min		1min	1min	3min	5min	
<i>oqxA</i>	OqxAF2	ATGAGCCTGCAAAAAACCTGG	95°C	30	95°C	50°C	72°C	72°	842
	OqxAR2	GGTCATGGCAACGGTTTT	5min		1min	1min	1min	5min	
<i>oqxB</i>	OqxBF2	ATGGACTTTTCCCGCTTTT							1378
	OqxBR2	ACGCCATCGGCACGAACAC							
<i>qnrA</i>	QnrAF2	ATGGATATTATTGATAAAGTT	95°C	30	95°C	48°C	72°C	72°	657
	QnrAR2	CTAATCCGGCAGCACTATKACTC	5min		45seg	45seg	45seg	1min	
<i>qnrA-2</i>	QnrA2F3	ATGGATATTATCGATAAAGTT							
	QnrA2R3	CTAATCCGGAAGCACTATTATCC							
<i>qnrB</i> <i>qnrB-31</i> <i>qnrB-17</i>	QnrB-R2	TTTGCBGYTCGCCAGTCGAA	95°C	30	95°C	50°C	72°C	72°	262
	QnrB31F	GGTATTGAGATTTCTCATTG	5min		45seg	45seg	45seg	1min	
	QnrB17R	TTCGCTGCTCGCCAGTCGAA							
<i>qnrS</i>	QnrSF2	ATGGAAACCTACAATCATACATAT	95°C	30	95°C	52°C	72°C	72°	657
	QnrSR3	TTAGTCAGGATAAACAACAATACC	5min		45seg	45seg	45seg	1min	
	QnrSF3	ATGGAAACCTACCGTCACACA							656
	QnrSR4	TAGTCAGGAAAAACAACAATACCC							

DI= Temperatura e tempo de desnaturação inicial; NC= Número de ciclos; D= Temperatura e tempo de desnaturação; A= Temperatura e tempo de anelamento; E= Temperatura e tempo de extensão; EF= Temperatura e tempo de extensão final.

3.9 LOCALIZAÇÃO DO GENE *qnrD*

No caso de resultado positivo para o gene *qnrD*, foi realizado PCR invertido, como preconizado por MAZZARIOL et al. (2011), no qual os iniciadores divergem entre si, partindo de uma região conhecida rumo aos extremos desconhecidos, e permitindo a obtenção da sequência plasmidial completa, que foi posteriormente sequenciada e analisada (Figura 6) (Tabela 4).

Figura 6. Representação do sentido de amplificação, utilizando os iniciadores INVDF-R e INVDR-F descritos por MAZZARIOL et al. (2011).

Tabela 4. Sequência de iniciadores para localização do gene *qnrD*, produto de amplificação e temperatura de anelamento.

Região	Iniciador (5' - 3')	Produto (pb)	Anelamento (°C)	Referência
<i>Plasmídeo qnrD</i>	INVDF-R	TATTCCCCGTAAATTGATCTCG	Variável	MAZZARIOL et al. (2011)
	INVDR-F	CAGGCGCTTCAGCTTGTT		

3.10 PESQUISA DE MUTAÇÕES NA REGIÃO DETERMINANTE DE RESISTÊNCIA À QUINOLONA

A pesquisa de mutações na região determinante de resistência a quinolona (QRDR) do gene *gyrA*, foi realizada apenas nas cepas positivas para qualquer dos genes de resistência a quinolonas pesquisado. Para tanto foi realizada PCR utilizando os iniciadores descritos no Tabela 5, a partir da extração de DNA total, seguido de sequenciamento e análise da sequência obtida para verificar as possíveis mutações.

Tabela 5. Sequência de iniciadores para pesquisa de mutações no gene *gyrA*.

Gene	Iniciador (5' - 3')	Produto (pb)	Referência
<i>gyrA</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	gyrA6F gyrA631R	CGACCTTGCGAGAGAAAT GTTCCATCAGCCCTTCAA	625 WEIGEL et al. (1998)
<i>gyrA</i> (<i>Aeromonas</i>)	AsalgyrAF GyrA AeroR	TCCTATCTTGATTACGCCATG CGGTACGCCTGCACGATGCCGG	643 GOÑI-URRIZA et al. (2002)
<i>gyrA</i> (Grupo <i>Proteae</i>)	GyrAF2 GyrAR2	ATGAGCGACAWTGCCARAGA GCAGTCGGRAARTCMGGCCC	659 Este estudo.*

*Condições para realização da PCR: Desnaturação inicial: 95° por 5 minutos; 30 ciclos: desnaturação - 95°C por 45 segundos, anelamento - 51°C por 45 segundos; extensão - 72°C por 45 segundos. Extensão final: 72°C por 2 minutos.

3.11 ASSOCIAÇÃO COM ELEMENTOS GENÉTICOS

As cepas positivas para qualquer dos gene de resistência a quinolonas foram submetidas à pesquisa de elementos genéticos integron de Classe 1 e integron de Classe 2, utilizando os iniciadores descritos por PLOY et al. (2000) (Tabela 6).

Após a confirmação da presença do elemento genético, foi realizada PCR para verificar a associação destes elementos genéticos com os genes de resistência a quinolonas, para tanto foi utilizado o iniciador senso dos genes das integrases combinados com o iniciador anti-senso do gene de resistência de interesse.

Tabela 6. Sequência de iniciadores para os genes *intI1* e *intI2*.

Gene	Iniciador (5' - 3')	Produto (pb)	Referência
<i>intI1</i>	<i>intI1L</i> <i>intI1R</i>	ACATGTGATGGCGACGCACGA ATTCTGTCTGCTGGCTGGCGA	562 PLOY et al. (2000)
<i>intI2</i>	<i>intI2L</i> <i>intI2R</i>	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG CACGGATATGCGACAAAAAGGT	789

3.12 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento direto para a confirmação dos fragmentos amplificados foi realizado a partir dos produtos da PCR purificados. O sequenciamento foi realizado por empresa externa especializada - Genomic Engenharia Molecular. As reações de

sequenciamento foram realizadas utilizando o kit “BigDye® Terminator v3. 1 Cycle Sequencing” (*Applied Biosystems*). O material foi analisado no equipamento de sequenciamento automático modelo 3130xl (*Applied Biosystems*).

3.13 ANÁLISE DOS RESULTADOS

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas foram alinhadas manualmente e comparadas com sequências existentes no banco de dados (*GenBank* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), utilizando o programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

3.14 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

A técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) foi utilizada para dois procedimentos distintos: comparação do perfil genético entre cepas de mesma espécie (digestão por *XbaI*) e determinação do tamanho de plasmídeos (digestão por *S1*).

Para ambos os procedimentos, a metodologia de preparo dos *plugs* foi a mesma, realizada de acordo com DROPA (2006).

3.14.1 Preparo do *plug*

As cepas foram reisoladas em ágar MacConkey e incubadas a 35°C por 18-24 horas. Uma única colônia de cada cepa foi semeada em 30 ml de caldo Luria a 0,5% de NaCl acrescentado, e incubada novamente a 35°C por 18-24 horas.

As culturas foram centrifugadas a 5000 rpm (centrífuga 5804R Eppendorf®) por 15 minutos a 24°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 ml de solução tampão TE I (Tris-HCL 10mM, pH 7,5; EDTA

1mM, pH 8,0) e transferidas para microtubos de 1,5 ml, e centrifugados a 12000 rpm por 5 minutos a 24°C.

Foram adicionados 400 µl de TE I, e desta suspensão, 80 µl foram adicionados a 320 µl de agarose para *Pulsed Field* a 1%, a 55-60°C. Em seguida, os moldes (3 por amostra) para confecção dos *plugs* foram preenchidos e incubados por 15 minutos a 4°C, para solidificação.

Os *plugs* foram retirados dos moldes e colocados em 5 ml de solução de lise (EDTA 50 mM, pH 8,0; Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; SDS 1%; Sarcosyl 1%; proteinase K 0,1 mg/ml), em tubos tipo Falcow[®], e incubados em banho-maria a 55°C por 2 horas. Após a incubação, foram realizadas 2 lavagens dos *plugs* em 10 ml de água ultrapura (Milli Q[®]) e 4 lavagens em 10 ml de TE I, com intervalos de 15 minutos, em banho-maria a 55°C.

Ao final das lavagens, os *plugs* foram transferidos para microtubos e estocados em 1 ml de TE I a 4°C, até o momento do uso.

3.14.2 Comparação do perfil genético entre cepas de mesma espécie (XBAI – PFGE)

A comparação do perfil genético foi realizada utilizando a técnica de PFGE, como descrito por (DROPA, 2006; CDC, 2013). Apenas as cepas de origem ambiental cuja espécie possuía mais de um exemplar foram submetidas a este procedimento. Este método foi utilizado para definir a clonalidade das cepas ambientais utilizadas no estudo. As cepas de origem clínica haviam sido triadas em estudo anterior (DROPA, 2006).

3.14.2.1 XbaI – PFGE

Para digestão enzimática com enzima de restrição *XbaI* (New England BioLabs, USA), foi utilizado um *plug* por amostra. Cada *plug* foi transferido para um novo microtubo de 1,5 ml, e neste foi adicionado 300 µl do tampão específico da

enzima *XbaI*, diluído segundo instruções do fabricante, e incubados em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após este período, retirou-se o tampão da enzima e adicionou-se 300 µl de uma solução contendo novo tampão da enzima, adicionado de albumina bovina acetilada (BSA) 0,01% e 10U de *XbaI*, então as amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 18 horas.

Após a digestão pela enzima *XbaI*, os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em campo pulsado (Chef Mapper (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Em um gel de agarose para Pulsed Field a 1% em solução tampão TBE 0,5X (Tris-borato 45 mM, EDTA dissódico 1 mM, pH 8,0) a 14°C. O marcador de peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker, BioLabs, New England) foi adicionado nas extremidades de cada gel.

As condições utilizadas na eletroforese foram: voltagem de 6V/cm, a 14°C, por 20 horas, com intervalo de pulsos de 3,51 segundos a 30,82 segundos.

Para visualização, o gel de PFGE foi corado em brometo de etídio 1 µg/ml, durante 1 hora, e visualizado sob luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems).

3.14.3 Detecção e determinação do tamanho dos plasmídeos

Para verificação da ocorrência e determinação do tamanho de plasmídeos nas cepas estudadas, foram realizados dois métodos: extração de plasmídeos por kit comercial (Wizard® Plus SV Minipreps – DNA Purification System . Promega – USA) e *SI* – PFGE. O primeiro método permite melhor detecção de plasmídeos de baixo molecular peso (0,1 a 23000 pares de bases); e o segundo método permite a visualização de plasmídeos de alto peso molecular, devido à digestão dos *plugs* com a enzima *SI* nuclease (Promega – USA), que “corta” regiões superenoveladas do DNA e permite a linearização dos plasmídeos de alto peso molecular (BARTON et al., 1995).

A extração de plasmídeos foi realizada utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps – DNA Purification System (Promega – USA), seguindo protocolo do

fabricante. A visualização do produto da extração foi por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%.

3.14.3.1 *SI* – PFGE

Para detecção de plasmídeos de alto peso molecular (superior a 23000 pares de bases) foi realizada a digestão enzimática por *SI* nuclease, seguida de eletroforese em campo pulsado.

Para realizar a digestão enzimática através da enzima *SI* nuclease (Promega, WI, EUA), foi utilizado um *plug* por amostra, no qual foi colocado em um novo microtubo de 1,5 ml e adicionado 10U da enzima em 350 µl de tampão, fornecido pelo fabricante. A digestão ocorreu em banho-maria a 37°C por 45 minutos, após esse período a reação foi interrompida ao transferir o *plug* para um novo microtubo com solução TE I.

Em um gel de agarose para Pulsed Field a 1% em solução tampão TBE 0,5X (Tris-borato 45 mM, EDTA dissódico 1 mM, pH 8,0), foram adicionados os *plugs* das amostras e de marcadores de peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker, New England BioLabs, USA; Midrange PFG Marker I, New England BioLabs, USA).

As condições utilizadas na eletroforese foram: voltagem de 6V/cm, a 14°C, por 20 horas, com intervalo de pulsos de 1 segundo a 40 segundos.

Para visualização, o gel de PFGE foi corado em brometo de etídio 1 µg/ml, durante 1 hora, e visualizado sob luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems).

4 RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Dentre as cepas ambientais, 12 não apresentavam identificação molecular, e após a análise das sequências obtidas através da amplificação do gene *16S rDNA* foi possível determinar as espécies das mesmas. Destas, 7 cepas foram identificadas como *Escherichia coli*, 2 *Proteus vulgaris*, 1 *Morganella morganii*, 1 *Citrobacter freundii*, e 1 *Klebsiella oxytoca*.

As 5 cepas pertencentes ao gênero *Aeromonas*, previamente classificadas como *Aeromonas hydrophila*, após a análise da árvore filogenética construída a partir do gene *gyrB* (Figura 7), foram alocadas em diferente posicionamento taxonômico, resultando então em 2 *Aeromonas hydrophila*, 1 *Aeromonas sanarellii*, 1 *Aeromonas media*, 1 *Aeromonas punctata*.

4.2 PERFIL DE SENSIBILIDADE À QUINOLONAS

Todas as 73 cepas selecionadas para o estudo foram triadas para as quatro gerações de quinolonas propostas, sendo estas: ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina. O perfil de sensibilidade observado pode ser verificado nas tabelas 7 e 8.

O ácido nalidíxico apresentou resistência em 69 (94,5%) cepas, a ciprofloxacina em 65 (89,0%) cepas, a levofloxacina em 59 (80,8%) cepas, e a moxifloxacina em 67 (91,8%) cepas (Tabela 9).

Das 73 cepas, 58 (79,4%) apresentaram resistência e 4 (5,5%) apresentaram sensibilidade a todas as gerações de quinolonas utilizadas no estudo.

Figura 7. Posicionamento filogenético das cepas de *Aeromonas* utilizando o gene *gyrB*. As distancias foram computadas utilizando o método de máxima verossimilhança (TAMURA et al., 2007; TAMURA et al., 2011) utilizando o software Mega® 5.1 Beta 4. As cepas deste estudo estão indicadas pelas setas: *Aeromonas sanarellii* (FSP 760/11); *Aeromonas punctata* (FSP 816/11); *Aeromonas media* (FSP 836/11); *Aeromonas hydrophila* (FSP 888/11); *Aeromonas hydrophila* (FSP 893/11); *Aeromonas sanarellii* (FSP 151/08).

Tabela 7. Perfil de sensibilidade às quatro gerações de quinolonas, cepas de origem clínica.

Identificação	Ano de Isolamento	Espécie	Perfil de sensibilidade as quinolonas observado neste estudo			
			NAL	CIP	LEV	MXF
FSP 201/05	2004	<i>Proteus mirabilis</i>	R	R	R	R
FSP 202/05	2004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 205/05	2004	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 211/05	2004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	I	R
FSP 212/05	2004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 220/05	2004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 234/05	2004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 237/05	2004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 253/05	2004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 259/05	2004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 260/05	2004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 264/05	2004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 269/05	2004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	I	S
FSP 292/05	2005	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 294/05	2005	<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	R
FSP 306/05	2005	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 307/05	2005	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 308/05	2005	<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	R
FSP 309/05	2005	<i>Providencia rettgeri</i>	R	R	R	R
FSP 311/05	2005	<i>Proteus mirabilis</i>	R	S	S	R
FSP 312/05	2005	<i>Morganella morganii</i>	S	S	S	S
FSP 314/05	2005	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 316/05	2005	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 317/05	2005	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 318/05	2005	<i>Providencia stuartii</i>	R	R	R	R
FSP 320/05	2005	<i>Providencia stuartii</i>	R	R	R	R
FSP 324/05	2005	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	R	R	R
FSP 325/05	2005	<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	R
FSP 327/05	2005	<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	R
FSP 329/05	2005	<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	R
FSP 331/05	2005	<i>Proteus mirabilis</i>	R	R	R	R
FSP 332/05	2005	<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	R
FSP 333/05	2005	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 335/05	2005	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 209/05	2004	<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	R
FSP 236/05	2004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	S	R
FSP 239/05	2004	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 241/05	2004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S
FSP 261/05	2004	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R	R
FSP 351/13	2009	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 353/13	2009	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 355/13	2008	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 359/13	2009	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R

NAL= Ácido nalidíxico; CIP= Ciprofloxacina; LEV= Levofloxacina; MXF= Moxifloxacina; R=Resistente; I= Intermediário; S= Sensível.

Tabela 8. Perfil de sensibilidade às quatro gerações de quinolonas, cepas de origem ambiental.

Identificação	Ano de Isolamento	Espécie	Perfil de sensibilidade as quinolonas observada neste estudo			
			NAL	CIP	LEV	MXF
FSP 760/11	2009	<i>Aeromonas sanarellii</i>	R	R	R	R
FSP 816/11	2009	<i>Aeromonas punctata</i>	R	R	R	R
FSP 836/11	2009	<i>Aeromonas media</i>	R	R	I	R
FSP 888/11	2009	<i>Aeromonas hydrophila</i>	R	R	S	R
FSP 893/11	2009	<i>Aeromonas hydrophila</i>	R	S	R	R
FSP 151/08	1994	<i>Aeromonas sanarellii</i>	R	S	S	S
FSP 1662/11	2011	<i>Salmonella Agona</i>	R	S	S	R
FSP 325/12	2011	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 1263/09	2009	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	R
FSP 1271/09	2009	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
FSP 1315/09	2009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 1380/09	2009	<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	R
FSP 1332/09	2009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 1355/09	2009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 1266/09	2009	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	R	I	R
FSP 1274/09	2009	<i>Proteus vulgaris</i>	S	S	S	S
FSP 1278/09	2009	<i>Proteus vulgaris</i>	S	S	S	S
FSP 1314/09	2009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 1348/09	2009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 1349/09	2009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 1350/09	2009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 1351/09	2009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 1353/09	2009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 1357/09	2009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 1358/09	2009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 1360/09	2009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 1361/09	2009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
FSP 1382/09	2009	<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	R
FSP 346/12	2009	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	I	R
FSP 347/12	2009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R

NAL= Ácido nalidíxico; CIP= Ciprofloxacina; LEV= Levofloxacina; MXF= Moxifloxacina; R=Resistente; I= Intermediário; S= Sensível.

Tabela 9. Porcentagem de cepas resistentes as quinolonas testadas em relação a origem.

	NAL	CIP	LEV	MXF
Todas as cepas (n=73)	94,5%	89,0%	80,8%	91,8%
Cepas Clínicas (n=43)	95,3%	93,0%	86,0%	93,0%
Cepas Ambientais (n=30)	93,3%	83,3%	73,3%	90,0%

4.3 COMPARAÇÃO GENÉTICA ENTRE AS CEPAS DE ORIGEM AMBIENTAL

A comparação entre os perfis genéticos foi realizada em 25 cepas de origem ambiental através da técnica de *Xba*I – PFGE, sendo estas, 15 *Escherichia coli*, 2 *Morganella morganii*, 2 *Citrobacter freundii*, 2 *Proteus vulgaris*, 2 *Aeromonas hydrophila*, e 2 *Aeromonas sanarellii* (dados não apresentados).

Das 15 cepas de *Escherichia coli*, foi possível identificar 7 perfis clonais diferentes, com predominância de 2 perfis clonais, e estes foram caracterizados como perfil 1 (P1) composto por 3 cepas e perfil 2 (P2) composto por 7 cepas. Para cada grupo clonal apenas uma cepa foi selecionada para representá-los, para P1 foi selecionada a cepa FSP 1348/09 e para P2 foi selecionada a cepa FSP 1351/09. As outras 5 cepas de *Escherichia coli* restantes apresentaram padrão de bandas distintos.

Todas as 4 cepas pertencentes ao gênero *Aeromonas*, apresentaram perfis moleculares distintos. As cepas de *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, e *Proteus vulgaris* apresentaram, cada qual com a sua espécie, similaridade genética, porém não foram agrupadas devido à divergência de outras características genéticas e fenotípicas. Após esta análise o número de cepas ambientais passou de 30 para 22 exemplares (Quadro 4), e o total de cepas selecionadas para o presente estudo foi reduzido para 65.

Quadro 4. Relação das 22 cepas de origem ambiental selecionadas para caracterização dos mecanismos moleculares de resistência a quinolonas.

Número FSP-USP	Espécie	Local	Ano de Isolamento
FSP 760/11	<i>Aeromonas sanarellii</i>	A	2009
FSP 816/11	<i>Aeromonas punctata</i>	A	2009
FSP 836/11	<i>Aeromonas media</i>	B	2009
FSP 888/11	<i>Aeromonas hydrophila</i>	A	2009
FSP 893/11	<i>Aeromonas hydrophila</i>	A	2009
FSP 151/08	<i>Aeromonas sanarellii</i>	A	1994
FSP 1662/11	<i>Salmonella enterica</i> sorovar Agona	A	2011
FSP 325/12	<i>Escherichia coli</i>	C	2011
FSP 1263/09	<i>Citrobacter freundii</i>	A	2009
FSP 1271/09	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	C	2009
FSP 1315/09	<i>Escherichia coli</i>	C	2009
FSP 1380/09	<i>Morganella morganii</i>	B	2009
FSP 1332/09	<i>Escherichia coli</i>	A	2009
FSP 1355/09	<i>Escherichia coli</i>	D	2009
FSP 1266/09	<i>Klebsiella oxytoca</i>	C	2009
FSP 1274/09	<i>Proteus vulgaris</i>	C	2009
FSP 1278/09	<i>Proteus vulgaris</i>	C	2009
FSP 1314/09	<i>Escherichia coli</i>	C	2009
FSP 1348/09	<i>Escherichia coli</i> (P1)	D	2009
FSP 1351/09	<i>Escherichia coli</i> (P2)	D	2009
FSP 1382/09	<i>Morganella morganii</i>	B	2009
FSP 346/12	<i>Citrobacter freundii</i>	A	2009

4.4 CEPAS SELECIONADAS PARA UTILIZAÇÃO NO ESTUDO

Foram selecionadas para continuidade deste estudo 65 cepas, 43 de origem clínica e 22 de origem ambiental, com perfil de resistência a quinolonas observado em estudos anteriores, com exclusão dos clones identificados. Destas, 23 (35,4%) correspondem a exemplares de *Klebsiella pneumoniae*, 12 (18,5%) de *Escherichia coli*, 10 (15,4%) de *Morganella morganii*, 3 (4,6%) de *Proteus mirabilis*, 2 (3,1%) de *Proteus vulgaris*, 2 (3,1%) de *Klebsiella oxytoca*, 2 (3,1%) de *Providencia stuartii*, 2 (3,1%) de *Aeromonas hydrophila*, 2 (3,1%) de *Aeromonas sanarellii*, 2 (3,1%) de *Citrobacter freundii*, 1 (1,5%) de *Providencia rettgeri*, 1 (1,5%) de *Salmonella enterica* sorovar Agona, 1 (1,5%) de *Enterobacter aerogenes*, 1 (1,5%) *Aeromonas media*, e 1 (1,5%) *Aeromonas punctata* (Figura 8).

4.4.1 Cepas Clínicas

Das 65 cepas, 43 (66,2%) correspondem às cepas de origem clínica, isoladas de amostras hospitalares, entre estas há 22 (51,2%) exemplares de *Klebsiella pneumoniae*, 8 (18,6%) de *Morganella morganii*, 5 (11,6%) de *Escherichia coli*, 3 (7,0%) de *Proteus mirabilis*, 2 (4,6%) de *Providencia stuartii*, 1 (2,3%) de *Klebsiella oxytoca*, 1 (2,3%) de *Providencia rettgeri*, e 1 (2,3%) de *Enterobacter aerogenes*.

4.4.2 Cepas Ambientais

Das 65 cepas, 22 (33,8%) correspondem a cepas de origem ambiental, provenientes de amostras de esgoto e lodo de esgoto, entre estas há 7 (31,8%) exemplares de *Escherichia coli*, 2 (9,1%) de *Aeromonas hydrophila*, 2 (9,1%) de *Aeromonas sanarellii*, 2 (9,1%) de *Proteus vulgaris*, 2 (9,1%) de *Morganella morganii*, 2 (9,1%) de *Citrobacter freundii*, 1 (4,5%) de *Klebsiella pneumoniae*, 1 (4,5%) de *Klebsiella oxytoca*, 1 (4,5%) de *Salmonella enterica* sorovar Agona, 1 (4,5%) de *Aeromonas media*, e 1 (4,5%) de *Aeromonas punctata*.

Figura 8. Distribuição de espécies bacterianas em relação à origem.

4.5 GENES DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS

A partir do DNA total extraído das 65 cepas selecionadas para a continuidade do estudo, foi realizada a pesquisa dos genes de resistência a quinolonas *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* e *oqxA* e *oqxB*.

Destes, foi observada a presença dos genes *qnrB*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *oqxA* e *oqxB*. E a ausência dos genes *qnrA*, *qnrC*, e *qepA*.

4.5.1 *qnrS*

O gene *qnrS* foi observado em 18 (27,7%) cepas, sendo 6 (33,3%) de origem clínica e 12 (66,7%) de origem ambiental (Quadro 5).

Das 6 cepas de origem clínica, 3 (50,0%) foram de *Klebsiella pneumoniae*, 1 (16,7%) de *Morganella morganii*, 1 (16,7%) de *Enterobacter aerogenes*, e 1 (16,7%) de *Proteus mirabilis*.

Das 12 cepas de origem ambiental, 4 (33,3%) cepas foram de *Escherichia coli*, 2 (16,7%) de *Aeromonas hydrophila*, 1 (8,3%) de *Aeromonas punctata*, 1 (8,3%) de *Aeromonas media*, 1 (8,3%) de *Aeromonas sanarellii*, 1 (8,3%) de *Salmonella Agona*, 1 (8,3%) de *Klebsiella pneumoniae*, e 1 (8,3%) de *Morganella morganii*.

A análise das sequências de nucleotídeos revelou que 17 (94,4%) cepas apresentaram o gene *qnrS2*, e apenas a cepa de *Enterobacter aerogenes* apresentou a variante *qnrS1*, representando 5,6% da frequência dentre as variantes do gene *qnrS*.

Quando pesquisada a presença do gene *intI1* e *intI2* nas cepas positivas para *qnrS*, foi observada positividade para *intI1* em 14 (77,8%) cepas e para *intI2* em 8 (44,4%) cepas. Porém ao realizar PCR para verificar a ocorrência de associação entre o gene de resistência e as integrases de classe 1 e 2, não houve positividade para tal associação utilizando a metodologia empregada.

4.5.2 *qnrB*

O gene *qnrB* foi observado em 13 (20,0%) cepas, sendo 5 (38,5%) cepas de origem clínica e 8 (61,5%) cepas de origem ambiental (Quadro 5).

Dentre as 5 cepas de origem clínica, 3 (60,0%) foram *Klebsiella pneumoniae*, 1 (20,0%) *Proteus mirabilis* e 1 (20,0%) *Morganella morganii*.

E dentre as 8 cepas de origem ambiental, 2 (25,0%) foram *Citrobacter freundii*, 1 (12,5%) *Aeromonas hydrophila*; 1 (12,5%) *Aeromonas media*, 1 (12,5%) *Aeromonas sanarellii*, 1 (12,5%) *Klebsiella pneumoniae*, 1 (12,5%) *Salmonella Agona*, e 1 (12,5%) *Escherichia coli*.

Através da análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos foi possível estabelecer as variantes detectadas. Foi observada maior prevalência da variante *qnrB19*, apresentando frequência de 61,5%, com 8 cepas positivas para esta variante, sendo estas 5 cepas de origem clínica, e as cepas de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas media* e *Aeromonas sanarellii*, representando as cepas de origem ambiental.

A variante *qnrB1* foi observada em 2 cepas de origem ambiental, sendo estas, 1 *Escherichia coli* e 1 *Klebsiella pneumoniae*, estas 2 cepas foram provenientes de um mesmo local e ano de isolamento.

Em 2 cepas de *Citrobacter freundii* foi obtida uma sequência parcial de 533 pares de bases, denominada *qnrB-like*, estas sequências quando traduzidas utilizando o software *Bioedit Sequence Alignment Editor*, apresentaram similaridade e identidade proteica de 100% com as variantes QnrB6 e QnrB9; e seus nucleotídeos apresentaram identidade de 98% com os genes *qnrB1* (520/533), *qnrB6* (522/533), e *qnrB9* (525/533), este percentual para a identidade nucleica é devido às mutações silenciosas observadas nesta sequência parcial do gene, os dados foram obtidos através do banco de dados *GenBank* utilizando a ferramenta *BLAST*.

Na cepa de *Salmonella enterica* sorovar *Agona* foi obtida uma sequência de 564 pares de bases, denominada *qnrB69-like*, sua identidade e similaridade proteica é de 99% e 100% respectivamente, quando comparada à enzima QnrB69, isto devido a uma substituição de aminoácidos na posição 142 (Met142 por Leu142), a sequência de nucleotídeos apresentou 99% de identidade com a variante *qnrB69*, este

percentual é devido, além da substituição de aminoácidos, a 2 mutações silenciosas observadas.

O gene *intI1* foi observado em 12 (92,3%) cepas e o gene *intI2* em 7 (53,8%) cepas, porém a associação entre os genes *qnrB* e as integrases não foi constatada.

4.5.3 *aac(6')-Ib-cr*

A PCR realizada para detectar a presença ou ausência da variante *aac(6')-Ib-cr*, não elimina a detecção da não variante, sendo então necessária à realização de sequenciamento para verificar as substituições nos aminoácidos 102 (Trp por Arg) e 179 (Asp por Tyr). Portanto a detecção através da PCR revelou positividade para os genes *aac(6')-Ib* e *aac(6')-Ib-cr* em 32 (49,2%) cepas, sendo 25 (78,1%) cepas de origem clínica e 7 (21,9%) cepas de origem ambiental.

Após sequenciamento e análise das sequências obtidas, foi observado que todas as 25 cepas clínicas não apresentavam as substituições nos aminoácidos 102 e 179 e, portanto não constituíam a variante de interesse (-*cr*). Todas as 7 cepas ambientais apresentaram as substituições e, portanto possuíam a variante-*cr*.

Destas 7 cepas positivas para *aac(6')-Ib-cr*, 2 (28,6%) cepas foram de *Morganella morganii*, 1 (14,3%) de *Aeromonas hydrophila*, 1 (14,3%) de *Aeromonas sanarellii*, 1 (14,3%) de *Aeromonas media*, 1 (14,3%) de *Citrobacter freundii*, e 1 (14,3%) de *Escherichia coli*, provenientes de 3 estações de tratamento de esgoto diferentes (Quadro 5).

Todas as 7 cepas apresentaram positividade para o gene *intI1* e apenas 2 (28,6%) foram positivas para o gene *intI2*. Ao realizar a PCR para verificar associação entre os genes *aac(6')-Ib-cr* e a integrase de Classe 1, a amplificação foi observada em 4 cepas, sendo estas as cepas de *Aeromonas hydrophila* (FSP 888/11), *Aeromonas sanarellii* (FSP 888/11), *Aeromonas media* (FSP 836/11) e *Citrobacter freundii* (FSP 1263/09), as bandas obtidas apresentaram número de bases distintos (Figura 9).

Figura 9. Gel de agarose com amplificação da associação entre os genes *intII* e *aac(6')-Ib-cr*. 1= *Aeromonas sanarellii* (FSP 760/11); 2= *Aeromonas media* (FSP 836/11); 3= *Aeromonas hydrophila* (FSP 888/11); 4= *Morganella morganii* (FSP 1380/09); 5= *Morganella morganii* (FSP 1382/09); 6= *Escherichia coli* (FSP 1314/09); 7= *Citrobacter freundii* (FSP 1263/09). M= GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder.

Através do sequenciamento foi comprovada a associação entre os genes *intII* e *aac(6')-Ib-cr*, a sequência obtida para *Aeromonas hydrophila* (FSP 888/11) apresentou fragmento de 1476 nucleotídeos, *Aeromonas media* (FSP 836/11) apresentou fragmento de 1480 nucleotídeos e *Citrobacter freundii* (FSP 1263/09) apresentou fragmento de 1477 nucleotídeos, nestes três fragmentos foi observado o gene *intII*, seguido pela região *attI* e o gene *aac(6')-Ib-cr*, estes fragmentos apresentaram identidade de 100% comparados a mesma região do plasmídeo pCFI-3 de *Citrobacter freundii* (JQ356870.1) (YIM et al., 2013) (Figura 10) (Anexo 1).

A cepa *Aeromonas sanarellii* (FSP 760/11) apresentou um fragmento de tamanho menor, com 1263 nucleotídeos. Ao comparar com os outros fragmentos obtidos e com o plasmídeo pCFI-3, foi observada uma deleção de um trecho de 216 pares de bases, correspondente a região do promotor e *attI*.

A associação entre o gene *aac(6')-Ib-cr* e a integrase de Classe 2 não foi constatada.

Figura 10. Esquema de associação entre integrase de classe 1 (*intII*) e o gene de resistência a quinolona *aac(6')-Ib-cr* observada nas cepas FSP 888/11, FSP 836/11 e FSP 1263/09 neste estudo.

4.5.4 *oqxA* e *oqxB*

Foram pesquisados os genes *oqxA* e *oqxB*, referentes ao sistema de efluxo OqxAB, nas 65 cepas selecionadas para o estudo, resultando na positividade para o gene *oqxA* em 28 (43,1%) cepas e para o gene *oqxB* em 27 (41,5%) cepas (Quadro 5).

Das 28 cepas positivas para *oqxA*, 25 (89,3%) foram de origem clínica e 3 (10,7%) de origem ambiental. As cepas de origem clínica foram 21 (84,0%) de *Klebsiella pneumoniae*, 2 (8,0%) *Escherichia coli*, 1 (4,0%) *Klebsiella oxytoca*, e 1 (4,0%) de *Enterobacter aerogenes*. As 3 cepas de origem ambiental correspondiam às espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*, representando 33,3% cada uma da frequência em cepas ambientais positivas para o gene.

As cepas positivas para o gene *oqxB* correspondiam às mesmas cepas positivas para o gene *oqxA*, com exceção apenas da cepa de *Escherichia coli* de origem ambiental, negativa para este gene.

O gene *intI1* foi detectado em 22 (78,6%) cepas e o gene *intI2* em 2 (7,1%) cepas, mas a associação entre os genes *oqx* e as integrases não foi observada.

4.5.5 *qnrD*

O gene *qnrD1* foi verificado e confirmado através de sequenciamento em 1 (1,5%) cepa de *Providencia rettgeri*, sendo esta de origem clínica (Quadro 5).

Esta cepa apresentou positividade para os genes *intI1* e *intI2*, porém não foi observada associação entre o gene *qnrD1* e as integrases.

De acordo com os estudos de MAZZARIOL et al. (2011) e ZHANG et al. (2013), foi realizado PCR invertido para obtenção da sequência completa do plasmídeo (Figura 11). Através desta técnica foi obtida uma sequência de 2618 pares de bases (Anexo 2), composta pelo gene *qnrD1*, e sequências de nucleotídeos que foram caracterizadas como regiões abertas de leitura (ORFs – “open reading frames”) (Figura 12), semelhantes aos detectados em *Providencia rettgeri*

(HQ834472.1 / HQ834473.1), *Proteus* sp. (JX514065.1) e *Salmonella enterica* sorovar Bovismorbifican (FJ228229.1).

Figura 11. Gel de agarose com amplificação do plasmídeo contendo o gene *qnrD1*, utilizando os iniciadores INVDF-R e INVDR-F. 1= GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder; 2= *Providencia rettgeri* (FSP 309/05) – extração de DNA total; 3= *Providencia rettgeri* (FSP 309/05) – extração de plasmídeo por kit comercial; 4= Branco; 5= Lambda DNA/ HindIII Marker.

Através do software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) e do programa Bioedit Sequence Alignment Editor, foi possível estabelecer o percentual de identidade do plasmídeo obtido neste estudo e os relatados anteriormente. Os genes *qnrD1* e *orf2* possuíam 100% de identidade com os mesmos genes observados no plasmídeo p2007057 (FJ228229.1) por CAVACO et al. (2009). O gene *orf3* tem identidade correspondente a 93% em relação ao mesmo gene encontrado no plasmídeo pGHS09-09a (HQ834473) por GUILLARD et al. (2012). O gene *orf4* apresentou identidade de 98% com o detectado no plasmídeo pDIJ09-518a (HQ834472) por GUILLARD et al. (2012).

Figura 12. Representação esquemática do plasmídeo contendo os genes *qnrD1*, *orf2*, *orf3*, e *orf4*. Obtida através da sequência de 2618 nucleotídeos, submetida ao software online *Draw Custom Plasmid Map* (<http://www.rf-cloning.org>) (BOND e NAUS, 2012).

4.6 DISTRIBUIÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS ENTRE AS CEPAS POSITIVAS

Das 65 cepas, 47 (72,3%) apresentaram positividade ao menos a um gene pesquisado. Destas, 29 (61,7%) correspondem a cepas de origem clínica, e 18 (38,3%) a cepas de origem ambiental.

O gene mais frequente, dentre as cepas positivas, foi *oqxA* com frequência de 59,6% (28/47); seguido por *oqxB* com 57,4% (27/47); *qnrS* com 38,3% (18/47); *qnrB* com 27,7% (13/47); *aac(6')-Ib-cr* com 14,9% (7/47), e *qnrD* com 2,1% (1/47) (Figura 13).

Dentre as cepas positivas de origem clínica (n=29), o genes mais prevalentes foram *oqxA* e *oqxB* com frequência de 86,2% (25/29) cada um, seguidos de *qnrS* com 20,7% (6/29); *qnrB* com 17,2% (5/29); e *qnrD* com 3,4% (1/29) (Figura 13).

Dentre as cepas positivas de origem ambiental (n=18), o gene mais prevalente foi *qnrS* com frequência de 66,7% (12/18); *qnrB* com 44,4% (8/18), *aac(6')-Ib-cr* com 38,9% (7/18); *oqxA* com 16,7% (3/18); e *oqxB* com 11,1% (2/18) (Figura 13).

A frequência de espécies carreadoras de genes de resistência a quinolonas foi liderada por *Klebsiella pneumoniae* com 47,9%, cuja frequência dentre as espécies

selecionadas para o estudo também foi a maior; seguida pelas cepas de *Escherichia coli* com 14,6%; *Morganella morganii* com 6,2%; *Citrobacter freundii* com 4,7%, *Aeromonas hydrophila* com 4,7%; *Aeromonas sanarellii* com 4,7%; *Aeromonas media* com 2,1%; *Aeromonas punctata* com 2,1%; *Proteus mirabilis* com 2,1%; *Enterobacter aerogenes* com 2,1%; *Salmonella Agona* com 2,1%, *Klebsiella oxytoca* com 2,1%; e *Providencia rettgeri* com 2,1%.

Nove (19,2%) cepas possuíam apenas um gene pesquisado: 3 *Escherichia coli*, 1 *Aeromonas sanarellii*, 1 *Aeromonas punctata*, 1 *Aeromonas hydrophila*, 1 *Providencia rettgeri*, 1 *Morganella morganii*, e 1 *Citrobacter freundii*.

Vinte e duas (46,8%) cepas possuíam apenas os genes *oqx*A e *oqx*B, que se complementam para codificar o mesmo sistema de efluxo, dentre estas estão 18 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Escherichia coli*, e 2 *Klebsiella oxytoca*.

Doze (23,4%) cepas carregavam 2 genes de resistência pesquisados, considerando os genes *oqx* apenas um, por codificarem um mesmo sistema de efluxo. Dentre estas cepas estão 2 *Escherichia coli*, 3 *Klebsiella pneumoniae*; 2 *Morganella morganii*, 1 *Enterobacter aerogenes*, 1 *Proteus mirabilis*, 1 *Aeromonas sanarellii*, 1 *Citrobacter freundii*, e 1 *Salmonella Agona*.

Quatro (10,6%) cepas carregavam 3 genes de resistência a quinolonas, este foi o maior número de coexistência de genes encontrada, dentre estas cepas estão 2 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Aeromonas hydrophila* e 1 *Aeromonas media*.

Figura 13. Distribuição de genes de resistência a quinolonas em relação a origem de isolamento das cepas bacterianas hospedeiras.

4.7 PRESENÇA DE MUTAÇÕES NO GENE *gyrA*

A presença de mutações na região QRDR do gene *gyrA* foi pesquisada nas 47 cepas positivas para os genes de resistência a quinolonas. Esta região está localizada entre os aminoácidos Alanina (67) e Glutamina (106) (RODRIGUEZ-MATINEZ et al., 2011).

Dentre as 47 cepas, 46 (97,9%) apresentaram ao menos uma mutação, sendo que uma cepa clínica de *Klebsiella pneumoniae* (FSP 241/05) não apresentou nenhuma mutação nesta região (Quadro 5).

O maior número de mutações foi observado no aminoácido serina na posição 83, cuja frequência foi de 100%, com 46 cepas mutadas nesta posição, dentre estas a substituição mais frequente foi de Ser83 por Ile83 observada em 23 (50,0%) cepas, seguida da substituição de Ser83 por Phe83 observada em 8 (17,4%) cepas, Ser83 por Leu83 observada em 7 (15,2%) cepas, Ser83 por Tyr83 observada em 6 (13,0%) cepas, e Ser83 por Arg83 observada em 2 (4,3%) cepas.

Foram observadas também mutações no aminoácido ácido aspártico na posição 87, com frequência de 40,4%, com 19 cepas mutadas nesta posição. Destas, 12 (63,2%) cepas apresentaram substituição de Asp87 por Asn87, e 7 (36,8%) cepas apresentaram substituição de Asp87 por Ala87.

Vinte e sete (57,4%) cepas apresentaram apenas uma mutação na região QRDR, e 19 (40,4%) cepas apresentaram 2 mutações nesta região do gene *gyrA*.

4.8 DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS PLASMÍDEOS

Para detecção e determinação da presença e tamanho de plasmídeos foram utilizadas as técnicas de S1-PFGE (Figura 14) e extração de plasmídeo por kit comercial seguida de eletroforese em gel de agarose.

Através do emprego destas duas metodologias foram observados plasmídeos de alto e baixo peso molecular em 43 cepas, e em 4 cepas não foram identificados plasmídeos utilizando estas técnicas (Quadro 5).

Figura 14. Gel de agarose de eletroforese em campo pulsado após digestão com S1 nuclease. 1= Lambda PFG Marker; 2= FSP 202/05; 3= FSP 211/05; 4= FSP 212/05; 5= FSP 234/05; 6= FSP 237/05; 7= FSP 253/05; 8= FSP 259/05; 9= FSP 260/05; 10= FSP 264/05; 11= FSP 269/05; 12= FSP 292/05; 13= FSP 306/05; 14= FSP 307/05; 15= FSP 316/05; 16= Midrange PFG Marker I.

Quadro 5. Perfil de sensibilidade e características moleculares de resistência à quinolonas das cepas positivas aos genes de resistência às quinolonas.

Cepa	Ano/Local Isolamento	Perfil de Resistência às Quinolonas	Gene PMQR	Mutações <i>gyrA</i>	Plasmídeos (kb)
<i>Escherichia coli</i> n=7					
<i>Origem Clínica</i>					
FSP 306/05 ⁺	2005 ¹ / Urina	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Leu83	245/ 130/ ≈23
FSP 307/05 ⁺	2005 ¹ / Urina	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Leu83 Asp87→Asn87	130/ ≈23
<i>Origem Ambiental</i>					
FSP 1315/09	2009 / C	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrB1, oqxA</i>	Ser83→Leu83 Asp87→Asn87	NI
FSP 1332/09	2009 / B	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrS2</i>	Ser83→Leu83 Asp87→Asn87	63,5
FSP 1355/09	2009 / D	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrS2</i>	Ser83→Leu83 Asp87→Asn87	NI
FSP 1314/09	2009 / C	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrS2, aac(6')-Ib-cr</i>	Ser83→Leu83 Asp87→Asn87	112/ ≈23/ ≈23
FSP 1348/09	2009 / D	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrS2</i>	Ser83→Leu83 Asp87→Asn87	220/ 33,5/ ≈23/ ≈23
<i>Klebsiella pneumoniae</i> n=19					
<i>Origem Clínica</i>					
FSP 202/05 ⁺	2004 ¹ / Prega Inguinal	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Phe83 Asp87→Ala87	270/ 130/ 30/ ≈23/ ≈23/ ≈6/ 4/ 361/ 2,4
FSP 211/05 ⁺	2004 ¹ / Sangue	NAL/CIP/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Tyr83 Asp87→Ala87	242,5/ 190/ 112/ 4
FSP 212/05 ⁺	2004 ¹ / Ponta de Cateter	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Tyr83 Asp87→Ala87	194/ 112/ ≈23/ 6
FSP 220/05 ⁺	2004 ¹ / Urina	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrB19, oqxA, oqxB</i>	Ser83→Ile83	209,5/ 145,5/ 90/ 48,5/ ≈23/ ≈23/ 9/ ≈5
FSP 234/05 ⁺	2004 ¹ / Urina	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Tyr83 Asp87→Ala87	150/ 70/ 50/ ≈23
FSP 237/05 ⁺	2004 ¹ / Urina	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Phe83 Asp87→Asn87	≈23/ ≈23/ ≈23/ ≈23/ 9,416/ 4,361/ 2,3/ ≈2
FSP 253/05 ⁺	2004 ¹ / Urina	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Ile83	380/ ≈23/ ≈23/ ≈23
FSP 259/05 ⁺	2004 ¹ / Escara	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Ile83	380/ ≈23/ ≈23/ ≈23
FSP 260/05 ⁺	2004 ¹ / Urina	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Ile83	380/ ≈23/ ≈23/ ≈23
FSP 264/05 ⁺	2004 ¹ / Prega Axilar	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Phe83 Asp87→Asn87	300/ 120/ ≈6,5/ 2,027
FSP 269/05 ⁺	2004 ¹ / Urina	NAL/CIP	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Tyr83	194/ 120/ ≈23/ ≈23
FSP 292/05 ⁺	2005 ¹ / Urina	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Ile83	380/ ≈23/ ≈23
FSP 316/05 ⁺	2005 ¹ / Secreção Purulenta	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Ile83	215/ ≈23/ ≈23
FSP 317/05 ⁺	2005 ¹ / Sangue	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Tyr83 Asp87→Ala87	≈23/ ≈23/ 6,557
FSP 333/05 ⁺	2005 ¹ / Urina	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrB19, qnrS2</i>	Ser83→Phe83 Asp87→Ala87	220/ 97
FSP 335/05 ⁺	2005 ¹ / Urina	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrB19, qnrS2, oqxA, oqxB</i>	Ser83→Ile83	220/ 145,5/ ≈23/ ≈23
FSP 236/05 ⁺	2004 ¹ / Urina	NAL/CIP/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Tyr83	≈23/ ≈23
FSP 241/05 ⁺	2004 ¹ / Urina	-	<i>qnrS2, oqxA, oqxB</i>	-	97/ 50/ 33,5/ ≈15/ ≈15/ 9/ ≈3
FSP 351/13 ⁺	2009 ² / Escara	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Phe83 Asp87→Asn87	≈23/ 9/ ≈5/ 4/ ≈3/ 2
FSP 353/13	2009 ² / Secreção Traqueal	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Ile83	≈5
FSP 355/13 ⁺	2008 ² / Ponta de Cateter	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Phe83 Asp87→Asn87	9/ ≈3/ 2
FSP 359/13 ⁺	2009 ² / Urina	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oqxB</i>	Ser83→Phe83 Asp87→Asn87	9/ ≈3/ 2
<i>Origem Ambiental</i>					
FSP 1271/09	2009 / C	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrB1, qnrS2, oqxA, oqxB</i>	Ser83→Ile83	≈23/ 4/ ≈1

Continuação do Quadro 5.

Cepa	Ano/Local Isolamento	Perfil de Resistência às Quinolonas	Gene PMQR	Mutações <i>gyrA</i>	Plasmídeos (kb)
<i>Morganella morganii</i> n=3					
<i>Origem Clínica</i>					
FSP 332/05 ⁺	2004 ¹ / Urina	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrB19, qnrS2</i>	Ser83→Ile83	NI
<i>Origem Ambiental</i>					
FSP 1380/09	2009 / B	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrS2, aac(6')-Ib-cr</i>	Ser83→Ile83	≈23
FSP 1382/09	2009 / B	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Ser83→Ile83	≈23
<i>Aeromonas hydrophila</i> n=2					
<i>Origem Ambiental</i>					
FSP 888/11	2009 / A	NAL/CIP/MXF	<i>qnrB19, qnrS2, aac(6')-Ib-cr#</i>	Ser83→Ile83	291/ ≈23/ ≈23/ 9/ 6/ 4
FSP 893/11	2009 / A	NAL/LEV/MXF	<i>qnrS2</i>	Ser83→Ile83	≈23/ ≈23/ 9/ 4
<i>Aeromonas sanarellii</i> n=2					
<i>Origem Ambiental</i>					
FSP 151/08	1994 / A	NAL	<i>qnrB19, qnrS2</i>	Ser83→Arg83	112/ ≈23/ 9/ 4
FSP 760/11	2009 / A	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>aac(6')-Ib-cr#</i>	Ser83→Ile83 Asp87→Asn87	182/ ≈23
<i>Klebsiella oxytoca</i> n=2					
<i>Origem Clínica</i>					
FSP 324/05 ⁺	2005 ¹ / Líquido Ascítico	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>oqxA, oxqB</i>	Ser83→Phe83 Asp87→Ala87	339,5/ 230/ 120/ ≈23/ ≈23/ 6/ ≈5/ ≈3
<i>Origem Ambiental</i>					
FSP 1266/09	2009 / C	NAL/CIP/MXF	<i>oqxA, oxqB</i>	Ser83→Ile83	242,5/ 209/ ≈23/ ≈23/ ≈23/ ≈23/ 9/ 4
<i>Aeromonas punctata</i> n=1					
<i>Origem Ambiental</i>					
FSP 816/11	2009 / A	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrS2</i>	Ser83→Ile83	≈23/ ≈23/ 9/ 6/ 4/ 2
<i>Aeromonas media</i> n=1					
<i>Origem Ambiental</i>					
FSP 836/11	2009 / B	NAL/CIP/MXF	<i>qnrB19, qnrS2, aac(6')-Ib-cr#</i>	Ser83→Ile83	≈23/ ≈23
<i>Enterobacter aerogenes</i> n=1					
<i>Origem Clínica</i>					
FSP 261/05 ⁺	2004 ¹ / Prega Axilar	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrB, qnrS1</i>	Ser83→Ile83	80/ 60/ 33,5/ ≈23/ ≈23
<i>Proteus mirabilis</i> n=1					
<i>Origem Clínica</i>					
FSP 331/05 ⁺	2005 ¹ / Urina	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrB19, qnrS2</i>	Ser83→Arg83	NI
<i>Providencia rettgeri</i> n=1					
<i>Origem Clínica</i>					
FSP 309/05 ⁺	2005 ¹ / Urina	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrD1</i>	Ser83→Ile83	220/ 145,5/ 112/ ≈23/ ≈4/ ≈2,5
<i>Citrobacter freundii</i> n=2					
<i>Origem Ambiental</i>					
FSP 1263/09	2009 / A	NAL/CIP/LEV/MXF	<i>qnrB-like, aac(6')-Ib-cr#</i>	Ser83→Ile83	≈300/ ≈23
FSP 346/12	2009 / A	NAL/CIP/MXF	<i>qnrB-like</i>	Ser83→Ile83	≈330/ ≈23
<i>Salmonella Agona</i> n=1					
<i>Origem Ambiental</i>					
FSP 1662/11	2011 / A	NAL/MXF	<i>qnrB-like, qnrS2</i>	Ser83→Ile83	≈15

+ = cepa ESBL positiva/ Hospitais (1 e 2)/ Estações de tratamento de esgoto (A, B, C e D)/ NAL= Ácido nalidíxico/ CIP= Ciprofloxacina/ LEV= Levofloxacina/ MXF= Moxifloxacina/ NI= não identificado/ # = associação com integrase de Classe 1.

5 DISCUSSÃO

5.1 PERFIL DE SENSIBILIDADE ÀS QUINOLONAS

Nos últimos anos tem se observado um aumento exponencial da resistência a quinolonas, principalmente entre espécies da família *Enterobacteriaceae*. Dada à importância clínica destes antimicrobianos este fato vem intensificar a preocupação com a disseminação desta resistência entre diferentes meios (RICE, 2009; LIVERMORE, 2012).

Muitos estudos revelam um alerta aos perfis de resistência a quinolonas em cepas de origem clínica, visto que este composto é empregado em diferentes tratamentos de infecções, causadas tanto por Gram positivos quanto por Gram negativos, e também nas mais diversas formas de infecções, em especial nas infecções comunitárias adquiridas (DALHOFF, 2012; SALLES et al., 2013).

Entretanto, cepas resistentes a quinolonas foram encontradas também no meio ambiente e relacionadas a animais. Estudos têm sido realizados para verificar e disponibilizar dados a respeito destes ambientes, e revelar o grave problema da dispersão desta resistência em meios distintos (POIREL et al., 2012).

Este estudo foi iniciado a partir de cepas fenotipicamente resistentes a alguma geração de quinolonas que foi observada em estudos anteriores. Entretanto, neste estudo foi empregado um representante de cada geração de quinolonas para melhor visualização da abrangência desta resistência.

Todas as gerações de quinolonas apresentaram baixa efetividade em elevado percentual de cepas, cerca de 90% destas. Dentre as cepas resistentes pode-se observar que o ácido nalidíxico, representante da primeira geração, foi a quinolona menos ativa (93,8% de cepas resistentes), seguido da moxifloxacina, representante da quarta geração, que apresentou resistência em 90,8% das cepas. Este fato pode ser explicado dado que a moxifloxacina foi elaborada para melhor atender a infecções de Gram positivos e com foco no trato respiratório e infecções intra-abdominais, e as cepas utilizadas neste estudo foram todas Gram negativas, e, portanto, ter ocasionado o elevado percentual de resistência para quinolona de quarta geração.

A levofloxacin (21,5% de cepas sensíveis) demonstrou maior eficácia dentre todas as quinolonas empregadas, seguida da ciprofloxacina (12,3% de cepas sensíveis), com cerca de 10% de diferença entre estas duas quinolonas. O emprego da levofloxacin é recomendado em casos especiais que necessitam maior atenção terapêutica, esta fluoroquinolona também possui amplo espectro de ação, porém a maior demanda de indicações ainda pertence à ciprofloxacina. Entretanto, o elevado perfil de resistência que tem sido observado para ambas as fluoroquinolonas alertam quanto sua eficácia nos tratamentos em que são empregadas (DRAGO et al., 2001; BOLON, 2011).

As cepas clínicas apresentaram maior percentual de resistência para todas as gerações de quinolonas em relação às cepas ambientais, porém estas cepas ainda assim exibiram resistência acima de 60% a todas as quinolonas.

Em algumas cepas não foi constatada resistência a nenhum antimicrobiano utilizado, este fato pode ser devido ao período de armazenamento e estocagem em freezer, ou perda do componente responsável pela resistência ou ainda diminuição ou não expressão deste componente.

5.2 GENES DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS

Os genes *qnr* foram os primeiros dentre os genes de resistência mediados por plasmídeos a serem descobertos e relacionados às quinolonas, com o gene *qnrA1* em 1998 por MARTINEZ-MARTINEZ et al. (1998). Desde então, a busca por estes genes tem se tornado cada vez mais frequente, e a sua disseminação amplamente comprovada.

No Brasil, foram observados os genes *qnrA1*, *qnrB2*, *qnrB19*, *qnrS1*, *qnrB1* e *aac(6')-Ib-cr*, em cepas de origem clínica (CASTANHEIRA et al., 2007; MINARINI et al., 2008; FERRARI et al., 2011; PEIRANO et al., 2011; PAIVA et al., 2012; VIANA et al., 2013).

Genes PMQRs, foram assim classificados devido à alta frequência com que são detectados inseridos em plasmídeos, entretanto, em alguns trabalhos estes foram localizados no cromossomo bacteriano (RUIZ E. et al., 2012). Neste estudo, a

localização do ambiente genético em que o gene estava inserido não foi pesquisada, com exceção do gene *qnrD1*, porém a pesquisa de plasmídeos revelou a presença destes elementos nas cepas, que pode sugerir que os genes em questão possam estar inseridos em algum destes. Das 47 cepas, apenas em 4 não foram observados plasmídeos, e nessas há maior probabilidade dos genes pesquisados estarem inseridos no cromossomo.

5.2.1 *qnrS*

O gene *qnrS*, inicialmente relatado em 2005, por HATA et al. (2005), a partir de uma cepa clínica isolada no Japão, adquiriu novas variantes no decorrer dos anos, atualmente este gene é composto por 8 variantes, e apresenta dispersão por todo o mundo, inclusive no Brasil. Este foi o segundo gene *qnr* descrito na literatura.

Neste estudo, foram observadas as variantes *qnrS1* e *qnrS2*, com a frequência em 27,7% (18/65) de cepas. E destas, a maior frequência foi observada em cepas de origem ambiental, sendo 66,7% (12/18). A variante *qnrS2* foi observada em 94,4% (17/18) de cepas. Apenas uma cepa de origem clínica (*Enterobacter aerogenes* - FSP 261/05) foi positiva para *qnrS1*.

No Brasil, o gene *qnrS1* foi relatado pela primeira vez por PAIVA et al. (2012), em cepas de *Escherichia coli*, isoladas de amostras de urina. Em 2013, houve um novo relato do gene *qnrS1*, por VIANA et al. (2013), que o observaram em cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, também isoladas de amostras de urina. Neste estudo, a cepa positiva para *qnrS1* também pertencia à família *Enterobacteriaceae* e provinha de amostra clínica, sendo esta de prega axilar, isolada no ano de 2004, e portanto anteriormente ao ano de divulgação do gene no Brasil.

A variante *qnrS2* foi relatada pela primeira vez por GAY et al. (2006), em cepas de *Salmonella enterica* sorovar Anatum e *Salmonella enterica* sorovar Bovismorbificans, provenientes de isolados clínicos, nos Estados Unidos. Desde então, os relatos desta variante tem ocorrido por todo o mundo (STRAHILEVITZ et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; HAN et al., 2012a; LITERAK et al., 2012; POIREL et al., 2012).

Neste estudo, esta variante (*qnrS2*), foi observada em cepas das diferentes origens estudadas, clínica e ambiental. E também em diferentes espécies bacterianas, em representantes da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Aeromonas*. Estudos brasileiros não haviam identificado esta variante anteriormente, sendo este o primeiro relato no país. É necessário destacar a dispersão desta variante nesses meios, e principalmente a alta prevalência no ambiente. POIREL et al. (2012) já haviam observado esta predisposição de genes *qnrS-type* em ambientes aquáticos.

O gênero *Aeromonas* tem sido o mais relacionado aos genes *qnrS* (CATTOIR et al., 2008a; SÁNCHEZ-CÉSPEDDES et al., 2008; MAJUMDAR et al., 2011; HAN et al., 2012a; HAN et al., 2012b; HAN et al., 2012c; MARTI e BALCÁZAR, 2012). E neste estudo, foi verificada a sua ocorrência em 5 cepas deste gênero, nas espécies *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas media*, *Aeromonas punctata*, e *Aeromonas sanarellii*.

Outro dado importante obtido neste estudo são as datas de isolamento destas cepas positivas para *qnrS*, em sua maioria, estas foram isoladas no período de 2004 a 2011. Dentre as cepas ambientais é relevante salientar a ocorrência do mesmo gene em diferentes períodos na mesma estação de tratamento de esgoto. Excepcionalmente, uma cepa de *Aeromonas sanarellii*, isolada no ano de 1994, possuía o gene *qnrS2*, o qual foi descrito somente 12 anos depois nos Estados Unidos, evidenciando que a circulação dos genes *qnr* é muito anterior às primeiras descrições, como relatado por JACOBY et al. (2009), e que estão amplamente disseminados no mundo.

5.2.2 *qnrB*

O gene *qnrB*, dentre os genes *qnr*, é o que comporta maior número de variantes. Segundo o website www.lahey.org/qnrstudies, até outubro de 2013 haviam sido relatadas 73 variantes, com ampla disseminação mundial.

Neste estudo foram detectadas as variantes *qnrB1*, *qnrB19* e duas variantes não identificadas, que foram caracterizadas como *qnrB-like* e *qnrB69-like*. Assim

como *qnrS*, também foi observada maior frequência em cepas ambientais com 61,5% (8/13) das cepas.

O gene *qnrB1*, foi descrito pela primeira vez em 2006 por JACOBY et al. (2006), em plasmídeos pMG298, pMG299, e pMG300 de cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de amostras clínicas da Índia. A partir desta descoberta, outros relatos a respeito desta variante ocorreram por todo o mundo (VILLA et al., 2012; FILIPPA et al., 2013; DOLEJSKA et al., 2013; ANDRES et al., 2013); inclusive no Brasil por MINARINI et al. (2008), PAIVA et al. (2012) e VIANA et al. (2013) em cepas de *Enterobacteriaceae* de origem clínica. Neste estudo foi observada a variante *qnrB1* em uma cepa de *Escherichia coli* e em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* de origem ambiental, provenientes de uma mesma estação de tratamento de esgoto e ano de isolamento. Revelando que este gene, anteriormente, apenas detectado no Brasil em amostras clínicas, está se dispersando para outros meios, inclusive em amostras ambientais.

A variante *qnrB19* foi a mais frequente dentre as variantes de *qnrB* detectadas, e foi observada tanto em cepas de origem clínica, quanto em cepas de origem ambiental. Este dado revela a disseminação nos dois meios estudados, e preocupação quanto ao meio ambiente, pois esta foi observada em 2 estações de tratamento de esgoto e em anos de isolamento diferentes. O primeiro relato desta variante ocorreu em 2008, realizado por CATTOIR et al. (2008), a partir de uma cepa de *Escherichia coli* proveniente de amostra clínica da Colômbia, e também demonstrou a associação deste gene com o elemento genético *ISEcp-1*. No Brasil, o gene *qnrB19* foi relatado por FERRARI et al. (2011), PAIVA et al. (2012) e VIANA et al. (2013), os três estudos observaram este gene em cepas provenientes de amostras clínicas. Excepcionalmente, a cepa de *Aeromonas sanarellii* isolada em 1994, também possuía o gene *qnrB19*, e mais uma vez salienta a circulação deste gene 14 anos antes de sua primeira descrição na Colômbia, bem como a sua dispersão pela América Latina (PALLECCHI et al., 2009; ANDRES et al., 2013; GOZÁLEZ e ARAQUE, 2013; ZAIDI et al., 2013).

Em duas cepas de *Citrobacter freundii* de origem ambiental foi observada uma variante *qnrB-like* com alta similaridade com as variantes *qnrB6* e *qnrB9*. A variante *qnrB6* (EF520349) foi detectada pela primeira vez em plasmídeo pWCH-

LM2 de uma cepa de *Pantoea agglomerans* em 2007, na China (www.lahey.org/qnrstudies), o estudo completo ainda não possui publicação. E a variante *qnrB9* (EF526508) foi observada em 2007, em plasmídeo pCF41 de uma cepa de *Citrobacter freundii*, na China, este relato não possui publicação (www.lahey.org/qnrstudies). Outros estudos foram publicados relatando a ocorrência destas variantes pelo mundo (LITERAK et al., 2012; RUIZ et al., 2012; SAIFUL et al., 2013). Em especial o de FORCELLA et al. (2009), cujos dados são similares aos deste estudo, no qual detectaram a variante *qnrB9* em cepa de *Citrobacter freundii* isolada de efluente de esgoto na Itália.

Segundo estudo de JACOBY et al. (2011), o surgimento das variantes *qnrB* podem ter ocorrido a partir do cromossomo de cepas de *Citrobacter freundii*, isto devido ao elevado número de variantes detectadas inicialmente em cepas desta espécie, e a relação com elementos genéticos, permitindo a fácil transferência para plasmídeos.

Em uma cepa de *Salmonella enterica* sorovar Agona de origem ambiental foi detectada uma variante *qnrB69-like*, com alta similaridade com a variante *qnrB69* (KC580658). Esta variante, até então, somente havia sido observada em uma cepa de *Citrobacter freundii*, isolada de amostras de fezes de corvos em 2013, nos Estados Unidos (www.lahey.org/qnrstudies). Este estudo completo ainda não possui publicação, e também não há outros relatos desta variante.

5.2.3 *qnrD*

CAVACO et al. (2009) relataram o gene *qnrD* pela primeira vez em cepas de *Salmonella enterica* sorovar Kentucky e *Salmonella enterica* sorovar Bovismorbifican, provenientes de amostras clínicas, na China. Em 2013, segundo o website www.lahey.org/qnrstudies, foi relatada uma nova variante, chamada *qnrD2* (não há estudos publicados), e, portanto a primeira passou a ser chamada de *qnrD1*.

A variante *qnrD1*, já foi detectada nos continentes Asiático e Europeu, com grande predominância na China (XIA et al., 2011; VELDMAN et al., 2011). HU et al. (2012) destacaram a importância clínica deste gene associado ao gene *bla_{KPC-2}* em

cepas de *Proteus mirabilis*, provenientes de amostras hospitalares na China. LI et al. (2012) observaram a relação entre resíduos de quinolonas em água residual de confinamentos suínos e solos agrícolas com a presença de genes PMQR, incluindo *qnrD1*, em amostras provenientes da China. ZHAO e DANG (2012) verificaram esta variante em cepas de *Proteus vulgaris* isoladas de água superficial do mar, na China. Na Europa, LITERAK et al. (2012) detectaram a variante *qnrD1* em amostras de pássaros aquáticos; MOKRACKA et al. (2012) observaram a variante *qnrD1* em cepas de *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris* provenientes de amostras clínicas da Polónia. Na Nigéria, OGBOLU et al. (2011) relataram a ocorrência de *qnrD1* em cepas de *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de amostras clínicas.

Devido à ocorrência deste gene em muitos trabalhos em cepas de *Proteus* spp., é possível observar maior afinidade dentre *qnrD1* e a grupo *Proteeae* (MAZZARIOL et al., 2011; GUILARD et al., 2012). Corroborando com os resultados encontrados neste estudo, no qual o gene *qnrD1* foi detectado em uma cepa clínica de *Providencia rettgeri*, isolada no ano de 2005 em uma amostra de urina.

De acordo com os estudos de MAZZARIOL et al. (2011) e GUILARD et al. (2012), quando detectado o gene *qnrD* em cepas de *Proteus* spp. e *Providencia* spp., há grande possibilidade de este estar inserido em plasmídeo de baixo peso molecular, não conjugativo, com cerca de 2 a 4kb. Seguindo a metodologia proposta por MAZZARIOL et al. (2011), foi possível amplificar a sequência completa do plasmídeo (2618pb), cujo gene *qnrD1* estava inserido, na cepa de *Providencia rettgeri*.

Do mesmo modo como os estudos anteriores, o plasmídeo identificado não apresentou outros genes de resistência, é de caráter não-conjugativo, e abriga 3 *orfs*. A *orf2* apresentou elevada identidade com a observada por CAVACO et al. (2009), o mesmo ocorreu com o estudo de GUILLARD et al. (2012), que sugeriram então uma possível transferência de plasmídeo entre *Salmonella* sp. e *Providencia rettgeri*. GUILLARD et al. (2012) propuseram que a *orf4* pode conter genes que codificam proteínas de replicação (Rep), seguida da região do promotor do gene *qnrD1*, mas

como não apresenta similaridade com outras proteínas de replicação conhecidas, esta hipótese ainda necessita de mais evidências para ser considerada.

É importante destacar a circulação deste gene no Brasil, em período antecedente à sua primeira descrição, cerca de 4 anos prévios, e também o poder de disseminação deste gene, cuja predominância de ocorrência está nos continentes Asiático e Europeu, constatando esta, a primeira descrição e caracterização do plasmídeo mediador do gene *qnrD1* no continente Americano.

Devido aos poucos dados em relação a estes plasmídeos na literatura e aos obtidos neste estudo, maiores esclarecimentos e estudos se fazem necessários, para a melhor compreensão de como ocorre esta disseminação.

5.2.4 *aac(6')-Ib-cr*

O gene *aac(6')-Ib-cr* teve seu primeiro relato em 2006, realizado por ROBICSEK et al. (2006a), que ao pesquisarem plasmídeos carreadores do gene *qnrA*, observaram diferenças entre as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para as fluoroquinolonas, dentre os diferentes plasmídeos identificados. E após as análises, concluíram que o gene *aac(6')-Ib*, codificava uma enzima com duas substituições de aminoácidos, e as atribuíram a responsabilidade pela acetilação das fluoroquinolonas. Este gene *aac(6')-Ib*, codifica a enzima aminoglicosídeo acetiltransferase, que causa resistência a aminoglicosídeos. Devido às substituições notadas nos aminoácidos Trp102→Arg102 e Asp179→Tyr179, passou a conferir resistência às fluoroquinolonas, e esta variante foi nomeada *aac(6')-Ib-cr*.

Desde então, o gene *aac(6')-Ib-cr*, tem sido relatado em diversas partes do mundo, sua disseminação pode ter passado despercebida por muitos anos, devido à associação apenas aos aminoglicosídeos. A presença do gene *aac(6')-Ib* pode ser considerada como fator de risco para resistência as quinolonas, dado o baixo número de substituições necessárias para determinar tal característica.

O gene *aac(6')-Ib-cr* já foi relatado em diversos países nos continentes Europeu, Asiático, Africano, Americano e na Oceania. Na América do Sul já foi

observado em alguns países como Uruguai, Argentina e Brasil (RODRIGUÉZ-MARTÍNEZ et al. 2011).

No Brasil, o primeiro relato ocorreu em 2011, por PEIRANO et al. (2011), em cepas de *Escherichia coli* de origem clínica. Os relatos posteriores, também foram a partir de cepas de *Enterobacteriaceae* provenientes de amostras clínicas (PAIVA et al., 2012; VIANA et al., 2013). Este estudo, opostamente aos anteriores realizados no país, não apresentou a variante *-cr* em nenhuma cepa originária de amostras clínicas, mas constatou a sua ocorrência em cepas de origem ambiental.

Em 10,8% (7/65) das cepas selecionadas para o estudo foi observada a presença do gene *aac(6')-Ib-cr*, provenientes de três estações de tratamento de esgoto diferentes, porém com coleta das amostras realizadas no mesmo período (2009), e em espécies bacterianas distintas, com representantes da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Aeromonas*.

Destas 7, em 4 cepas foi possível realizar a constatação de associação do elemento genético integron de classe 1 com o gene *aac(6')-Ib-cr*. As associações com elementos genéticos são comuns dentre os genes PMQRs, porém, a comprovação desta é de grande importância no âmbito da disseminação dos genes de resistência, visto o papel crucial destes na evolução da resistência bacteriana, por permitirem a coexistência, integração, e acúmulo de genes de resistência em um mesmo elemento genético, que pode ser transferido para outras cepas bacterianas.

Os genes *aac(6')-Ib-cr*, assim como seu precursor *aac(6')-Ib*, são geralmente associados a elementos genéticos, entre estes elementos se destacam transposons (principalmente *Tn1331*), integron de classe 1, e dentre as sequências de inserção, a IS26, e podem estar inseridos em plasmídeos ou no cromossomo (RAMIREZ et al., 2013).

Neste estudo foi observada a deleção região *attI* e do promotor, em uma das sequências obtidas a partir da amplificação da associação dos genes *intI1* e *aac(6')-Ib-cr*. Esta deleção pode impedir a aquisição de outros cassetes de genes, e a expressão dos genes cassetes subsequentes, mas não é possível afirmar se esta alteração implica em outros danos ao integron.

Este estudo é o primeiro a relatar a presença do gene *aac(6')-Ib-cr* em cepas provenientes de amostras ambientais no Brasil. Ao relacionarmos este aos estudos

brasileiros anteriores, podemos constatar uma possível disseminação deste gene entre diferentes ambientes, clínico e ambiental. Este estudo também é o primeiro no país a constatar a associação do gene *aac(6')-Ib-cr* ao elemento genético integron de classe 1, tornando sua dispersão e coexistência de outros genes de resistência facilitada, além de possibilitar a resistência múltipla aos antimicrobianos (LUPO et al., 2012).

5.2.5 *oqx*

O sistema de efluxo OqxAB, codificado por dois genes, *oqxA* e *oqxB*, configurados em um mesmo operon, foi descrito pela primeira vez em 2004, em uma cepa de *Escherichia coli*, por HANSEN et al. (2004), no qual o atribuíram a capacidade de resistência ao promotor de crescimento olaquinox, utilizado em animais.

Após outros estudos, foi verificado que este sistema de efluxo também permite a resistência a outros compostos, como cloranfenicol e quinolonas, e passou a ser incluído dentre os PMQRs (HANSEN et al., 2007; KIM HB et al., 2009).

Este estudo revelou elevada frequência dos genes *oqx* (43,1%), em especial nas cepas de origem clínica, apresentando 38,5% (25/65) de cepas positivas. Houve baixa frequência nas cepas de origem ambiental, com cerca de 4,6% (3/65). Entretanto, estes genes não haviam sido descritos no Brasil até o momento, tornando esta a primeira descrição dos genes *oqx* no país.

É importante ressaltar a íntima relação destes genes com a utilização do composto olaquinox, cujo uso foi proibido no Brasil em 2004, muito próximo ao período de isolamento das cepas nas amostras clínicas, que compreendem em sua maioria aos anos de 2004 a 2005, porém todas as cepas clínicas isoladas de 2008 a 2009 também apresentaram positividade. Este fato alerta para a elevada disseminação destes genes dentre as cepas provenientes de amostras clínicas, e a capacidade deste sistema de efluxo de determinar resistência a outros compostos, além das quinolonas.

Mesmo sendo mais frequentes nas cepas de origem clínica, estes genes também foram observados em cepas de origem ambiental, destacando-se o fato de sua disseminação nos ambientes estudados mesmo após a proibição do uso do

olaquinox. Outros estudos também relataram a dispersão dos genes *oqxA* e *oqxB*, tanto em cepas ambientais quanto em cepas clínicas (HANSEN et al., 2005; ZHAO et al., 2010; CHEN et al., 2012; LIU et al., 2013).

PEREZ et al. (2013) detectaram o sistema de efluxo OqxAB em cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes, provenientes de amostras clínicas de diferentes países. Segundo NORMAN et al. (2008), os genes *oqx* são originários de estruturas cromossômicas de cepas de *Klebsiella pneumoniae*, dado que pode esclarecer a alta prevalência de genes *oqx* dentre as cepas de *Klebsiella pneumoniae* incluídas neste estudo. Porém, como não foi realizado o mapeamento do ambiente genético destes genes neste estudo, não se pode afirmar a exata localização destes genes nestas cepas.

Apenas uma cepa de *Escherichia coli* (FSP 1315/09) de origem ambiental não apresentou os dois genes necessários para codificar o sistema de efluxo. Este fato também foi observado em outros estudos, como o realizado por RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al. (2013), que constatarem a redução de suscetibilidade as quinolonas devido ao sistema de efluxo OqxAB e alertaram sobre a alta frequência de cepas de *Klebsiella pneumoniae* ESBL-positivas carreadoras dos genes *oqx*.

5.2.6 Coexistência de genes de resistência a quinolonas

A coexistência de genes de resistência a quinolonas nas cepas utilizadas neste estudo foi alarmante, principalmente em relação às cepas ambientais cuja frequência de coexistência de genes foi de 56,2% (9/16) dentre as cepas carreadoras de mais de um gene de resistência a quinolonas. Este dado ressalta a importância das cepas ambientais no papel de reservatório e veículos disseminadores de genes de resistência (PICÃO et al., 2008; HAWKEY e JONES, 2009).

Com exceção de uma cepa clínica (FSP 353/13), todas as outras cepas provenientes de amostras clínicas apresentaram positividade para produção de ESBL, de acordo com estudos anteriores (DROPA, 2006 e DROPA, 2013). Os resultados deste estudo corroboram a observação de outros autores (SILVA-SANCHEZ et al., 2011; SHIBL et al., 2012; BRIALES et al., 2012; PARK et al., 2012) sobre a

elevada frequência de associação encontrada entre genes *bla-ESBL* e PMQRs, evidenciando a possibilidade de tal associação. A ocorrência de resistência a duas classes de antimicrobianos, usados frequentemente no tratamento de infecções, traz preocupação adicional no âmbito da saúde pública, pois reduz significativamente as opções disponíveis para tratamento dos pacientes.

5.3 PRESENÇA DE MUTAÇÕES NO GENE *gyrA*

A resistência às quinolonas, antes da descoberta dos plasmídeos carreadores de genes de resistência a quinolonas, era atribuída essencialmente às mutações encontradas nas regiões determinantes de resistência a quinolonas (QRDR). Estas regiões são bem caracterizadas nos genes *gyrA* e *parC*, o primeiro gene é relacionado principalmente aos Gram negativos, e o segundo gene aos Gram positivos. Na enzima DNA-girase são observadas substituições de aminoácidos entre Ala67 e Gln106 (JACOBY, 2005).

Neste estudo, foram pesquisadas mutações na região QRDR do gene *gyrA*, por se tratarem de cepas Gram negativas. As mutações observadas ocorreram com maior frequência na posição 83, como relatada por outros estudos (WEIGEL et al., 1998; PAZHANI et al., 2011). Com exceção de uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*, de origem clínica, todas as demais cepas submetidas à pesquisa de mutações apresentaram ao menos uma substituição na enzima GyrA.

Os genes PMQRs proporcionam baixos níveis de redução da sensibilidade às quinolonas, e possibilitam a ocorrência de mutações nas regiões QRDR, entretanto a presença destas mutações geralmente proporciona altos níveis de resistência as quinolonas (STRAHILEVITZ et al., 2009).

Como observado no Quadro 5, os perfis de resistência ao relacionarmos presença de genes e número de mutações são distintos, e portanto não foi possível determinar a importância de cada mecanismo de resistência em relação ao perfil fenotípico de resistência observado. A única cepa em que não foram observadas mutações, *Klebsiella pneumoniae* (FSP 241/05), apresentou-se sensível a todas as quinolonas testadas, mesmo carregando os genes *qnrS2* e *oqxAB*. Esta cepa pode

representar um reservatório silencioso de genes de resistência. Este fato alerta quanto à disseminação de genes por cepas não resistentes, e atribui o perfil de altos níveis de resistência, assim como na literatura, às mutações espontâneas nos genes *gyrA* e *parC*.

5.4 IMPORTÂNCIA DOS PLASMÍDEOS MEDIADORES DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS

As mutações nos genes codificadores das enzimas DNA-girase e Topoisomerase IV são espontâneas, porém ocorrem principalmente quando há exposição a baixos níveis de quinolonas, através da pressão seletiva.

Essas mutações são de grande importância devido aos altos níveis de resistência as quinolonas que são atribuídas a elas. O número de mutações na região QRDR tem influência no perfil de resistência bacteriano, quanto maior o número de substituições de aminoácidos, maiores serão os níveis de resistência observados fenotipicamente (POIREL et al., 2012).

Por sua vez os genes PMQRs não proporcionam à bactéria redução elevada da sensibilidade as quinolonas, os perfis observados são discretos, entretanto suficientes para garantir a sobrevivência da bactéria e possibilitar as mutações nas enzimas DNA-girase e Topoisomerase IV.

A disseminação dos genes PMQRs pode ocorrer de forma silenciosa, e a transferência passar despercebida por muito tempo, como já verificado por JACOBY et al. (2009). Estes genes podem não causar grande impacto quando operam sozinhos, mas o risco é a probabilidade destes genes possibilitarem as mutações nas enzimas, e estas quando mutadas promovem a ineficácia das quinolonas.

As quinolonas são antimicrobianos sintéticos, e não são naturalmente detectadas no meio ambiente, mas segundo WELLINGTON et al. (2013) estas podem permanecer por longos períodos quando depositadas no ambiente. Através da ampla utilização das quinolonas em diversas áreas, a disponibilidade das quinolonas no meio ambiente é alta, e devido à capacidade de permanência destes compostos, combinada com o papel dos genes PMQRs, bactérias ambientais passaram de apenas

carreadoras e reservatórios de genes de resistência a quinolonas, para bactérias fenotipicamente resistentes às quinolonas, como observado neste estudo, no qual mais de 70% das cepas ambientais foram resistentes a todas as quinolonas utilizadas.

JAKOBSEN et al. (2012) observaram a diminuição da eficácia da ciprofloxacina no tratamento de cobaias infectadas com bactérias carreadoras de genes *qnr*, este estudo ressalta a importância dos genes PMQRs, e questiona o sucesso nos tratamentos utilizando quinolonas, quando não existe uma triagem para os genes de resistência a esta classe de antimicrobianos.

A associação dos genes de resistência a quinolonas a elementos genéticos é outro fator de grande importância, uma vez que estes elementos contribuem para evolução e disseminação da resistência bacteriana.

Plasmídeos carreadores de genes de resistência a quinolonas têm sido observados em todo o mundo, e não há uma relação claramente estabelecida para associar um determinado gene a um determinado tipo de plasmídeo (STRAHILEVITZ et al., 2009).

Genes *qnrA* possuem maior número de descrições, e têm sido observado inseridos em plasmídeos de alto peso molecular, e geralmente associados a integrons de classe 1. Os genes *qnrB* são comumente verificados também em plasmídeos de alto peso molecular, mas relacionados principalmente à *ISCRI*. Por sua vez, os genes *qnrS* são encontrados principalmente em plasmídeos de menor peso molecular, e associado a *ISEcpI* e Tn3. Mesmo com estes dados, não é possível estabelecer uma regra ao ambiente genético comum a estes genes (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2011; POIREL et al., 2012; GUAN et al., 2013).

Neste estudo os genes detectados não foram mapeados, com exceção do *qnrDI*, mas a determinação do ambiente genético é de grande importância, tanto do ponto de vista molecular, quanto epidemiológico. Com dados mais detalhados a respeito da resistência a quinolonas, o futuro desta classe de antimicrobianos poderá ser visualizado e determinado.

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados neste estudo revelam a dispersão dos genes de resistência a quinolonas, na Grande de São Paulo, bem como alertam para a disseminação e circulação destes genes, não somente no meio clínico e hospitalar, como também no meio ambiente.

Na clínica, os genes de resistência foram observados em cepas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, que compreende distintas espécies bacterianas, como: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., entre outras. Esta família tem sido relacionada de forma constante a multirresistência, e a genes de resistência de diferentes classes de antimicrobianos, inclusive aos das quinolonas. Outro fator, que torna esta família importante disseminadora de genes de resistência, é a afinidade desta com os elementos genéticos.

O emprego das quinolonas é recorrente em determinadas infecções, estes compostos abrangem as duas mais frequentes infecções comunitárias adquiridas, as infecções do trato respiratório e do trato urinário. Sua formulação tem sido adaptada para determinados micro-organismos, como a moxifloxacina voltada principalmente para infecções respiratórias e Gram positivos; e a gemifloxacina pertencente as “novas fluoroquinolonas” atendendo a um grande número de infecções, em especial Gram negativos.

Ainda no âmbito clínico, a falência e deficiência nos tratamentos infecciosos bacterianos se devem, principalmente, às bactérias multirresistentes. Para estas, antimicrobianos de uso comum deixaram de ser empregados, e novas alternativas e custos adicionais dispensados para o sistema de saúde. Em muitas ocasiões as quinolonas são estas alternativas, mas com a elevada resistência que tem apresentado, e a dispersão de genes de resistência, seu uso tem sido limitado.

No ambiente, além das cepas de *Enterobacteriaceae*, também foram detectados genes de resistência a quinolonas em cepas de *Aeromonas*. Estas que são bactérias pertencentes à família *Aeromonadaceae*, geralmente habitam ambientes aquáticos e são relacionadas a infecções em peixes, e a poucas infecções em humanos, geralmente de caráter oportunista. O gênero *Aeromonas* é um importante

reservatório de genes de resistência, e tem estreita relação com as quinolonas, já que estes antimicrobianos são amplamente utilizados na aquicultura. Este gênero é reconhecido por transferir genes de resistência a outras espécies bacterianas (CABELLO, 2006). Considerando essas características do gênero *Aeromonas*, os resultados obtidos neste estudo alertam para possível e relevante participação desses micro-organismos na disseminação de genes de resistência às quinolonas no meio ambiente. Os resultados evidenciaram a ocorrência dos genes *qnrS2* e *qnrB19* em diferentes estações de tratamento de esgoto, e também em uma mesma estação, porém com intervalo de 15 anos da data de isolamento indicando, possivelmente, ampla circulação desses genes de resistência na população.

O resultado obtido neste estudo vem intensificar a preocupação com a extensa utilização de antimicrobianos na medicina veterinária, agricultura e aquicultura, uma vez que compostos como as quinolonas tem capacidade de persistir no ambiente por longos períodos, e exercer pressão seletiva em cepas ambientais (GOLET et al., 2003; WELLINGTON et al., 2013).

A atenção com o meio ambiente também se faz necessária, visto que a origem dos genes de resistência tem apresentado elevada relação com bactérias ambientais, e estas responsabilizadas pela transferência para o ambiente clínico (PERRY e WRIGHT, 2013).

A disseminação de genes de resistência através da transferência de genes entre diferentes bactérias e ambientes tem sido muito estudada, principalmente pelos graves problemas e transtornos que a resistência bacteriana acarreta. Porém, o uso abusivo de compostos antimicrobianos, em diferentes áreas de atuação, ainda é frequente e há pouco controle sobre a melhor forma de utilização destes. A conscientização, redução do uso, e melhor controle destes compostos podem ser medidas de prevenção à ampla disponibilidade dos antimicrobianos. Mas no caso das quinolonas, devido a capacidade de sedimentação e permanência por períodos prolongados no ambiente, é necessário o desenvolvimento de estratégias adequadas para remoção destes compostos em cada tipo de área contaminada. A existência de genes de resistência, em cepas ambientais e cepas clínicas, é esperada e natural, mas sua manutenção e elevada frequência no meio ambiente, e disseminação para outros meios é alarmante.

Neste estudo não foi averiguado o mecanismo responsável pela resistência em todas as cepas, e para estas, estudos posteriores que investiguem todos os mecanismos de resistência a quinolonas são necessários. Além disso, também são necessários estudos que averiguem mecanismos de resistência não verificados neste estudo, como análise das porinas e outros sistemas de efluxo, em todas as cepas, pois outros mecanismos podem estar contribuindo para os perfis de resistência encontrados. E para melhor análise e observação das sutis variações no perfil de sensibilidade às quinolonas, é aconselhável realizar a concentração inibitória mínima para todas as cepas.

6. CONCLUSÕES

- Dentre as cepas inicialmente selecionadas foi possível constatar elevada frequência de resistência a todas as gerações de quinolonas, nos diferentes ambientes estudados.
- Foram detectados e identificados os genes *qnrS1*, *qnrS2*, *qnrB1*, *qnrB19*, *qnrD1*, *aac(6')-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrB-like*, e *qnrB69-like* nas cepas selecionadas para o estudo.
- Foi observada associação entre integron de classe 1 e o gene *aac(6')-Ib-cr*, sendo esta a primeira detecção do gene *aac(6')-Ib-cr* em cepas de origem ambiental no Brasil e também o primeiro relato desta associação no país.
- Todas as cepas carreadoras de genes de resistência a quinolonas, exceto uma, apresentavam ao menos uma mutação na enzima DNA girase e perfil de resistência a alguma quinolona utilizada no estudo.
- Os genes *qnrS2*, *qnrD1*, *oqxA*, e *oqxB*, não identificados anteriormente no Brasil, foram observados pela primeira vez neste estudo.
- Em 91,5% das cepas carreadoras de genes de resistência a quinolonas foram observados plasmídeos.
- Foi possível verificar a ocorrência de genes de resistência a quinolonas, em cepas clínicas e ambientais, e com estes dados mostrar a possível circulação destes na Grande São Paulo.

7 REFERÊNCIAS

Acar JF, Moulin G. Antimicrobial resistance: a complex issue. *Rev Sci Tech.* 2012;31(1):23-31.

Alós J-I. Quinolonas. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 2009; 27(5):290–97.

Andersson MI, MacGowan AP. Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51 Suppl 1:1-11.

Andres P, Lucero C, Soler-Bistué A, Guerriero L, Albornoz E, Tran T, Zorreguieta A; PMQR Group, Galas M, Corso A, Tolmasky ME, Petroni A. Differential distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical enterobacteria with unusual phenotypes of quinolone susceptibility from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jun;57(6):2467-75.

Asai T, Sato C, Masani K, Usui M, Ozawa M, Ogino T, Aoki H, Sawada T, Izumiya H, Watanabe H. Epidemiology of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* isolates from food-producing animals in Japan. *Gut Pathogens.* 2010; 2(17): 1-5.

Ball P. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother.* 2000 Jul;46 Suppl T1:17-24.

Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19(3):260-5.

Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.* 1995 Apr 10;226(2):235-40.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966 Apr;45(4):493-6.

Bila DM, Dezotti M. Fármacos no meio ambiente. *Quím. Nova.* 2003; 26(4): 523-530.

Bolon MK. The newer fluoroquinolones. *Med Clin North Am.* 2011 Jul;95(4):793-817, viii.

Bond SR, Naus CC. RF-Cloning.org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jul;40(Web Server issue):W209-13.

Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, de Alba PD, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in *Escherichia coli* and *Klebsiella*

pneumoniae producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(5):431-4.

Broaders E, Gahan CG, Marchesi JR. Mobile genetic elements of the human gastrointestinal tract: potential for spread of antibiotic resistance genes. *Gut Microbes*. 2013 Jul-Aug;4(4):271-80.

Burrus V, Waldor MK. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res Microbiol*. 2004; 155(5): 376-86.

Castanheira M, Pereira AS, Nicoletti AG, Pignatari AC, Barth AL, Gales AC. First report of plasmid-mediated *qnrA1* in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(4):1527-9.

Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol*. 2006;8(7):1137-44.

Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(2):394-7.

Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis*. 2008a Feb;14(2):231-7.

Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in na *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008b; 52(10):3801-04.

Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):603-8.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* [documento na internet]. Atlanta, 2013. [acesso em 20 set 2013]. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>>.

Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *Int J Food Microbiol*. 2001/68(1-2):11-20.

Chen H, Yan SH, Ye ZL, Meng HJ, Zhu YG. Utilization of urban sewage sludge: Chinese perspectives. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2012;19(5):1454-63.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 10th ed. CLSI publication M02-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA: CLSI; 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Publication M100-S22, Vol. 32, No. 3. Wayne, PA: CLSI; 2012.

Collignon P, Powers JH, Chiller TM, Aidara-Kane A, Aarestrup FM. World health organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *CID*. 2009; 49:132–41.

Collignon P. Clinical impact of antimicrobial resistance in humans. *Rev Sci Tech*. 2012;31(1):211-20.

Conselho Nacional de Meio Ambiente. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Resolução n.º 375 , de 29 de agosto de 2006. Diário Oficial da União. 30 ago 2006; Seção :141-6.

Cosgrove SE, Carmeli Y. The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. *Clin Infect Dis*. 2003;36(11):1433-7.

Cruz AR, Paes AC, Siqueira AK. Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos. *Vet. e Zootec*. 2012; 19(4): 601-610.

Cutolo SA. Reuso de águas residuárias e saúde pública. São Paulo:Annablume; FAPESP; 2009

Dahmen S, Poirel L, Mansour W, Bouallègue O, Nordmann P. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* from Tunisia. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(7):1019-23.

Dalhoff A. Resistance surveillance studies: a multifaceted problem—the fluoroquinolone example. *Infection*. 2012 Jun;40(3):239-62.

Devirgiliis C, Barile S, Perozzi G. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. *Genes Nutr*. 2011;6(3):275-84.

Dolejska M, Villa L, Dobiasova H, Fortini D, Feudi C, Carattoli A. Plasmid content of a clinically relevant *Klebsiella pneumoniae* clone from the Czech Republic producing CTX-M-15 and QnrB1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Feb;57(2):1073-6.

Drago L, De Vecchi E, Mombelli B, Nicola L, Valli M, Gismondo MR. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2001 Jul;48(1):37-45.

Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(2):385-92.

Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X. Quinolones: action and resistance updated. *Curr Top Med Chem.* 2009;9(11):981-98.

Dropa M. Caracterização genotípica de cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2006.

Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Murakami T, Cassettari VC, Franco F, Guida SM, Balabakis AJ, Passadore LF, Santos SR, Matté GR, Matté MH. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009;51(4):203-9.

Dropa M. Disseminação da resistência a antimicrobianos em cepas clínicas e ambientais de *Enterobacteriaceae*: identificação e mapeamento do ambiente genético de genes codificadores de ESBL. [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2013.

Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51 Suppl 1:13-20.

Étienne P, Roger PM, Brofferio P, Labate C, Blanc V, Tiger F, Négrin N, Léotard S. Antimicrobial stewardship program and quality of antibiotic prescriptions. *Médecine et maladies infectieuses.* 2011; 41: 608–12.

Falcão JM, Pisco AM, Simões JA, Falcão IM, Pimenta ZP, Nunes B. Prescrição de antibacterianos em clínica geral: um estudo na rede médicos-sentinela. *Rev Port Clin Geral.* 2003; 19:315-29.

Falconer SB, Czarny TL, Brown ED. Antibiotics as probes of biological complexity. *Nat Chem Biol.* 2011;7(7):415-23.

Ferrari R, Galiana A, Cremades R, Rodriguez JC, Magnani M, Tognim MC, Oliveira TC, Royo G. Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* strains isolated in Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 2011;5(6):496-8.

Figueira V, Vaz-Moreira I, Silva M, Manaia CM. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water Res.* 2011;45(17):5599-611.

Filippa N, Carricajo A, Grattard F, Fascia P, El Sayed F, Defilippis JP, Berthelot P, Aubert G. Outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *qnrB1* and blaCTX-M15 in a French intensive care unit. *Ann Intensive Care*. 2013 Jul 1;3(1):18.

Forcella C, Pellegrini C, Celenza G, Segatore B, Calabrese R, Tavio MM, Amicosante G, Perilli M. QnrB9 in association with TEM-116 extended-spectrum beta-lactamase in *Citrobacter freundii* isolated from sewage effluent: first report from Italy. *J Chemother*. 2010 Aug;22(4):243-5.

Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park CH, Jacoby G, Barrett TJ, Medalla F, Chiller TM, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin Infect Dis*. 2006 Aug 1;43(3):297-304.

Goñi-Urriza M, Arpin C, Capdepuy M, Dubois V, Caumette P, Quentin C. Type II topoisomerase quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, and *A. sobria* complexes and mutations associated with quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Feb;46(2):350-9.

Golet EM, Xifra I, Siegrist H, Alder AC, Giger W. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environ Sci Technol*. 2003 Aug 1;37(15):3243-9.

Gonzales E, Mello HHC, Café MB. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. *Revista UFMG*. 2012 Dez 13: 48-53.

González F, Araque M. Association of Transferable Quinolone Resistance Determinant qnrB19 with Extended-Spectrum β -Lactamases in *Salmonella* GIVE and *Salmonella* Heidelberg in Venezuela. *Int J Microbiol*. 2013;2013:628185.

Guan X, Xue X, Liu Y, Wang J, Wang Y, Wang J, Wang K, Jiang H, Zhang L, Yang B, Wang N, Pan L. Plasmid-mediated quinolone resistance--current knowledge and future perspectives. *J Int Med Res*. 2013 Feb;41(1):20-30.

Guillard T, Cambau E, Neuwirth C, Nenninger T, Mbadi A, Brasme L, Vernet-Garnier V, Bajolet O, de Champs C. Description of a 2,683-base-pair plasmid containing *qnrD* in two *Providencia rettgeri* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jan;56(1):565-8.

Han JE, Kim JH, Cheresca CH Jr, Shin SP, Jun JW, Chai JY, Han SY, Park SC. First description of the *qnrS-like* (*qnrS5*) gene and analysis of quinolone resistance-determining regions in motile *Aeromonas* spp. from diseased fish and water. *Res Microbiol*. 2012a;163(1):73-9.

Han JE, Kim JH, Choresca CH Jr, Shin SP, Jun JW, Chai JY, Park SC. A small IncQ-type plasmid carrying the quinolone resistance (*qnrS2*) gene from *Aeromonas hydrophila*. *Lett Appl Microbiol*. 2012b Apr;54(4):374-6.

- Han JE, Kim JH, Choresca CH Jr, Shin SP, Jun JW, Chai JY, Park SC. First description of ColE-type plasmid in *Aeromonas* spp. carrying quinolone resistance (*qnrS2*) gene. Lett Appl Microbiol. 2012c Oct;55(4):290-4.
- Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, Sørensen SJ. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(9):3332-7.
- Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, Sørensen SJ. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. J Antimicrob Chemother. 2007 Jul;60(1):145-7.
- Hansen LH, Sørensen SJ, Jørgensen HS, Jensen LB. The prevalence of the OqxAB multidrug efflux pump amongst olaquinox-resistant *Escherichia coli* in pigs. Microb Drug Resist. 2005 Winter;11(4):378-82.
- Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Ibe S, Sakae K. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(2):801-3.
- Hawkey PM. Mechanisms of quinolone action and microbial response. J Antimicrob Chemother. 2003;51 Suppl 1:29-35.
- Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. J Antimicrob Chemother. 2009;64 Suppl 1:i3-10.
- Hernández A, Sánchez MB, Martínez JL. Quinolone resistance: much more than predicted. Frontiers in Microbiology. 2011; 2: 1-6.
- Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. Clinical Infectious Diseases. 2009; 49:1248–53.
- Hu YY, Cai JC, Zhang R, Zhou HW, Sun Q, Chen GX. Emergence of *Proteus mirabilis* harboring *blaKPC-2* and *qnrD* in a Chinese Hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2012 May;56(5):2278-82.
- Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. CID. 2005; 41:S120-S126.
- Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(4):1178-82.
- 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(27): 2297–99.

Jacoby GA, Gacharna N, Black TA, Miller GH, Hooper DC. Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(4):1665-6.

Jacoby GA, Griffin CM, Hooper DC. *Citrobacter* spp. as a source of *qnrB* Alleles. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Nov;55(11):4979-84.

Jakobsen L, Cattoir V, Jensen KS, Hammerum AM, Nordmann P, Frimodt-Møller N. Impact of low-level fluoroquinolone resistance genes *qnrA1*, *qnrB19* and *qnrS1* on ciprofloxacin treatment of isogenic *Escherichia coli* strains in a murine urinary tract infection model. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Oct;67(10):2438-44.

Jiang HX, Tang D, Liu YH, Zhang XH, Zeng ZL, Xu L, Hawkey PM. Prevalence and characteristics of β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(10):2350-3.

Kelly BG, Vespermann A, Bolton DJ. The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(5):951-68.

Kim ES, Jeong J-Y, Choi S-H, Lee S-O, Kim S-H, Kim M-N, Woo JH, Kim YS. Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene, *qepA*, in *Escherichia coli* clinical isolates in Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2009; 65:335–38.

Kim HB, Wang M, Park CH, Kim E-C, Jacoby GA, Hooper DC. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(8):3582–84.

Kmet V, Piatnicová E. Antibiotic resistance in commensal intestinal microflora. *Folia Microbiol (Praha).* 2010;55(4):332-5.

Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(6):423-35.

Lee MK, Kanatani MS. Quinolones: which generation for which microbe? *West J Med.* 1999;170(6):359-61.

Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(1):185-91.

Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.* 2004;10(12 Suppl):S122-9.

Li X-Z, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*. 2009; 69(12): 1555–1623.

Li J, Wang T, Shao B, Shen J, Wang S, Wu Y. Plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic residues in wastewater and soil adjacent to Swine feedlots: potential transfer to agricultural lands. *Environ Health Perspect*. 2012;120(8):1144-9.

Literak I, Dolejska M, Janoszowska D, Hrusakova J, Meissner W, Rzyska H, Bzoma S, Cizek A. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(24):8126-34.

Liu BT, Yang QE, Li L, Sun J, Liao XP, Fang LX, Yang SS, Deng H, Liu YH. Dissemination and Characterization of Plasmids Carrying *oqxAB-bla* CTX-M Genes in *Escherichia coli* Isolates from Food-Producing Animals. *PLoS One*. 2013 Sep 9;8(9):e73947.

Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med*. 2012 Jun;27(2):128-42.

Longhi C, Conte MP, Marazzato M, Iebba V, Totino V, Santangelo F, Gallinelli C, Pallecchi L, Riccobono E, Schippa S, Comanducci A. Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in *Escherichia coli* from community uncomplicated urinary tract infection in an area of high prevalence of quinolone resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(8):1917-21.

Lupo A, Coyne S, Berendonk TU. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Front Microbiol*. 2012;3:18.

MacPherson DW, Gushulak BD, Baine WB, Bala S, Gubbins PO, Holtom P, Segarra-Newnham M. Population mobility, globalization, and antimicrobial drug resistance. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(11):1727-32.

Majumdar T, Das B, Bhadra RK, Dam B, Mazumder S. Complete nucleotide sequence of a quinolone resistance gene (*qnrS2*) carrying plasmid of *Aeromonas hydrophila* isolated from fish. *Plasmid*. 2011 Jul;66(2):79-84.

Marques MV. *Biologia molecular e genética bacteriana*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética; 2012.

Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(4):718-33.

Marti E, Balcázar JL. Multidrug resistance-encoding plasmid from *Aeromonas* sp. strain P2G1. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Sep;18(9):E366-8.

Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. 1998;351(9105):797-9.

Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(8):608-20.

Mazzariol A, Kocsis B, Koncan R, Kocsis E, Lanzafame P, Cornaglia G. Description and plasmid characterization of *qnrD* determinants in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii*. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar;18(3):E46-8.

McGowan JE Jr. Economic impact of antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(2):286-92.

Millanao B A, Barrientos H M, Gómez C C, Tomova A, Buschmann A, Dölz H, Cabello FC. [Injudicious and excessive use of antibiotics: public health and salmon aquaculture in Chile]. *Rev Med Chil*. 2011;139(1):107-18.

Minarini LA, Poirel L, Cattoir V, Darini AL, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(3):474-8.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova o regulamento técnico para fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Instrução Normativa n.º 26, de 9 de julho de 2009. Diário Oficial da União. 10 jul 2009; Seção 1.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o uso da substância química denominada Olaquinox, como aditivo promotor de crescimento em animais produtores de alimentos. Instrução Normativa n.º 11, de 24 de novembro de 2004. Diário Oficial da União. 10 jul 2009; Seção 1:5.

Mokracka J, Gruszczyńska B, Kaznowski A. Integrons, β -lactamase and *qnr* genes in multidrug resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *P. vulgaris*. *APMIS*. 2012 Dec;120(12):950-8.

Moura EMM. Análise do perfil de resistência a antibióticos e detecção dos genes de virulência e resistência em *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2010.

Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*. 1980 Oct 10;8(19):4321-5.

Norman A, Hansen LH, She Q, Sørensen SJ. Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid*. 2008 Jul;60(1):59-74.

Ogbolu DO, Daini OA, Ogunledun A, Alli AO, Webber MA. High levels of multidrug resistance in clinical isolates of Gram-negative pathogens from Nigeria. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Jan;37(1):62-6.

Oliveira DE. Isolamento, identificação, quantificação de *Aeromonas hydrophila* provenientes de esgoto e lodo tratados e pesquisa de genes de virulência e β -lactamases. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2011.

Pagès J-M, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1794:826–33.

Pagès JM, Amaral L, Fanning S. An original deal for new molecule: reversal of efflux pump activity, a rational strategy to combat gram-negative resistant bacteria. *Curr Med Chem*. 2011;18(19):2969-80.

Paiva MC, Nascimento AM, Camargo IL, Lima-Bittencourt CI, Nardi RM. The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6')-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(5):687-9.

Pallecchi L, Riccobono E, Mantella A, Bartalesi F, Sennati S, Gamboa H, Gotuzzo E, Bartoloni A, Rossolini GM. High prevalence of *qnr* genes in commensal enterobacteria from healthy children in Peru and Bolivia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jun;53(6):2632-5.

Pallo-Zimmerman L, Byron J, Graves T. Fluoroquinolones: then and now. *Compend Contin Educ Vet*. 2010;32(7):E1-9.

Palumbo M, Gatto B, Zagotto G, Palù G. On the mechanism of action of quinolone drugs. *Trends Microbiol*. 1993;1(6):232-5.

Pan A, Buttazzi R, Marchi M, Gagliotti C, Resi D, Moro ML. Secular trends in antibiotic consumption in the adult population in Emilia-Romagna, Italy, 2003–2009. *CID*. 2011; 17(11):1698-703.

PARANÁ – Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem animal, no Estado do Paraná (PAMvet-PR). Levantamento do Uso e Comercialização de Medicamentos Veterinários em Frango de Corte. 2005.

Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence of *aac(6')Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme in the United States. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2006; 50(11): 3953–55.

Park KS, Kim MH, Park TS, Nam YS, Lee HJ, Suh JT. Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance genes, *aac(6')*-Ib-cr, *qepA*, and *oqxAB* in clinical isolates of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Ann Clin Lab Sci*. 2012;42(2):191-7.

Pazhani GP, Chakraborty S, Fujihara K, Yamasaki S, Ghosh A, Nair GB, Ramamurthy T. QRDR mutations, efflux system & antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from an outbreak of diarrhoea in Ahmedabad, India. *Indian J Med Res*. 2011 Aug;134:214-23.

Peirano G, Asensi MD, Pitondo-Silva A, Pitout JD. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(7):1039-43.

Pereira AS, Andrade SS, Monteiro J, Sader HS, Pignatari AC, Gales AC. Evaluation of the susceptibility profiles, genetic similarity and presence of *qnr* gene in *Escherichia coli* resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals. *Braz J Infect Dis*. 2007;11(1):40-3.

Perez F, Rudin SD, Marshall SH, Coakley P, Chen L, Kreiswirth BN, Rather PN, Hujer AM, Toltzis P, van Duin D, Paterson DL, Bonomo RA. *OqxAB*, a Quinolone and Olaquinox Efflux Pump, Is Widely Distributed among Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Human Origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Sep;57(9):4602-3.

Périchon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by *QepA*-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(7):2464-9.

Perry JA, Wright GD. The antibiotic resistance "mobilome": searching for the link between environment and clinic. *Front Microbiol*. 2013;4:138.

Picão RC, Poirel L, Demarta A, Silva CS, Corvaglia AR, Petrini O, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Nov;62(5):948-50.

Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Oct;44(10):2684-8.

Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QnrA*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(8):3523-5.

Poirel L, Villa L, Bertini A, Pitout JD, Nordmann P, Carattoli A. Expanded-spectrum- β -Lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases*. 2007; 13(5):803-05.

Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. *Front Microbiol*. 2012;3:24.

Ramirez MS, Nikolaidis N, Tolmasky ME. Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the *aac(6')-Ib* paradigm. *Front Microbiol*. 2013 May 17;4:121.

Rice LB. The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr Opin Microbiol*. 2009 Oct;12(5):476-81.

Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*. 2006a;12(1):83-8.

Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis*. 2006b;6(10):629-40.

Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother*. 2011;17(2):149-82.

Rodríguez-Martínez JM, Díaz de Alba P, Briales A, Machuca J, Lossa M, Fernández-Cuenca F, Rodríguez Baño J, Martínez-Martínez L, Pascual Á. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Jan;68(1):68-73.

Rotschafer JC, Ullman MA, Sullivan CJ. Optimal use of fluoroquinolones in the intensive care unit setting. *Crit Care Clin*. 2011; 27:95–106.

Ruiz J, Pons MJ, Gomes C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(3):196-203.

Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martínez-Martínez L, Arlet G, Torres C. *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Apr;67(4):886-97.

Saiful Anuar AS, Mohd Yusof MY, Tay ST. Prevalence of plasmid-mediated *qnr* determinants and gyrase alteration in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university teaching hospital in Malaysia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013 Jul;17(13):1744-7.

Salles MJ, Zurita J, Mejía C, Villegas MV. Resistant Gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. *Epidemiol Infect.* 2013 Aug 7:1-14.

Sánchez-Céspedes J, Blasco MD, Marti S, Alba V, Alcalde E, Esteve C, Vila J. Plasmid-mediated QnrS2 determinant from a clinical *Aeromonas veronii* isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Aug;52(8):2990-1.

Schito GC. Is antimicrobial resistance also subject to globalization? *Clin Microbiol Infect.* 2002;8 Suppl 3:1-8.

Silley P, Simjee S, Schwarz S. Surveillance and monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic consumption in humans and animals. *Rev Sci Tech.* 2012;31(1):105-20.

Silva-Sanchez J, Barrios H, Reyna-Flores F, Bello-Diaz M, Sanchez-Perez A, Rojas T; Bacterial Resistance Consortium, Garza-Ramos U. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in Mexico. *Microb Drug Resist.* 2011;17(4):497-505.

Soler L, Yáñez MA, Chacon MR, Aguilera-Arreola MG, Catalán V, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004 Sep;54(Pt 5):1511-9.

Souza MVN, Vasconcelos TRA. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. *Quím. Nova.* 2005; 28(4):678-682.

Schultsz C, Geerlings S. Plasmid-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*: changing landscape and implications for therapy. *Drugs.* 2012;72(1):1-16.

Shibl AM, Al-Agamy MH, Khubnani H, Senok AC, Tawfik AF, Livermore DM. High prevalence of acquired quinolone-resistance genes among *Enterobacteriaceae* from Saudi Arabia with CTX-M-15 β -lactamase. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(4):350-3.

Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):664-89.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007 Aug;24(8):1596-9.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011 Oct;28(10):2731-9.

Tausova D, Dolejska M, Cizek A, Hanusova L, Hrusakova J, Svoboda O, Camlik G, Literak I. *Escherichia coli* with extended-spectrum β -lactamase and plasmid-

mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(5):1103-7.

Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Swings J. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Syst Appl Microbiol.* 2001 Dec;24(4):520-38.

Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 8^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

Vaarten J. Clinical impact of antimicrobial resistance in animals. *Rev Sci Tech.* 2012;31(1):221-9.

Van Bambeke F, Michot JM, Van Eldere J, Tulkens PM. Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(4):256-80. Review. Erratum in: *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(6):513.

Van der Bij AK, Pitout JD. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(9):2090-100.

Veldman K, Cavaco LM, Mevius D, Battisti A, Franco A, Botteldoorn N, Bruneau M, Perrin-Guyomard A, Cerny T, De Frutos Escobar C, Guerra B, Schroeter A, Gutierrez M, Hopkins K, Myllyniemi AL, Sunde M, Wasyl D, Aarestrup FM. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Jun;66(6):1278-86.

Viana AL, Cayô R, Avelino CC, Gales AC, Franco MC, Minarini LA. Extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil carry distinct types of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *J Med Microbiol.* 2013 Sep;62(Pt 9):1326-31.

Villa L, Poirel L, Nordmann P, Carta C, Carattoli A. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the *bla*NDM-1, *bla*CTX-M-15 and *qnrB1* genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Jul;67(7):1645-50.

Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(7):2242-8.

Wang M, Jacoby GA, Mills DM, Hooper DC. SOS regulation of *qnrB* expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009a;53(2):821-3.

Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, Hooper DC, Wang M. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009b;53(5):1892-7.

Weigel LM, Steward CD, Tenover FC. *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Oct;42(10):2661-7.

Wellington EM, Boxall AB, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM, Johnson-Rollings AS, Jones DL, Lee NM, Otten W, Thomas CM, Williams AP. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2013 Feb;13(2):155-65.

Wooldridge M. Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals. *Rev Sci Tech*. 2012;31(1):231-47.

Xia LN, Tao XQ, Shen JZ, Dai L, Wang Y, Chen X, Wu CM. A survey of β -lactamase and 16S rRNA methylase genes among fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates and their horizontal transmission in Shandong, China. *Foodborne Pathog Dis*. 2011 Dec;8(12):1241-8.

Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(9):3354-60.

Yim G, Kwong W, Davies J, Miao V. Complex integrons containing *qnrB4-ampC* (*bla*(DHA-1)) in plasmids of multidrug-resistant *Citrobacter freundii* from wastewater. *Can J Microbiol*. 2013 Feb;59(2):110-6.

Zaidi MB, Estrada-García T, Campos FD, Chim R, Arjona F, Leon M, Michell A, Chaussabel D. Incidence, clinical presentation, and antimicrobial resistance trends in *Salmonella* and *Shigella* infections from children in Yucatan, Mexico. *Front Microbiol*. 2013 Oct 1;4:288.

Zhang S, Sun J, Liao XP, Hu QJ, Liu BT, Fang LX, Deng H, Ma J, Xiao X, Zhu HQ, Liu YH. Prevalence and plasmid characterization of the *qnrD* determinant in *Enterobacteriaceae* isolated from animals, retail meat products, and humans. *Microb Drug Resist*. 2013 Aug;19(4):331-5.

Zhao J, Chen Z, Chen S, Deng Y, Liu Y, Tian W, Huang X, Wu C, Sun Y, Sun Y, Zeng Z, Liu JH. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Oct;54(10):4219-24.

Zhao JY, Dang H. Coastal seawater bacteria harbor a large reservoir of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Jiaozhou Bay, China. *Microb Ecol*. 2012 Jul;64(1):187-99.

ANEXOS

Anexo 1 – Comparação entre seqüências de associações dos genes *intl1* e *aac(6')-Ib-cr*.

Comparação entre sequências de associações dos genes *intl1* e *aac(6')-Ib-cr*, sendo as sequências *C. freundii* JQ356870.1 e *aac(6')-Ib-cr* (215528069) extraídas do banco de dados *Genbank*; e FSP 888/11, FSP 836/11; FSP 1263/09; FSP 760/11 pertencentes a este estudo.

Anexo 2 – Sequência completa do plasmídeo carreador do gene *qnrD1*.

A	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																	
FSP 309/05	ATGGA	AAAGC	ACCTT	ATCA	ATGAA	AGTTT	TTCAC	GAGAT	CAATT	TACGG	GAATAG	AGTTA	AAATAT	TGCTT	TTTCA	ATTGT	GATTT	TTTCAG	GGGTT	G							
FSP 309/05	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																	
FSP 309/05	ATTTA	ACTGA	TACTG	AATTT	GTTG	ATTG	TAGT	TTTTA	CGAC	AGGA	ATAG	CTTG	GAAG	GGTGT	GATTT	TAA	TAGAG	CCAA	CTAAAA	ACGCTAG	CTTTAA						
FSP 309/05	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300																	
FSP 309/05	AAGCT	GCGAT	TTTAT	CAATG	AGTA	ATTTT	AAAA	CATT	TAGC	GCCT	TAGG	TCTTG	AAAT	TAGT	GAGTG	TTT	AGCTC	AAGG	AGCTG	ATTTT	CGAGGG	CTAA	T				
FSP 309/05	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400																	
FSP 309/05	TTTAT	GAA	TATG	ATA	CTAC	AAGG	TCAT	GTTT	TGTAG	TGCT	TATAT	AACC	AAG	CAAA	TCTT	AGTT	ACGTA	ATTTT	TCTAG	AGTCA	TATTAG	AAAA	AGT				
FSP 309/05	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500																	
FSP 309/05	GCGA	ACTGT	GGA	AAAT	CGCT	GGA	ATGG	CAC	TGTGA	TAACT	GGCG	CCGT	GTTT	CGTGG	CTCC	GATC	TTTCT	TGTGG	GAGT	TTT	CATC	GTTT	GATT	GGT	C		
FSP 309/05	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600																	
FSP 309/05	TTTGG	CTGAT	TTTTA	CTGG	TGTG	ATTTA	ACGGG	TGGGG	CGCTT	GGCG	AGCTT	GATG	CAAG	GC	GAAT	TAA	TTTAG	ATGG	AGTGA	AGTT	GGAT	GGAG	AGCag				
FSP 309/05	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700																	
FSP 309/05	GCGT	TCAG	CTTGT	TGAG	AGTT	TAGG	TGTT	ATTG	tTC	ACC	GATAAA	CTag	GTA	AAAA	ACGC	CTAAT	GCCCC	AATGT	GGTAC	TAA	TCA	AAAC	GGAG	CGA			
FSP 309/05	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800																	
FSP 309/05	AGCG	ACAT	CTTC	ATCT	TGTCT	TTT	GCTTTT	CTCC	ATGAT	CAGT	TATT	TGGG	TCAT	GGT	CTC	TTAG	CTCG	TTAAT	CTGG	CTAAG	TTT	GGT	TAGG	TTGGG	CTC		
FSP 309/05	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900																	
FSP 309/05	TTTC	GACA	CTTC	GCAAT	CCA	AGAA	TCC	CTAG	TCCG	TTGAT	TGGT	GCCT	TTAT	CAGG	TACG	CAC	TGTA	AATCT	TTT	CGAT	ACCG	CAGC	TGAT	TCG	GAG	GCA	
FSP 309/05	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000																	
FSP 309/05	GAGCC	GAA	ATTT	CGTTT	TCCGG	TACG	TTTT	ACT	TACC	ACA	ATTT	GCCT	GTTT	ATCCT	TTTCG	GAG	ACCG	GGCTA	AGTCC	GAGT	CAAT	CAAG	TGGT	GCATT	TG		
FSP 309/05	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100																	
FSP 309/05	AGTTA	ATGT	CGTT	GAA	TGGT	TTTA	AGGA	AGTAG	TGAC	AACT	AGCT	AGCTT	CCCG	TTCG	TAA	GATT	GGA	TTGCT	GAGG	TCTA	ATCG	AAGC	AACGA	ATGC	ACGCG		
FSP 309/05	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200																	
FSP 309/05	AATT	AGATT	AGC	AGAG	CCGA	AGT	GATG	TCACA	ATCAT	TTT	CGCT	CTGT	GCCT	TCTG	GAGT	ATCA	CAAAAA	ATTT	CCCT	CATG	TTTT	CAAC	TCG	CAAC	GCT		
FSP 309/05	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300																	
FSP 309/05	CGCC	GCAAG	GGCT	GAACT	TGTTT	CACG	TCG	AGGA	AGCG	GAA	TTTCCC	GAAAG	CCTTA	TAA	TATCT	CCGTT	CAC	ACAT	CATC	CGA	GGGG	ATCAC	ATG	CTC			
FSP 309/05	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400																	
FSP 309/05	AATT	ATTT	CGTTT	GGCAT	CGCC	AGC	AGATT	ACGA	ATAC	ATCG	AAGA	ATTAA	ATTTA	TGG	GAATT	GTCAT	TTT	GAT	AAG	C	GACCG	GGTT	CAAG	GGG	TT	CGTTG	
FSP 309/05	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500																	
FSP 309/05	TGA	AGAT	CCGG	TGAT	CGGG	GCA	AAAA	TACA	ATCG	AGG	CGGT	GAAAA	TTTAA	AGCG	TTAG	CGTC	ACGG	CAT	AAAA	ACGCT	GGA	ACC	GAAC	GGATT	G		
FSP 309/05	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600																	
FSP 309/05	ACCT	TTT	CCG	GAGT	TGAT	CCG	CTGG	GCA	TAG	AGTGT	GGA	ACCC	CGA	ACA	ATGTC	AGCTT	GTTT	TAG	CGTTA	TATC	ATTG	TACGA	ATGAT	GAAG	ATTATC		
FSP 309/05	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700																	
FSP 309/05	AGG	CGAT	GGA	ATT	CAGT	TAA	GTCA	AGTAT	CGA	ATAT	GCA	AAATG	TCAG	CCCG	GATCAT	CTTTT	TC	AGGT	AAAA	ATCA	ACG	GTAT	TAGG	TGAT	GTTTC		
FSP 309/05	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800																	
FSP 309/05	GAT	GC	TAA	AC	CAGCT	AGAG	GAAG	GGCT	AAAT	AACG	TTAGG	TTT	ACCT	ATTT	ATTT	CAC	CTAT	TTT	ACCT	ATTT	ATTT	TAC	CTAT	TTT	ACCT	ATTTA	
FSP 309/05	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900																	
FSP 309/05	TTT	CAC	TATT	ATTTT	ACCT	ATTT	ATTTT	ACCT	ATTT	ATTTT	ACCT	ATTT	ATTTT	ACCT	ATTT	ATTTT	ACCT	ATTT	ATTTT	ACCT	ATTT	ATTTT	ACCT	ATTT	ATTTT	ACCT	ATTTA
FSP 309/05	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000																	
FSP 309/05	AATA	TAGG	TAGT	TGAAAA	CAAA	TcGT	GAT	ACTTT	CAGT	ATCA	ATGCC	ACTCA	TTT	CTGG	ACG	AAAA	TGAAT	GAC	ATA	AGG	CTCC	GCCCT	CTGG	CTA

A – Sequência completa do plasmídeo carreador do gene *qnrD1* obtida neste estudo, referente a cepa FSP 309/05. B – Representação linear da sequência descrita em A.