UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo dos mecanismos de resistência às quinolonas em
enterobactérias isoladas de alguns estados brasileiros**

Luciene Andrade da Rocha Minarini

Ribeirão Preto
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo dos mecanismos de resistência às quinolonas em
enterobactérias isoladas de alguns estados brasileiros**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à
Farmácia para obtenção do Título de Doutor em
Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientada: **Luciene Andrade da Rocha Minarini**

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Ana Lucia da Costa Darini**

Ribeirão Preto
2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciene Andrade da Rocha Minarini

Estudo dos mecanismos de resistência às quinolonas em enterobactérias isoladas de alguns estados brasileiros

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lucia da Costa Darini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho de pesquisa foi realizado nos seguintes centros de pesquisa:

Como laboratório principal, Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM) do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, sob orientação da *Prof.^a. Dr.^a. Ana Lucia da Costa Darini*.

Durante o estágio de doutorado no exterior, Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Faculté de Medicine de l'Université Paris XI, Paris, França, sob supervisão do *Prof. Dr. Patrice Nordmann*.

Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, nas dependências da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, onde foi realizada parte dos experimentos de seqüenciamento, sob coordenação do *Prof. Dr. Wilson de Araújo da Silva Júnior*.

Os meus mais sinceros agradecimentos:

A minha orientadora, . . Ana Lucia da Costa Darini, por ter me acolhido em sua equipe de pesquisa, por sua disponibilidade e por seus valiosos ensinamentos durante a pós-graduação. Agradeço ainda por todo seu apoio e empenho no desenvolvimento deste estudo.

À Izabel Cristina V. Palazzo, pelo apoio durante a técnica de determinação da concentração inibitória mínima para os antibióticos testados frente às bactérias estudadas e ajuda nos experimentos de hibridação. Agradeço, particularmente, seus constantes e valiosos conselhos científicos.

À Joseane C. Ferreira, agradeço pela importante contribuição na padronização da técnica de extração de proteínas de membrana externa e pelo apoio na realização do experimento de eletroforese de campo pulsado.

Aos docentes do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Física e Química, por disponibilizarem a ultracentrífuga durante a técnica de extração de proteínas de membrana externa.

À Nathalia A. C. Trevisani, aluna de iniciação científica, por sua importante contribuição na detecção de mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos e nos experimentos de extração de porinas.

Ao doutorando Eduardo C. Clímaco, por sua contribuição nas técnicas de PCR e seqüenciamento utilizadas na determinação do contexto genético da resistência aos antibióticos β -lactâmicos.

Aos integrantes do LEBEM, André Pitondo Silva e Leonardo Andrade, pelas constantes discussões científicas.

À Adriana Aparecida Márquez, pela colaboração na técnica de seqüenciamento realizada do Hemocentro.

Ao Professor Patrice Nordmann, meu supervisor de estágio no exterior, por ter me dado a honra de integrar à sua renomada equipe de pesquisa e pela grande oportunidade de aprendizado.

Ao Dr. Laurent Poirel, meu co-supervisor de estágio de doutorado no exterior, pelo espírito de pesquisa que me foi transmitido e pelos seus importantes conselhos científicos.

Ao Dr. Vincent Cattoir, por todos os conselhos ao curso dos experimentos de clonagem e análise do contexto de determinantes gênicos avaliados neste trabalho.

Aos membros do laboratório de pesquisa na França, em especial, Pauline Mugnier, Samy Figueiredo, Sandrine Bernabeu, Carla Sofia Silva, Luisa Meira, Hedi Mammeri, Amelie Carrër, Delphine Girlich, Gaëlle Cuzon e Fateméh Nandari, por toda ajuda e colaboração que me foi dada ao longo do meu estágio na França. Agradeço a disponibilidade e os ensinamentos de todos.

Ao Dr. George A. Jacoby (EUA), Dr. David Livermore (Inglaterra), Dr. Patrice Nordmann (França) e Dr. Jorge Sampaio (Instituto Fleury, SP, Brasil) por terem gentilmente cedido linhagens-controle imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos diretores clínicos do Lemos Laboratórios de Análises Clínicas de Juiz de Fora e Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, os quais cederam amostras bacterianas avaliadas neste estudo. Em especial, agradeço Juarez Rocha pela manutenção e identificação desta coleção bacteriana.

À CAPES, pela bolsa de doutorado que me foi concedida no Brasil e no exterior.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido a este trabalho.

A minha mais profunda gratidão

Ao meu marido, Paulo, com quem compartilhei momentos de felicidade, de grandes aprendizados e de incertezas neste início de vida acadêmica. Agradeço sempre seu companheirismo, seu amor, e sua intensa amizade.

Aos meus queridos pais, Marlene e Nelson, e minha irmã Lillian, pelo importante apoio e incentivo durante estes anos e, principalmente, durante minha estadia no exterior.

Aos meus sogros, Dorvalina e Adilson, e minha cunhada Idelzina, pelos constantes incentivos. Agradeço a sincera amizade e o grande apoio durante estes anos.

Aos queridos amigos do LEBEM, Cristina, Joseane, Eduardo, André, Leonardo, Nathalia, Amanda, Priscila, Rubens e Ilana pelo apoio, pela amizade, convivência e simpatia de todos.

Aos meus amigos do laboratório em Paris, Pauline, Samy, Sofia, Luisa, Vincent e Fateméh que me acolheram, agradeço pela receptividade, apoio e amizade de todos.

Aos meus queridos amigos e companheiros da “rotina parisiense”, Susi, Rodrigo, Marcelo, Helder, Mari, Fran, Carol, Ricardo, Sofia, Renata, e todos aqueles com quem compartilhei momentos de alegria e descontração, agradeço a amizade e as experiências trocadas.

« Savoir s'étonner à propos est le premier
pas fait sur la route de la découverte »

Louis Pasteur

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A classe das quinolonas	2
1.1.1. Classificação e relação estrutura-atividade	2
1.1.2. Mecanismo de ação das quinolonas	4
1.2. Epidemiologia da resistência às quinolonas em enterobactérias	5
1.3. Mecanismos de resistência às quinolonas de origem cromossômica	7
1.3.1. Alterações na DNA girase	8
1.3.2. Alterações na topoisomerase IV	9
1.4. Mecanismos plasmídeos de resistência às quinolonas	10
1.4.1. Determinantes Qnr	10
1.4.2. Determinantes AAC(6')-Ib-cr	16
1.4.3. Determinantes QepA	18
1.5. Diminuição do acúmulo de antibiótico no interior da célula bacteriana	19
1.6. Associação de mecanismos de resistência às quinolonas e antibióticos β -lactâmicos em enterobactérias	19
1.6.1. Genes β -M e sua associação com estruturas gênicas	22
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Amostras bacterianas	28
3.2. Armazenamento das amostras	29
3.3. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	30
3.4. Determinação das seqüências genéticas	32
3.4.1. Extração do DNA cromossômico	32
3.4.2. Extração de DNA pelo método de fervura	33
3.4.3. Condições da PCR	33
3.4.4. Seqüenciamento	34
3.5. Caracterização dos mecanismos de resistência às quinolonas	34
3.5.1. Detecção de genes plasmídeos por hibridação de colônia	34
3.5.2. Detecção de genes plasmídeos por multiplex PCR	35
3.5.3. Caracterização da localização genética do determinante <i>qnr</i>	36
3.5.4. Clonagem	38
3.5.5. Amplificação da região QRDR dos genes cromossômicos <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	38

3.6. Caracterização dos mecanismos de resistência aos β -lactâmicos.....	39
3.6.1. Detecção da produção de ESBL.....	39
3.6.2. Determinação do ponto isoelétrico das β -lactamases.....	40
3.6.3. Detecção de genes de β -lactamase.....	41
3.6.4. Caracterização da localização genética do determinante β -M.....	42
3.7. Transferência de genes plasmídeos de resistência.....	43
3.8. Extração de plasmídeos e hibridação.....	44
3.9. Eletroforese de campo pulsado.....	45
3.10. Análise da impermeabilidade da membrana celular bacteriana	47
3.10.1. Análise das proteínas de membrana externa.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1. Características fenotípicas das enterobactérias.....	50
4.1.1. Frequência das espécies bacterianas.....	50
4.1.2. Avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos	51
4.2. Caracterização dos mecanismos de resistência às quinolonas	54
4.2.1. Detecção do determinante QnrA.....	54
4.2.2. Detecção dos determinantes QnrB e QnrS.....	60
4.2.3. Mutações nos genes cromossômicos <i>gyA</i> e <i>parC</i>	65
4.2.4. Análise das proteínas de membrana externa.....	73
4.3. Caracterização dos determinantes plasmídeos de resistência aos β -lactâmicos.....	75
5. CONCLUSÕES	83
6. REFERÊNCIAS.....	86
APÊNDICES	104
Apêndice 1 - Características das enterobactérias resistentes às quinolonas e classificação em grupos fenotipicamente diferentes.....	105
Apêndice 2 - Sensibilidade às fluoroquinolonas e as alterações em GyrA identificadas nas enterobactérias avaliadas	108
Apêndice 3 - Sensibilidade às fluoroquinolonas e as alterações em ParC identificadas nas enterobactérias avaliadas	110
ARTIGOS.....	112
Publicados.....	113
Aceitos para publicação.....	115
Em redação.....	115

RESUMO

Minarini, L. A. R. **Estudo dos mecanismos de resistência às quinolonas em enterobactérias isoladas de alguns estados brasileiros.** 2008. 115f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Este estudo foi elaborado com o objetivo de elucidar os mecanismos de resistência às quinolonas presentes em enterobactérias isoladas de pacientes de duas regiões metropolitanas brasileiras. Foram avaliadas possíveis alterações nas proteínas relacionadas com o sítio de ação das quinolonas, bem como a presença de plasmídeos e integrons que carregam determinantes gênicos que codificam resistência às quinolonas. A associação destes com mecanismos plasmideais de resistência aos antibióticos β -lactâmicos também foi analisada. Foram avaliadas 257 enterobactérias resistentes ao ácido nalidíxico isoladas de pacientes hospitalizados e da comunidade no período de 2000 a 2005. Por PCR e seqüenciamento, foram analisadas as mutações presentes nos genes cromossômicos *gyrA* e *parC* e as estruturas gênicas associadas com determinantes plasmideais de resistência às quinolonas, *Qnr*, e aos β -lactâmicos de amplo espectro. Foram determinados os perfis plasmideais e a transferabilidade dos plasmídeos que carregaram estes determinantes. A extração e a análise das proteínas de membrana externa foi realizada para avaliar uma possível perda ou diminuição da expressão de porinas, também relacionada com os mecanismos de resistência avaliados. Todas as amostras foram resistentes ao ácido nalidíxico, apresentando concentração inibitória mínima (CIM) superior a 16 $\mu\text{g/mL}$, e em média, 70% apresentaram diminuição de sensibilidade às fluoroquinolonas testadas. De 257 enterobactérias resistentes ao ácido nalidíxico, em seis enterobactérias (2,3%), incluindo 3 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae* e 1 *C. freundii* foi encontrado o gene *qnrB*. Cinco linhagens apresentaram suas seqüências idênticas ao gene *qnrB2*, e uma linhagem, *C. freundii* JF79, apresentou uma seqüência idêntica ao gene *qnrB8*. Em uma linhagem de *E. cloacae* foi detectado o gene *qnrA1* (0,37%). Os genes *qnrA* e *qnrB* apresentaram-se localizados em plasmídeos que apresentaram de 55 a 180 kilobases. A análise da estrutura gênica indicou que os genes *qnrA1* e *qnrB2* estavam associados com um integron classe 1 e localizados entre o elemento *ISCR1* e a segunda cópia do segmento conservado 3'. Na coleção bacteriana avaliada, as principais mutações observadas foram nos códons 83 e 87 em *gyrA*, e nos códons 80 e 84 em *parC*. Todas as enterobactérias que exibiram unicamente mutações no gene *gyrA* apresentaram CIM $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ para o ácido nalidíxico. A diferença encontrada nos valores da CIM de fluoroquinolonas em enterobactérias que apresentaram as mesmas substituições em GyrA e ParC foi explicada pela ausência ou diminuição da expressão de porinas. Em relação à produção de β -lactamase de espectro ampliado (ESBL), sua presença foi comprovada em 24 (9,3%) enterobactérias. O seqüenciamento de *ESBL* identificou 18 determinantes: CTX-M-2 (n=13), incluindo dois novos variantes, CTX-M-8 (n=2) e CTX-M-9 (n=3) mediados por plasmídeos de 48 a 180 kilobases, não conjugativos, em maioria. O gene *ESBL* foi detectado em seis enterobactérias. Todos os determinantes do grupo 2 apresentaram-se associados com um elemento *ISCR1*, enquanto que aqueles do grupo 9 estiveram relacionados com *ISEcp1*. Concluindo, o principal mecanismo de resistência às quinolonas detectado foi a presença de substituições em GyrA e ParC, apesar de outros mecanismos, como a diminuição da expressão de porinas estarem envolvidos nas enterobactérias avaliadas. A associação da produção de ESBL foi significativa devido ao encontro de uma grande diversidade de genótipos circulando na comunidade, com uma predominância de enterobactérias produtoras de CTX-M. Quanto aos determinantes *Qnr* descritos neste estudo, que notoriamente foram os primeiros relatos no Brasil, somente dois deles apresentaram-se relacionados com a produção de ESBL.

Palavras-chave: Determinantes *Qnr*, quinolonas, topoisomerasas, ESBL.

ABSTRACT

Minarini, L. A. R. **Characterization of the mechanisms of quinolone resistance among enterobacterial isolates from Brazil.** 2008. 115f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The aim of this study was to investigate the main mechanisms of quinolone resistance among enterobacterial isolates recovered from hospitalized patients and outpatients in Brazil. The modification of the quinolone targets with changes of DNA gyrase and of topoisomerase IV genes and the presence of determinants codifying plasmid-mediated quinolone and oxymino-cephalosporins resistance were investigated. Two hundred fifty seven non-duplicate nalidixic-acid resistant enterobacterial isolates recovered from January 2000 to May 2005 were analysed. Mutations in the topoisomerases *gyrA* and *parC* genes and the genetic structures surrounding Qnr and CTX-M determinants were recognized by PCR and sequencing. Conjugation experiments were performed to determine whether the *qnr*- and β -lactamase carrying plasmids were self transferable. Also, decrease in the level of porin expression related to quinolone resistance was assessed. All enterobacterial isolates were resistant to nalidixic-acid, showing minimal inhibitory concentrations (MIC) $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ and 70% of these isolates showed decreased susceptibility to fluoroquinolone. Six *qnrB*-positive (2.3%) out of 257 nalidixic-acid resistant enterobacterial isolates, were identified, including 3 *Escherichia coli*, 2 *Klebsiella pneumoniae* and 1 *Citrobacter freundii*. Five isolates had an identical *qnrB2* sequence and one isolate, *C. freundii* 79, possessed the *qnrB8*. A single *Enterobacter cloacae* carrying a plasmid encoding *qnrA* gene was identified (0.37%). All isolates were negative for the *qnrS* genes. Plasmid-mediated quinolone resistance ranged from 55- to 180-kb in size. Sequence analysis of the genetic structures surrounding of the *qnrA* and *qnrB* genes identified an *ISCR1* element at the left-hand boundary and a partial copy of the 3'-end segment of class 1 integrons. Concerning the changes of DNA gyrase and topoisomerase IV, the most common modification in the enterobacterial isolates analyzed were present at codons 83 and 87 in GyrA and in ParC at codons 80 and 84. All isolates that exhibited mutations in *gyrA* gene showed nalidixic-acid MIC $\geq 16 \mu\text{g/mL}$. The finding of different MIC values to fluoroquinolones in enterobacterial isolates with the same GyrA and ParC modification was explained by a decreasing in the level of porin expression. Regarding β -lactam resistance mechanisms, twenty four (9.3%) ESBL-producing enterobacterial isolates were detected. Sequencing of the CTX-M-encoding genes identified 18 determinants belonging to CTX-M-2 (n=13), CTX-M-8 (n=2) and CTX-M-9 (n=3) groups. CTX-M-2 group determinants included β -lactamase and the two novel variants. Plasmids harboring β -lactamase genes ranged from 48- to 180- kb in size and were not transferable, in their majority. β -lactamase genes were detected in all the 6 β -lactamase negative isolates. All alleles belonging to the group 2 were associated with *ISCR1* element, while all β -lactamase genes were related to *ISEcp1* element. In conclusion, alterations in the targets of quinolones, GyrA and ParC was the main mechanism of quinolone resistance identified in this study, although a decreasing of the porins expression had been identified among nalidixic-acid resistant enterobacterial isolates. In the surveyed area, the prevalence of ESBL producers was important (9.3%), provided that this finding was related to a large diversity of genotypes circulating in the community, mainly CTX-M-producing isolates. This study constituted the first epidemiological survey of QnrA and QnrB determinants among Brazilian isolates. Interestingly, the *qnrB2* gene was identified in non ESBL producers isolates and *qnrS* genes were not found.

Keywords: Qnr determinants, quinolone, topoisomerases genes, ESBL

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química das quinolonas	2
Figura 2.	Interrupção da atividade da topoisomerase por fluoroquinolonas.....	8
Figura 3.	Representação esquemática das principais estruturas associadas com os genes <i>qnr</i>	13
Figura 4.	Representação esquemática de diferentes elementos gênicos envolvidos no processo de mobilização de <i>-M</i>	24
Figura 5.	Estratégia para o mapeamento genético do integron classe 1 contendo os genes <i>qnrA</i> ou <i>qnrB</i>	37
Figura 6.	Porcentagem das principais espécies de enterobactérias isoladas no período do estudo.....	50
Figura 7.	Relação entre o número de enterobactérias e as concentrações inibitórias mínimas de cada quinolona testada.....	52
Figura 8.	Relação entre o número de enterobactérias e as concentrações inibitórias mínimas de cada cefalosporina testada.....	52
Figura 9.	Padrões de macrorestrição de crDNA obtidos por PFGE após digestão do DNA genômico das enterobactérias com enzima de restrição <i>XbaI</i>	56
Figura 10.	Representação esquemática do integron classe 1 que contém o gene <i>qnrA</i>	59
Figura 11.	Perfil plasmideal das linhagens <i>qnrB</i> após eletroforese em gel de agarose 0,7%....	62
Figura 12.	Organização das estruturas gênicas adjacentes ao gene <i>qnrB2</i>	65
Figura 13.	Número de enterobactérias, divididas por espécies, em relação à variação de sensibilidade à ciprofloxacina.....	66
Figura 14.	Esquematização das estruturas adjacentes aos genes <i>-M</i>	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados referentes às linhagens-controle utilizadas neste estudo.....	29
Tabela 2 -	Características de cada grupo estabelecido para a classificação das enterobactérias.....	31
Tabela 3 -	<i>Primers</i> utilizados no multiplex PCR <i>qnr</i>	36
Tabela 4 -	<i>Primers</i> utilizados na caracterização da localização do gene <i>qnr</i>	37
Tabela 5 -	<i>Primers</i> utilizados na detecção de genes ESBL	42
Tabela 6 -	<i>Primers</i> utilizados na caracterização da localização genética de <i>-M</i>	42
Tabela 7 -	Perfil de sensibilidade das linhagens <i>E. cloacae</i> JF277, <i>E. coli</i> J53 e transconjugante.....	57
Tabela 8 -	Caracterização das linhagens <i>qnrB</i> , de seus transformantes e transconjugantes, e valores da CIM para quinolonas, fluoroquinolonas, gentamicina e ceftazidima	63
Tabela 9 -	Valores da CIM para fluoroquinolonas e as mutações detectadas nos genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i> nas enterobactérias avaliadas.....	68
Tabela 10 -	Características das enterobactérias produtoras de ESBL.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Alfa
β	Beta
ATCC	"American Type Culture Collection"
Az	Azida sódica
BHI	"Brain Heart Infusion", Ágar infusão cérebro e coração
BM	Banho de água
CAZ	Ceftazidima
CD	Disco Combinado
CESP	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia marcescens</i> , <i>Providencia</i> spp.
CFO	Cefoxitina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	"Clinical Laboratory Standards Institute"
CPM	Cefepima
cr	Cromossômica (o)
CTX	Cefotaxima
CTX/AC	Cefotaxima acrescido de ácido clavulânico
dNTP	Nucleotídeos
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ESBL	"Extended-Spectrum β -lactamases", β -lactamase de espectro estendido
FEP	Cefepima
FOX	Cefoxitina
GAT	Gatifloxacina
GEN	Gentamicina
HCl	Ácido clorídrico
I	Intermediário
IEF	"Isoelectric focusing", focalização isoelétrica
IMP	Imipenem
IS	Seqüência de inserção
ITU	Infecção do trato urinário
JF	Juiz de fora
kb	Quilobases
KCl	Cloreto de potássio
LB	"Luria Broth", caldo Luria Bertani
LEBEM	Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular
mA	Miliampere
	Cloreto de magnésio

mM	Milimolar
MOX	Moxifloxacina
MVSP	<i>“Multi Variate Statistical Package”</i>
n	Número
NaCl	Cloreto de sódio
NAL	Ácido nalidíxico
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
NI	Dado não informado
nm	Nanômetro
NOR	Norfloxacina
P	<i>Primer</i> , sequência iniciadora
pb	Pares de bases
PBPs	<i>“Penicillin-binding proteins”</i> , proteínas ligadoras de penicilina
PCR	<i>“Polimerase Chain Reaction”</i> , reação da polimerase em cadeia
PFGE	<i>“Pulsed-Field Gel Electrophoresis”</i> , eletroforese de campo pulsado
pH	Potencial de hidrogênio
pI	Ponto isoelétrico
QRDR	Região determinante de resistência à quinolona
R	Resistente
RFLP	<i>“Restriction fragment lenght polymorphism”</i> , polimorfismo do comprimento dos fragmentos de inserção
rpm	Rotação por minuto
S	Sensível
SENTRY	Programa de vigilância de resistência bacteriana aos antimicrobianos
Tc	Transconjugante
Tf	Transformante
TSA	<i>“Tryptic soy agar”</i>
TSB	<i>“Tryptic soy broth”</i>
TSI	<i>“Triple Sugar Iron”</i> , Ágar tríplice açúcar e ferro
U	Unidade
UFC	Unidade formadora de colônia
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
5’CS	Segmento conservado 5’
3’CS	Segmento conservado 3’

Aminoácidos

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
Cys	Cisteína
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

Introdução

Mecanismos de resistência às quinolonas

- A classe das quinolonas
 - Epidemiologia da resistência às quinolonas em enterobactérias
 - Mecanismos de resistência às quinolonas de origem cromossômica
 - Mecanismos plasmídeos de resistência às quinolonas
 - Diminuição do acúmulo do antibiótico no interior da célula bacteriana
 - Associação de mecanismos de resistência às quinolonas e antibióticos β -lactâmicos em enterobactérias
-

1.1. A classe das quinolonas

1.1.1. Classificação e relação estrutura-atividade

As quinolonas são moléculas sintéticas desenvolvidas a partir de modificações da estrutura 4-quinolona (Figura 1) (LESCHER et al., 1962).

Em 1962, durante a síntese e a purificação da cloroquina (agente contra a malária) um composto com atividade contra bactérias Gram-negativas foi descoberto, sendo chamado de ácido nalidíxico (LESCHER et al., 1962). Seu uso clínico foi limitado à terapêutica das infecções urinárias não complicadas. Algumas modificações estruturais, nesta primeira geração de quinolonas, foram baseadas em uma estratégia para expandir o espectro de atividade e desenvolverem muitos dos primeiros compostos da segunda geração, como o ácido oxolínico e cinoxacina (SPANGLER; JACOBS; APPELBAUM, 1996; BLONDEAU, 2004).

Figura 1. Estrutura química das quinolonas

Com o objetivo de melhorar a atividade contra bactérias Gram-negativas, inclusive *Pseudomonas* spp., foi realizada uma substituição da piperazina na posição R7, que resultou na síntese do ácido pipemídico. Embora muitas substituições tenham sido realizadas com o propósito de expandir a atividade contra

diversos patógenos, o uso clínico de quinolonas de segunda geração permaneceu limitado pelo seu restrito espectro de atividade (APPELBAUM; HUNTER, 2000).

A terceira geração de quinolonas foi marcada pela adição de flúor na posição R6, o que levou à classificação de seus compostos como fluoroquinolonas. A atividade contra Gram-positivos, associada com a fluoração nesta posição, resultou em maior solubilidade desses fármacos em soluções oftálmicas, aumentando a utilidade terapêutica das quinolonas. Desta maneira, norfloxacin foi a primeira quinolona usada no tratamento de doenças infecciosas oftálmicas, como a conjuntivite bacteriana. Este fármaco demonstrou atividade anti-pseudomonas, contra bacilos Gram-negativos em geral e atividade limitada contra bactérias Gram-positivas (ITO et al., 1980). As substituições nas posições R1 e R8, de carbono para nitrogênio, caracterizaram os compostos de terceira geração. A adição do anel ciclopropil na posição R1 deu origem à ciprofloxacina e a adição de piridobenzoxazina entre as posições R1 e R8, originou o composto ofloxacina. Ambos os compostos oferecem atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A levofloxacina, enantiômero da ofloxacina, apresenta atividade também contra *Streptococcus pneumoniae* (APPELBAUM; HUNTER, 2000).

Em virtude da emergência da resistência bacteriana às gerações citadas anteriormente, iniciou-se o desenvolvimento de novas quinolonas, caracterizando a quarta geração desses compostos (APPELBAUM; HUNTER, 2000). A adição do grupamento metoxi na posição R8 originou os compostos moxifloxacina e gatifloxacina. O primeiro deles apresenta um anel bicíclico ligado à posição R7, enquanto que o outro composto carrega um grupamento metil no anel piperazínico. Estas alterações permitiram reduzir o efluxo da célula bacteriana e aumentar a

potência contra *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. resistente a outras quinolonas (FUKUDA et al., 2001).

1.1.2. Mecanismo de ação das quinolonas

O DNA é classicamente retratado como um par de filamentos helicoidais fechados. Quando a hélice se encontra intacta, as informações dos códigos não são acessíveis para a transcrição e o DNA não pode se replicar para a divisão celular. Assim, a separação e reunificação dos filamentos são processos essenciais para o crescimento e a multiplicação celular (COZZARELLI, 1980).

Em bactérias, a enzima que age sobre o DNA é a topoisomerase do tipo II (DNA girase), que converte sua hélice numa forma super-helicoidal negativa para preparar a separação dos filamentos. A forma primária desta enzima é um tetrâmero com duas subunidades A e duas subunidades B, denominadas GyrA e GyrB, respectivamente. Ambas as subunidades contêm uma região que liga a enzima ao DNA. Outra enzima responsável por esse processo é a topoisomerase IV, que provoca a separação (decatenação) dos círculos ligados resultantes da duplicação do DNA bacteriano. Por sua vez, esta enzima também possui duas subunidades, ParC e ParE (REECE; MAXWELL, 1991) .

As quinolonas capturam uma ou ambas as enzimas do cromossomo bacteriano, criando um complexo medicamento-enzima-DNA com rupturas em um único filamento que impede a passagem contínua do DNA pelo mecanismo de replicação. Neste estágio, a ação do fármaco é reversível. Entretanto, na presença de concentrações medicamentosas mais altas, aparecem rupturas nos dois filamentos e, conseqüentemente, morte da célula bacteriana (COZZARELLI, 1980; REECE; MAXWELL, 1991). O grau de ligação de uma quinolona a cada uma das

topoisomerasas difere de um fármaco para outro e, em certa medida, de um microrganismo para outro (COURTRIGHT; TUROWSKI; SONSTEIN, 1998; MOREAU et al., 1990).

1.2. Epidemiologia da resistência às quinolonas em enterobactérias

Os antibióticos da classe das quinolonas apresentam potente atividade contra grande número de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e ainda apresentam conveniência quanto ao seu uso e à sua biodisponibilidade (HURST et al., 2002). Como resultado de seu amplo espectro de ação, as fluoroquinolonas têm sido extensivamente prescritas como terapia empírica em muitos casos de infecções em hospitais e na comunidade devido à alta frequência de patógenos com elevada percentagem de resistência a várias classes de antibióticos e à severidade da doença (HURST et al., 2002; CHENIA; PILLAY; PILLAY, 2006).

Desde a introdução do ácido nalidíxico em 1960, o antibiótico ciprofloxacina é considerado, entre a classe das quinolonas, o agente antimicrobiano mais consumido em todo mundo (ACAR; GOLDSTEIN, 1997; CHENIA; PILLAY; PILLAY, 2006). O alto consumo de quinolonas e fluoroquinolonas, bem como erros em seu emprego na terapêutica, têm sido considerado fatores responsáveis pelo rápido desenvolvimento de resistência bacteriana a esta classe de antibióticos. Em países com intenso uso terapêutico de quinolonas, a resistência às fluoroquinolonas tem se tornado problema crescente na medicina clínica, limitando os agentes disponíveis para o tratamento de vários tipos de infecções (HOOPER, 2002; NAHEED et al., 2004; BIEDENBACH et al., 2006).

Em meados de 1990, a resistência às quinolonas esteve presente em menos de 1% de enterobactérias isoladas na Europa e Estados Unidos (BAQUERO, 1990).

Entretanto, aumento no percentual de *Escherichia coli* resistente à ciprofloxacina está sendo observado na Europa e países da América Latina, associado com o uso acentuado desses agentes (GALES et al., 2000). Livermore e colaboradores identificaram um aumento da prevalência de amostras de *K. pneumoniae* (3,5 a 7,1%) e *E. coli* (de 0,8 a 3,7%) resistentes às fluoroquinolonas isoladas de hemocultura, entre 1990 e 1999, em países europeus (LIVERMORE et al., 2002). Na China, por exemplo, esta percentagem encontra-se bem mais elevada, sendo mais de 50% das amostras clínicas de *E. coli* resistentes à ciprofloxacina (WANG et al., 2001).

O Brasil tem um das mais altas percentagens de resistência às quinolonas entre os países da América Latina. De acordo com um estudo realizado pelo “SENTRY Antimicrobial Surveillance Program”, o qual analisou dados referentes ao perfil de sensibilidade de vários patógenos isolados em países da América Latina, entre os anos de 1997 e 2001, o Brasil apresentou 10 a 20% de *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes à ciprofloxacina, dependendo da quinolona testada (SADER et al., 2004). Um estudo mais recente, publicado em 2006 por este mesmo programa de vigilância, revelou que a percentagem de resistência ao ácido nalidíxico foi mais alta na América Latina (15%) comparada à América do Norte (6,3%), sendo considerada mais alta no México (50%) e no Brasil (33,6%) (BIEDENBACH et al., 2006). Confirmando esta informação, Pereira e colaboradores reportaram significativo aumento na taxa de resistência às quinolonas em um centro médico brasileiro entre 2002 e 2003, que pode estar relacionado com aumento do uso deste medicamento nas infecções adquiridas na comunidade (PEREIRA et al., 2007).

Diferentes mecanismos de resistência estão envolvidos no desenvolvimento de resistência às fluoroquinolonas. Os principais mecanismos se dividem em três

categorias: alterações na DNA girase e topoisomerase IV, considerados sítios ativos de quinolonas; diminuição do acúmulo de antibiótico no interior da célula bacteriana, por impermeabilidade de membrana e hiperexpressão de sistemas de bomba de efluxo. Estes mecanismos são mediados por genes cromossômicos (VILA et al., 1994; RUIZ, 2003). Em adição, elementos móveis têm sido descritos carreando o gene *qnr*, o qual confere baixo nível de resistência às quinolonas e são transferíveis horizontalmente (RUIZ, 2003).

1.3. Mecanismos de resistência às quinolonas de origem cromossômica

As quinolonas agem inibindo a ação de topoisomerases tipo II (DNA girase) e topoisomerase IV (GELLERT et al., 1997).

O primeiro alvo de fluoroquinolonas em bactérias Gram-negativas é a DNA girase, um tipo de topoisomerase II que apresenta função na replicação e transcrição do DNA, mais precisamente catalisa a “superespiral” negativa do DNA. Esta enzima tetramérica é composta por duas subunidades A e duas subunidades B, as quais são mediadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. A topoisomerase IV apresenta uma estrutura com duas subunidades A e duas subunidades B mediadas, respectivamente, por *parC* e *parE*. Esta enzima demonstra uma similaridade com a seqüência de aminoácidos correspondente à DNA girase, o que significa que quinolonas podem ser capazes de inibir a atividade da topoisomerase IV, bem como da DNA girase (Figura 2) (DRLICA; ZHAO, 1997).

Figura 2. Interrupção da atividade da topoisomerase por fluoroquinolonas

Os sítios de ação das quinolonas são basicamente diferentes em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Em Gram-negativas, preferencialmente, é a DNA girase, enquanto que em Gram-positivas, o alvo principal é a enzima topoisomerase IV (RUIZ, 2003).

O desenvolvimento de resistência às quinolonas, especialmente em membros da família *Enterobacteriaceae*, tem sido descrito por alterações de nucleotídeos nos genes cromossômicos que codificam as DNA girase, GyrA e GyrB e as topoisomerasas IV, ParC e ParE (RUIZ, 2003).

1.3.1. Alterações na DNA girase

As mutações descritas no gene *gyrA* geralmente estão localizadas na porção N-terminal e C-terminal do gene, entre os nucleotídeos 199 e 318 na sequência do gene, em *E. coli*, em uma área designada região determinante de resistência à quinolona (QRDR), próximos ao sítio Tyr122, o qual liga momentaneamente o DNA clivado durante a atividade da enzima (YOSHIDA et al., 1990). Estas mutações são encontradas, mais freqüentemente, nos códons 83 e 87, próximo ao sítio de

restrição de *Hin*I, sendo Ser83 o ponto mais comum em *E. coli*. Estes códons interagem com radicais nas posições R1 e R7 da estrutura das quinolonas.

Algumas mutações nos códons 51, 67, 81, 82, 84 e 106 no gene *gyrA* também têm sido responsáveis pelo desenvolvimento de resistência às quinolonas em *E. coli*, sendo a mutação no códon 51 a mais recentemente descrita (VILA et al., 1994; EVERETT et al., 1996; FRIEDMAN; LU; DRLICA, 2001).

A presença de uma única mutação em alguma posição já mencionada em QRDR de *gyrA*, geralmente resulta em alto nível de resistência ao ácido nalidíxico; mas, para obter alto nível de resistência às fluoroquinolonas, é necessária a presença de mutações adicionais em *gyrA* e/ou em outro alvo, como no gene *parC*.

Algumas mutações em *gyrB*, principalmente na posição 426, conferem resistência a todas quinolonas e, na posição 447, conferem resistência somente ao ácido nalidíxico (RUIZ, 2003). Entretanto, a frequência de mutações em *gyrB* em bactérias Gram-negativas é muito menor quando comparada com a frequência de mutações em *gyrA* (DEGUCHI et al., 1996).

1.3.2. Alterações na topoisomerase IV

No gene *parC* de *E. coli*, mais comumente, ocorrem substituições nos códons 78, 80 e 84 (EVERETT et al., 1996; VILA; RUIZ; NAVIA, 1999). As mutações em *parC* são mais comuns que em *parE*, sendo que estas conferem resistência às quinolonas somente na presença concomitante de alterações de DNA girase, ou seja, alterações em topoisomerase IV desempenham papel secundário no desenvolvimento da resistência (BREINES et al., 1997).

1.4. Mecanismos plasmideais de resistência às quinolonas

1.4.1. Determinantes Qnr

O mais importante e freqüente mecanismo de resistência em enterobactérias é a alteração das enzimas consideradas sítios ativos de quinolonas, a DNA girase e a topoisomerase IV codificadas por genes cromossômicos. Porém, desde a descoberta de um plasmídeo que carrega um gene de resistência à quinolona, realizada por Martinez-Martinez e colaboradores em 1994 (MARTINEZ-MARTINEZ; PASCUAL; JACOBY, 1998), a investigação e a caracterização de determinantes plasmideais responsáveis por este fenótipo têm sido exaustivamente reportadas.

O primeiro determinante plasmideal de resistência às quinolonas foi descoberto quando uma quinolona foi utilizada como antibiótico seletivo em experimentos realizados para caracterizar um plasmídeo, chamado pMG252, que continha vários genes de resistência. Inesperadamente, a linhagem de *E. coli* utilizada como receptora para esse plasmídeo e que continha suas porinas intactas, apresentou um aumento de sua concentração inibitória mínima (CIM) entre 8 e 64 vezes após a aquisição deste plasmídeo. Subseqüentemente, o gene responsável por este fenótipo foi clonado e apresentou uma seqüência de 657 nucleotídeos, sendo a proteína codificada por este gene chamada de Qnr. Recentemente, devido à descoberta de novas variantes dessa proteína, ela foi nomeada QnrA. Experiências de “binding” confirmaram que essa proteína, com 218 aminoácidos, protege a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição por quinolonas, se fixando a estas enzimas em competição com o DNA bacteriano, o que confere resistência ao ácido nalidíxico (NAL) e aumento dos níveis de resistência às fluoroquinolonas (TRAN; JACOBY, 2002; ROBICSEK; JACOBY; HOOPER, 2006). A redução do

número de complexos binários topoisomerases-DNA diminui a fixação das quinolonas nos sítios ativos.

Atualmente, a presença de QnrA tem sido reportada em enterobactérias na Ásia, em muitos países europeus e, recentemente na América do Sul, destacando-se o Brasil (CAMBAU et al., 2006; WU et al., 2007; ELLINGTON et al., 2007; MINARINI; GALES; DARINI, 2007; LAVILLA et al., 2008). Seis variantes do determinante QnrA (QnrA1-QnrA6) já foram encontrados em diversos países (XU et al., 2007; CATTOIR et al., 2007a; LAVILLA et al., 2008).

A descoberta de QnrA1 provocou interesse crescente na busca de novos determinantes plasmideais de resistência às quinolonas. O gene *qnrS* foi detectado primeiramente no Japão, em *Shigella flexneri* causadora de toxinfecção alimentar (HATA et al., 2005), sendo posteriormente encontrado na Alemanha, Estados Unidos, Taiwan, Vietnam, França, Suíça e Espanha (ROBICSEK et al., 2006; ROBICSEK; JACOBY; HOOPER, 2006; LAVILLA et al., 2008). Este gene de resistência codifica uma proteína de 218 aminoácidos que apresenta 59% de identidade com QnrA1 (HATA et al., 2005). Um novo variante, denominado QnrS2, foi identificado em *Salmonella enterica* sorotipo Anatum isolada de carcaças de aves nos Estados Unidos e apresentou 91% de identidade com QnrS1 (GAY et al., 2006). Recentemente, na Espanha, foi encontrado QnrS1 em *K. pneumoniae* (LAVILLA et al., 2008).

Em 2006, outro variante do gene *qnr*, nomeado *qnrB*, foi identificado por Robsicsek e colaboradores nos Estados Unidos em amostras bacterianas provenientes da Índia (ROBSICSEK et al., 2006), e foi recentemente encontrado em outros países como, Coreia (PAI et al., 2007), Kuwait (CATTOIR et al., 2007b), França (CATTOIR et al., 2007a), Suíça (VELDMAN; PELT; MEVIUS, 2008), Taiwan

(WU et al., 2007) e Brasil (MINARINI et al., em publicação). Até o momento, foram detectadas 15 variantes do gene *qnrB* (B1-B15) que se distinguem por mutações pontuais de nucleotídeos (PAI et al., 2007; CATTOIR et al., 2007b; PARK et al., 2007; KEHRENBURG et al., 2008). Notoriamente, houve relatos de co-existência dos determinantes QnrB4 e QnrS1 (CATTOIR; POIREL; NORDMANN, 2007) em uma mesma célula bacteriana.

A frequência de determinantes de resistência do tipo Qnr tem sido considerada baixa entre amostras clínicas bacterianas avaliadas até o momento, porém há vários relatos pontuais de sua detecção. As análises genotípicas revelaram que estes isolados não são epidemiologicamente relacionados, com exceção de um surto nosocomial causado por um clone de *E. cloacae qnrA* multirresistente isolado na Holanda (PAAUW et al., 2006). Esses resultados sugerem que a disseminação de genes *qnr* provém da emergência simultânea e independente de várias estruturas genéticas móveis que seriam propagadas por transposição ou conjugação (PAAUW et al., 2006).

O gene *qnr* tem sido encontrado em plasmídeos de tamanhos que variam de 54 a 180 kb, aproximadamente. O contexto genético do determinante *qnrA* é caracterizado pela presença de uma estrutura inicialmente descrita por Hall e Strokes (1990), conhecida como “integron complexo do tipo *sul-1*” (Figura 3) (HALL; STROKES, 1990). Estes integrons, que seriam implicados na mobilização do gene *qnrA* por um mecanismo conhecido como “rolling cycle transposition”, são atualmente reconhecidos, constituindo, de fato, um elemento (ISCR1) da família de transposons IS9110 (TOLEMANN; BENNETT; WALSH, 2006). Estes transposons possuem uma estrutura caracterizada pela duplicação dos genes *qacE/sul1* presentes na extremidade 3' dos integrons de classe 1 (Figura 3) e pela presença de

uma região comum (CR1) que contém o gene *orf513* codificado por uma recombinase e de um promotor da expressão do gene *qnrA* (MAMMERI et al., 2005). O segmento conservado 5' do integron (5'CS) contém o gene *int* que codifica uma proteína de 337 aminoácidos, homóloga às proteínas pertencentes à família integrase e a região promotora, P1-P2. Nas extremidades da região de genes cassetes (região variável) existe uma pequena sequência invertida e repetida chamada 59-elemento base (59-be), importante em eventos recombinantes observados na evolução de integrons. Cada gene cassette que se insere no integron tem sua própria versão do elemento 59-be (Figura 3).

Figura 3. Representação esquemática das principais estruturas associadas com os genes *qnr*. (A) integron classe 1 contendo o elemento *ISCR1* associado com o gene *qnrA1* (POIREL et al., 2005) (B) integron classe 1 contendo o gene *qnrB2* (GARNIER et al., 2006) (C) elemento de inserção associado com o gene *qnrS1* (HATA et al., 2005). Os genes, ORFs e suas direções de transcrição estão representadas pelas setas e os retângulos em preto correspondem aos sítios *attC*.

Em função dos plasmídeos, as distâncias que separam os genes *orf513* e *qnrA* variam, ainda que a natureza dos genes situados próximos ao gene *qnrA*. Esta

variação sugere que estes transposons se constituíram de forma independente durante eventos genéticos diferentes.

O contexto genético de *qnrB* e *qnrS* foi considerado diferente daquele apresentado pelo gene *qnrA*, apresentando uma maior variabilidade (Figura 3). Inicialmente, o gene *qnrB1* foi descrito em um plasmídeo, conhecido como pMG298, próximo do gene *orf1005* que apresenta uma estrutura similar àquela de um transposon com as seqüências invertidas repetidas de 83 pb e sua expressão codificada provavelmente por uma transposase (JACOBY et al., 2006). A análise do contexto do gene *qnrB2* identificado em uma linhagem de *Citrobacter koseri* isolada nos Estados Unidos e descrita por Jacoby e colaboradores, não evidenciou a estrutura genética implicada na mobilização do gene de resistência (JACOBY et al., 2006). Porém, este mesmo gene foi identificado em *Salmonella enterica* sorotipo Keurmassar isolada no Senegal, e apresentou-se associado com um elemento ISCR1, entre os operons *sap* e *psp*, os quais codificam uma permease e uma proteína de choque térmico, respectivamente (Figura 3) (GARNIER et al., 2006).

O gene *QnrS1*, inicialmente descrito por Hata e colaboradores em *Shigella flexneri*, foi associado com duas seqüências invertidas repetidas de 1,2 kb (HATA et al., 2005) e com uma transposase (Figura 3). A análise do contexto genético de *qnrS1* identificado em *E. cloacae* isolada no Vietnam e na França revelam um contexto genético diferente, caracterizado por uma seqüência de inserção denominada ISEc12 (POIREL; LAVIANDIER; NORDMANN, 2006).

A variabilidade das estruturas associadas com os diferentes determinantes Qnr revela a diversidade dos sistemas de captura e de mobilização dos genes responsáveis pela disseminação destes determinantes. A emergência mundial desse novo mecanismo de resistência não provém da disseminação de uma única

estrutura genética, mas da presença de várias estruturas provenientes de eventos de mobilização diferentes (NORDMANN; MAMMERI, 2007).

A origem dos determinantes Qnr permanece pouco conhecida. Os genes *qnrA* foram identificados no cromossomo de *Shewanella algae* (POIREL et al., 2005), designando esta espécie aquática como um possível reservatório do determinante de resistência QnrA. A pesquisa dos progenitores dos genes *qnrB* e *qnrS* permitiu identificar três genes cromossômicos estruturalmente similares nas espécies marinhas, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Photobacterium profundum*. A expressão destes genes clonados em *E. coli* confere o mesmo fenótipo de resistência às quinolonas que aquele observado com os determinantes Qnr (POIREL et al., 2005). Cattoir e colaboradores identificaram, recentemente, a origem mais provável do gene *qnrS*; *Vibrio splendidus* possui em seu cromossomo um gene que codifica uma proteína de pentapeptídeos repetidos que apresentou 88% de identidade com o determinante plasmideal QnrS1 (CATTOIR et al., 2007c).

Como os genes *qnrB* e *qnrS* foram detectados em *Salmonella* spp. isolada de carcaças de aves (GAY et al., 2006), o possível papel seletivo das quinolonas utilizadas na criação de animais torna mais evidente a capacidade de favorecer a emergência da resistência a estes antibióticos, considerando-se a alimentação uma fonte potencial de disseminação de determinantes Qnr na população. Em adição, a presença do gene *qnrS2* em microrganismos presentes na água para tratamento de plantas, como demonstrado por Bonemann e colaboradores, enfatiza a possível disseminação de determinantes de resistência do tipo Qnr no ambiente (BONEMANN et al., 2006). Essa afirmativa sobre o papel da água como veículo da disseminação de determinantes de resistência foi referenciada em um estudo realizado recentemente por Cattoir e colaboradores, que reporta a presença não

esperada de determinantes QnrS2 em *Aeromonas* spp. isoladas em diversas partes do Rio Sena, em Paris (CATTOIR et al., 2008).

1.4.2. Determinantes AAC(6')-Ib-cr

Em 2005, um novo mecanismo de resistência às quinolonas responsável pela inativação enzimática de algumas fluoroquinolonas foi reportado por Robicsek e colaboradores nos Estados Unidos (ROBICSEK et al., 2006).

Alguns transconjugantes obtidos após experimentos de conjugação realizados em amostras clínicas isoladas na China, que continham o gene *qnrA*, apresentaram valores de CIM para ciprofloxacina superiores àqueles geralmente encontrados em transconjugantes *qnrA*. Os experimentos realizados, subsequente, demonstraram que não houve aumento da expressão do gene ou do número de cópias de *qnrA*. Os autores caracterizaram o integron contendo o gene *qnrA* e detectaram múltiplos genes de resistência na região do cassete gênico, onde o gene *aac(6')-Ib* estava presente. Após a caracterização desses genes, comprovou-se que o responsável por este fenótipo de resistência às fluoroquinolonas foi o gene *aac(6')-Ib*, então designado variante cr (do inglês, *ciprofloxacin resistance*). Este variante codifica uma acetiltransferase que inativa aminoglicosídeos (amicacina, canamicina e tobramicina) e confere sensibilidade reduzida à ciprofloxacina e norfloxacina por N-acetilação do radical amino piperazinil (ROBICSEK et al., 2006). O determinante AAC(6')-Ib-cr tem dois aminoácidos diferentes de sua sequência original, Trp102Arg e Asp179Tyr, os quais demonstraram (juntos) serem necessários e suficientes para promover a acetilação da ciprofloxacina e da norfloxacina. Quando foram encontrados os genes *qnrA* e *aac(6')-Ib-cr* em uma mesma célula bacteriana, o valor da CIM para ciprofloxacina

apresentou-se 4 vezes maior que aquele obtido quando esteve presente apenas o gene *qnrA*. Um estudo de mutagênese realizado pelo mesmo grupo do pesquisador Robicsek et al. demonstrou que as duas mutações encontradas no variante *aac(6')-Ib-cr* foram verdadeiramente responsáveis pela diminuição da sensibilidade à ciprofloxacina. Uma única substituição Asp179Tyr conferiu aumento de duas vezes no valor da CIM para ciprofloxacina, valor menor àquele obtido na presença das duas mutações. Em adição, estas duas mutações levaram à redução no valor da CIM para canamicina (256 para 64 µg/mL), tobramicina (32 para 16 µg/mL) e amicacina (16 para 8 µg/mL) (ROBICSEK et al., 2006).

É importante destacar ainda que, apesar dos genes *qnrA* e *aac(6')-Ib-cr* gerarem apenas redução de sensibilidade à ciprofloxacina, foi demonstrado que a presença de um deles facilita a sobrevivência da célula bacteriana exposta a uma concentração de ciprofloxacina próxima àquela obtida em níveis séricos durante a terapia, ou seja, facilita a seleção de mutantes com alterações nos genes cromossômicos responsáveis pela resistência à quinolona e que, conseqüentemente, levaria à falência terapêutica.

Pouco se sabe sobre a epidemiologia do determinante AAC(6')-Ib-cr desde seu primeiro estudo em 2004 (ROBICSEK et al., 2006). Este variante foi encontrado apenas em enterobactérias isoladas na Ásia, em seu estudo original, em algumas regiões da América do Norte, Eslovênia (AVGUSTIN et al., 2007) e recentemente na América do Sul (CORDEIRO et al., 2008; QUIROGA et al., 2007). Nos Estados Unidos, Park e colaboradores reportaram 44 isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. que apresentaram o gene *aac(6')-Ib-cr* e não encontraram nenhuma relação entre este encontro e dados clínicos dos pacientes. Os autores ainda relataram a presença desse gene em amostras resistentes e sensíveis à

ciprofloxacina, e ainda sugeriram que a disseminação de *aac(6')-Ib-cr* pode não ter sido desencadeada por um único clone ou um único tipo de plasmídeo. Uma grande diversidade de plasmídeos foi encontrada carreando este gene (PARK et al., 2006).

1.4.3. Determinantes QepA

Recentemente, o gene *qepA* que codifica uma proteína que participa da regulação do sistema de efluxo foi identificado em uma plasmídeo pHPA da linhagem *E. coli* C316 em um elemento de transposição, entre duas cópias de IS26 (YAMANE et al., 2007; PERICHON; COURVALIN; GALIMAND, 2007). A proteína QepA, de 511 aminoácidos, demonstrou uma considerável similaridade com transportadores pertencentes à família 14-transmembrana (bomba de efluxo tipo MFS, do inglês “Major Facilitators”) de actinomicetos do ambiente e foi responsável por um aumento significativo do nível de resistência à norfloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina devido à excreção do antibiótico para o exterior da célula bacteriana.

Em suma, três determinantes plasmídeos de resistência às quinolonas e fluoroquinolonas foram descritos: os genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA*. Estes genes estão sendo encontrados, de forma mais freqüente nos últimos anos, entre enterobactérias, porém o período de seu surgimento entre isolados clínicos não é conhecido. Geralmente, eles estão associados com plasmídeos que carregam algum determinante de resistência aos β -lactâmicos, o que constitui um risco epidemiológico devido à possibilidade de co-seleção desses determinantes de resistência, favorecendo ainda sua disseminação. É importante salientar que poucos estudos avaliam a presença destes genes plasmídeos entre amostras clínicas de *Pseudomonas* e *Acinetobacter*.

1.5. Diminuição do acúmulo de antibiótico no interior da célula bacteriana

As quinolonas podem atravessar a membrana externa de bactérias por duas diferentes formas: através de porinas específicas ou por difusão na camada fosfolipídica. O grau de difusão de quinolonas é fortemente associado e dependente da hidrofobicidade da membrana. Todas as quinolonas podem atravessar a membrana externa através de porinas, mas, somente aquelas com alta hidrofobicidade podem se difundir pela camada fosfolipídica (CHAPMAN; GEORGOPAPADOKOU, 1988). Desta forma, alterações na composição de porinas ou nos lipopolissacarídeos podem alterar o perfil de sensibilidade da bactéria (MONIOT-VILLE et al., 1991).

As alterações na permeabilidade da membrana são geralmente associadas com diminuição da expressão de porinas em *E. coli* e outras bactérias Gram-negativas (VILA et al, 1999). A membrana externa de *E. coli* possui três principais porinas: OmpA, OmpC e OmpF. A diminuição da expressão de OmpF está relacionada com o aumento na resistência a muitas quinolonas e antibióticos β -lactâmicos (COHEN et al., 1989).

1.6. Associação de mecanismos de resistência às quinolonas e antibióticos β -lactâmicos em enterobactérias

O grupo dos β -lactâmicos reúne alguns dos antimicrobianos mais importantes e mais utilizados na prática clínica para o tratamento de infecções hospitalares e comunitárias. A atividade desses antibióticos é decorrente da habilidade desses compostos em interferir na síntese do peptidoglicano, componente fundamental da parede celular bacteriana. Entre vários mecanismos de resistência adquirida aos antibióticos β -lactâmicos, a produção de β -lactamase por

bactérias Gram-negativas é a mais prevalente. As β -lactamases cataliticamente rompem o anel β -cíclico de antibióticos β -lactâmicos, via formação de um derivado ácido, serina-éster acilenzima (QUINTILIANI; SAHM; COURVALIN, 1999). Alterações em PBPs preexistentes (do inglês, *penicillin-binding proteins*), aquisição de nova PBP, mudança ou perda de proteínas de membrana em microrganismos Gram-negativos e, aumento da atividade de efluxo do próprio antibiótico, podem conferir resistência aos antibióticos (QUINTILIANI; SAHM; COURVALIN, 1999).

As β -lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês, *extended spectrum β -lactamases*), pertencentes à subclasse 2be, são enzimas codificadas por genes plasmideais resultantes de alterações das β -lactamases clássicas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 (PATERSON et al., 2000; FIETT et al., 2000). Estas enzimas podem ser provenientes de pressão seletiva em ambientes onde há uso abusivo de antibióticos de amplo espectro (por exemplo, cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações) (FIETT et al., 2000).

As enzimas CTX-M surgiram na década de 80, alguns anos após a introdução da cefotaxima no tratamento de infecções bacterianas. Apesar de não ter sido observada a disseminação mundial de linhagens produtoras de CTX-M até o ano de 1995, esta enzima está atualmente concentrada principalmente em certas áreas como, América do Sul e algumas regiões da Europa (BONNET et al., 2001; OLIVER et al., 2001; PALLECCHI et al., 2007). As enzimas CTX-M têm sido detectadas em isolados clínicos, em bactérias comensais de humanos e animais e em produtos alimentícios e esgoto. Estas enzimas conferem maior resistência à cefotaxima comparado à ceftazidima e apresenta distribuição abrangente sugerindo a presença de reservatórios ambientais destes determinantes de resistência (PALLECCHI et al., 2007)

A produção de ESBL é usualmente mediada por genes plasmídeos. Estes plasmídeos são facilmente transmitidos a diferentes gêneros e espécies de enterobactérias, que acumulam genes de resistência e resultam em bactérias resistentes a uma variedade de classes de antibióticos.

O problema do aumento do número de infecções causadas por bactérias resistentes às quinolonas em pacientes de diversas partes do mundo, inclusive no Brasil, é agravado pela presença concomitante de outros mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, os quais são extensivamente utilizados na prática clínica. Atualmente, muitas publicações têm enfatizado o aumento do percentual de enterobactérias que apresentam sensibilidade diminuída às fluoroquinolonas e que são produtoras de ESBL, no Brasil e no mundo, em consequência da associação de mecanismos de resistência bacteriana (PATERSON et al., 2000; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2003; BRASME et al., 2007; HO et al., 2007; PEREIRA et al., 2007). A alta percentagem de enterobactérias com esta característica é constatada em amostras brasileiras provenientes de hospitais e de pacientes ambulatoriais (SADER et al., 2004; MINARINI et al., 2007; MINARINI et al., em publicação).

Existe ainda uma freqüente associação entre os determinantes plasmídeos de resistência às quinolonas do tipo Qnr e as enzimas ESBL em uma mesma bactéria, o que enfatiza a possibilidade de uma co-seleção destes dois mecanismos de resistência plasmídeos. Alguns estudos, recentemente realizados, mostraram que 4% das enterobactérias isoladas na Turquia produziam ESBL do tipo VEB-1 co-exprimindo QnrA (NAZIC; POIREL; NORDMANN, 2005) enquanto que 48% das enterobactérias da Tailândia produziam VEB e QnrA1, concomitantemente (POIREL et al., 2005). QnrA foi ainda identificada em enterobactérias produtoras de CTX-M-1 e M-15 (LAVIGNE et al., 2006), CTX-M-9 e SHV-7 (WANG et al., 2004), SHV-5

(NAZIC; POIREL; NORDMANN, 2005; MINARINI; GALES; DARINI, 2007), as cefalosporinas plasmídeais FOX-5 (MARTINEZ-MARTINEZ; PASCUAL; JACOBY, 1998; WANG et al., 2004) e as carbapenemases plasmídeais OXA-48 (NAZIC; POIREL; NORDMANN, 2005) e IMP-8 (CHU et al., 2006). Os determinantes do tipo QnrB foram encontrados em enterobactérias produtoras de CTX-M-15, SHV-12 e SHV-30 (JACOBY et al., 2006; GARNIER et al., 2006; GAY et al., 2006), enquanto que os determinantes QnrS foram associados com a produção de TEM-52, CTX-M-1, SHV-12 e a uma nova β -lactamase LAP-1 (POIREL; LEVIANDIER; NORDMANN, 2006).

Assim, a investigação desta relação e associação de resistências às quinolonas e β -lactâmicos torna-se essencial, pois, este evento agravaria ainda mais a escolha da antibioticoterapia correta para infecções causadas por essas bactérias multirresistentes, sendo poucas as alternativas terapêuticas que poderiam ser utilizadas.

1.6.1. Genes β -M e sua associação com estruturas gênicas

As enzimas CTX-M podem ser separadas em cinco grupos com base na identidade de suas seqüências de aminoácidos: grupos CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. Entre as enzimas de um mesmo grupo, o percentual de identidade é igual ou superior a 94%, enquanto que, entre enzimas pertencentes a grupos diferentes esta percentagem é inferior a 90% (BONNET, 2004).

Por serem as enzimas CTX-M altamente similares às β -lactamases produzidas intrinsecamente por várias espécies do gênero *Kluyvera*, e ainda por serem as seqüências próximas aos genes β -M semelhantes às aquelas em seus progenitores, esses genes cromossômicos podem representar os prováveis

progenitores dos genes β -M. A alta similaridade encontrada entre grupos de CTX-M e uma determinada β -lactamase intrínseca de *Kluyvera* spp. permite identificar o seu progenitor (VILLEGAS et al., 2004; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2004)

Os genes β -M estão geralmente associados com plasmídeos de tamanhos que variam de 7 a 160 kb. Diferentes elementos gênicos podem estar envolvidos no processo de mobilização de β -M (Figura 4A e 4B). A seqüência de inserção *ISEcp1* tem sido observada à montante (de 42 a 266 pb) de diversos genes β -M, principalmente daqueles que codificam as enzimas CTX-M-1, 2, 3, 9, 13, 14, 15, 17, 19, 20 e 21 (Figura 4B). Este elemento de inserção é formado por uma região *tnpA* que codifica uma transposase, flanqueada por duas seqüências repetidas e invertidas, IRR e IRL, (do inglês, *right inverted repeats* e *left inverted repeats*) (LARTIGUE; POIREL; NORDMANN, 2004; SALADIN et al., 2002). Poirel e colaboradores demonstraram que, além do elemento *ISEcp1* ser capaz de mobilizar os genes β -M, este elemento também está envolvido na mobilidade destes genes (Figura 4B) (POIREL; DECOUSSER; NORDMANN, 2003).

O outro elemento genético relacionado com a mobilização de genes β -M, principalmente genes β -M-2 e β -M-9, é a *ISCR1*, elemento que engloba o gene da recombinase Orf513 (Figura 4A) (SABATE et al., 2000; DI CONZA et al., 2002). *ISCR1* pertence à família de seqüências de inserção *IS91-like*, que são capazes de mobilizar seqüências de DNA adjacentes por um mecanismo de transposição incomum denominado, em inglês, *rolling-circle replication*. Geralmente o elemento *ISCR1* faz parte de complexos integrons de classe 1. Estes integrons contêm o segmento conservado 5' (5'CS) e uma duplicação do segmento 3' (3'CS), considerando que os genes β -M não se encontram inseridos na região de cassetes gênicos (Figura 4A). No segmento conservado 5', é encontrado o gene *int* que

codifica uma integrase e adjacente a este gene, há um sítio de recombinação *attI* (PAULSEN et al., 1993). Uma região conservada *ISCR1* abriga o gene da Orf513 que codifica uma DNA recombinase capaz de capturar e integrar diversos genes na região variável. Esta região contendo o gene β -M tem sido encontrada entre as duas regiões 3'CS (SABATE et al., 2000).

Outros elementos podem estar envolvidos na mobilização de genes β -M: IS26 têm sido observada anteriormente a este gene (KARIM et al., 2001; SALADIN et al., 2002) e o elemento IS903-like tem sido encontrado posteriormente aos genes β -M-14, β -M-17 e β -M-19 (POIREL; DECOUSSER; NORDMANN, 2003).

Figura 4. Representação esquemática de diferentes elementos gênicos envolvidos no processo de mobilização de β -M (Adaptado de POIREL; DECOUSSER; NORDMANN, 2003). (A) gene β -M associado com integron classe 1; (B) gene β -M associado com o elemento *ISEcp1*.

Objetivos

Objetivo Geral
Objetivos específicos

Objetivo geral do estudo

Determinar o principal mecanismo de resistência às quinolonas em enterobactérias isoladas de espécimes clínicos de pacientes e a correlação com outros mecanismos de resistência.

Objetivos específicos

- Determinar o perfil de sensibilidade a vários antibióticos da classe das quinolonas e dos β -lactâmicos nas enterobactérias do estudo.
- Determinar a frequência do gene *qnr* nas enterobactérias isoladas.
- Determinar a transferabilidade e o tamanho do plasmídeo responsável pela disseminação da resistência às quinolonas.
- Caracterizar e analisar a estrutura do integron associado com o gene *qnr*.
- Investigar as mutações predominantes nos genes *gyrA* e *parC*, correlacionando-as com a diminuição de sensibilidade às fluoroquinolonas
- Comparar a diminuição ou a perda da expressão de proteínas de membrana responsáveis pela penetração do antibiótico no interior da célula, com o perfil de resistência às quinolonas em enterobactérias com e sem mutações em genes codificadores das topoisomerasas.
- Verificar a produção de ESBL em enterobactérias que apresentaram sensibilidade reduzida às cefalosporinas.
- Determinar as β -lactamases presentes nas enterobactérias do estudo.
- Caracterizar os elementos gênicos responsáveis pela disseminação e regulação dos genes β -M presentes nas enterobactérias avaliadas.

Material e Métodos

- Amostras bacterianas
 - Armazenamento das amostras
 - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
 - Determinação das seqüências genéticas
 - Caracterização dos mecanismos de resistência às quinolonas
 - Caracterização dos mecanismos de resistência aos β -lactâmicos
 - Transferência de genes plasmídeos de resistência
 - Extração de plasmídeos e hibridação
 - Eletroforese de campo pulsado
 - Análise da impermeabilidade da membrana celular bacteriana
-

3.1. Amostras bacterianas

Foram avaliadas enterobactérias isoladas de material clínico de pacientes hospitalizados ou da comunidade de dois estados brasileiros. Foram incluídas no estudo enterobactérias que demonstraram diminuição da sensibilidade ao ácido nalidíxico (NAL). Foram incluídas, no presente estudo, 257 enterobactérias que apresentaram redução de sensibilidade às quinolonas isoladas de pacientes que receberam atendimento no Lemos Laboratórios de Análises Clínicas, Juiz de Fora (MG), no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, USP (SP) e na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, USP (SP), no período de 2000 a 2005. Foram excluídas do trabalho enterobactérias de mesma espécie isoladas do mesmo paciente. Os dados referentes ao paciente e às bactérias isoladas estão apresentados no Apêndice 1. As linhagens-controle que foram utilizadas neste estudo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Dados referentes às linhagens-controle utilizadas neste estudo

LINHAGEM CONTROLE	FENÓTIPO	EXPERIMENTO
<i>K. pneumoniae</i>	Resistente à ciprofloxacina (gene <i>qnrA</i>)	Hibridação de colônica e PCR
<i>E. coli</i>	Resistente à ciprofloxacina (gene <i>qnrB</i>)	Hibridação de colônica e PCR
<i>E. coli</i> pBCH2.	Resistente à ciprofloxacina (gene <i>qnrS</i>)	PCR
<i>E. coli</i> J53 ^a	Resistente à azida sódica	Receptora em conjugação
<i>E. coli</i> V517	Tamanhos de plasmídeos conhecidos	Extração e análise de plasmídeos
<i>E. coli</i>	Tamanhos de plasmídeos conhecidos	Extração e análise de plasmídeos
<i>E. coli</i>	Sensível a maioria dos antibióticos	Receptora em transformação
<i>E. coli</i> ATCC25922	Padrão de sensibilidade	Determinação da CIM
<i>E. coli</i> J53	Expressa OmpC e OmpF	Análise de porinas
<i>E. coli</i> J62 TEM-	pl 5,4	Determinação de pl e PCR
<i>E. coli</i> J62 TEM-	pl 5,6	Determinação de pl e PCR
<i>E. coli</i> J53 TEM-	pl 6,3	Determinação de pl e PCR
<i>E. coli</i> J53 SHV-	pl 7,6	Determinação de pl e PCR
<i>E. coli</i> J53 SHV-	pl 8,2	Determinação de pl e PCR
<i>E. coli</i> RJ	CTX-M-2	PCR
<i>E. coli</i> RJ	CTX-M-9	PCR
<i>E. aerogenes</i>	CTX-M-8	PCR

^a linhagens cedidas pelo pesquisador Dr. George A. Jacoby, *Lahey Hitchcock Clinic, Burlington*, Estados Unidos;

^b linhagens cedidas pelo pesquisador Dr. Patrice Nordmann, *Hôpital Bicêtre, Paris, França*;

^c linhagens cedidas pelo pesquisador Dr. David Livermore, *PHLS-ARMRL, Londres, Inglaterra*;

^d linhagens cedidas pelo pesquisador Dr. Jorge Sampaio, *Instituto Fleury, São Paulo, Brasil*.

3.2. Armazenamento das amostras

Depois de isoladas, as amostras bacterianas foram identificadas no Lemos Laboratórios de Análises Clínicas utilizando testes bioquímicos convencionais e pelo sistema semi-automatizado MiniApi (*bioMérieux*), por método enzimático e colorimétrico. Após a identificação, as bactérias foram suspensas em caldo Mueller Hinton (Difco) e semeadas em ágar MacConkey (Difco) e ágar Mueller Hinton (Difco) suplementado com sangue de carneiro a 5% (ágar sangue) para verificar a pureza da cultura. Após esse procedimento, somente uma colônia isolada e pura foi transferida e armazenada em ágar Mueller Hinton e mantida em temperatura ambiente.

Ao final das coletas, as amostras bacterianas foram transferidas para o Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP e foram cultivadas em Ágar MacConkey, durante 18 horas a 37°C. As colônias foram transferidas para caldo BHI acrescido com glicerol 15%, onde foram estocadas a -80°C para os estudos subseqüentes.

Para permitir o isolamento de colônias puras e viáveis, alíquotas das culturas estocadas foram cultivadas novamente em BHI, incubadas a 37°C, durante 18 – 24 horas e transferidas para ágar sangue, antes de serem submetidas aos experimentos.

3.3. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos, para as enterobactérias estocadas, foi realizado, primeiramente, pelo método de disco difusão, como descrito e recomendado pelo “*Clinical Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2006). Foram selecionadas as enterobactérias que apresentaram sensibilidade diminuída, isto é, halo de inibição diminuído para ácido nalidíxico ($\leq$ 18 mm) (CLSI, 2006).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para antibióticos pertencentes à classe das quinolonas e dos β -lactâmicos foi realizada pelo método de diluição em ágar, de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2005). Foram testados os antimicrobianos: ciprofloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, levofloxacina, ofloxacina, ceftazidima, cefotaxima e cefoxitina. Os antibióticos β -lactâmicos ceftazidima, cefotaxima e cefoxitina foram adicionados a este

experimento com a finalidade de realizar uma triagem de possíveis enterobactérias produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL).

Após análise das CIM determinadas para as enterobactérias, essas foram separadas em 12 grupos, que varia do grupo 1 ao grupo 12, utilizando as seguintes características fenotípicas: sensibilidade à ciprofloxacina e cefoxitina e possível produção de ESBL. A Tabela 2 apresenta as características estabelecidas para divisão das enterobactérias do estudo nos diferentes grupos.

Tabela 2- Características de cada grupo estabelecido para a classificação das enterobactérias

GRUPOS	CIPROFLOXACINA*	TRIAGEM PARA ESBL	DIMINUIÇÃO DE SENSIBILIDADE À CEFOXITINA
1	R	Positiva	Presente
2	R	Positiva	Ausente
3	R	Negativa	Ausente
4	R	Negativa	Presente
5	I	Positiva	Presente
6	I	Positiva	Ausente
7	I	Negativa	Ausente
8	I	Negativa	Presente
9	S	Positiva	Presente
10	S	Positiva	Ausente
11	S	Negativa	Ausente
12	S	Negativa	Presente

* R, resistente; I, sensibilidade intermediária; S, sensível.

Esta classificação agrupa enterobactérias com características fenotípicas semelhantes em um mesmo grupamento. Desta maneira, torna-se possível estabelecer quais as enterobactérias de cada grupo seriam melhor avaliadas em relação à mutação em genes cromossômicos e análise de proteína de membrana externa (porina) presentes na célula bacteriana.

3.4. Determinação das seqüências genéticas

3.4.1. Extração do DNA cromossômico

A extração do DNA cromossômico bacteriano foi realizada segundo o método de Pitcher et al. (1989). Cada enterobactéria foi semeada em ágar sangue 5% e incubada durante 24 horas a 37°C, para a extração do DNA cromossômico. Colônias das enterobactérias foram transferidas para um tubo tipo “eppendorf” contendo 100 µL da solução I: Solução tamponante TE (10 mM Tris, 1mM EDTA) pH 8,0 e sacarose 25%. Foram adicionados aos tubos 500 µL de GES (5 M tiocianato de guanidina, 0,1 M de EDTA e 0,5% peso/volume de solução 30% de sarcosinato lauril sódico) e as bactérias foram gentilmente misturadas.

Observada a lise das células, foram adicionados 250 µL de acetato de amônio 7,5 M aos tubos, sendo estes misturados gentilmente e incubados em gelo durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 500 µL de clorofórmio/2-pentanol (24:1), os tubos foram agitados manualmente durante 10 minutos e, posteriormente, centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm. Para um novo tubo tipo “eppendorf” de 1,5 mL, transferiu-se 700 µL da fase orgânica (fase superior) da mistura, no qual foram adicionados 875 µL de etanol absoluto mantido a -20°C. Os tubos foram misturados gentilmente e mantidos a -20°C por 18-20 horas.

Após este período, os tubos foram homogeneizados e centrifugados por 3 minutos a 13.000 rpm. Após o sobrenadante ser desprezado, o DNA precipitado foi lavado com uma mistura de acetato de amônio/etanol, homogeneizado dentro do próprio tubo e centrifugado novamente. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e repetiu-se a lavagem com apenas etanol absoluto. Os tubos foram homogeneizados, centrifugados por 3 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi desprezado. Após a evaporação de todo o etanol em fluxo laminar, foram

adicionados 100 μL de solução TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0). A concentração e a pureza do DNA genômico extraído também foram analisados em espectrofotômetro de luz ultravioleta com comprimento de onda (λ) de 260 nm e 280 nm (Gene Quant Photometer, Amersham Biosciences). Após a determinação da concentração do DNA genômico, as amostras foram diluídas em água deionizada esterilizada com volume suficiente para atingir concentração final de 30 ng/ μL , para ser utilizado nas reações de PCR.

3.4.2. Extração de DNA pelo método de fervura

Uma única colônia de cada amostra a ser testada, proveniente de cultura recente em ágar sangue, foi suspensa em 200 μL de água destilada esterilizada. As células foram lisadas por aquecimento a 95°C durante 10 minutos, e deixadas em gelo durante 5 minutos. Os restos celulares foram removidos por centrifugação a 13.200 rpm durante 5 minutos (PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002). Dois μL do volume total do sobrenadante foram usados no PCR.

3.4.3. Condições da PCR

A detecção dos genes de resistência foi realizada utilizando os seguintes componentes para 25 μL de reação: água duplamente processada “Qualidade PCR” (w-3500 SIGMA), solução tamponante de reação 10X na concentração final 1X acrescido de cloreto de magnésio 2 mM, *Taq* DNA polimerase 0,625 U (Invitrogen), os 4 nucleotídeos dNTP (Invitrogen) utilizados na concentração de 0,2 mM cada um e *primers* na concentração de 25 pmol (Primer Tech). Os termocicladores utilizados para os experimentos foram *Mastercycler Gradiente* (Eppendorf) e GeneAmp 2700 (Applied Biosystems).

3.4.4. Seqüenciamento

Os fragmentos obtidos pela reação de amplificação foram seqüenciados para determinar a seqüência de cada gene, bem como sua localização genética.

Os produtos amplificados foram purificados com o *kit* GFX-TM PCR (Amersham Bioscience) para estocagem e posterior seqüenciamento. Todas as etapas do seqüenciamento foram realizadas em microplacas de 96 poços. Para a etapa de amplificação, foram utilizados 1,0 µL de DNA (30 ng/µL), 0,8 µL do *primer* (16 pmol/µL), 4,0 µL da solução GT Dye Terminator (*kit* ET Dye Terminator, Amersham Bioscience) e água W-3500 (Sigma) suficiente para completar o volume final de 10,5 µL. A seguir, o ciclo de amplificação utilizado foi: 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 80 segundos a 60°C, com repetição de 30 vezes. Em seguida, o produto amplificado foi precipitado com acetato de amônio 7,5 M e etanol 95% e então seqüenciado em (Amersham Bioscience, Suécia) ou 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram analisadas no programa ChromasPro versão 1.33 (Technelysium Pty Ltd, Austrália) e comparadas às seqüências disponíveis no banco de dados *GenBank* ([://www.ncbi.nih.gov/](http://www.ncbi.nih.gov/)).

3.5. Caracterização dos mecanismos de resistência às quinolonas

3.5.1. Detecção de genes plasmídeos por hibridização de colônia

Para detectar os genes *qnrA* e *qnrB* nas enterobactérias do estudo, foi realizada hibridação de colônia por *dot blot* com sonda específica para cada um destes determinantes.

Após crescimento das amostras bacterianas em ágar sangue, cinco colônias de cada bactéria foram semeadas em 200 µL de BHI distribuídos em uma placa de 96 poços. Após o crescimento em caldo a 37°C durante 18 horas, as bactérias foram semeadas sobre uma membrana Hybond-N+, cortada previamente, em contato com

o meio de cultura ágar Mueller Hinton, utilizando um replicador de 96 furos. A placa contendo a membrana foi incubada a 37°C durante 18 horas.

Após a incubação, a membrana foi retirada e lavada com solução fixadora (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) por duas vezes durante 20 minutos. Após essa etapa, a membrana foi colocada em um béquer contendo SDS 0,5%, em ebulição, durante 20 minutos, por duas vezes. A membrana, então, foi seca sobre papel absorvente em temperatura ambiente. A reação de hibridação foi realizada utilizando o “*kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems*” (GE). As membranas foram colocadas em garrafas de hibridação, nas quais foi adicionada solução de pré-hibridação (solução tamponante de hibridação, NaCl 0,5 M, reagente bloqueador 5%) e incubadas a 42°C durante 15 minutos. Após esse processo, toda a solução de pré-hibridação foi retirada da garrafa e a “sonda qnr” desnaturada contendo “*DNA Labelling reagent*” e glutaraldeído (reagentes fornecidos pelo kit) em mesmas proporções de volumes, foi adicionada. A hibridação foi realizada a 42°C durante 18 horas.

Foram realizadas várias etapas de lavagem da membrana com os reagentes componentes do *kit*, S1 e S2, antes da adição do reagente revelador.

3.5.2. Detecção de genes plasmideais por multiplex PCR

O protocolo utilizado para multiplex PCR para detecção dos genes *qnr* foi descrito por Cattoir e colaboradores (2007b). A extração de DNA foi realizada pelo método de fervura, como descrito no item 3.4.2. Foi preparada solução contendo tampão de reação (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM), 1,5 mM, 200 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 20 pmol de cada um dos 6 *primers* (Tabela 3) e 2,5 U de *Taq* polimerase (Applied Biosystems). A amplificação dos genes foi realizada com as

seguintes etapas: 10 minutos a 95°C, 35 ciclos de amplificação contendo 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 54°C e 1 minuto a 72°C e, finalmente, 10 minutos a 72°C, como extensão final. Os fragmentos de DNA foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 2% em 100 volts durante 1 hora de corrida em TAE (Tris-HCl 40 mM pH 8,3, acetato 2 mM, EDTA 1 mM) contendo 0,05 mg/L de brometo de etídeo (CATTOIR et al., 2007b).

Tabela 3. *Primers* utilizados no multiplex PCR *qnr*

PRIMER	SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS 5'- 3'	GENE
QnrA mult-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	<i>qnrA1 a qnrA6</i>
QnrA mult-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	
QnrB mult-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	<i>qnrB1 a qnrB8</i>
QnrB mult-R	TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA	
QnrS mult-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	<i>qnrS1 e qnrS2</i>
QnrS mult-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	

3.5.3. Caracterização da localização genética do determinante *qnr*

Como os genes *qnrA* e *qnrB* geralmente se apresentam associados com um integron, foram utilizados pares de *primers* específicos para cada região deste elemento (Tabela 4 e Figura 5). É importante salientar que o gene *qnr* encontra-se associado com integron de classe I de 9 a 13 kb, em média (MAMMERI et al., 2005). Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram variáveis ou inexistentes, de acordo com os genes existentes.

As seqüências dos *primers* que foram utilizados na PCR e seqüenciamento estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4- *Primers* utilizados na caracterização da localização do gene *qnr*

PRIMER	GENE	SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS 5'-3'	Tº ANELAMENTO	REFERÊNCIA
P1	<i>Int2</i>	TCTCGGGTAACATCAAGG	50°C	MARTINEZ-FREIJO et al., 1998
P2	<i>Int2</i>	GTGGACATAA GCCTGTTCGGTT	62°C	próprio estudo
P3	5CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	50°C	próprio estudo
P4	3CS	CTGTTTCAGGAACCGGGTCAAAG	64°C	próprio estudo
P5	3CS	GCGAAATGTA GTGCTTACGTTG	60°C	próprio estudo
P6	3CS	AAGCAGACTTGACCTGA	46°C	próprio estudo
P7	3CS2	GCAACACCGACAGGGATGGAT	62°C	próprio estudo
P8	3CS2	GGTGACGGTGTTCGGCATTCT	62°C	próprio estudo
P9	<i>Orf513</i>	CTTTTGCCCTAGCTGCGG	54°C	próprio estudo
P10	<i>Orf513</i>	CAGGTCTTGAGTATCGTCTA TC	60°C	próprio estudo
P11	<i>OrfF</i>	CAGCAAGGGCGCAAAGTCT	58°C	próprio estudo
P12	<i>qnrA1</i>	CAATCCTCGAAACTGGCATC	56°C	RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2003
P13	<i>qnrA1</i>	ATCCAGATCGGCAAAGGTTA	56°C	JACOBY et al., 2003
P14	<i>qnrR</i>	GATAAAGTT TTTCAGCAAGAGG	60°C	próprio estudo
P15	<i>AmpR</i>	CGTCATCTCAGTTTTACCCGC	60°C	próprio estudo
P16	3CS2	GCAACACCGACAGGGATGGAT	62°C	próprio estudo
P17	3CS2	GGTGACGGTGTTCGGCATTCT	62°C	próprio estudo
P18	<i>Orf5</i>	GCTCGGATCTCAGGACGAAG	60°C	próprio estudo
P19	<i>qnrB1</i>	ATGACGCCATTACTGTATAA	53°C	JACOBY et al., 2006
P20	<i>qnrB1</i>	GATCGCAATGTGTGAAGTTT C	53°C	JACOBY et al., 2006

Figura 5. Estratégia para o mapeamento genético do integron classe I contendo os genes *qnrA* ou *qnrB* (A) Estrutura representativa do integron contendo o gene *qnr* (em destaque). Os determinantes estão representados pelas setas, indicando a direção da transcrição; (B) Localização dos primers utilizados no mapeamento por PCR representados pelas setas e pela letra P, com seu respectivo número.

3.5.4. Clonagem

Foram realizados experimentos de clonagem para a obtenção de plasmídeos recombinantes *qnrB*. O DNA genômico das bactérias contendo o gene *qnrB* foi extraído segundo Pitcher et al. (1989). As estruturas genéticas próximas e associadas com os determinantes *qnrB* foram identificadas após serem clonadas utilizando o DNA total digerido com enzimas de restrição *KpnI* ou *EcoRI* ligado ao vetor pBK-CMV (Stratagene). Os plasmídeos recombinantes foram eletroporados em *E. coli* TOP10 e os clones selecionados em Agar Tryptic Soy (TSA) contendo canamicina (30 µg/mL) e ácido nalidíxico (3 µg/mL). Os plasmídeos dos clones obtidos foram extraídos pelo *kit* Plasmid Midi (Qiagen) e as seqüências determinadas por seqüenciamento direto usando os *primers* específicos T3 e T5 (Stratagene) para o vetor. As seqüências obtidas foram analisadas no programa ChromasPro versão 1.33 (Technelysium Pty Ltd, Austrália) e comparadas às seqüências disponíveis no banco de dados *GenBank* ([://www.ncbi.nih.gov/](http://www.ncbi.nih.gov/)).

3.5.5. Amplificação da região QRDR dos genes cromossômicos *gyrA* e *parC*

Os *primers* GyrA1 5'-CGACCTTGCGAGAGAAAT-3' e GyrA2 5'-GTTCCATCAGCCCTTCAA-3' e ParC1 5'-AGCGCCTTGCGTACATGAAT-3' e ParC2 5'-GTGGTAGCGAAGAGGTGGTT-3' foram utilizados para amplificar a região QRDR dos genes cromossômicos *gyrA* e *parC*, respectivamente (MAMMERI et al., 2005). A amplificação destes genes foi iniciada pela desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 60 segundos, 55°C por 60 segundos e 72°C por 1 minuto. Os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados foram 630 pb e 940 pb para *gyrA* e *parC*, respectivamente. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os produtos de PCR foram purificados e seqüenciados. As seqüências de nucleotídeos da QRDR obtidas das 112 enterobactérias avaliadas foram comparadas com as seqüências de

referência depositadas no *GeneBank database* (números de acesso AF052253 ao AF052260).

3.6. Caracterização dos mecanismos de resistência aos β -lactâmicos

3.6.1. Detecção da produção de ESBL

As prováveis enterobactérias produtoras de ESBL, ou seja, aquelas que apresentaram diminuição de sensibilidade à ceftazidima ou cefotaxima, foram submetidas ao teste do disco combinado (CD), utilizando-se discos de cefalosporinas associadas com ácido clavulânico disponíveis comercialmente (Oxoid). As placas de ágar Mueller Hinton foram inoculadas com uma suspensão bacteriana preparada em solução fisiológica esterilizada equivalente à concentração de 0,5 da escala de McFarland, a partir de um crescimento de 18 horas em placa de ágar sangue. Após a secagem das placas, foram aplicados os discos de antibióticos. As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C.

Os substratos testados foram ceftazidima e cefotaxima. O teste foi considerado positivo quando a diferença entre o diâmetro do halo da cefalosporina associada com ácido clavulânico e a medida do halo do mesmo substrato sem o inibidor de β -lactamase foi maior ou igual a 5 mm (CARTER et al., 2000).

3.6.2. Determinação do ponto isoelétrico das β -lactamases

A focalização do ponto isoeletrico (pI) é a etapa inicial na identificação de quantas e quais possíveis β -lactamases são produzidas por uma amostra bacteriana.

Foram determinados os pIs das enzimas produzidas pelas 24 enterobactérias ESBL do estudo. Após o isolamento da amostra bacteriana em ágar sangue, aproximadamente 10 colônias foram semeadas em 10 mL de caldo BHI (Difco). Após incubação a 37°C durante 24 horas com agitação constante, foram transferidos 0,5 mL da suspensão bacteriana para um novo tubo contendo 9,5 mL de BHI. Esta nova suspensão foi incubada a 37°C durante 4 a 5 horas. Após 15 minutos de centrifugação a 4.000 rpm, o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e desprezado. O precipitado de células bacterianas foi suspenso em 250 μ L de uma solução de acetato de sódio esterilizada 0,2 M pH 5,5, e transferido para um novo tubo tipo “eppendorf”. Logo em seguida, os tubos foram colocados em gelo seco e banho de água a 37°C, deixando 3 minutos em cada estágio para completa lise das células bacterianas. Este processo, de submeter a suspensão bacteriana a diferenças bruscas de temperatura, foi repetido por 4 vezes. Após esse procedimento, as enterobactérias foram mantidas no gelo por 30 minutos e, durante este período, agitadas vigorosamente por duas vezes (nos minutos 10 e 20). Após 15 minutos de centrifugação (9.000 rpm) a 5°C, o sobrenadante foi retirado e colocado em um novo tubo, no qual foram adicionados 250 μ L de água esterilizada para cada enterobactéria. Os extratos enzimáticos foram mantidos em freezer a -20°C até o momento do uso.

Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (Ampholine pH 3,5 - 9,5, Amershan Biociences) destes extratos enzimáticos. As condições de corrida foram

1500 volts, 50 mA, 30 wats, à temperatura de 10° C. O tempo de corrida foi de 2 horas (WESTERMEIER et al., 2001)

Após a corrida eletroforética em Multiphor 3501 (Amershan Biosciences), o gel foi corado com nitrocefina 500 mM (Oxoid), revelador das bandas de β -lactamases. De acordo com a distância percorrida por cada banda no gel de poliacrilamida, foram calculados os pls do extrato enzimático submetido à eletroforese em relação aos controles aplicados no mesmo gel. A extração e a corrida eletroforética das β -lactamases das linhagens-controle (Tabela 1) foi realizada concomitante à extração de amostras teste.

3.6.3. Detecção de genes de β -lactamase

Os genes β , β -M e β -M presentes nas linhagens foram detectados por PCR utilizando *primers* específicos (Tabela 5). Os *primers* CTXMA1 e CTXMA2 são degenerados, capazes de alinhar e amplificar fragmentos internos de 550 pb específicos dos genes β -M que codificam enzimas dos grupos CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-9. Para determinar a qual grupo pertence o gene β -M, foram utilizados pares de *primers* específicos de cada grupo: M2A e M2B, M9A e TOHO2b rev, M1f e M1r. A presença de genes dos grupos CTX-M-8 e CTX-M-25 foi investigada utilizando os *primers* M825F e M8258R. Os *primers* utilizados para amplificar β e β -se anelam em regiões constantes para cada família. Para amplificação de cada gene de resistência, foram utilizadas as condições de PCR descritas no item 3.4.3. A amplificação de todos os genes foi realizada com as seguintes etapas: 10 minutos a 95°C, 35 ciclos de amplificação com 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C e, finalmente, 10 minutos a 72 °C, como extensão final.

Tabela 5 - *Primers* utilizados na detecção de genes de ESBL

PRIMER	SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS 5'-3'	LOCALIZAÇÃO
CTXMA1	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	gene β -M
CTXMA2	CCGCRATATGRTTGGTGGTG	gene β -M
CTXM1f	GACGATGTCACTGGCTGAGC	grupo CTX-M-1
CTXM1r	AGCCGCCGACGCTAATACA	grupo CTX-M-1
CTXM2A	GCCGCTCAATGTTAACGG	grupo CTX-M-2
CTXM2B	GAAACCGTGGGTTACGAT	grupo CTX-M-2
CTXM9A	CTGATGTAACACGGATTGAC	grupo CTX-M-9
TOHO2b rev	TTACAGCCCTTCGGCGAT	grupo CTX-M-9
TEM α	GAGTATTCAACATTTCCGTGT	gene
TEM β	TAATCAGTGAGGCACCTATCT	gene
SHVA	ATGCGTTATTTGCGCTGTGT	gene
SHVB	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	gene
CTX825F	CGCTTTGCCATGTGCAGCACC	gene β -M-8
CTX825R	GCTCAGTACGATCGAGCC	gene β -M-8

3.6.4. Caracterização da localização genética do determinante β -M

O gene β -M pode se apresentar localizado em um integron classe I de estrutura variável de forma similar ao gene *qnr*, adjacente ao elemento *ISCR1*. Neste caso, o *primer* M2A5f (localizado na região *ISCR1* dos integrons de classe 1) e o *primer* M2A3r (*primer* consenso para todos os grupos de CTX-M) foram utilizados para amplificar o fragmento de tamanho variável entre esses dois elementos (Tabela 6). Foram ainda utilizados os *primers* M2A4f e *qacED1r* para amplificar a seqüência localizada posteriormente ao β -M.

Tabela 6 - *Primers* utilizados na caracterização da localização genética de β -M

PRIMER	SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS 5'- 3'	LOCALIZAÇÃO
ISEcpPROM+	TGCTCTGTGGATAACTTGC	<i>ISEcp1</i>
M2A3r	ACCTTACTGGTACTGCACAT	β -M-2 gene
M2A5f	CCAAATCGAACCTTATTAGAGC	Orf513
M2A4f	CACAGTTGGTGACGTGGCTTAA	β -M-2 gene
<i>qacED1r</i>	CCTCCATGATACCGAGTGAGAA	Orf3
IS903bint	GCTTTTGGACTTTCCAACGCGC	ÍS903B transposase

Para verificar a possível associação do gene β -M com uma sequência de inserção *ISEcp1* foram utilizados os *primers* ISEcpPROM+ e TOHO2b rev (Tabela 5 e 6) que amplificaram um fragmento correspondente à região *ISEcp1*, que antecede o gene β -M. (ECKERT; GAUTIER; ARLET, 2006). Foram ainda utilizados os *primers* M9A e IS903bint (Tabela 5 e 6) para amplificar a sequência localizada posteriormente ao β -M.

3.7. Transferência de genes plasmideais de resistência

Os experimentos de conjugação foram realizados em caldo Luria Bertani (LB) utilizando *E. coli* como bactéria receptora. Culturas de células doadoras e receptoras foram adicionadas, em fase logarítmica de crescimento (0,5 mL de cada), a 4 mL de LB e incubadas a 37°C sem agitação. Os transconjugantes contendo os genes de resistência estudados, como *qnr* e β -M, foram selecionados em TSA contendo azida sódica (100 µg/mL) e ácido nalidíxico (6 µg/mL) ou cefotaxima (2 µg/mL), respectivamente. Quanto aos plasmídeos considerados não conjugativos, sua transferência foi realizada por eletroporação, utilizando *E. coli* TOP10 como receptora. Para a seleção de transconjugantes ou células recombinantes contendo os genes *qnr* e β -M, placas de TSA contendo o antibiótico ácido nalidixico (3 µg/mL) e cefotaxima (2 µg/mL) foram utilizadas, respectivamente. As colônias transconjugantes foram testadas e confirmadas por PCR.

3.8. Extração de plasmídeos e hibridação

A extração de plasmídeos das bactérias e seus transconjugantes ou células recombinantes obtidas por conjugação ou eletroporação contendo os genes *qnr* ou *qnr_M* foi realizada segundo a técnica de Kieser (KIESER et al., 1984).

Várias colônias de cada bactéria testada foram suspensas e homogeneizadas em 500 µL de solução de Kieser (sacarose 0,3 M, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA- 25 mM pH 8,0, verde de bromocresol 0,02%) adicionados previamente em tubos “eppendorf”. Nesta suspensão, foram adicionados 250 µL de solução de lise (SDS 2%, NaOH 0,3N) preparada no momento do uso. Os tubos foram incubados a 55°C em banho de água durante 30 minutos. Após essa incubação, os tubos foram deixados em gelo durante 5 minutos. Foram adicionados, então, 250 µL de fenol -clorofórmio ácido preparado previamente. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm, a 4°C durante 12 minutos. O sobrenadante foi retirado e 20 µL deste, utilizado em gel de agarose 0,7% em TBE para análise. As condições utilizadas na corrida eletroforética foram: 60 volts durante os primeiros 15 minutos e 95 volts durante 4 horas. O gel foi corado em brometo de etídeo 0,5 mg/L em TBE durante 30 minutos e visualizado em luz UV. A linhagem *E. coli* V517 e *E. coli* 50192 foram utilizadas como padrões por conter plasmídeos com tamanhos pré-definidos. Foi calculado o tamanho do plasmídeo presente na linhagem bacteriana pela comparação com a medida da distância de migração de bandas em relação ao padrão, após o gel ser fotografado.

Após purificação, desnaturação e neutralização do DNA presente em cada gel, o DNA plasmideal foi transferido para uma membrana Hybond-N⁺ (Amersham Bioscience). A membrana contendo o DNA plasmideal foi submetida à reação de hibridização com sonda específica para cada gene, construída a partir do produto do

PCR realizado com DNA extraído do controle positivo do respectivo gene estudado, como anteriormente descrito no item 3.5.2.

3.9. Eletroforese de campo pulsado

A eletroforese de campo pulsado (PFGE) foi realizada segundo Gauton (1997) usando fonte EPS600 e aparelho Gene Navigator (Pharmacia).

Uma colônia de cada amostra foi inoculada em 5 mL de caldo BHI e incubada a 37°C durante 24 horas. Uma alíquota de 1,5 mL da cultura foi adicionada em tubo tipo “eppendorf” e centrifugada por 2 minutos, a 12.000 rpm, a 4°C. As células bacterianas foram lavadas com 500 µL da solução de suspensão (10 mM Tris, 1,0 M NaCl), novamente centrifugadas, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi suspenso em 200 µL de solução de suspensão, e 150 µL foram transferidos para um novo tubo colocado em banho de água por 5 a 10 minutos para manter a temperatura em 48°C. Em seguida, 150 µL de agarose (1,5% Agarose Ultra Pure) foram rapidamente adicionados a este mesmo tubo. Os discos de agarose foram feitos e colocados em tubos contendo solução de lise (6 mM Tris, pH 8,0; 1 M NaCl; 100 mM EDTA; 0,5% laurylsarcosil Na) acrescentado RNase a uma concentração final de 20 µg/mL; foram incubados por 4 a 5 horas a 37°C. Ao final deste período, a solução tamponante foi retirada e foi adicionada a solução ES (EDTA pH 9; sarcosil 1%) acrescida de 1 mg/mL de proteinase K e os tubos foram incubados a 50°C por 18 a 20 horas. Os discos de agarose foram lavados cinco vezes com 13 mL da solução TE 1X (10 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0), com intervalo de 30 minutos para cada lavagem. Um único disco foi colocado em 100 µL de solução tamponante 1X concentrada e deixado a 37°C por 30 minutos. Em seguida, essa solução foi retirada e foi adicionada solução preparada no momento

do uso e também 30 U de enzima de restrição *Xba*I. A incubação foi realizada em banho de água a 37°C durante 18 a 20 horas.

Foram preparados 150 mL de gel 1% (Agarose ultra purê, Gibco BRL) em TBE 0,5X (0,89 M Tris; 0,89 ácido bórico; 0,25 M EDTA, pH 8,0). A eletroforese foi realizada com solução de TBE 0,5X à temperatura de 14°C por 25 horas, sendo que os pulsos utilizados foram, 5 segundos por 3 horas, 9 segundos por 5 horas, 12 segundos por 5 horas, 20 segundos por 4 horas, 25 segundos por 3 horas e 30 segundos por 3 horas, totalizando 22 horas (HAGMAN; KÜHN, 2002). O gel foi corado com brometo de etídio a 1 µg/mL por 30 minutos, descorados por mais 30 minutos e fotografados.

Os perfis eletroforéticos foram analisados visualmente pela comparação dos fragmentos de DNA de cada linhagem estudada, sendo que foi considerado o número e o tamanho aparente dos fragmentos. Os critérios para definição dos perfis genéticos foram definidos por Tenover e colaboradores (TENOVER et al., 1995). Pela comparação das bandas no gel, as enterobactérias que apresentaram o mesmo perfil eletroforético, ou seja, percentagens de similaridade igual a 100%, foram consideradas da mesma linhagem. Quando ocorreram 2 a 3 bandas de diferença em uma linhagem quando comparada à predominante, esta foi considerada intimamente relacionada. Diferenças de 4 e 6 bandas em relação à linhagem predominante, permitiu classificar a linhagem como possivelmente relacionada. Quando houve uma diferença maior ou igual a 7 bandas, as linhagens foram consideradas diferentes. As linhagens com os mesmos tipos genéticos foram denominadas arbitrariamente com letras maiúsculas (A, B, C, D) e os subtipos genéticos foram seguidos de números (A1, A2, A3). A análise dos RFLPs, do inglês, “*restriction fragment length polymorphism*”, obtidos pela macrorestrição do crDNA com a enzima *Xba*I após

PFGE, foi realizada pelo programa de computação “*Multi Variate Statistical Package*” (MVSP) aplicando-se o método “*Unweighted Pair Group Using Mathematical Average Taxonomy*”, UPGMA, o que gerou dendogramas mostrando a percentagem de similaridade genética entre as enterobactérias estudadas.

3.10. Análise da impermeabilidade da membrana celular bacteriana

3.10.1. Análise das proteínas de membrana externa

Após o isolamento em ágar sangue de 9 *E. coli*, 20 colônias de cada enterobactéria foram suspensas em, aproximadamente, 5 mL de BHI (Brain Heart Infusion) acrescido de antibiótico. Os tubos foram incubados durante 18 horas em estufa a 37°C sob agitação constante. Após o crescimento da bactéria, foram transferidos 5 mL da suspensão em BHI para um novo frasco contendo 45 mL do mesmo meio de cultura. Este volume final foi dividido em 2 frascos e novamente incubados durante 4 a 5 horas a 37°C sob agitação. Em seguida, este conteúdo foi transferido para tubos tipo “Falcon” de 50 mL e centrifugado durante 20 minutos a 4.000 rpm em centrífuga Beckman GS-15R. O sobrenadante foi aspirado e descartado, e o precipitado suspenso em 5 mL de Tris 30 mM pH8.0. Após agitação enérgica dos tubos, o precipitado foi mantido em gelo até o momento da sonicação e durante todo esse processo. Como parâmetros para sonicação, para cada sobrenadante foram utilizados pulsos de 2 segundos a 80 volts durante 5 minutos. Esse processo foi repetido 3 vezes para cada suspensão bacteriana. Em seguida, os extratos foram transferidos para 2 tubos “eppendorf” de 1,5 mL e centrifugados por 20 minutos a 8.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e transferido para tubo Ti 70.1, tubos específicos utilizados em ultracentrífuga. Os tubos contendo o extrato bruto protéico foram centrifugados durante 34 minutos, a 38.000 rpm a 4°C em

ultracentrífuga, para que ocorra a precipitação das proteínas de membrana externa. Após o descarte do sobrenadante, cada precipitado foi suspenso em 1 mL de Tris 30 mM pH 8,0, com a adição posterior de 100 µL de sarcosil 20%. Após o preparo e montagem do sistema de gel de poliacrilamida, em tubos “eppendorf” pequenos, 20 µL do extrato protéico e 20 µL de tampão de amostra foram adicionados ao tubo, os quais foram fervidos durante 20 minutos. Foram aplicados 20 µL de cada amostra no gel, sendo que nos primeiros poços, foram adicionados os padrões de baixo peso molecular (6,5 a 66 mDA) e de alto peso molecular (36 a 205 mDA). A corrida eletroforética foi realizada em 60 mA e 200 volts durante 40 minutos. A coloração do gel foi feita com “commassie blue” (Sigma) durante 1 hora. O perfil de proteínas obtido das amostras clínicas do estudo foi comparado com o perfil protéico de bactérias sensíveis de mesma espécie.

Resultados e Discussão

- Características fenotípicas das enterobactérias
 - Caracterização dos mecanismos de resistência às quinolonas
 - Caracterização dos determinantes plasmídeos de resistência aos β -lactâmicos
-

4.1. Características fenotípicas das enterobactérias

4.1.1. Frequência das espécies bacterianas

No período de coleta das enterobactérias, de janeiro de 2000 a fevereiro de 2005, foi coletado um total de 257 enterobactérias resistentes ao ácido nalidíxico isoladas de material clínico de pacientes hospitalizados e da comunidade nos estados de Minas Gerais e São Paulo. De acordo com a Figura 6, desse total, 199 (77%) são *E. coli*, 27 (11%) *K. pneumoniae*, 12 (5%) *K. oxytoca*, 3 (1%) *P. mirabilis*, 6 (2%) *E. cloacae*, 2 (1%) *S. marcescens*, 2 (1%) *E. aerogenes*, 2 (1%) *C. freundii*, e 1 (0,3%) isolado de cada espécie bacteriana *M. morganii*, *P. stuartii*, *P. vulgaris* e *Providencia* sp.

Figura 6. Percentagem das principais espécies de enterobactérias isoladas no período do estudo

A maioria das enterobactérias (94%) foi isolada de infecções do trato urinário (ITU), sendo 199 (77%) isolados de *E. coli*, a espécie mais prevalente isolada causando ITU.

4.1.2. Avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos

No Apêndice 1, estão demonstradas as CIM de cada antimicrobiano testado e os dados relativos a cada enterobactéria estudada.

De acordo com os limites propostos pelo CLSI para a técnica de diluição em ágar, todas as enterobactérias foram resistentes ao ácido nalidíxico, enquanto 184 (71,6%) e 187 (72,7%) apresentaram diminuição de sensibilidade à ciprofloxacina e norfloxacina, respectivamente. Em relação à ofloxacina, 187 (72,7%) enterobactérias apresentaram redução de sensibilidade, enquanto 179 (69,6%) mostraram diminuição de sensibilidade à levofloxacina. Cinquenta e oito enterobactérias (22,5%) apresentaram diminuição de sensibilidade aos antibióticos β -lactâmicos ceftazidima e/ou cefotaxima ($MIC \geq 2 \mu g/mL$). Desta maneira, tais enterobactérias foram consideradas possíveis produtoras de ESBL. A relação entre o número de enterobactérias e as concentrações testadas de cada antibiótico da classe das quinolonas está representada na Figura 7.

Figura 7. Relação entre o número de enterobactérias e as concentrações inibitórias mínimas de cada quinolona testada

Na Figura 8, a relação entre o número de enterobactérias e as concentrações testadas para cada cefalosporina está demonstrada.

Figura 8. Relação entre o número de enterobactérias e as concentrações inibitórias mínimas para cada cefalosporina testada

Todas enterobactérias apresentaram CIM superior a 16 µg/mL para o ácido nalidíxico, sendo que mais de 91% apresentaram CIM maior que 128 µg/mL. Setenta e dois por cento das enterobactérias apresentaram CIM superior a 2 µg/mL para ciprofloxacina e/ou 8 µg/mL para o antibiótico norfloxacina, ou seja diminuição de sensibilidade às fluoroquinolonas. Em relação à ofloxacina, 72% das enterobactérias apresentaram CIM com valores entre 4 e 128 µg/mL e 63% apresentaram CIM entre 4 e 32 µg/mL para levofloxacina.

Em termos gerais, a proporção de *E. coli* resistente às fluoroquinolonas foi maior em relação às outras espécies isoladas, desconsiderando que esta espécie foi isolada em 77% dos casos de ITU. Estes resultados são considerados mais expressivos quando comparados com um estudo realizado na Turquia, no qual foram avaliadas 258 *E. coli* e 50 *K. pneumoniae* isoladas de urina de pacientes da comunidade em 2001 (TOLUN et al., 2004). Nesse estudo, 50% das amostras apresentaram resistência à ciprofloxacina, sendo que esta característica foi detectada em maior número em amostras de *E. coli* (53,1%) que em *K. pneumoniae* (34%) (TOLUN et al., 2004), o que pode ser explicado pela diferença no número total de espécies avaliadas.

Recentemente, a resistência às cefalosporinas de terceira geração mediada pela produção de ESBL tem se tornado um grave problema, principalmente entre as espécies *E. coli* e *Klebsiella* spp. As fluoroquinolonas podem ser utilizadas efetivamente para combater infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBL. Portanto, o aparecimento da resistência às fluoroquinolonas em enterobactérias produtoras de ESBL, poderia marcadamente restringir as opções terapêuticas. No presente trabalho, em relação às cefalosporinas testadas, aproximadamente 83% das enterobactérias apresentaram valores de CIM entre 4 e

32 µg/mL para cefoxitina. Vinte e dois por cento das enterobactérias apresentaram CIM $\geq$ 2 µg/mL para ceftazidima e/ou cefotaxima, sendo consideradas possíveis produtoras de ESBL de acordo com os limites estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2006).

Após a análise da CIM para os antimicrobianos testados, as enterobactérias foram separadas em grupos, que varia do grupo 1 ao grupo 12 (Apêndice 1). O Grupo 3 apresentou maior número de enterobactérias (n=103), apresentando somente resistência à ciprofloxacina. Nos Grupos 1 e 11 foram incluídas 30 e 53 enterobactérias, respectivamente, sendo que o Grupo 1 apresentou diminuição da sensibilidade à ciprofloxacina, cefoxitina, cefotaxima e/ou ceftazidima e o Grupo 11 apresentou sensibilidade a estes antibióticos. Vinte e oito enterobactérias foram classificadas no Grupo 4 por apresentarem resistência à ciprofloxacina e diminuição da sensibilidade à cefoxitina. O Grupo 2 apresentou 18 enterobactérias incluídas e o Grupo 9, 6 enterobactérias. Finalmente, os Grupos 7, 10 e 12 apresentaram, respectivamente, 5, 4 e 10 enterobactérias. As enterobactérias que apresentaram sensibilidade intermediária à ciprofloxacina, não apresentaram diminuição de sensibilidade a nenhuma cefalosporina testada. Portanto, não há nenhuma enterobactéria incluída nos Grupos 5, 6, 8.

4.2. Caracterização dos mecanismos de resistência às quinolonas

4.2.1. Detecção do determinante QnrA

A presença do gene *qnrA* foi investigada pelo método de hibridização em colônia e confirmada por PCR. De 257 enterobactérias resistentes ao ácido nalidíxico, em uma linhagem de *Enterobacter cloacae* (0,37%) foi encontrado o gene *qnrA* (MINARINI; GALES; DARINI, 2007). Esta enterobactéria, *E. cloacae* JF277, foi isolada da secreção de coto de amputação após uma cirurgia vascular, em janeiro

de 2005, de um paciente do sexo masculino com 62 anos de idade e diabético. Neste mesmo local de infecção foi isolado, concomitantemente, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e às quinolonas testadas. O teste de sensibilidade aos antibióticos, realizado por disco difusão, revelou que *E. cloacae* apresentou resistência à amoxicilina acrescida de ácido clavulânico, à cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima e ao ácido nalidíxico. Apresentou ainda sinergismo entre as cefalosporinas ceftazidima, cefotaxima e cefpodoxima e o ácido clavulânico, resultado consistente com a produção de ESBL.

Este foi o primeiro relato de *qnrA* encontrado em enterobactéria isolada de paciente no Brasil. Apesar de ser considerado um importante encontro, a prevalência de *qnrA* foi considerada baixa em relação a outros estudos realizados em países asiáticos, na Europa e Estados Unidos. Em 2005, Corkill e colaboradores detectaram a presença do gene *qnrA* em 32% das enterobactérias resistentes à ciprofloxacina estudadas no Reino Unido. Nos Estados Unidos, essa percentagem foi menor, em torno de 10 e 11% (WANG et al., 2004; ROBICSEK et al., 2005) e na China, 7,7% (WANG et al., 2003). Em termos gerais, a freqüência de determinantes de resistência do tipo Qnr tem sido considerada baixa entre amostras clínicas bacterianas (MAMMERI et al., 2005), porém há vários relatos pontuais de sua detecção, com exceção de um único surto nosocomial causado por *E. cloacae qnrA* na Holanda (PAAUW et al., 2006).

A conjugação, utilizando *E. coli* J53 resistente à azida sódica como linhagem receptora, foi realizada para determinar se o plasmídeo que contém o gene *qnrA* é conjugativo. Os transconjugantes foram selecionados com ceftazidima (2 µg/mL) e azida sódica (100 µg/mL) e testados individualmente, por PCR, utilizando *primers* específicos para o gene. A freqüência da conjugação (número de transconjugantes /

número de células doadoras) foi, aproximadamente, 8×10^{-2} . A análise do perfil plasmideal das células doadoras e transconjugantes identificou um plasmídeo de 180 kb que, após transferência para uma membrana, hibridizou com a sonda específica para *qnrA*. A análise do gel de eletroforese de campo pulsado demonstrou que a célula receptora e a transconjugante, obtida após conjugação, exibiram perfis similares, exceto em relação a um único fragmento compatível com o plasmídeo que continha o gene *qnrA*, que foi transferido na conjugação (Figura 9).

Figura 9. (A) Padrões de macrorestrição de crDNA obtidos por PFGE após digestão do DNA genômico das enterobactérias com enzima de restrição *Xba*I. Canaletas de 1-4: M, marcador (concatâmeros do fago λ), controle positivo *qnrA*, linhagem *E. cloacae* JF277, linhagem *E. coli* J53 e transconjugante, respectivamente; (B) Membrana após hibridação com sonda *qnrA*. Canaletas de 1-3: linhagem doadora *E. cloacae* JF277, linhagem receptora *E. coli* J53 e transconjugante.

O perfil de sensibilidade das linhagens *E. cloacae* JF277, da receptora *E. coli* J53 e do transconjugante foi determinado por diluição em ágar e os resultados foram analisados de acordo com o CLSI (CLSI, 2006). As concentrações inibitórias mínimas foram apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7- Perfil de sensibilidade das linhagens *E. cloacae* JF277, *E. coli* J53 e transconjugante

LINHAGEM	CIM (µg/mL)*												
	CTX	CTX/AC	CAZ	FEP	FOX	NAL	CIP	NOR	OFL	LVX	GAT	MOX	IMP
<i>E. coli</i> J53	<0,125	0,125	0,062	0,03	2	4	<0,03	0,03	0,03	<0,03	< 0,016	<0,016	0,062
<i>E. cloacae</i> JF277	128	64	128	2	>256	128	2	2	2	1	0,25	1	0,25
Transconjugante	128	0,125	8	<0,5	4	128	0,125	0,5	0,5	0,25	0,125	0,25	0,25

* CTX, cefotaxima; CTX/AC, cefotaxima / ácido clavulânico; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; FOX, cefoxitina; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; OFL, ofloxacina; LVX, levofloxacina; GAT, gatifloxacina; MOX, moxifloxacina; IMP, imipenem.

A resistência ao ácido nalidíxico e cefotaxima foi transferida por conjugação. A CIM do transconjugante para o antibiótico ácido nalidíxico aumentou de 4 para 128 µg/mL devido à transferência do plasmídeo contendo o gene *qnrA*. Entretanto, a CIM para ciprofloxacina foi 0,125 µg/mL, valor considerado 4 vezes maior em relação à CIM de *E. coli* J53 para o mesmo antibiótico. A presença do gene *qnrA* foi ainda responsável pelo aumento da CIM para os antibióticos norfloxacina, ofloxacina, e levofloxacina. A resistência aos outros agentes antimicrobianos, exceto cefoxitina, foi transferida com o plasmídeo. Os valores da CIM para *E. cloacae* JF277 e transconjugante obtidos para o antibiótico imipenem mantiveram-se uniformes (0,25 µg/mL) e o perfil de sensibilidade para as cefalosporinas de 3ª geração correspondeu à expressão de ESBL. Pôde-se notar ainda que, a visualização desta expressão foi prejudicada, em parte, pela presença da produção intrínseca da enzima AmpC pela linhagem *E. cloacae* JF277. O ácido clavulânico acrescido ao antibiótico cefotaxima pouco inibiu a expressão da enzima ESBL na linhagem doadora devido à expressão de AmpC na mesma célula. Porém, essa inibição foi notavelmente observada no transconjugante, sabendo-se que a CIM para cefotaxima/ácido clavulânico diminuiu de 64 para 0,125 µg/mL nesta linhagem.

Os extratos de β -lactamase obtidos destas linhagens foram submetidos à técnica de focalização isoelétrica para determinação do ponto isoelétrico das enzimas produzidas. A análise demonstrou que, nas linhagens doadora *E. cloacae* JF277 e transconjugante, foram visualizadas duas bandas de pI, 5,4 e 8,2. Adicionalmente, pôde-se ainda visualizar uma banda de 9,0 correspondente a produção de AmpC na linhagem *E. cloacae* JF277. Com os resultados do seqüenciamento, os genes responsáveis pela produção destas enzimas foram identificados como β -1 e β -5, porém não se encontram localizados no mesmo integron que contém o gene *qnr*. Esta observação indica que a co-localização do gene *qnrA* e genes que codificam ESBL em um mesmo plasmídeo provavelmente resultou de eventos genéticos não relacionados.

Em outros estudos, QnrA foi identificada em enterobactérias produtoras de CTX-M-1 e M-15 (LAVIGNE et al., 2006), CTX-M-9 e SHV-7 (WANG et al., 2004), SHV-5 (NAZIC; POIREL; NORDMANN, 2005), cefalosporinases plasmídeais FOX-5 (MARTINEZ-MARTINEZ; PASCUAL; JACOBY, 1998; WANG et al., 2004) e carbapenemases plasmídeais OXA-48 (NAZIC; POIREL; NORDMANN, 2005) e IMP-8 (CHU et al., 2006).

Com o objetivo de se avaliar o envolvimento de mutações na região QRDR dos genes *gyrA* e *parC*, foi realizado o seqüenciamento dessas regiões determinantes. Nenhuma alteração de aminoácido em QRDR, em ambos os genes foi observada, embora algumas substituições de nucleotídeos tenham sido identificadas. No gene *parC*, houve alterações nos códons 70Val (GTA→GTG), 72Gly (GGT→GGG), 74Tyr (TAT→TAC) e 78Gly (GGC→GGT). Em *gyrA*, houve alterações nos códons 73Ile (ATC→ATT) e 74Val (GTT→GTC).

O gene *qnrA* foi seqüenciado e sua seqüência de nucleotídeos foi idêntica àquela encontrada em uma linhagem de *K. pneumoniae*, originalmente descrita e reportada por Martinez-Martinez e colaboradores (1998) como gene *qnrA1*. A análise da estrutura genética indicou que este determinante *qnrA1* está inserido em um integron classe 1 e localizado entre as duas regiões conservadas 3'CS, entre o elemento *ISCR1*, que abriga o gene *orf513*, e o gene *ampR*, um regulador da expressão de *ampC* (Figura 10). Entre o segmento conservado 5'CS e a primeira cópia da região 3'CS, foi encontrado somente um gene cassette, o gene *aadA2*, responsável pela diminuição da sensibilidade aos aminoglicosídeos. Isto diferencia o integron analisado no presente estudo daqueles previamente reportados. A estrutura de um integron, conhecido como In36, encontrado em *E. coli* isolada na China continha 2 genes de resistência entre 5'CS e 3'CS, os genes *dfr16* e *aadA2* (Figura 10) (WANG et al., 2003).

Figura 10. Representação esquemática do integron classe 1 que contém o gene *qnrA*. (A) Estrutura do integron In36 encontrado em *E. coli* (WANG et al., 2003). (B) Estrutura do integron classe 1 contendo o gene *qnrA1* encontrado em *E. cloacae* JF277. Os genes, ORFs e suas direções de transcrição estão representadas pelas setas e os retângulos em preto correspondem aos sítios *attC* (59-be).

4.2.2. Detecção dos determinantes QnrB e QnrS

A detecção dos genes *qnrB* e *qnrS* foi realizada pela técnica multiplex PCR Qnr (CATTOIR et al., 2007b). De 257 enterobactérias resistentes ao ácido nalidíxico, em seis enterobactérias (2,3%), incluindo 3 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae* e 1 *C. freundii* foi encontrado o gene *qnrB*. Essas enterobactérias foram isoladas de infecções do trato urinário, nos anos de 2003 a 2005, de pacientes da comunidade em Juiz de Fora, MG. Cinco linhagens apresentaram seqüências idênticas ao gene *qnrB2* e uma linhagem, *C. freundii* JF79, apresentou a seqüência do gene *qnr* idêntica ao gene *qnrB8* (número de acesso EF576718). Esta única linhagem *qnrB8* (*C. freundii* JF79) foi detectada em 2003, 3 linhagens *qnrB2* (*E. coli* JF113, *K. pneumoniae* JF230 e *K. pneumoniae* JF234) em 2004 e outras duas *qnrB2* em 2005 (*E. coli* JF342 e *E. coli* JF371). Assim, o determinante QnrB2 foi o mais freqüente detectado. Nenhuma linhagem contendo determinantes Qnr foi identificada de 2000 a 2002. Em adição, não foi identificada nenhuma linhagem *qnrS* nas enterobactérias avaliadas.

Este foi o primeiro relato de determinantes QnrB entre linhagens isoladas na América Latina, sendo encontrados em enterobactérias isoladas de pacientes da comunidade (MINARINI et al., em publicação) . Recentemente, esses determinantes foram identificados, como casos isolados, na Coréia (PAI et al., 2007), Kuwait (CATTOIR et al., 2007b), França (CATTOIR et al., 2007a), Suíça (VELDMAN; PELT; MEVIUS, 2008) e Taiwan (WU et al., 2007). O encontro de genes *qnrB* parece ser mais restritiva a alguns países, enquanto que os genes *qnrS* e *qnrA* já foram identificados em todos continentes.

A prevalência de determinantes QnrB foi considerada baixa no Brasil, e não apresentou um aumento significativo durante o período estudado. Estes dados são coerentes com aqueles obtidos em um recente estudo conduzido por Cattoir et al.

(2007b), de 2002 a 2004, que reportou somente 3 em 64 enterobactérias produtoras de ESBL provenientes do Kuwait contendo o determinante QnrB.

O teste de sensibilidade aos antibióticos realizado por disco difusão revelou que as linhagens QnrB do estudo apresentaram resistência à amoxicilina, ticarcilina, gentamicina, e ao ácido nalidíxico e demonstraram sensibilidade à amoxicilina acrescida de ácido clavulânico e às cefalosporinas de amplo espectro, exceto *K. pneumoniae* JF230, que foi resistente à cefotaxima e cefepime. Esta linhagem apresentou ainda sinergismo entre as cefalosporinas ceftazidima, cefotaxima e cefpodoxima e o ácido clavulânico, resultado consistente com a produção de ESBL. *C. freundii* JF79 e *E. coli* JF113 foram sensíveis às fluoroquinolonas, de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI, porém todas as linhagens *qnrB2* apresentaram CIM $\geq 0,5$ µg/mL para ciprofloxacina e/ou CIM ≥ 48 µg/mL para ácido nalidíxico (Tabela 8).

Em uma das seis linhagens *qnrB*, *K. pneumoniae* JF230, houve a associação de mecanismos de resistência plasmideais de resistência às quinolonas e às cefalosporinas de amplo espectro, havendo a produção de CTX-M-2. Os determinantes do tipo QnrB já foram encontrados em enterobactérias produtoras de CTX-M-15, SHV-12 e SHV-30 (JACOBY et al., 2006; GARNIER et al., 2006; GAY et al., 2006).

A análise plasmideal das linhagens QnrB demonstrou a presença de plasmídeos que apresentaram de 7 a 154 kb, em tamanho, e três a sete plasmídeos em cada linhagem (Figura 13).

Figura 11. Perfil plasmideal das linhagens *qnrB* após eletroforese em gel de agarose 0,7%. A, *E. coli* 50192 (linhagem padrão). Canaletas de 1 a 6: *E. coli* JF113, *E. coli* JF342, *C. freundii* JF79, *K. pneumoniae* JF234, *E. coli* JF371, *K. pneumoniae* JF230.

Os plasmídeos carreando determinantes QnrB foram transferidos por conjugação em três das seis linhagens estudadas. Os plasmídeos conjugativos *qnrB* de *E. coli* JF113 e *K. pneumoniae* JF234 apresentaram 55 kb e de *E. coli* JF342, 154 kb. As duas linhagens, *E. coli* JF371 e *K. pneumoniae* JF230, apresentaram plasmídeos não transferíveis de 124 e 65 kb (Figura 11). De forma notória, nenhum plasmídeo foi identificado em *C. freundii* JF79, o que sugere uma localização cromossômica do gene *qnrB8* nesta linhagem.

Embora a associação de determinantes Qnr e ESBL tem sido reportada com frequência, os genes *qnrB2* e β -M-2 foram localizados em plasmídeos distintos na linhagem *K. pneumoniae* JF230.

O perfil de sensibilidade das linhagens *qnrB*, *E. coli* J53 e dos transconjugantes e transformantes obtidos foi determinado por Etest e os resultados foram analisados de acordo com o CLSI (CLSI, 2007). Os valores da CIM estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Caracterização das linhagens *qnrB*, de seus transformantes e transconjugantes, e valores da CIM de quinolonas, fluoroquinolonas, gentamicina e ceftazidima

LINHAGEM ^a	DETERMINANTE QNR	DATA DE ISOLAMENTO	TAMANHO DE PLASMÍDEO (KB)	CIM (µg/mL) ^d					
				NAL	OFL	NOR	CIP	GEN	CAZ
<i>C. freundii</i> JF79	QnrB8	05/12/2003		>256	3	1	0,38	0,25	0,75
<i>E. coli</i> JF113	QnrB2	19/02/2004		48	2	1	0,5	0,25	1
Tc 113				24	1	1	0,38	0,25	1
<i>K. pneumoniae</i>	QnrB2	04/10/2004	124	>256	>32	48	>32	0,25	64
Tf 230				48	1	1	0,38	0,25	0,25
<i>K. pneumoniae</i> JF234	QnrB2	13/10/2004		>256	>32	>256	>32	0,25	0,25
Tc 234				16	1,5	1	0,38	0,01	0,25
<i>E. coli</i> JF342	QnrB2	29/09/2005		>256	>32	>256	>32	16	1,5
Tc 342				>16	4	1	0,5	0,5	0,5
<i>E. coli</i> JF371	QnrB2	08/03/2005	65	>256	>32	>256	>32	0,38	0,38
Tf 371				16	1,5	1	0,38	0,25	0,25
<i>E. coli</i> J53				4	0,12	0,25	0,01	0,12	0,01

^a Tc, transconjugante; Tf, transformante;

^b presença de β -M-2;

^c plasmídeos conjugativos;

^d NAL, ácido nalidíxico; OFL, ofloxacina; NOR, norfloxacina; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; CAZ, ceftazidima;

^e ND, não determinado.

As CIM reportadas na Tabela 8 demonstraram que a resistência ao ácido nalidíxico foi transferida por conjugação. As CIM do ácido nalidíxico para os transconjugantes aumentaram de 4 para 24 µg/mL (*E. coli* JF113), 16 µg/mL (*K. pneumoniae* JF234) ou 256 µg/mL (*K. pneumoniae* JF342) devido ao plasmídeo *qnrB* transferido. Em adição, as CIM da ciprofloxacina para os transconjugantes variou entre 0,38 e 0,5 µg/mL, um aumento de 3 a 4 vezes comparado à linhagem *E. coli* J53.

Com o objetivo de se avaliar o envolvimento de mutações na região QRDR dos genes *gyrA* e *parC*, foi realizado o seqüenciamento dessas regiões determinantes. Uma substituição no códon 83 foi detectada em QRDR do gene *gyrA*

nas linhagens *C. freundii* JF79 (Thr83Ile) e *E. coli* JF113 (Ser83Phe). Substituições nos códons 83 e 87 em *gyrA* e no códon 80 em *parC* foram encontradas nas linhagens *K. pneumoniae* JF230, *K. pneumoniae* JF234 (Ser83Phe, Asp87Ala e Ser80Ile), *E. coli* JF371 e *E. coli* JF342 (Ser83Leu, Asp87Asn e Ser80Ile). Estas alterações esclarecem as diferenças dos valores da CIM das quinolonas e fluoroquinolonas encontradas nas linhagens *qnrB*.

A análise da estrutura genética adjacente ao gene *qnrB2* identificou, em sua extremidade 5', um operon *psp* que codifica uma proteína de choque térmico, seguido por uma cópia parcial do segmento conservado 3' de um integron classe 1 (Figura 12). Na extremidade 3' do gene *qnrB2*, um operon *sap*, que codifica uma permease responsável pelo sistema de transporte de peptídeos seguido por um gene envolvido ao sistema de fonte de carbono em *Shigella flexneri* foram identificados. O gene *dfrA25* foi identificado na região de cassetes gênicos em *E. coli* JF113, *E. coli* JF342, *K. pneumoniae* JF230 e *K. pneumoniae* JF234, enquanto que os genes *dfr17* e *aadA5*, que medeiam resistência às sulfonamidas e aos aminoglicosídeos, respectivamente, foram identificados em *E. coli* JF371 (Figura 12). Todas as linhagens *qnrB2* apresentaram um gene para recombinase na sequência que precede o gene *qnrB2*, como reportado por Garnier et al. (2006). O gene *qnrB2* apresentou-se inserido em direção contrária ao gene *orf513* (Figura 12).

Figura 12. Organização das estruturas gênicas adjacentes aos genes *qnrB2* detectados neste estudo.

(A) Integron classe 1 contendo o gene *qnrB2* em *E. coli* JF113, *K. pneumoniae* JF230, *K. pneumoniae* JF234 e *E. coli* JF342; (B) em *E. coli* JF371 (C) integron classe 1 de *S. enterica* serovar Keurmassar descrita anteriormente por Garnier et al. (2006). Os genes, ORFs e suas direções de transcrição estão representadas pelas setas e os retângulos em preto correspondem aos sítios *attC* (59be). *Cs* corresponde ao gene envolvido no sistema de fonte de carbono.

Não foi possível determinar as estruturas adjacentes ao gene *qnrB8* em *C. freundii* JF79. Os experimentos de transformação falharam e não foi possível obter os clones recombinantes após diversas tentativas.

4.2.3. Mutações nos genes cromossômicos *gyrA* e *parC*

Dentre as enterobactérias estudadas, foi realizado seqüenciamento de QRDR dos genes *gyrA* e *parC* de 112 isolados, entre estes, 81 enterobactérias resistentes à ciprofloxacina (CIM ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$), 5 enterobactérias com sensibilidade intermediária (CIM 2 $\mu\text{g/mL}$) e 26 enterobactérias sensíveis à ciprofloxacina. Ou seja, todas as amostras clínicas pertencentes aos grupos 1, 2, 4, 7, 9, 10 e 12 foram

avaliadas em relação à presença de mutações em genes cromossômicos. Ainda, 6 enterobactérias pertencentes ao grupo 3, que apresentou como característica somente a resistência à ciprofloxacina, e 6 enterobactérias pertencentes ao grupo 11 com característica inversa, sensibilidade à ciprofloxacina, foram escolhidas aleatoriamente dentre seus grupos. Na Figura 13, encontra-se a distribuição de espécies bacterianas avaliadas quanto às mutações em *gyrA* e *parC* em relação à sensibilidade à ciprofloxacina.

Figura 13. Número de enterobactérias, divididas por espécies, em relação à variação de sensibilidade à ciprofloxacina

De acordo com Ruiz (2003), as alterações mais comuns que ocorrem em enterobactérias resistentes às quinolonas estão presentes em *GyrA*, no códon 83, seguida pelo códon 87; e em *ParC*, nos códons 80 e 84. O autor ainda científica que

a presença de múltiplas mutações nos genes *gyrA* e *parC* é necessária para que enterobactérias apresentem resistência em altos níveis às fluoroquinolonas (VILA et al., 1994; WEIGEL et al., 1998).

Embora uma diversidade de mutações tenha sido encontrada em GyrA e ParC nas enterobactérias avaliadas neste estudo (Tabela 9 e Apêndice 2), não houve uma clara correlação entre a frequência e a distribuição de cada alteração e os valores da CIM encontrados para fluoroquinolonas encontrados, os quais variaram de 2 a >128 µg/mL para ciprofloxacina, de 4 a 128 µg/mL para ofloxacina e de 2 a 64 µg/mL para levofloxacina.

Nove isolados que apresentaram $CIM \leq 1 \mu\text{g/mL}$ para ciprofloxacina não apresentaram mutações nos genes de topoisomerase. Entretanto, um isolado de *E. cloacae* exibiu diminuição de sensibilidade às fluoroquinolonas (MIC 2 µg/mL) e nenhuma mutação nos genes de topoisomerasas.

A maioria das enterobactérias estudadas (91%) apresentou mutações nos códons 83 e/ou 87 em *gyrA*: Thr83Ile e Asp87Asn (*C. freundii*), Ser83Phe ou Tyr e Asp87Asn ou Ala (*E. cloacae*), Ser83Leu e Asp87Asn, Tyr ou Gly (*E. coli*), Thr83Ile e Asp87Tyr ou His (*K. oxytoca*), Ser83Phe ou Tyr e Asp87Ala ou Tyr (*K. pneumoniae*), Ser83Phe (*P. mirabilis*), Ser83Ile ou Arg e Glu87Gly (*P. stuartii*) e Ser83Ile (*S. marcescens*).

Tabela 9. Valores da CIM para fluoroquinolonas e as mutações detectadas nos genes *gyrA* e *parC* nas enterobactérias avaliadas

ESPÉCIES	NÚMERO DE AMOSTRA	CIM (µg/mL) ^{b, c}				ALTERAÇÃO EM GYRA		ALTERAÇÃO EM PARC		
		CIP	NOR	OFL	LVX					
<i>C. freundii</i>	1	32	64	64	32	Thr83Ile	Asp87Asn			
	1	0,25	0,5	1	0,5	Thr83Ile				
<i>E. aerogenes</i>	1	0,5	1	0,5	0,25					Cys107Trp
<i>E. cloacae</i>	1	16	64	16	8	Ser83Phe	Asp87Asn	Ser80Ile		
	2	32-64	64-128	16-64	8-64	Ser83Phe	Asp87Asn			
	1	64	>128	32	32	Ser83Tyr	Asp87Ala			
	1	0,125	1	2	0,5	----- Nenhuma mutação -----				
	2	1	1	0,5		----- Nenhuma mutação -----				
<i>E. coli</i>	4	32->128	>128	64-128	16-128	Ser83Leu	Asp87Asn	Ser80Ile	Glu84Gly	
	1	32	32	>128	16	Ser83Leu	Asp87Asn	Ser80Ile	Glu84Ala	
	1	16	128	64	32	Ser83Leu	Asp87Asn	Ser80Ile	Glu84Lys	
	1	64	128	128	64	Ser83Leu	Asp87Asn	Ser80Arg		
	31	2->128	8->128	4-128	2-64	Ser83Leu	Asp87Asn	Ser80Ile		
	4	2	4	1-4	1-2	Ser83Leu	Asp87Tyr	Ser80Ile		
	1	1	4	2	1	Ser83Leu	Asp87Gly	Gly78Cys		
	1	8	16	16	8	Ser83Leu	Asp87Gly	Ser80Ile		
	7	8-64	16-128	16-64	4-64	Ser83Leu	Asp87Asn		Glu84Lys	
	1	1	2	4	2	Ser83Leu	Asp87Asn			Cys107Trp
	1	4	8	8	4	Ser83Leu		Ser80Arg		
	3	0,06-1	0,5-4	0,12-4	0,12- 2		Asp87Gly			
	4	0,03-8	0,5-64	0,5-8	0,25-8	Ser83Leu				
	5	0,03-1	0,03-4	0,06-2	0,03-4	----- Nenhuma mutação -----				
<i>K. oxytoca</i>	1	32	64	64	32	Thr83Ile	Asp87Tyr	Ser80Arg	Pro91Ser	
	6	16-32	64-128	16-32	8-16	Thr83Ile	Asp87His	Ser80Ile	Pro91Ser	
	1	32	64	64	32	Thr83Ile	Asp87Tyr		Pro91Ser	
	4	8-16	16-64	8-16	2-8	Thr83Ile	Asp87His	Ser80Ile		
<i>K. pneumoniae</i>	1	16	64	32	16	Ser83Phe	Asp87Ala	Ser80Ile		
	4	4-8	16-64	4-16	4-8	Ser83Ile		Ser80Ile		
	1	128	>128	128	128	Ser83Phe		Ser80Ile		
	8	0,25-4	1-16	1-8	0,5-4	Ser83Phe				
	3	4-8	16-32	4-16	2-8	Ser83Tyr				
	1	1	8	4	2		Asp87Tyr			
	3	0,5-1	0,5-8	0,125-4	0,06-1	----- Nenhuma mutação -----				
<i>P. mirabilis</i>	1	1	8	1	1	Ser83Phe				
<i>P. stuartii</i>	1	64	128	64	128	Ser83Ile	Glu87Gly			
	1	32	>128	16	16	Ser83Arg				
<i>S. marcescens</i>	2	8-16	64-128	16-32	16	Ser83Ile				

^a presença do gene *qnrA*;^b CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; OFL, ofloxacina; LVX, levofloxacina;^c Pontos de corte de sensibilidade (≤ valor) e resistência (≥ valor) definidos pelo CLSI (2006): 4 e 16 µg/mL para norfloxacina, 2 e 8 µg/mL para levofloxacina e ofloxacina, 1 e 4 µg/mL para ciprofloxacina.

Dentre as 48 *E. coli* avaliadas com resistência à ciprofloxacina, foram encontradas alterações nos códons 83Ser, 85Val, 87Asp, 89Ile, 91Arg, 100Tyr e 111Ser em GyrA (Apêndice 2). Uma substituição usual do nucleotídeo C pelo T na

segunda posição do códon 83 resultou na alteração do aminoácido serina por leucina em todas as *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas. Quatro *E. coli* que apresentaram esta única alteração, apresentaram CIM ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ para ciprofloxacina. De acordo com Vila et al. (1999), uma mutação adicional no códon 87 é requerida para que haja resistência às fluoroquinolonas. Condizente com esta afirmativa, os isolados de *E. coli* que apresentaram uma mutação adicional no códon 87, Asp87Asn, como demonstrado em 91,6% das amostras, apresentaram os valores da CIM para ciprofloxacina mais elevados, ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$.

As alterações presentes em *gyrA* nas amostras de *E. coli* avaliadas foram reportadas em dois trabalhos, um deles realizado por Weigel et al. (1998) no qual foi estudado um grande número de enterobactérias resistentes e sensíveis à ciprofloxacina. No trabalho realizado por Lee et al. (2005), a substituição de serina por leucina no códon 83 em *gyrA* foi observada em todas as amostras de *E. coli* isoladas de fezes de frango; e em 60% dessas amostras, foi encontrada uma substituição na posição 87Asp.

Em relação às 4 *E. cloacae* resistentes à ciprofloxacina avaliadas, houve mutações em *gyrA* nos códons 79Pro, 83Ser, 87Asp, 89Ile, 90Val e 95Pro, como anteriormente descrito nos estudos realizados por Deguchi et al. (1997) e Weigel et al. (1998). Observou-se, em 3 enterobactérias, *E. cloacae* JF182, *E. cloacae* JF207 e *E. cloacae* JF216, uma troca de aminoácidos nos códons 83, de Ser→Phe e 87, de Asp→Asn. Em *E. cloacae* 183, foram observadas alterações nos códons 83Ser→Tyr e 87Asp→Ala. Nos códons 79Pro, 89Ile, 90Val e 95Pro, observaram-se apenas trocas de nucleotídeos sem que houvesse alteração do aminoácido.

Somente 1 *C. freundii* resistente à ciprofloxacina, *C. freundii* JF130, foi avaliada quanto à presença de mutações em *gyrA* e *parC*. *C. freundii* JF130 exibiu

uma alteração na posição Thr83Ile na sequência de *gyrA*, como também demonstrado no trabalho de Weigel et al. (1998). Porém, na posição 87Asp houve uma diferença no aminoácido substituído, Asp por Asn ao invés de glicina, o que não tinha sido relatado até o momento. Esta substituição aumentou o valor da CIM das fluoroquinolonas. *C. freundii* JF79 (CIM CIP 0,25 µg/mL) apresentou somente uma alteração em *gyrA*, Thr83Ile. Não foram encontradas alterações em *gyrA* ou *parC* em amostras de *Citrobacter* spp. sensíveis às fluoroquinolonas.

As mesmas alterações encontradas em *gyrA* nas espécies de *Providencia* e *Serratia*, 83Ser→Arg ou Ile ou somente 83Ser→Ile, foram também reportadas no trabalho realizado por Weigel et al. (1998). *P. stuartii* JF29 apresentou somente a alteração no códon 83Ser→Arg. *P. stuartii* JF244 apresentou alteração nos códons 83Ser→Ile e 87Glu→Gly. Os dois isolados resistentes à ciprofloxacina, *S. marcescens* JF271 e *S. marcescens* JF56, apresentaram alteração de aminoácido no códon 83SerIle e somente troca de 1 nucleotídeo no códon 117Ala (GCG→GCC).

Alterações nos códons 78, 80, 84 e 107 foram observadas na QRDR do gene *parC*: Ser80Ile e Glu84Gly, Ala ou Lys, Ser80Arg, Glu84Lys, Gly78Cys, Cys107Trp (*E. coli*), Ser80Ile (*E. cloacae*), Cys107Trp (*E. aerogenes*), Ser80Arg e Pro91Ser, Pro91Ser, Ser80Ile (*K. oxytoca*) e Ser80Ile (*K. pneumoniae*). Analisando os dados da Tabela 9 e Apêndice 3, não há evidências de que estas alterações descritas em *parC* foram responsáveis pela diferença dos valores da CIM para fluoroquinolonas encontrados nos diferentes isolados. Uma nova substituição, Glu por Ala no códon 84 do gene *parC* ainda não reportada, foi demonstrada em uma *E. coli*. O efeito desta alteração (Glu84Ala) em nível de resistência às fluoroquinolonas não foi aparente porque não houve variações significativas nos valores da CIM. As

amostras de *C. freundii*, *P. mirabilis*, *P. stuartii* e *S. marcescens* não apresentaram mutações no gene *parC*. Nas 4 *E. cloacae* avaliadas, todas apresentaram uma mutação em *parC* nos códons 68Gly, 70Val, 74Tyr, 96Arg, 97Tyr, 101Tyr, 102Gly e 108Ala, sem que houvesse alteração do aminoácido codificado. Em *E. cloacae* JF216, além dessas mutações, foi detectada uma alteração do aminoácido no códon 80, Ser→Ile.

Observou-se ainda no presente trabalho que, em 95,8% das amostras de *E. coli* resistentes às fluroquinolonas, mutações em *gyrA* acrescidas de alterações em *parC* estão presentes. É interessante destacar que esta mesma percentagem foi encontrada em um estudo conduzido por Gales e colaboradores (2000) no Brasil. No trabalho realizado por Lee e colaboradores (2005), esta percentagem foi menor, 60,2% de *E. coli* isoladas de frangos apresentaram mutações simultâneas nos genes *gyrA* e *parC* na Coreia.

De acordo com a Tabela 9, 66,6% das amostras de *E. coli* com CIM de ciprofloxacina superior a 4 µg/mL apresentaram as seguintes substituições; Ser83Leu e Asp87Asn em GyrA e Ser80Ile em ParC, enquanto que 6 isolados (9,2%) com CIM de ciprofloxacina superior a 16 µg/mL, apresentaram as substituições Ser83Leu e Asp87Asn em GyrA, e Ser80Ile e Glu84Gly, Ala ou Lys em ParC. Ainda, uma substituição incomum, de serina por arginina no códon 80 no gene *parC*, foi observada em um isolado de *E. coli*. De uma forma geral, em relação à *E. coli*, pode-se afirmar que uma mudança em 83Ser foi suficiente para gerar um alto nível de resistência ao ácido nalidíxico, enquanto que uma segunda alteração em 87Asp em GyrA pode apresentar um papel complementar no desenvolvimento de alto nível de resistência à ciprofloxacina.

Em 3 *E. coli* que apresentaram CIM para ciprofloxacina igual a 2 µg/mL foi observada a troca de aminoácido na posição 83Ser por Leu e 87Asp por Tyr e em um isolado, a presença das substituições em 83Ser por Leu e 87Asp por Asn proporcionou um aumento significativo da CIM para os antibióticos norfloxacin, ofloxacin e levofloxacin. Nestas 4 enterobactérias, foi encontrada ainda uma alteração na posição 80Ser por Ile em *parC*.

Weigel et al. (1998) reportaram somente a alteração na posição 83Thr→Ile em *gyrA* em *K. oxytoca* resistentes à ciprofloxacina. No presente trabalho, todas apresentaram essa alteração, sendo observada também uma alteração na posição Asp87Tyr em GyrA em 2 amostras que apresentaram CIM para ciprofloxacina igual a 32 µg/mL (*K. oxytoca* JF165 e *K. oxytoca* JF194), ou uma substituição pelo aminoácido His, em 10 amostras com CIM entre 8 e 16 µg/mL para o mesmo antibiótico. Todas as *K. oxytoca* resistentes às fluoroquinolonas apresentaram mutações em *gyrA* e *parC*, sendo que a CIM para ciprofloxacina variou entre 8 e 32 µg/mL.

A análise da seqüência de *gyrA* revelou que uma única ou dupla mutação está presente nos isolados de *K. pneumoniae* resistentes às fluoroquinolonas deste estudo. Porém, foram encontradas substituições diferentes no códon 83, do aminoácido Ser por Ile, e no códon 87, Asp por Ala ou Tyr, mutações raramente descritas na literatura (DEGUCHI et al., 1997; WEIGEL et al., 1998). Não foi encontrada nenhuma mutação em *parC* em *K. pneumoniae* sensíveis à ciprofloxacina, apenas alterações no códon 83Ser→Phe ou 87Asp→Tyr em *gyrA*. Em *K. pneumoniae*, nenhuma mutação específica foi associada com aumento ou diminuição do nível de resistência às fluoroquinolonas.

Em síntese, a comparação das seqüências do gene *gyrA* obtidas das enterobactérias com resistência às fluoroquinolonas revelou numerosas diferenças e similaridades entre as sete espécies avaliadas. As principais mutações observadas em *gyrA* foram nos códons 83 e 87, e em *parC*, nos códons 80 e 84. Nenhuma mutação em *parC* foi registrada em enterobactérias que não apresentaram alteração na seqüência de *gyrA*. Todas as amostras que apresentaram mutações simples no gene *gyrA* exibiram CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido nalidíxico. Este encontro sugere que o ácido nalidíxico poderia ser um bom marcador para avaliar a presença de mutações simples em bactérias sensíveis à ciprofloxacina como sugerido anteriormente (Gales et al., 2000). É importante lembrar ainda que, as alterações descritas nos códon 83Ser e 87Asp em *gyrA* e na posição 80Ser na seqüência de *parC* em amostras de *E. coli* já foram relatadas anteriormente. Porém, a substituição no códon 84Glu de *parC* pelo aminoácido Ala na amostra *E. coli* JF88 é primeiramente relatada neste trabalho.

4.2.4. Análise das proteínas de membrana externa

Em algumas enterobactérias que apresentaram as mesmas alterações de aminoácidos em GyrA e ParC e valores da CIM diferentes para fluoroquinolonas, foram avaliadas quanto à presença de possíveis alterações na expressão de suas proteínas de membrana externa. Sabe-se que mutações em genes cromossômicos *gyrA* e *parC* são os principais responsáveis pela diminuição de sensibilidade às quinolonas e fluoroquinolonas. Porém, a diminuição da expressão de proteínas responsáveis pela passagem do antibiótico para o interior da célula, ou até mesmo sua perda, pode acarretar em um aumento dos níveis de resistência às fluoroquinolonas, com conseqüente aumento dos valores da CIM.

As enterobactérias *E. coli* JF251, 263, 26, 281, 301, 191, 286 apresentaram as mesmas substituições; Ser83Leu, Asp87Asn em GyrA e Ser80Ile em ParC. Porém, estas enterobactérias apresentaram valores diferentes da CIM da ciprofloxacina, variando entre 4 e 128 µg/mL. Assim, foi possível esclarecer estas diferenças após observar diferenças na expressão de porinas. *E. coli* JF251, 263, 26 e 281 apresentaram valores da CIM da ciprofloxacina entre 4 e 8 µg/mL e suas proteínas permaneceram intactas. Porém, em *E. coli* JF191, 286, e 301, que apresentaram níveis superiores da CIM da ciprofloxacina em relação àqueles citados anteriormente, entre 32 e >128 µg/mL, foi observada a perda da expressão da proteína de tamanho compatível com OmpF, principal proteína responsável pela entrada de quinolonas para o interior da célula bacteriana. Em adição, em *E. coli* JF191 e 286, com CIM para todas fluoroquinolonas testadas entre 64 e >128 µg/mL, foi observada ainda a diminuição da expressão da proteína compatível com OmpA, o que justifica o aparecimento de valores da CIM ciprofloxacina elevados.

As enterobactérias *E. coli* JF50 e 41 apresentaram as mesmas alterações; Ser83Leu, Asp87Asn em GyrA e Ser80Ile e Glu84Gly em ParC, ou seja, uma alteração adicional no códon 84 em ParC em relação às analisadas no parágrafo anterior. As diferenças nos valores obtidos da CIM CIP, 32 µg/mL para *E. coli* JF50 e >128 µg/mL para *E. coli* JF41 pôde ser explicado pela diminuição da expressão da proteína compatível com OmpF, porém bem mais acentuada em *E. coli* JF41.

Pôde-se afirmar ainda que, a alteração adicional em ParC no códon 84 em *E. coli* JF50 e 41 não influenciou diretamente os altos níveis de resistência às fluoroquinolonas encontrados. O que realmente justifica o encontro de elevados níveis de resistência às fluoroquinolonas nestas enterobactérias é a diminuição da expressão de porinas ou sua inexistência.

4.3. Caracterização dos determinantes plasmideais de resistência aos β -lactâmicos

Vinte quatro (9,3%) enterobactérias produtoras de ESBL isoladas de 21 pacientes foram detectadas na coleção avaliada: 9 *E. coli*, 6 *K. pneumoniae*, 5 *E. cloacae*, 2 *P. stuartii*, 1 *M. morganii* e 1 *C. freundii*. A proporção de pacientes do sexo feminino/masculino que apresentaram infecção do trato urinário (ITU) causada por uma enterobactéria produtora de ESBL foi 14/7, exceto *E. cloacae* JF277 que apresentou o gene *qnrA*, que foi isolada de secreção. Estes pacientes apresentaram, em média, 60,8 anos de idade (variação de 5 a 93 anos). Um paciente apresentou quatro diferentes enterobactérias produtoras de ESBL (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *M. morganii* e *P. stuartii*) isoladas de urina em diferentes datas.

Por PCR e seqüenciamento, a presença dos genes β -*lact* e β -*lact*_M foi analisada nas 24 enterobactérias produtoras de ESBL (Tabela 10). O seqüenciamento de β -*lact*_M identificou 18 variantes, CTX-M-2 (n=13, 72%), CTX-M-8 (n=2, 11%) e CTX-M-9 (n=3, 17%). Os determinantes do grupo CTX-M-2 encontrados incluíram os genes β -*lact*_{M-2} e dois novos variantes. Os números correspondentes aos novos alelos identificados neste estudo, foram solicitados ao Dr. Jacoby do Laboratório Lahey, instituição responsável pela nomenclatura de novos determinantes ESBL identificados. Neste trabalho, estes números foram representados pelas letras X e Y.

A nova seqüência (β -*lact*_{M-y}) obtida em *P. stuartii* JF29 foi diferenciada de β -*lact*_{M-2} por uma única mutação (Pro52Ser) levando à substituição do aminoácido prolina por serina na posição 18 da seqüência protéica. O gene β -*lact*_{M-y} identificado em *E. cloacae* JF216 apresentou uma substituição (Pro508Thr) alterando o aminoácido prolina para treonina na posição 170. Nenhuma enzima pertencente ao grupo CTX-M-1 foi detectada.

O gene β_{-5} foi detectado em todas as seis enterobactérias (25%), nas quais não foi detectado o gene β_{-M} . Nas enterobactérias produtoras de ESBL, foi detectado ainda o gene β_{-1} que codifica uma β -lactamase de espectro restrito, exceto em *M. morganii* JF89. Uma única enterobactéria, *K. pneumoniae* JF17, expressou duas diferentes β -lactamases, OKP-A, uma outra β -lactamase de espectro restrito, e CTX-M-9.

De 2001 a 2003, a produção de CTX-M foi detectada em uma, três e duas enterobactérias a cada ano, respectivamente (Tabela 10). Em 2004, 10 enterobactérias produtoras de CTX-M foram identificadas, sendo a enzima CTX-M-2 a mais freqüentemente encontrada (7 isolados).

E. coli foi a espécie que produziu CTX-M em maior número; 8 dos 9 isolados foram *E. coli*, 4 dos 5 foram *E. cloacae* e 2 dos 6 foram *K. pneumoniae* produtores de CTX-M. Ainda, *C. freundii*, *M. morganii* e *P. stuartii* foram produtores de CTX-M-2. Em termos gerais, *E. coli* foi associada principalmente com enzimas CTX-M e *K. pneumoniae* carregou genes SHV.

Todas enterobactérias produtoras de CTX-M demonstraram um fenótipo de multirresistência: 94% dos isolados apresentaram co-resistência à ciprofloxacina, 88,9% ao sulfametoxazol trimetoprim, 83,3% à tetraciclina, 50% à gentamicina e nenhuma exibiu resistência à amicacina (Tabela 10).

Os plasmídeos que carregaram β_{-M} apresentaram 48 a 180 kb em tamanho (Tabela 10). De 18 enterobactérias que apresentaram o gene β_{-M} , dois isolados, *E. cloacae* JF216 e *E. cloacae* JF183, apresentaram seus plasmídeos que carregavam resistência à cefotaxima transferidos por conjugação, plasmídeos de 48 e 154 kb, respectivamente. Os outros dezesseis plasmídeos que abrigaram o gene β_{-M} não foram transferidos, embora plasmídeos de alto peso molecular tenham sido

observados. Os plasmídeos não conjugativos foram mobilizados por eletroporação. Em alguns casos, plasmídeos que carrearam β -M pertencentes a mesmos ou diferentes grupos apresentaram um mesmo peso molecular. Em particular, os plasmídeos que carrearam β -M-8 e β -M-9 apresentaram um plasmídeos de 114 kb, porém houve variação na co-resistência transferida. Três destes plasmídeos não apresentaram co-resistência à tetraciclina, sulfametoxazol trimetoprim ou gentamicina, e dois deles carregaram determinantes de resistência à tetraciclina. Por outro lado, plasmídeos relacionados com o gene β -M-2 apresentaram diferentes tamanhos, 48, 114 e 154 kb, e ainda mediaram resistência à tetraciclina, sulfametoxazol trimetoprim e gentamicina. A transferência simultânea de β -1 foi observada em alguns casos (Tabela 10).

De acordo com a determinação da sequência à montante do gene β -M-9, foi identificado o elemento *ISEcp1* localizado a 74 pb do códon de início da transcrição deste gene em todas enterobactérias produtoras de CTX-M-9. O elemento *ISCR1*, o qual inclui o gene *orf513* foi encontrado em todos isolados que apresentaram o gene β -M-2, incluindo os novos alelos identificados (Figura 14). A distância que separa o elemento *ISCR1* do códon iniciador da transcrição variou entre as enterobactérias que abrigam o gene β -M-2; uma sequência de 266 pb foi identificada à direita do elemento *ISCR1* e à montante do gene β -M-2 em 8 isolados (*E. coli* JF25, *E. coli* JF26, *E. coli* JF239, *E. coli* JF251, *E. coli* JF286, *P. stuartii* JF29, *K. pneumoniae* JF230 e *M. morganii* JF89). Uma sequência de 260 pb foi encontrada entre *ISCR1* e o gene β -M-2 em todos isolados de *E. cloacae* (*E. cloacae* JF182, *E. cloacae* JF183, *E. cloacae* JF207, *E. cloacae* JF216) e em *P. stuartii* JF244. Tais sequências apresentaram uma deleção de 6 pb comparada à sequência de 266 pb mencionada anteriormente (Figura 14). Um diferente promotor, foi identificado na região que

separa os elementos *ISCR1* e $-M-2$. Uma variação na região -35 do promotor, seqüência TTATAC ao invés de TTTTAC, foi identificada em um único isolado, *K. pneumoniae* JF230. À jusante de todos os genes $-M-2$ detectados, foi encontrado um segmento com 99% de identidade com a seqüência que antecede o gene -1 , gene este localizado no cromossomo da *Kluyvera ascorbata* e finaliza 28 pb antes do códon finalizador da transcrição de Orf3, seguido pela segunda cópia do segmento 3'CS, de um integron classe 1 típico, como reportado previamente (VALVERDE et al., 2006). Em termos gerais, a extremidade 5' dos genes $-M$ foi mantida, todos os determinantes do grupo 2 apresentaram-se associados com um elemento *ISCR1*, enquanto que todos os determinantes do grupo 9 detectados estiveram associados com o elemento *ISEcp1*.

(A) *E. coli* JF25, *E. coli* JF26, *E. coli* JF239, *E. coli* JF251, *E. coli* JF286, *P. stuartii* JF29, *K. pneumoniae* JF230 e *M. morganii* 89

(B) *E. cloacae* JF182, *E. cloacae* JF183, *E. cloacae* JF207, *E. cloacae* JF216 e *P. stuartii* JF244

(C) *K. pneumoniae* JF230

(D) *C. freundii* JF130, *E. coli* JF301, *K. pneumoniae* JF17

Figura 14. Esquematização das estruturas adjacentes aos genes $-M$.

Entre as linhagens de *E. coli*, *E. cloacae* e *K. pneumoniae*, a genotipagem realizada por PFGE identificou dezesseis diferentes tipos, dos quais 14 foram únicos e 2 (tipos F e R) incluíram mais de um isolado. Todas as linhagens que apresentaram os determinantes CTX-M-2 e CTX-M-9 apresentaram-se como diferentes tipos, ou seja, foram considerados clones não relacionados. Com base nestes dados, a evolução e distribuição de enterobactérias nesta comunidade estudada não foram representadas pela disseminação de uma única linhagem. Duas enterobactérias que apresentaram o gene β -M-8 e que foram isoladas de diferentes pacientes foram considerados clones intimamente relacionados. Em adição, três dos 4 isolados de *K. pneumoniae* que apresentaram o gene β -5 isoladas de diferentes pacientes foram classificadas como mesmo clone.

A prevalência de enterobactérias produtoras de ESBL isoladas de pacientes da comunidade que apresentaram resistência às quinolonas é significativa (9,3%) por este encontro estar associado com uma grande diversidade de genótipos circulando na comunidade, com uma predominância de enterobactérias produtoras de CTX-M, como reportado por outros estudos (LARTIGUE et al., 2007; HO et al., 2007), sugerindo a transmissão de elementos extracromossômicos associados com resistência bacteriana.

A ocorrência de enzimas ESBL em uma comunidade brasileira avaliada é de interesse devido à grande possibilidade de influxo destes determinantes de resistência nos hospitais da região, o que representa um fator de risco para que ocorram subseqüentes infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL em pacientes hospitalizados (PITOUT et al., 2005). Ainda, as opções terapêuticas

tornam-se limitadas para o tratamento de infecções adquiridas na comunidade causadas por microrganismos multirresistentes.

Enterobactérias produtoras de ESBL e resistentes às fluoroquinolonas têm sido detectadas em alguns centros médicos brasileiros, indicando que estes isolados estão realmente disseminados no Brasil (PEREIRA et al., 2007). No presente estudo, apesar de CTX-M ser a enzima a mais comumente ESBL identificada, seguida por SHV, a percentagem de produtores de CTX-M foi considerada menor que àquelas obtidas em outros países latino americanos, como Bolívia e Peru, estudo realizado por Pallecchi e colaboradores (2007), porém apresentou valores mais altos que aqueles reportados no continente norte americano (PITOUT et al., 2007; LEWIS et al., 2007).

Enzimas pertencentes ao grupo CTX-M-2 estão disseminadas na América Latina (PALLECCHI et al., 2007) e está presente na comunidade estudada desde 2001 (MINARINI et al., 2007), embora tenham sido encontrados plasmídeos não conjugativos em muitos isolados, o que poderia dificultar sua permanência e disseminação entre enterobactérias. Enzimas CTX-M-2 apareceram em maior número em 2004, porém não houve um aumento significativo de casos até meados de 2005.

Dois novos alelos relacionados ao gene β -M-2 foram identificados neste estudo, detectados, respectivamente em *E. cloacae* e *P. stuartii*. As duas substituições detectadas sugerem uma possível disseminação local desses determinantes. A primeira e única descrição de CTX-M-8 foi em *E. cloacae*, *C. amalonaticus* e *E. aerogenes* isolados no Brasil em 1997 (BONNET et al., 2000). No presente estudo 2 *E. coli* β -M-8, com mesmo padrão PFGE, foram isoladas de diferentes pacientes. É interessante notar que estes isolados produtores de CTX-M-

8 são relativamente raros no mundo, tendo sido descritos somente em território brasileiro, de forma pontual. CTX-M-9 são enzimas particularmente presentes na Espanha (LIVERMORE et al., 2007) e recentemente descritas no Brasil (MINARINI et al., 2007).

Tabela 10- Características das enterobactérias produtoras de ESBL

Grupos	Amostras bacterianas	Data de isolamento		ESBL			CIM (µg/mL) ^b								Fenótipo de ...		Co- ...	Plasmídeo (kb)	
					SHV	CTX	FOX	CAZ	CTX	NAL	CIP	NOR	OFL	LVX					
1	<i>E. cloacae</i> JF182	8/6/2004	M	TEM-1		CTX-M-2	>128	64	>128	>128	32	64	16	8	NAL CIP STX TET	Transf.	TET	154	A
1	<i>E. cloacae</i> JF183	11/6/2004	F	TEM-1*		CTX-M-2	>128	32	>128	>128	64	>128	32	32	NAL CIP GEN STX TET	Conj.	STX	154	B
1	<i>E. cloacae</i> JF207	11/8/2004	F	TEM-1		CTX-M-2	>128	64	>128	>128	64	>128	64	64	NAL CIP STX TET	Transf.	STX	48	C
1	<i>E. coli</i> JF25	3/11/2001	M	TEM-1		CTX-M-2	16	16	>128	>128	16	32	16	8	NAL CIP STX TET	Transf.	TET	154	I
1	<i>E. coli</i> JF286	24/1/2005	F	TEM-1*		CTX-M-2	32	8	128	>128	64	128	128	64	NAL CIP GEN STX TET	Transf.	Nenhuma	154	N
1	<i>M. morganii</i> JF89	26/12/2003	F			CTX-M-2	>128	8	128	>128	64	64	128	64	NAL CIP GEN STX	Transf.	GEN	48	ND
1	<i>E. coli</i> JF213	25/8/2004	F	TEM-1		CTX-M-8	4	<1	8	>128	4	8	8	4	NAL CIP STX TET	Transf.	Nenhuma	114	F
1	<i>C. freundii</i> JF130	22/3/2004	F	TEM-1*		CTX-M-9	128	>128	8	>128	32	64	64	32	NAL CIP STX TET	Transf.	TET	114	ND
1	<i>E. coli</i> JF301	1/2/2005	F	TEM-1*		CTX-M-9	32	16	>128	>128	32	32	16	8	NAL CIP GEN	Transf.	Nenhuma	114	O
1	<i>K. pneumoniae</i> JF17	10/4/2002	F	TEM-1	OKP A	CTX-M-9	32	8	64	>128	4	8	8	2	NAL CIP GEN STX TET	Transf.	TET	114	Q
1	<i>E. cloacae</i> JF216	2/9/2004	F	TEM-1*		CTX-M-X	>128	>128	>128	>128	16	64	16	8	NAL CIP STX TET	Conj.	STX TET	48	D
1	<i>P. stuartii</i> JF29	11/2/2002	F	TEM-1*		CTX-M-Y	32	<1	32	>128	32	>128	16	16	NAL CIP GEN STX TET	Transf.	GEN TET	180	ND
2	<i>E. coli</i> JF239	23/10/2004	F	TEM-1		CTX-M-2	8	4	128	>128	128	128	32	32	NAL CIP GEN STX TET	Transf.	TET	154	H
2	<i>E. coli</i> JF251	16/11/2004	F	TEM-1*		CTX-M-2	4	4	>128	>128	8	16	16	8	NAL CIP GEN STX TET	Transf.	GEN	154	J
2	<i>E. coli</i> JF26	2/4/2002	F	TEM-1*		CTX-M-2	8	8	>128	>128	8	32	16	8	NAL CIP TET	Transf.	Nenhuma	114	L
2	<i>K. pneumoniae</i> JF230	4/10/2004	M	TEM-1*		CTX-M-2	4	16	128	>128	16	64	32	16	NAL CIP STX	Transf.	STX	114	S
2	<i>P. stuartii</i> JF244	30/10/2004	M	TEM-1*		CTX-M-2	4	16	128	>128	64	128	64	128	NAL CIP GEN STX TET	Transf.	GEN	154	ND
2	<i>K. pneumoniae</i> JF10	6/11/2001	F	TEM-1	SHV-5		4	>128	16	>128	4	16	4	4					P
2	<i>K. pneumoniae</i> JF6	14/7/2001	M	TEM-1	SHV-5		8	>128	16	>128	8	64	16	8					R
2	<i>K. pneumoniae</i> JF7	28/8/2001	F	TEM-1	SHV-5		8	128	16	>128	8	32	8	8					R
2	<i>K. pneumoniae</i> JF16	15/3/2002	M	TEM-1	SHV-5		8	>128	32	>128	4	16	4	4					R1
9	<i>E. cloacae</i> JF277	11/1/2005	M	TEM-1	SHV-5		>128	128	32	32	0,5	1	1	0,5					E
9	<i>E. coli</i> JF220	15/9/2004	F	TEM-1	SHV-5		32	32	8	16	<0,03	<0,03	0,06	<0,03					G
10	<i>E. coli</i> JF74	27/11/2003	F	TEM-1		CTX-M-8	8	128	16	>128	0,12	0,5	0,5	1	NAL STX TET	Transf.	Nenhuma	114	F

^a M, masculino; F, feminino.

^b FOX, cefoxitina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; OFL, ofloxacina; LVX, levofloxacina.

^c NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; STX, sulfametoxazol trimetoprim; TET, tetraciclina; GEN, gentamicina.

^d Transf., transferência do plasmídeo por eletroporation em *E. coli* TOP10; Conj., transferência por conjugação em *E. coli* J53

^e ND, não determinado.

^f genes co-transferidos com -_M estão indicados por asteriscos.

Conclusões

- O principal mecanismo investigado de resistência às quinolonas foi a presença de substituições em GyrA e ParC, apesar de outros mecanismos, como a diminuição da expressão de porinas estarem envolvidos.
- Uma alta percentagem de enterobactérias com diminuição de sensibilidade às fluoroquinolonas esteve presente, principalmente entre isolados de *E. coli*.
- Os determinantes Qnr , QnrA1, QnrB2 e QnrB8, descritos neste estudo foram os primeiros relatos de resistência às quinolonas mediada por plasmídeo no Brasil. É importante salientar que, a associação de determinantes Qnr com ESBL esteve presente em apenas 28,5% dos casos de Qnr, percentagem baixa em relação àquelas descritas na literatura.
- Os genes *qnrA* e *qnrB* apresentaram-se localizados em plasmídeos de 55 a 180 kilobases, conjugativos em maioria.
- A análise da estrutura gênica adjacente aos determinantes Qnr encontrados indicou que os genes *qnrA1* e *qnrB2* estavam associados com um integron classe 1 e localizados entre o elemento *ISCR1* e a segunda cópia do segmento conservado 3', o que corresponde aos integrons caracterizados e descritos anteriormente na literatura.
- Quanto às alterações em GyrA e ParC, as principais mutações observadas foram nos códons 83 e 87 em *gyrA*, e nos códons 80 e 84 em *parC*. Em termos gerais, não houve uma correlação exata entre valores de CIM das fluoroquinolonas obtidos e a presença de alterações em GyrA e/ou ParC
- A diferença encontrada nos valores da CIM de fluoroquinolonas em algumas enterobactérias que apresentaram as mesmas substituições em GyrA e ParC pôde ser explicada pela ausência ou diminuição da expressão de porinas.

- Houve significativa associação da produção de ESBL nas enterobactérias avaliadas com o encontro de uma grande diversidade de genótipos circulando na comunidade, com uma predominância de enterobactérias produtoras de CTX-M.
- O seqüenciamento dos genes *bla* identificou 4 determinantes diferentes: CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e SHV-5. Em adição, dois novos variantes pertencentes ao grupo CTX-M-2 foram identificados.
- Os genes *-M-2* estão disseminados na América Latina com sua ocorrência na comunidade estudada desde 2001, embora tenham sido encontrados em plasmídeos não conjugativos, em maioria.
- Todos os determinantes do grupo 2 apresentaram-se associados com um elemento *ISCR1*, enquanto que aqueles do grupo 9 estiveram relacionados com *ISEcp1*.

Referências*

*De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) — NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- ACAR, J.F.; GOLDSTEIN, F.W. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, v. 24, p. 67-73, 1997.
- APPELBAUM, P.C.; HUNTER, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 16, p. 5-15, 2000.
- AVGUSTIN, J.A.; KEBER, R.; ZERJAVIC, K.; ORAZEM, T.; GRABNAR, M. Emergence of the quinolone resistance-mediating gene *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 4171-4173, 2007.
- BAQUERO, F. Resistance to quinolones in Gram-negative microorganisms: mechanisms and prevention. *European Urology*, v. 17, p. 3-12, 1990.
- BIEDENBACH, D.; TOLEMAN, M.; WALSH, T.; JONES, R. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2004). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 54, p. 13-21, 2006.
- BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, v. 7, p. 1513-1523, 1979.
- BLONDEAU, J.M. Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of Ophthalmology*, v. 49, p. 73-78, 2004.
- BONEMANN, G.; STIENS, M.; PUHLER, A.; SCHLÜTER, A. Mobilizable IncQ-related plasmid carrying a new quinolone resistance gene, *qnrS2*, isolated from the bacterial community of a wastewater treatment plant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 3075-3080, 2006.
- BONNET, R. Growing Group of Extended-Spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 1-14, 2004.
- BONNET, R.; DUTOIR, C.; SAMPAIO, J.L.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic

efficiency due to substitution Asp-240-Gly. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 2269-2275, 2001.

BOU, G.; CARTELLE, M.; THOMAS, M.; CANLE, D.; MOLINA, F.; MOURE, R.; EIROS, J.M.; GUERRETO, A. Identification and broad dissemination of CTX-M-14 β -lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 4030-4036, 2002.

BRASME, L.; NORDMANN, P.; FIDEL, F.; LARTIGUE, M.F.; BAJOLET, O.; POIREL, L.; FORTE, D.; VERNET-GARNIER, V.; MADOUX, J.; REVEIL, J.C.; ALBA-SAUVIAT, C.; BAUDINAT, I.; BINEAU, P.; BOUQUIGNY-SAISON, C.; ELOY, C.; LAFAURIE, C.; SIMÉON, D.; VERQUIN, J.P.; NOËL, F.; STRADY, C.; DE CHAMPS, C. Incidence of class A extended-spectrum β -lactamases in Champagne-Ardenne (France): a 1 year prospective study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 60, p. 956-964, 2007.

BREINES, D. V.; OUABDESSELAM, S.; NG, E. Y.; TANKOVIC, J.; SHAH, S.; SOUSSY, C. J.; HOOPER, D. C. Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of Topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, p. 175–179, 1997.

BRISSE, S.; FLUIT, A.C.; WAGNER, U.; HEISIG, P.; MILATOVIC, D.; VERHOEF, J.; SCHEURING, S.; KOHRER, K.; SCHMITZ, F.J. Association of alterations in ParC and GyrA proteins with resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecium* to nine different fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, p. 2513-2516, 1999.

CAMBAU, E.; LASCOLS, C.; SOUGAKOFF, W.; BÉBÉAR, C.; BONNET, R.; CAVALLO, J.D.; GUTMANN, L.; PLOY, M.C.; JARLIER, V.; SOUSSY, C.J.; ROBERT, J. Occurrence of *qnrA*-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002–2005. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 12, p. 1013-1020, 2006.

CANTON, R.; COQUE, T.M.; BAQUERO, F. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Current Opinion in Infectious Disease*, v. 16, p. 315-325, 2003.

- CARTER, M.W.; OAKTON, K.J.; WARNER, M.; LIVERMORE, D.M. Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella* with the Oxoid Combination Disk Method. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 4228-4232, 2000.
- CATTOIR, V.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant QnrB4 Identified in France in an *Enterobacter cloacae* Clinical Isolate Coexpressing a QnrS1 Determinant. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, v. 51, p. 2652-2653, 2007.
- CATTOIR, V.; WEILL, F.X.; POIREL, L.; FABRE, L.; SOUSSY, C.J.; NORDMANN, P. Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 59, p. 751–754, 2007a.
- CATTOIR, V.; POIREL, L.; ROTIMI, V.; SOUSSY, C.J.; NORDMANN, P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 60, p. 394–397, 2007b.
- CATTOIR, V.; POIREL, L.; MAZEL, D.; SOUSSY, C.J.; NORDMANN, P. *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, v. 51, p. 2650-2651, 2007c.
- CATTOIR, V.; POIREL, L.; AUBERT, C.; SOUSSY, J.C.; NORDMANN, P. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, p. 231-237, 2008.
- CHAPMAN, J.S.; GEORGOPAPADAKOU, N.H. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, v.32, p. 438-442, 1988.
- CHENIA, H.Y.; PILLAY, B.; PILLAY, D. Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 58, p. 1274-1278, 2006.
- CHU, Y.W.; CHEUNG, T.K.M.; NG, T.K.; TSANG, D.; TO, W.K.; KAM, K.M.; LO, J.Y.C. Quinolone resistance determinant *qnrA3* in clinical isolates of *Salmonella* in

2000–2005 in Hong Kong. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 58, p. 904-905, 2006.

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. ed. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2006.

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. ed. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2007.

COHEN, S.P.; MCMURRY, L.M.; HOOPER, D.C.; WOLFSON, J.S.; LEVY, S.B. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 33, p. 1318–25, 1989.

CORDEIRO, N.F.; ROBINO, L.; MEDINA, J.; SEIJA, V.; BADO, I.; GARCÍA, V.; BERRO, M.; PONTET, J.; LÓPEZ, L.; BAZET, C.; RIEPPI, G.; GUTKIND, G.; AYALA, J.A.; VIGNOLI, R. Ciprofloxacin-resistant enterobacteria harboring the *aac(6')-Ib-cr* variant isolated from feces of inpatients in an ICU, Uruguay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 806-807, 2008.

CORKILL, J.E.; ANSON, J.J.; HART, C.A. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, p. 1115-1117, 2005.

COURTRIGHT, J.B.; TUROWSKI, D.A.; SONSTEIN, S.A. Alteration of bacterial DNA structure, gene expression, and plasmid encoded antibiotic resistance following exposure to enoxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* v. 21 (suppl B), p.1-18, 1998.

COZZARELLI, N.R. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science*, v. 207, p. 953-960, 1980.

DAVIES, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, v. 264, p. 375-382, 1994.

DECOUSSER, J.W.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A β -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 3595-3598, 2001.

DEGUCHI, T.; YASUDA, M.; NAKANO, M.; OSEKI, S.; EZAKI, T.; SAITO, L.; KAWADA, Y. Quinolone resistant *Neisseria gonorrhoeae* correlation of alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV with antimicrobial susceptibility profiles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 40, p. 1020-1023, 1996.

DEGUCHI, T.; YASUDA, M.; NAKANO, M.; OZEKI, S.; KANEMATSU, E.; NISHINO, Y.; ISHIHARA, S.; KAWADA, Y. Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in quinolone-resistant clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 40, p.543-549, 1997.

DI CONZA, J.; AYALA, J.A.; POWER, P.; MOLLERACH, M.; GUTKIND, G. Novel class 1 integron (InS21) carrying β -lactamase in *Salmonella enterica* serovar infantis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 2257-2261, 2002.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, p. 377-392, 1997.

ECKERT, C.; GAUTIER, V.; ARLET, G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various β -lactamase genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, p. 14-23, 2006.

ELLINGTON, M.J.; HOPE, R.; TURTON, J.F.; WARNER, M.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D.M. Detection of *qnrA* among *Enterobacteriaceae* from South-East England with extended-spectrum and high-level AmpC β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 60, p. -1178, 2007.

ESSACK, S.Y.; HALL, L.M.; PILLAY, D.G.; MCFADYEN, M.L.; LIVERMORE, D.M. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum

beta-lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 88-95, 2001.

EVERETT, M.J.; JIN, Y.F.; RICCI, V.; PIDDOCK, L.J.V. Contribution of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 40, p. 2380–2386, 1996.

FIETT, J.; PALUCHA, A.; MIACZYNSKA, B.; STANKIEWICA, M.; PRZONDO-MORDARSKA, H.; HRYNIEWICZ, W.; GNIADKOWSKI, M. A Novel Complex Mutant β -lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended Spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, p. 1499-1505, 2000.

FRIEDMAN, S.; LU, T.; DRLICA, K. Mutation in the DNA gyrase A gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 2378–2380, 2001.

FUKUDA, H.; KISHII, R.; TAKEI, M.; HOSAKA, M. Contributions of the 8- methoxy group of gatifloxacin to resistance selectivity, target preference and antibacterial activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p.1649–1653, 2001

GALES, A.C.; GORDON, K.A.; WILKE, W.W.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N. Occurrence of single-point *gyrA* mutations among ciprofloxacin-susceptible *Escherichia coli* isolates causing urinary tract infections in Latin America. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 36, p. 61-64, 2000.

GARNIER, F.; RAKED, N.; GASSAMA, A.; DENIS, F.; PLOY, M.C. Genetic environment of quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sul1*-type integron in the newly described *Salmonella enterica* serovar Keurmassar. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 3200-3202, 2006.

GAY, K.; ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; PARK, C.H.; JACOBY, G.; BARRETT, T.J.; MEDALLA, F.; CHILLER, T.M.; HOOPER, D.C. Plasmid-mediated quinolone

resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 43, p. -304, 2006.

GELLERT, M.; MIZUUCHI, K.; O'DEA, M. H.; ITOH, T.; TOMIZAWA, J. I. Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, p. 4772-4776, 1997.

GRUTEKE, P.; GOESSENS, W.; VAN GILS, J.; PEERBOOMS, P.; LEMMENS-DEN TOOM, N.; VAN SANTEN-VERHEUVEL, M.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum beta-lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 1161-1166, 2003.

HALL, R.M.; STOKES, H.W. The structure of a partial duplication in the integron of plasmid pDGO100. *Plasmid*, v. 23, p. 76-79, 1990.

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. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, v. 49, p. 801-803, 2005.

HERNADEZ-ALLES, S.; ALBERTI, S.; ALVAREZ, X.D.; DOMÉNECH-SANCHEZ, A.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; GIL, J.; TOMÁS, J.M.; BENEDI, V.J. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology*, v. 145, p. 673-679, 1999.

HIRAI, K.; AOYAMA, H.; IRIKURA, T.; IYOBE, S.; MITSUHASHI, S. Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 29, p. 535-538, 1996.

HO, P.L.; POON, W.W.N.; LOKE, L.; LEUNG, M.S.T.; CHOW, K.H.; WONG, R.C.W.; YIP, K.S.; LAI, E.L.; TSANG, K.W.T. AND ON BEHALF OF THE COMBAT STUDY GROUP. Community emergence of CTX-M type extended-spectrum β -lactamases among urinary *Escherichia coli* from women. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 60, p. 140-144, 2007.

- HOOPER, D.C. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infectious Disease*, v. 2, p. 530-538, 2002.
- HURST, M.; LAMB, H.M.; SCOTT, L.J.; FIGGITT, D.P. Levofloxacin: an updated review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs*, v. 62, p. 2127-67, 2002.
- ITO, K.; HIRAI, K.; INOUE, M.; KOGA, H.; SUZUE, S.; IRIKURA, T.; MITSUHASHI, S. In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.17, p.103–108, 1980.
- JACOBY, G.A.; CHOW, N.; WAITES, K.B. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 559-562, 2003.
- JACOBY, G.A.; WALSH, K.E.; MILLS, D.M.; WALKER, V.J.; OH, H.; ROBICSEK, A.; HOOPER, D.C. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 1178-1182, 2006.
- JONAS, D.; BIEHLER, K.; HARTUNG, D.; SPITZMULLER, B.; DASCHNER, F.D. Plasmid-mediated quinolone resistance in isolates obtained in German intensive care units. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 773-775, 2005.
- JONES, M.E.; PETERS, E.; WEERSINK, A.M.; FLUIT, A.; VERHOEF, J. Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet*, v. 349, p. 1742 – 1743, 1997.
- KARIM, A.; POIREL, L.; NAGARAJAN, S.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 201, p. 237 – 241, 2001.
- KEHRENBURG, C.; FRIEDERICH, S.; DE JONG, A.; SCHWARZ, S. Novel variant of the *qnrB* gene, *qnrB12*, in *Citrobacter werkmanii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 1206-1207, 2008.
- LARTIGUE, M.F.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Diversity of genetic environment of *bla*(CTX-M) genes. *FEMS Microbiology Letters*, v.15, p. 201-207, 2004.

- LAVIGNE, J.P.; MARCHANDIN, H.; DELMAS, J.; BOUZIGES, N.; LECAILLON, E.; CAVALIE, L.; JEAN-PIERRE, H.; BONNET, R.; SOTTO, A. *qnrA* in CTX-M-Producing *Escherichia coli* Isolates from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 4224-4228, 2006.
- LAVILLA, S.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.J.; SABATÉ, M.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; LARROSA, M.N.; BARTOLOMÉ, R.M.; CARATTOLI, A.; PRATS, G. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p. 291-295, 2008.
- LEE, Y.J.; CHO, J.K.; KIM, K.S.; TAK, R.B.; KIM, A.R.; KIM, J.W.; IM, S.K.; KIM, B.H. Fluoroquinolone resistance and *gyrA* and *parC* mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken. *Journal of Microbiology*, v. 43, p. 391-397, 2005.
- LESCHER, G.Y.; FROELICH, E.J.; GRUETT, M.D.; BAILEY, J.H.; BRUNDAGE, R.P. 1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapy agents. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, v. 5, p. 1063–1068, 1962.
- LEVESQUE, C.; PICHE, L.; LAROSE, C.; ROY, P.H. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 185-191, 1995.
- LIVERMORE, D.M.; JAMES, D.; REACHER, M.; GRAHAM, C.; NICHOLS, P.; STEPHENS, P.; JOHNSON, A.P.; GEORGE, R.C. Trends in fluoroquinolone (ciprofloxacin) resistance in *Enterobacteriaceae* from bacteremias, England and Wales, 1990-1999. *Emergence of Infection Disease*, v. 8, p. 473-478, 2002.
- MAMMERI, H.; DE LOO, M.V.; POIREL, L.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; NORDMANN, P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 71-76, 2005.
- MARTINEZ-FREIJO, P.; FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.J.; VERHOEF, J.; JONES, M. Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic region in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, p. 686-689, 1998.

- MARTINEZ-MARTINEZ, L.; GARCIA, I.; BALLESTA, S.; BENEDI, V.J. HERNANDEZ-ALLES, S.; PASCUAL, A. Energy dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 1850-1852, 1998.
- MARTINEZ-MARTINEZ, L.; HERNANDEZ-ALLES, S.; ALBERTI, S.; TOMAS, J.M.; BENEDI, V.J.; JACOBY, G.A. In vivo selection of porin deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 40, p. 342-348, 1996.
- MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A.; CONEJO, M.C.; GARCIA, I.; JOYANES, P.; DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A.; BENEDÍ, V.J. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 3926-3932, 2002.
- MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, G.A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, v. 351, p. 797-799, 1998.
- MINARINI L.A.R.; CLÍMACO E.C.; GUIMARÃES, D.B.; FERREIRA, J.C.; PALAZZO, I. C.V.; MARTINEZ, R.; DARINI, A.L.C. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. in a university hospital in Brazil. *Current Microbiology* (in press).
- MINARINI, L.A.R.; GALES, A.C.; DARINI, A.L.C. First Report of a plasmid-mediated resistance to quinolone and cefotaxime in *Enterobacter cloacae* isolated from an outpatient in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. -402, 2007.
- MINARINI, L.A.R.; GALES, A.C.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C. Prevalence of community-occurring extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. *Current Microbiology*, v. 54, p. -341, 2007.
- MINARINI, L.A.R.; POIREL, L.; CATTOIR, V.; DARINI, A.L.C.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistant determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, in press.
- MONIOT-VILLE, N.; GUIBERT, J.; MOREAU, N.; ACAR, J. F.; COLLATZ, E.; GUTMANN, L. Mechanisms of quinolone resistance in a clinical isolate of *Escherichia*

coli highly resistant to fluoroquinolones but susceptible to nalidixic acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 35, p. 519–523, 1991.

MOREAU, N.J.; ROBAUX, H.; BARON, L.; TABARY, X. Inhibitory effects of quinolones on pro- and eukaryotic DNA topoisomerases I and II. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 34, p. 1955-1960, 1990.

MUNDAY, C.J.; BOYD, D.A.; BRENWALD, N.; MILLER, M.; ANDREWS, J.M.; WISE, R.; MULVEY, M.R.; HAWKEY, P.M. Molecular and kinetic comparison of the novel extended-spectrum beta-lactamases CTX-M-25 and CTX-M-26. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 4829-4834, 2004.

NAHEED, A.; KALLURI, P.; TALUKDER, K.; FARUQUE, A.; KHATUN F.; NAIR, G.; MINTZ, E.; BREIMAN, R. Fluoroquinolone-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 in northeastern Bangladesh. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 4, p. 607-608, 2004.

NAZIC, H.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. -2147, 2005.

NORDMANN, P.; MAMMERI, H. Resistance plasmidique aux quinolones. *Microbiologie*, v. 9, p. 246-253, 2007.

, P.; POIREL, L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, p. 463-469, 2005.

OLIVER, A.; PEREZ-DÍAZ, J.C.; COQUE, T.M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 616-620, 2001.

PAAUW, A.; FLUIT, A.C.; VERHOEF, J.; LEVERSTEIN-VAN HALL, M.A. *Enterobacter cloacae* outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch hospital. *Emerging Infectious Diseases*, v.12, p. 807-812, 2006.

PAI, H.; SEO, M.R.; CHOI, T.Y. Association of QnrB Determinants and production of extended-spectrum β -lactamases or plasmid-mediated AmpC β -lactamases in

clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 366-368, 2007.

PALLECCHI, L.; BARTOLONI, A.; FIORELLI, C.; MANTELLA, A.; DI MAGGIO, T.; GAMBOA, H.; GOTUZZO, E.; KRONVALL, G.; PARADISI, F.; ROSSOLINI, G.M. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum β -lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 2720-2725, 2007.

PARK, C.H.; ROBICSEK, A.; JACOBY, G.A.; SAHM, D., HOOPER, D.C. Prevalence of *aac(6')Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 3953-3955, 2006.

PARK, Y.J.; YU, J.K.; LEE, S.; OH, E.J.; WOO, G.J. Prevalence and diversity of *qnr* alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, v. 60, p. 868–871, 2007.

PATERSON, D.L.; MULAIZIMOGLU, L.; CASELLAS, J.M.; KO, W.C.; GOOSSENS, H.; VON GOTTBURG, A.; MOHAPATRAS TRENHOLME, G.M.; KLUGMAN, K.P.; MCCORMACK, J.G.; YU, V.L. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum-beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 30, p. 473–478, 2000.

PAULSEN, I.T.; LITTLEJOHN, T.G.; RADSTROM, P.; SUNDSTROM, L.; SKOLD, O.; SWEDBERG, G.; SKURRAY, R.A. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptic and disinfectants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 37, p. 761-768, 1993.

PEREIRA, A.S.; ANDRADE, S.S.; MONTEIRO, J.; SADER, H.S.; PIGNATARI A.C.C.; GALES, A.C. Evaluation of the Susceptibility profiles, genetic similarity and presence of *qnr* gene in *Escherichia coli* resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 11, p. 40-43, 2007.

- PÉREZ-PÉREZ, F.J.; HANSON, N.D. Detection of Plasmid-Mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 2153-2162, 2002.
- PERICHON, 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*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 2464-2469, 2007.
- POIREL, L.; DECOUSSER, J.W.; NORDMANN, P. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a β -lactamase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 2938-2945, 2003.
- POIREL, L.; LEVIANDIER, C.; NORDMANN, P. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 3992-3997, 2006.
- POIREL, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.M.; MAMMERI, H.; LIARD, A.; NORDMANN, P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. -3525, 2005.
- QUINTEROS, M.; RADICE, M.; GARDELLA, N.; RODRIGUEZ, M.M.; COSTA, N.; KORBENFELD, D.; COUTO, E.; GUTKIND, G.; MICROBIOLOGY STUDY GROUP. Extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 2864-2867, 2003.
- QUINTILIANI, J.R.; SAHM, D.F.; COURVALIN, P. Mechanisms of Resistance to Antimicrobial Agents. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. *Manual of Clinical Microbiology*. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999, p.1505-1525.
- QUIROGA, P.; ANDRES, P.; PETRONI, A.; SOLER-BISTUE, A.; GUERRIERO, L.; JORDA VARGAS, L.; ZORREGUIETA, A.; TOKUMOTO, M.; QUIROGA, C.; TOLMASKY, M.; GALAS, M.; CENTRON, D. Complex class 1 integrons with diverse variable regions including *aac(6')-Ib-cr* and a novel allele *qnrB10* associated to

- ISCR1 in clinical *Enterobacteria* from Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 4466-4470, 2007.
- REECE, R.J.; MAXWELL, A. DNA gyrase: Structure and function. *Critical Review of Biochemical Molecular Biology*, v. 26, p. 335-375, 1991.
- ROBICSEK, A.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infectious Disease*, v. 6, p. 629-640, 2006.
- ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G.A.; MACIELAG, M.; ABBANAT, D., PARK, C.H.; BUSH, K.; HOOPER, D.C. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, v. 12, p. -88, 2006.
- ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; SAHM, D.F., JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 2872-2874, 2006.
- RODRIGUEZ-MARTINES, J.M.; PASCUAL, A.; GARCIA, I.; MARTINEZ-MARTINES, L. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type β -lactamase. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, v. 52, p. 703-706, 2003.
- RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, p. 1109-1117, 2003.
- SABATE, M.; TARRAGE, R.; NAVARRO, F.; MIRO, E.; VERGES, C.; BARBE, J.; PRATS, G. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing- β -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, p. 1970-1973, 2000.
- , H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C.; SENTRY participants group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Brazilian Journal of Infectious Disease*, v. 8, p. 25-79, 2004.

- SALADIN, M.; CAO, V.T. ; LAMBERT, T.; DONAY, J.L.; HERRMANN, J.L.; OULD-HOCINE, Z.; VERDET, C.; DELISLE, F.; PHILIPPON, A.; ARLET, G. Diversity of CTX-M-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiology Letters*, v. 209, p. 161-168, 2002.
- SMITH, A.; PENNEFATHER, P.M.; KAYE, S.B.; HART, C.A. Fluoroquinolones: place in ocular therapy. *Drugs*, v. 61, p. 747–761, 2001.
- SPANGLER, S.K.; JACOBS, M.R.; APPELBAUM, P.C. Susceptibility of anaerobic bacteria to trovafloxacin: comparison with other quinolones and non-quinolone antibiotics. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, v. 5, p. 101-109, 1996.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; DOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 2233-2239, 1995.
- TOLEMAN, M.A.; BENNETT, P.M.; WALSH, T.R. ISCR1 elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology Molecular Biology Review*, v. , p. -316, 2006.
- TOLUN, V.; KUCUKBASMALI, O.; TORUMKUNEY-AKBULUT, D.; CATAL, C.; ANG-KUCUKER, M.; ANG, O. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 10, p. 72-75, 2004.
- TRAN, J.H.; JACOBY, G.A. Mechanisms of plasmid-mediated quinolone resistance. *of the National Academy of Sciences*, v. 99, p. 5638-5642, 2002.
- VELDMAN, K.; VAN PELT, W.; MEVIUS, D. First report of *qnr* genes in Salmonella in The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p. 452-453, 2008.
- VILA, J.; RUIZ, J.; MARCO, F.; BARCELÓ, A.; GOÑI, P.; GIRALT, E.; JIMENEZ DE ANTA, T. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and minimal inhibitory concentration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, p. 2477-2479, 1994.

- VILA, J.; RUIZ, J.; NAVIA, M.M. Molecular bases of quinolone resistance acquisition in gram-negative bacteria. *Recent Research Developments in Antimicrobials and chemotherapy*, v. 3, p. 323-344, 1999.
- VILA, J.; RUIZ, J.; SANCHEZ, F.; NAVARRO, F.; MIRELIS, B.; JIMÉNEZ DE ANTA, M. T.; PRATZ, G. Investigation of quinolone resistance development of an *Haemophilus influenzae* strain isolated from a patient with recurrent respiratory infections treated with ofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, p. 161-162, 1999.
- VILLEGAS, M.V.; CORREA, A.; PEREZ, F.; ZULUAGA, T.; RADICE, M.; GUTKIND G.; CASELLAS, J.M.; AYALA, J.; LOLANS, K.; QUINN, J.P.; COLOMBIAN NOSOCOMIAL RESISTANCE STUDY GROUP. CTX-M-12 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* Clinical isolate in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 629-631, 2004.
- WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum beta-lactamases. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 50, p. -165, 2004.
- WANG, F.; ZHU, D.; HU, F.; ZHANG, Y. Surveillance of bacterial resistance among isolates in Shanghai in 1999. *Journal of Infectious Chemotherapy*, v. 7, p. 117-120, 2001.
- WANG, M.; SAHM, D.F.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnr gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p.1295-1299, 2004.
- WANG, M.; TRAN, J.H.; JACOBY, G.A.; ZHANG, Y.; WANG, F.; HOOPER, D.C. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 2242-2248, 2003.
- WEIGEL, L.M.; STEWARD, C.D.; TENOVER, F.C. *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 2661-2667, 1998.

- WIEGAND, L.; KHALAF, N.; AL-AGAMY, M.H.M.; WIEDEMANN, B. First detection of the transferable quinolone resistance determinant in clinical *Providencia stuartii* strains in Egypt. *Clinical Microbiology Infection*, v. 10, p. 64, 2004.
- WOODFORD, N.; FAGAN, E.J.; ELLINGTON, M.J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, p. 154-155, 2006.
- WU, J.J.; KO, W.C.; TSAI, S.H.; YAN, J.J. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.51, p. 1123-1127, 2007.
- XU, X.; WU, S.; YE, X.; LIU, Y.; SHI, W.; ZHANG, Y.; WANG, M. Prevalence and Expression of the Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant *qnrA1*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. -4110, 2007.
- 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 an *Escherichia coli* Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 3354-3360, 2007.
- YOSHIDA, H.; BOGAKI, M.; NAKAMURA, M.; NAKAMURA, S. Quinolone resistance determining region in the DNA girase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.37, p.839-845, 1990.
- , S.; WHITE, D.G.; GE, B.; AYERS, S.; FRIEDMAN, S.; ENGLISH, L.; WAGNER, D.; GAINES, S.; MENG, J. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *and Environmental Microbiology*, v.67, p.1558-1564, 2001.

Apêndices

- Apêndice 1
 - Apêndice 2
 - Apêndice 3
-

Apêndice 1 - Características das enterobactérias resistentes às quinolonas e classificação em grupos fenotipicamente diferentes

Amostra	Data de isolamento	Paciente	Sítio de infecção	CIM**								Características dos Grupos***		
				CFO	CAZ	CTX	NAL	CIP	NOR	OFL	LVX	CIP	ESBL	CFO
GRUPO 1														
K. pneumoniae RP17	26/1/2000	GET	Escarro	16	32	128	>128	8	32	4	2	R	P	R
K. pneumoniae RP107	10/4/2000	LAG	Urina	16	32	>128	>128	4	16	8	4	R	P	R
K. oxytoca RP136	10/5/2000	LPS	Urina	32	<1	2	>128	32	128	32	16	R	P	R
K. pneumoniae RP175	12/6/2000	DGB	Abscesso	32	32	>128	>128	4	32	8	8	R	P	R
K. pneumoniae RP180	19/6/2000	SGF	Ferida	16	32	>128	>128	4	16	16	8	R	P	R
K. oxytoca RP181	23/6/2000	MLA	Ouvido	16	>128	32	>128	16	128	16	8	R	P	R
K. oxytoca RP183	26/6/2000	WLR	Ferida	16	>128	32	>128	16	128	16	8	R	P	R
K. oxytoca RP184	27/6/2000	AMCB	Uretral	16	>128	32	>128	16	64	16	8	R	P	R
K. oxytoca RP185	28/6/2000	LASF	Abscesso	16	<1	2	>128	16	128	16	16	R	P	R
P. stuartii JF29	26/5/2001	SMV	Urina	32	<1	32	>128	32	>128	16	16	R	P	R
E. coli JF25	3/11/2001	PFF	Urina	16	16	>128	>128	16	32	16	8	R	P	R
K. pneumoniae JF17	10/4/2002	ERD	Urina	32	8	64	>128	4	8	8	2	R	P	R
E. coli JF27	2/5/2002	CMGLS	Urina	32	4	<1	>128	32	64	32	16	R	P	R
E. coli JF32	23/8/2003	FLGN	Urina	64	8	2	>128	8	16	16	8	R	P	R
S. marcescens JF56	15/10/2003	LMSJ	Urina	>128	<1	32	>128	16	128	16	16	R	P	R
M. morgani JF89	26/12/2003	SMV	Urina	>128	8	128	>128	64	64	128	64	R	P	R
E. coli JF114	20/2/2004	ACP	Urina	64	16	2	>128	64	>128	32	16	R	P	R
C. freundii JF130	22/3/2004	JVS	Urina	128	>128	8	>128	32	64	64	32	R	P	R
E. coli JF138	30/3/2004	CMM	Urina	32	2	8	>128	32	128	32	16	R	P	R
K. oxytoca JF165	11/5/2004	MAS	Urina	16	2	2	>128	32	64	64	32	R	P	R
E. cloacae JF182	8/6/2004	GS	Urina	>128	64	>128	>128	32	64	16	8	R	P	R
E. cloacae JF183	11/6/2004	TMS	Urina	>128	32	>128	>128	64	>128	32	32	R	P	R
K. oxytoca JF194	10/7/2004	GHL	Urina	32	4	4	>128	32	64	64	32	R	P	R
E. cloacae JF207	11/8/2004	ICD	Urina	>128	64	>128	>128	64	>128	64	64	R	P	R
E. cloacae JF216	2/9/2004	ICO	Urina	>128	>128	>128	>128	16	64	16	8	R	P	R
S. marcescens JF271	29/12/2004	MAGL	Urina	128	8	64	>128	8	64	32	16	R	P	R
E. coli JF286	24/1/2005	MARC	Urina	32	8	128	>128	64	128	128	64	R	P	R
E. coli JF282	19/1/2005	LVA	Urina	32	8	<1	>128	32	128	32	16	R	P	R
E. coli JF301	1/2/2005	LFA	Urina	32	16	>128	>128	32	32	16	8	R	P	R
E. coli JF270	29/12/2004	MLSR	Urina	16	<1	32	>128	64	64	32	16	R	P	R
GRUPO 2														
K. oxytoca RP3	2/1/2000	JMS	Ferida	4	4	128	>128	8	16	8	2	R	P	
K. oxytoca RP1	2/1/2000	MAS	Urina	8	4	>128	>128	8	16	8	4	R	P	
K. oxytoca RP26	2/2/2000	ACA	Urina	8	4	128	>128	16	64	8	4	R	P	
K. oxytoca RP103	10/4/2000	JAF	Sangue	8	64	4	>128	16	64	16	8	R	P	
K. pneumoniae JF6	14/7/2001	LMSJ	Urina	8	>128	16	>128	8	64	16	8	R	P	
K. pneumoniae JF7	28/8/2001	SMV	Urina	8	128	16	>128	8	32	8	8	R	P	
K. pneumoniae JF10	6/11/2001	VSM	Urina	4	>128	16	>128	4	16	4	4	R	P	
K. pneumoniae JF16	15/3/2002	FI	Urina	8	>128	32	>128	4	16	4	4	R	P	
E. coli JF26	2/4/2002	MMAL	Urina	8	8	>128	>128	8	32	16	8	R	P	
E. coli JF88	26/12/2003	MGB	Urina	8	4	16	>128	32	32	>128	16	R	P	
E. coli JF115	27/2/2004	ATZ	Urina	4	<1	2	>128	8	16	16	4	R	P	
E. coli JF213	25/8/2004	MAMG	Urina	4	<1	8	>128	4	8	8	4	R	P	
K. pneumoniae JF230	4/10/2004	PAM	Urina	4	16	128	>128	16	64	32	16	R	P	
E. coli JF239	23/10/2004	SLS	Urina	8	4	128	>128	128	128	32	32	R	P	
E. coli JF240	25/10/2004	AA	Urina	4	4	<1	>128	128	>128	64	64	R	P	
Providencia JF244	30/10/2004	GZL	Urina	4	16	128	>128	64	128	64	128	R	P	
E. coli JF263	6/12/2004	FMOS	Urina	<1	8	2	>128	4	8	4	2	R	P	
E. coli JF251	16/11/2004	SMV	Urina	4	4	>128	>128	8	16	16	8	R	P	
GRUPO 3														
E. coli JF31	28/1/2003	MATA	Urina	8	<1	<1	>128	8	16	8	8	R		
E. coli JF44	19/9/2003	EFT	Urina	8	<1	<1	>128	16	64	32	16	R		
E. coli JF47	23/9/2003	DLC	Urina	4	<1	<1	>128	16	16	16	8	R		
E. coli JF50	1/10/2003	NAP	Urina	8	<1	<1	>128	32	>128	64	16	R		
E. coli JF54	10/10/2003	MRA	Urina	8	<1	<1	>128	32	64	16	8	R		
E. coli JF55	11/10/2003	DHS	Urina	8	<1	<1	>128	16	64	32	32	R		
E. coli JF58	17/10/2003	DBS	Urina	4	<1	<1	>128	16	64	32	16	R		
E. coli JF60	21/10/2003	MAO	Urina	8	<1	<1	>128	32	128	32	8	R		
E. coli JF61	22/10/2003	RGTG	Urina	8	<1	<1	>128	64	>128	32	32	R		
E. coli JF62	23/10/2003	MTOG	Urina	4	<1	<1	>128	16	64	32	16	R		
E. coli JF63	3/11/2003	CRLJ	Urina	8	<1	<1	>128	16	16	16	8	R		
E. coli JF68	12/11/2003	JFC	Urina	8	<1	<1	>128	32	64	32	16	R		
E. coli JF67	12/11/2003	JSSL	Urina	4	<1	<1	>128	32	64	64	32	R		
E. coli JF71	18/11/2003	HNMS	Urina	8	<1	<1	>128	32	128	64	16	R		
E. coli JF73	22/11/2003	KCL	Urina	4	<1	<1	>128	16	64	16	8	R		
E. coli JF75	1/12/2003	MHAF	Urina	8	<1	<1	>128	32	>128	32	16	R		
E. coli JF76	2/12/2003	MLNP	Urina	4	<1	<1	>128	4	16	8	4	R		
E. coli JF85	17/12/2003	GGP	Urina	2	<1	<1	>128	4	16	4	4	R		
E. coli JF87	23/12/2003	LFM	Urina	4	<1	<1	>128	16	64	32	8	R		
E. coli JF90	27/12/2003	GCDC	Urina	8	<1	<1	>128	32	128	32	8	R		
E. coli JF92	8/1/2004	SAJA	Urina	4	<1	<1	>128	16	64	16	8	R		
E. coli JF93	12/1/2004	MES	Urina	8	<1	<1	>128	16	64	16	8	R		
E. coli JF101	27/1/2004	LMSJ	Urina	8	<1	<1	>128	8	16	16	4	R		
E. coli JF102	30/1/2004	CCM	Urina	8	<1	<1	>128	32	64	16	16	R		
E. coli JF107	5/2/2004	MGS	Urina	8	<1	<1	>128	8	32	16	4	R		
E. coli JF109	16/2/2004	JTS	Urina	4	<1	<1	>128	16	64	16	16	R		
E. coli JF111	18/2/2004	MJA	Urina	4	<1	<1	>128	32	64	16	16	R		
E. coli JF118	2/3/2004	CCA	Urina	8	<1	<1	>128	64	>128	32	16	R		
E. coli JF117	2/3/2004	ELCR	Urina	8	<1	<1	>128	64	>128	32	16	R		
E. coli JF120	3/3/2004	LGS	Urina	8	<1	<1	>128	8	16	16	8	R		
E. coli JF119	3/3/2004	LSF	Urina	4	<1	<1	>128	8	16	16	16	R		
E. coli JF123	8/3/2004	RAS	Urina	8	<1	<1	>128	16	128	32	16	R		
E. coli JF125	9/3/2004	MAVB	Urina	8	<1	<1	>128	16	64	16	8	R		
E. coli JF127	11/3/2004	RSA	Urina	4	<1	<1	>128	32	32	64	16	R		
K. pneumoniae JF132	24/3/2004	MARC	Urina	2	<1	<1	>128	128	128	32	32	R		
P. mirabilis JF133	25/3/2004	APSB	Urina	2	<1	<1	>128	16	32	32	16	R		
E. coli JF135	25/3/2004	RMG	Urina	8	<1	<1	>128	4	16	8	4	R		
E. coli JF137	26/3/2004	JLS	Urina	8	<1	<1	>128	32	128	32	16	R		
E. coli JF136	26/3/2004	LRVS	Urina	4	<1	<1	>128	16	64	1				

E. coli JF201	6/8/2004	MGSRC	Urina	4	<1	<1	>128	16	64	16	16	R		
E. coli JF209	16/8/2004	MM.	Urina	8	<1	<1	>128	64	>128	64	32	R		
P. mirabilis JF217	17/8/2004	MARC	Urina	4	<1	<1	>128	128	128	32	16	R		
E. coli JF210	18/8/2004	AMNP	Urina	4	<1	<1	>128	16	128	16	8	R		
E. coli JF212	19/8/2004	GMOL	Urina	4	<1	<1	>128	32	64	32	16	R		
E. coli JF221	17/9/2004	MANP	Urina	4	<1	<1	>128	32	>128	32	16	R		
E. coli JF227	24/9/2004	AMC	Urina	4	<1	<1	>128	8	32	16	8	R		
E. coli JF229	4/10/2004	NANG	Urina	4	<1	<1	>128	8	32	16	8	R		
E. coli JF234	13/10/2004	IFRA	Urina	4	<1	<1	>128	32	128	32	16	R		
E. coli JF238	20/10/2004	MCFC	Urina	8	<1	<1	>128	128	>128	64	64	R		
E. coli JF243	29/10/2004	CMA	Urina	8	<1	<1	>128	64	128	16	32	R		
E. coli JF38	11/9/2003	VCN	Urina	8	<1	<1	>128	8	16	8	8	R		
E. coli JF42	17/9/2003	VRS	Urina	4	<1	<1	>128	4	16	8	4	R		
E. coli JF57	16/10/2003	TAM	Urina	16	<1	<1	>128	32	>128	16	8	R		
E. coli JF59	20/10/2003	TBZ	Urina	8	<1	<1	>128	16	64	16	16	R		
E. coli JF103	2/2/2004	TMBP	Urina	8	<1	<1	>128	64	128	32	32	R		
E. coli JF195	13/7/2004	WDC	Urina	8	<1	<1	>128	16	128	32	8	R		
E. coli JF197	20/7/2004	ZAR	Urina	8	<1	<1	>128	16	32	16	8	R		
P. vulgaris JF206	10/8/2004	TMSB	Urina	4	<1	<1	>128	4	32	16	8	R		
E. coli JF208	16/8/2004	SMV	Urina	8	<1	<1	>128	32	128	16	16	R		
E. coli JF284	23/1/2005	RTGDD	Urina	8	<1	<1	>128	64	>128	32	32	R		
E. coli JF285	24/1/2005	JCMM	Urina	8	<1	<1	>128	64	>128	128	32	R		
E. coli JF248	8/11/2004	KCFXL	Urina	8	<1	<1	>128	32	64	32	16	R		
E. coli JF256	24/11/2004	ECF	Urina	8	<1	<1	>128	32	128	32	16	R		
E. coli JF259	1/12/2004	AOMB	Urina	8	<1	<1	>128	16	16	8	8	R		
E. coli JF280	14/1/2005	RGS	Urina	8	<1	<1	>128	16	128	16	8	R		
E. coli JF291	26/1/2005	FSL	Urina	8	<1	<1	>128	16	64	32	16	R		
E. coli JF302	2/2/2005	MSLG	Urina	8	<1	<1	>128	16	128	64	32	R		
E. coli JF371	8/3/2005	MARC	Urina	4	4	<1	>128	>32	>128	64	32	R		
E. coli JF281	19/1/2005	SMV	Urina	8	<1	<1	>128	4	32	16	8	R		
E. coli JF295	28/1/2005	JST	Urina	4	<1	<1	>128	128	>128	128	32	R		
E. coli JF261	2/12/2004	DMG	Urina	4	<1	<1	>128	32	64	16	16	R		
E. coli JF265	16/12/2004	LHF	Urina	4	<1	<1	>128	32	128	32	32	R		
E. coli JF268	21/12/2004	MA T	Urina	4	<1	<1	>128	32	64	32	16	R		
E. coli JF278	12/1/2005	ACP	Urina	4	<1	<1	>128	32	128	32	16	R		
E. coli JF289	25/1/2005	EVTG	Urina	4	<1	<1	>128	32	32	32	16	R		
E. coli JF272	31/12/2004	BMB	Urina	4	<1	<1	>128	16	16	8	8	R		
E. coli JF273	4/1/2005	ERG	Urina	4	<1	<1	>128	16	32	16	8	R		
E. coli JF279	13/1/2005	MCCR	Urina	4	<1	<1	>128	16	32	16	8	R		
E. coli JF342	29/9/2005	LPA	Urina	2	<1	<1	>128	64	>128	64	4	R		
E. coli JF283	20/1/2005	EPS	Urina	4	<1	<1	>128	16	128	16	8	R		
E. coli JF274	6/1/2005	HHGG	Urina	4	<1	<1	>128	8	16	8	4	R		
E. coli JF288	25/1/2005	DHS	Urina	4	<1	<1	>128	8	16	16	8	R		
E. coli JF258	27/11/2004	MCSR	Urina	2	<1	<1	>128	128	128	64	32	R		
E. coli JF245	4/11/2004	LTB	Urina	2	<1	<1	>128	8	8	8	4	R		
GRUPO 4														
K. oxytoca RP186	28/6/2000	SVM	Abscesso	16	<1	<1	>128	16	64	16	16	R		R
E. coli JF36	9/9/2003	APB	Urina	16	<1	<1	>128	16	32	16	16	R		R
E. coli JF41	15/9/2003	HNMS	Urina	16	<1	<1	>128	>128	>128	128	128	R		R
E. coli JF45	19/9/2003	NVC	Urina	16	<1	<1	>128	32	>128	32	16	R		R
E. coli JF48	23/9/2003	DHS	Urina	32	<1	<1	>128	64	128	128	64	R		R
E. coli JF51	6/10/2003	SMS	Urina	16	<1	<1	>128	128	>128	128	64	R		R
E. coli JF77	2/12/2003	GMAA	Urina	16	<1	<1	>128	16	64	16	16	R		R
E. coli JF83	12/12/2003	LVA	Urina	32	<1	<1	>128	64	128	64	64	R		R
E. coli JF98	23/1/2004	IV	Urina	16	<1	<1	>128	64	128	64	32	R		R
E. coli JF106	5/2/2004	VED	Urina	32	<1	<1	>128	128	>128	64	32	R		R
E. coli JF126	10/3/2004	AOMB	Urina	32	<1	<1	>128	32	128	32	8	R		R
E. coli JF129	19/3/2004	SOC	Urina	32	<1	<1	>128	8	16	16	8	R		R
E. coli JF128	19/3/2004	VLDP	Urina	32	<1	<1	>128	32	128	16	16	R		R
E. coli JF141	31/3/2004	JPS	Urina	16	<1	<1	>128	128	>128	128	64	R		R
E. coli JF152	13/4/2004	IMS	Urina	64	<1	<1	>128	8	16	16	8	R		R
E. coli JF151	13/4/2004	LCSB	Urina	84	<1	<1	>128	16	64	16	8	R		R
K. pneumoniae JF160	3/5/2004	SCFML	Urina	32	<1	<1	>128	4	16	4	4	R		R
E. coli JF163	8/5/2004	ACLM	Urina	16	<1	<1	>128	16	16	4	8	R		R
E. coli JF174	20/5/2004	MNT	Urina	32	<1	<1	>128	128	128	128	64	R		R
E. coli JF191	5/7/2004	FMOS	Urina	16	<1	<1	>128	>128	>128	128	64	R		R
E. coli JF192	8/7/2004	LVA	Urina	32	<1	<1	>128	32	128	64	32	R		R
E. coli JF202	6/8/2004	NMB	Urina	16	<1	<1	>128	64	128	32	16	R		R
E. coli JF204	9/8/2004	M.ANP	Urina	16	<1	<1	>128	32	>128	64	32	R		R
E. coli JF205	10/8/2004	AASB	Urina	32	<1	<1	>128	128	>128	128	64	R		R
E. coli JF290	26/1/2005	RCCC	Urina	64	<1	<1	>128	32	64	32	16	R		R
E. coli JF305	15/2/2005	MCA	Urina	64	<1	<1	>128	16	128	64	32	R		R
E. coli JF275	7/1/2005	CFB	Urina	32	<1	<1	>128	>128	>128	>128	64	R		R
K. pneumoniae JF299	31/1/2005	OKF	Urina	32	<1	<1	>128	128	>128	128	128	R		R
GRUPO 7														
E. coli JF180	6/6/2004	GPO	Urina	4	<1	<1	>128	2	4	1	2	I		
K. pneumoniae JF184	19/6/2004	SCMN	Urina	4	<1	<1	>128	2	8	2	4	I		
E. coli JF199	27/7/2004	CP	Urina	8	<1	<1	>128	2	64	16	16	I		
E. coli JF232	7/10/2004	RSS	Urina	<1	<1	<1	>128	2	4	1	1	I		
E. coli JF249	11/11/2004	GG	Urina	2	<1	<1	>128	2	4	4	2	I		
GRUPO 9														
E. coli RP167	5/6/2000	JGL	Urina	32	<1	128	128	1	4	4	2	S	P	R
P. mirabilis JF146	6/4/2004	MMSM	Urina	>128	64	<1	>128	1	8	1	1	S	P	R
E. cloacae JF154	19/4/2004	ACLF	Urina	>128	4	4	64	0,125	1	2	0,5	S	P	R
E. coli JF220	15/9/2004	ALFS	Urina	32	32	8	16	<0,0312	<0,0312	0,0625	<0,0312	S	P	R
E. coli JF224	22/9/2004	MMBW	Urina	128	8	4	>128	1	4	2	1	S	P	R
E. cloacae JF277	11/1/2005	MOF	Coto	>128	128	32	32	0,5	1	1	0,5	S	P	R
GRUPO 10														
K. pneumoniae RP48	28/2/2000	HET	Urina	4	4	128	32	0,5	1	0,5	0,25	S	P	
K. pneumoniae RP105	11/4/2000	AAF	Urina	8	<1	2	64	1	0,5	0,125	0,0625	S	P	
E. coli JF74	27/11/2003	AMEC	Urina	8	128	16	>128	0,125	0,5	0,5	1	S	P	
E. coli JF175	25/5/													

<i>E. coli</i> JF142	5/4/2004	DC	Urina	8	<1	<1	128	0,0625	0,5	0,5	0,25	S	
<i>E. coli</i> JF148	8/4/2004	GCMM	Urina	2	<1	<1	>128	0,5	2	1	0,5	S	
<i>E. coli</i> JF157	20/4/2004	NAP	Urina	4	<1	<1	>128	<0,03125	0,0625	<0,0312	<0,0312	S	
<i>E. coli</i> JF161	4/5/2004	IVSM	Urina	4	<1	<1	>128	0,25	0,5	0,125	0,5	S	
<i>E. coli</i> JF162	5/5/2004	AAPA	Urina	4	<1	<1	>128	0,25	0,5	0,125	0,5	S	
<i>E. coli</i> JF166	13/5/2004	OAC	Urina	2	<1	<1	>128	1	4	1	1	S	
<i>E. coli</i> JF188	14/5/2004	JCS	Urina	4	<1	<1	128	0,125	0,5	0,5	0,25	S	
<i>E. coli</i> JF170	14/5/2004	RAMM	Urina	8	<1	<1	>128	0,25	0,5	0,25	0,5	S	
<i>E. coli</i> JF172	17/5/2004	BAS	Urina	4	<1	<1	>128	0,125	0,5	0,5	0,25	S	
<i>E. coli</i> JF181	7/6/2004	MCFC	Urina	4	<1	<1	>128	0,25	0,5	0,5	0,25	S	
<i>E. coli</i> JF187	1/7/2004	CBR	Urina	8	<1	<1	64	0,06	0,5	0,25	0,125	S	
<i>E. coli</i> JF190	5/7/2004	ALS	Urina	4	<1	<1	>128	0,5	0,25	0,5	0,25	S	
<i>E. coli</i> JF211	18/8/2004	DBM	Urina	<1	<1	<1	>128	0,125	0,5	0,5	0,25	S	
<i>E. coli</i> JF214	26/8/2004	EPR	Urina	8	<1	<1	>128	0,0625	<0,03125	0,0625	<0,0312	S	
<i>E. coli</i> JF1218	10/9/2004	ATZ	Urina	8	<1	<1	>128	1	8	2	1	S	
<i>E. coli</i> JF219	10/9/2004	MOSC	Urina	8	<1	<1	>128	0,125	0,5	0,5	0,5	S	
<i>E. coli</i> JF222	21/9/2004	GFB	Urina	8	<1	<1	>128	0,5	1	1	0,5	S	
<i>K. pneumoniae</i> JF228	24/9/2004	VED	Urina	2	<1	<1	>128	1	2	2	1	S	
<i>E. coli</i> JF233	11/10/2004	JSC	Urina	4	<1	<1	>128	0,0625	0,0625	2	0,125	S	
<i>E. coli</i> JF235	13/10/2004	GMT	Urina	4	<1	<1	16	<0,03	64	0,06	4	S	
<i>E. coli</i> JF242	26/10/2004	JRG	Urina	4	<1	<1	>128	0,125	1	0,5	0,25	S	
<i>E. coli</i> JF241	26/10/2004	LTT	Urina	8	<1	<1	>128	0,125	0,5	0,5	0,25	S	
<i>E. coli</i> RP80		GC	Fezes	4	<1	<1	>128	0,25	1	1	0,5	S	
<i>E. coli</i> RP94		AJH	Fezes	4	<1	<1	>128	0,25	1	1	0,5	S	
<i>E. coli</i> RP78		THJAP	Fezes	4	<1	<1	>128	2	2	2	1	S	
<i>E. coli</i> RP84		JBG	Fezes	4	<1	<1	>128	0,25	0,25	0,5	1	S	
<i>E. coli</i> JF297	29/1/2005	D.A.Q	Urina	8	<1	<1	>128	0,25	0,5	2	0,5	S	
<i>E. coli</i> JF300	1/2/2005	GRMM	Urina	8	<1	<1	>128	0,25	2	1	0,5	S	
<i>E. coli</i> JF306	15/2/2005	WC	Urina	8	<1	<1	32	0,125	0,5	0,5	0,25	S	
<i>E. coli</i> JF252	16/11/2004	MLV	Urina	4	<1	<1	>128	1	4	2	1	S	
<i>E. coli</i> JF247	8/1/2004	ICD	Urina	4	<1	<1	>128	0,25	0,25	0,5	0,25	S	
<i>K. pneumoniae</i> JF262	6/12/2004	VED	Urina	2	<1	<1	>128	0,5	2	2	1	S	
<i>E. coli</i> JF264	8/12/2004	DJSZ	Urina	2	<1	<1	128	0,25	0,5	0,5	0,25	S	
GRUPO 12													
<i>K. pneumoniae</i> RP21	31/1/2000	GMM	Urina	64	<1	<1	128	0,5	8	4	1	S	R
<i>E. coli</i> RP148	18/5/2000	JCP	Urina	32	<1	<1	>128	1	4	2	2	S	R
<i>K. pneumoniae</i> RP176	13/6/2000	JCN	Urina	32	<1	<1	>128	1	8	4	2	S	R
<i>K. pneumoniae</i> JF43	7/10/2003	MEDB	Urina	16	<1	<1	64	0,25	1	1	0,5	S	R
<i>C. freundii</i> JF79	5/12/2003	CFA	Urina	128	<1	<1	>128	0,25	0,5	1	0,5	S	R
<i>E. aerogenes</i> JF145	19/4/2004	AJAB	Urina	>128	<1	<1	32	0,5	1	0,5	0,25	S	R
<i>E. coli</i> JF167	13/5/2004	CRBS	Urina	32	<1	<1	>128	0,5	2	0,125	0,5	S	R
<i>E. coli</i> JF287	24/1/2005	LMD	Urina	64	<1	<1	>128	1	2	4	2	S	R
<i>E. coli</i> JF303	11/2/2005	DHS	Urina	32	<1	<1	128	1	4	2	1	S	R
<i>K. pneumoniae</i> JF292	27/1/2005	ATZ	Urina	32	<1	<1	128	0,5	4	2	1	S	R

* CIM, concentração inibitória mínima; CFO, cefoxitina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; NAL, ácido nalidixico; CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; OFL, ofloxacina; LVX, levofloxacina. *** R, resistente; I, intermediário; S, sensível; P, positivo.

Apêndice 2. Sensibilidade às fluoroquinolonas e as alterações em GyrA identificadas nas enterobactérias avaliadas

Amostra	CIM (µg/mL) de				Alterações de aminoácidos nas posições											
	CIP	NOR	OFL	LVX	79	83	85	87	89	90	91	95	98	100	111	
CIM CIP ≥4 µg/mL																
C. freundii ATCC 8090																
C. freundii JF130	32	64	64	32			Thr (ACC)	Asp (GAC)								
							Ile (ATC)	Asn (AAC)								
E. cloacae ATCC 13047																
E. cloacae JF182	32	64	16	8	Pro (CCC)	Ser (TCC)		Asp (GAC)	Ile (ATC)	Val (GTT)		Pro (CCT)				
E. cloacae JF207	64	>128	64	64	Pro (CCT)	Phe (TTC)		Asn (AAC)	Ile (ATT)	Val (GTC)		Pro (CCC)				
E. cloacae JF216	16	64	16	8	Pro (CCT)	Phe (TTC)		Asn (AAC)	Ile (ATT)	Val (GTC)		Pro (CCC)				
E. cloacae JF183	64	>128	32	32	Pro (CCT)	Tyr (TAC)		Ala (GCC)	Ile (ATT)	Val (GTC)		Pro (CCC)				
E. coli ATCC 11775																
E. coli JF239	128	128	32	32		Ser (TCG)	Val (GTC)	Asp (GAC)	Ile (ATT)		Arg (CGC)			Tyr (TAT)	Ser (TCT)	
E. coli JF114	64	>128	32	16		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF115	8	16	16	4		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF126	32	128	32	8		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF138	32	128	32	16		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF151	16	64	16	8		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF152	8	16	16	8		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF163	16	16	4	8		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF174	128	128	128	64		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF191	>128	>128	128	64		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF192	32	128	64	32		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF204	32	>128	64	32		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF205	128	>128	128	64		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF240	128	>128	64	64		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF25	16	32	16	8		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF251	8	16	16	8		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF26	8	32	16	8		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF263	4	8	4	2		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF27	32	64	32	16		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF270	64	64	32	16		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF281	4	32	16	8		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF282	32	128	32	16		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF285	64	>128	128	32		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF286	64	128	128	64		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF290	32	64	32	16		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF302	16	128	64	32		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF305	16	128	64	32		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF32	8	16	16	8		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF36	16	32	16	16		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF41	>128	>128	128	128		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF45	32	>128	32	16		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF48	64	128	128	64		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF50	32	>128	64	16		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF51	128	>128	128	64		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF77	16	64	16	16		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF83	64	128	64	64		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF88	32	32	>128	16		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF98	64	128	64	32		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF301	32	32	16	8		Leu (TTG)		Asn (AAC)	Ile (ATC)							
E. coli JF128	32	128	16	16		Leu (TTG)		Asn (AAC)	Ile (ATC)							
E. coli JF141	128	>128	128	64		Leu (TTG)		Asn (AAC)	Ile (ATC)							
E. coli JF202	64	128	32	16		Leu (TTG)		Asn (AAC)	Ile (ATC)							
E. coli JF275	>128	>128	>128	64		Leu (TTG)		Asn (AAC)	Ile (ATC)							
E. coli JF295	128	>128	128	32		Leu (TTG)		Asn (AAC)	Ile (ATC)							
E. coli JF129	8	16	16	8		Leu (TTG)	Val (GTT)	Gly (GGC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF106	128	>128	64	32		Leu (TTG)	Val (GTT)	Tyr (TAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF178	8	64	8	8		Leu (TTG)	Val (GTT)		Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF213	4	8	8	4		Leu (TTG)	Val (GTT)		Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
K. oxytoca ATCC 13182																
K. oxytoca JF165	32	64	64	32		Thr (ACT)		Asp (GAC)								
K. oxytoca JF194	32	64	64	32		Ile (ATT)		Tyr (TAC)								
K. oxytoca RP1	8	16	8	4		Ile (ATT)		Tyr (TAC)								
K. oxytoca RP103	16	64	16	8		Ile (ATT)		His (CAC)								
K. oxytoca RP136	32	128	32	16		Ile (ATT)		His (CAC)								
K. oxytoca RP181	16	128	16	8		Ile (ATT)		His (CAC)								
K. oxytoca RP183	16	128	16	8		Ile (ATT)		His (CAC)								
K. oxytoca RP184	16	64	16	8		Ile (ATT)		His (CAC)								
K. oxytoca RP185	16	128	16	16		Ile (ATT)		His (CAC)								
K. oxytoca RP186	16	64	16	16		Ile (ATT)		His (CAC)								
K. oxytoca RP26	16	64	8	4		Ile (ATT)		His (CAC)								
K. oxytoca RP3	8	16	8	2		Ile (ATT)		His (CAC)								
K. pneumoniae ATCC 13883																
K. pneumoniae JF10	4	16	4	4		Ser (TCC)		Asp (GAC)						Leu (CTG)		
K. pneumoniae JF16	4	16	4	4		Ile (ATC)										
K. pneumoniae JF6	8	64	16	8		Ile (ATC)										
K. pneumoniae JF7	8	32	8	8		Ile (ATC)										
K. pneumoniae JF160	4	16	4	4		Phe (TTC)										
K. pneumoniae JF17	4	8	8	2		Phe (TTC)								Leu (TTG)		
K. pneumoniae JF230	16	64	32	16		Phe (TTC)		Ala (GCC)								
K. pneumoniae JF299	128	>128	128	128		Phe (TTC)										
K. pneumoniae RP107	4	16	8	4		Phe (TTC)										
K. pneumoniae RP175	4	32	8	8		Tyr (TAC)										
K. pneumoniae RP180	4	16	16	8		Tyr (TAC)										
K. pneumoniae RP17	8	32	4	2				Tyr (TAC)								
Providencia ATCC																
P. stuartii JF29	32	>128	16	16		Ser (ACG)		Glu (GAG)								
Providencia JF244	64	128	64	128		Arg (AGA)										
						Ile (ATC)		Gly (GGG)								
S. marcescens ATCC																
S. marcescens JF271	8	64	32	16		Ser (AGC)										
S. marcescens JF56	16	128	16	16		Ile (ATC)										
						Ile (ATC)										
CIM CIP = 2 µg/mL																
E. coli ATCC 11775																
E. coli JF180	2	4	1	2		Ser (TCG)	Val (GTC)	Asp (GAC)	Ile (ATT)		Arg (CGC)			Tyr (TAT)	Ser (TCT)	
E. coli JF232	2	4	4	1		Leu (TTG)	Val (GTT)	Tyr (TAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF249	2	4	4	2		Leu (TTG)	Val (GTT)	Tyr (TAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
E. coli JF199	2	64	16	16		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)	
K. pneumoniae ATCC 13883																
K. pneumoniae JF184	2	8	2	4		Ser (TCC)										
						Phe (TTC)										

Amostra	CIM (µg/mL) de	Alterações de aminoácidos nas posições
---------	----------------	--

	CIP	NOR	OFL	LVX	79	83	85	87	89	90	91	95	98	100	111
CIM CIP< 2 µg/mL															
C. freundii ATCC 8090						Thr (ACC)									
C. freundii JF79	0,25	0,5	1	0,5		Ile (ATC)									
E. aerogenes ATCC 13048															
E. aerogenes JF145	0,5	1	0,5	0,25											
E. cloacae ATCC 13047					Pro (CCC)				Ile (ATT)	Val (GTT)		Pro (CCT)			
E. cloacae JF154	0,125	1	2	0,5	Pro (CCT)				Ile (ATC)	Val (GTC)		Pro (CCC)			
E. cloacae JF277 **	0,5	1	1	0,5											
E. coli ATCC 11775						Ser (TCG)	Val (GTC)	Asp (GAC)	Ile (ATT)		Arg (CGC)			Tyr (TAT)	Ser (TCT)
E. coli JF287	1	2	4	2		Leu (TTG)	Val (GTT)	Asn (AAC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)
E. coli JF224	1	4	2	1		Leu (TTG)	Val (GTT)	Gly (GGC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)
E. coli JF175	0,25	0,5	1	0,25		Leu (TTG)	Val (GTT)		Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)
E. coli JF49	<0,0312	0,5	0,5	0,25		Leu (TTG)	Val (GTT)		Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)
E. coli JF74	0,125	0,5	0,5	1		Leu (TTG)	Val (GTT)		Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)
E. coli JF187	0,06	0,5	0,25	0,13			Val (GTT)	Gly (GGC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)
E. coli JF167	0,5	2	0,13	0,5			Val (GTT)	Gly (GGC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)
E. coli RP167	1	4	4	2			Val (GTT)	Gly (GGC)	Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)
E. coli JF220	<0,0312	<0,031	0,06	<0,03			Val (GTT)		Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)
E. coli JF235	<0,03	64	0,06	4			Val (GTT)		Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)
E. coli JF303	1	4	2	1			Val (GTT)		Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)
E. coli JF306	0,125	0,5	0,5	0,25			Val (GTT)		Ile (ATC)		Arg (CGT)			Tyr (TAC)	Ser (TCC)
E. coli RP148	1	4	2	2					Ile (ATC)						
K. pneumoniae ATCC 13883						Ser (TCC)		Asp (GAC)		Val (GTG)					
K. pneumoniae JF113	1	1	2	1		Phe (TTC)									
K. pneumoniae JF292	0,5	4	2	1		Phe (TTC)									
K. pneumoniae JF43	0,25	1	1	0,5		Phe (TTC)									
K. pneumoniae RP19	1	2	1	1		Phe (TTC)									
K. pneumoniae RP105	1	0,5	0,13	0,06						Val (GTC)					
K. pneumoniae RP176	1	8	4	2											
K. pneumoniae RP21	0,5	8	4	1				Tyr (TAC)							
K. pneumoniae RP48	0,5	1	0,5	0,25						Val (GTC)					
P. mirabilis ATCC						Ser (TCC)									
P. mirabilis JF146	1	8	1	1		Phe (TTC)									

* CIM, concentração inibitória mínima; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; OFL, ofloxacina; LVX, levofloxacina.
 ** Houve mutação 73Ile e 74Val, sem alteração de aminoácido

Apêndice 3. Sensibilidade às fluoroquinolonas e as alterações em ParC identificadas nas enterobactérias avaliadas

Amostra	CIM (µg/mL) de				Alterações de aminoácidos nas posições																		
	CIP	NOR	OFL	LVX	68	70	71	74	78	80	81	84	90	91	92	96	97	100	101	102	107	108	
CIM CIP ≥4 µg/mL																							
C. freundii ATCC 8090																							
C. freundii JF130	32	64	64	32	sem mutação																		
E. cloacae ATCC 13047																							
E. cloacae JF182	32	64	16	8	Gly (GGC) Val (GTG)				Tyr (TAT)		Ser (AGC)		Arg (CGT) Tyr (TAC)				Tyr (GAC)		Gly (GGT)		Ala (GCA)		
E. cloacae JF207	64	>128	64	64	Gly (GGC) Val (GTG)				Tyr (TAC)		Arg (CGC) Tyr (TAT)				Tyr (GAT)		Gly (GGC)		Ala (GCG)				
E. cloacae JF216	16	64	16	8	Gly (GGC) Val (GTG)				Tyr (TAC)		Ile (ATC)		Arg (CGC) Tyr (TAT)				Tyr (GAT)		Gly (GGC)		Ala (GCG)		
E. cloacae JF183	64	>128	32	32	Gly (GGC) Val (GTG)				Tyr (TAC)		Arg (CGC) Tyr (TAT)				Tyr (GAT)		Gly (GGC)		Ala (GCG)				
E. coli ATCC 11775																							
E. coli JF239	128	128	32	32					Ser (AGC)		Glu (GAA)		Gln (CAA)		Gly (GGC)								
E. coli JF114	64	>128	32	16					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF115	8	16	16	4					Ile (ATC)		Lys (AAA)		Gln (CAG)										
E. coli JF126	32	128	32	8					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF138	32	128	32	16					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF151	16	64	16	8					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF152	8	16	16	8					Ile (ATC)		Lys (AAA)		Gln (CAG)										
E. coli JF163	16	16	4	8					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF174	128	128	128	64					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF191	>128	>128	128	64					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF192	32	128	64	32					Ile (ATC)														
E. coli JF204	32	>128	64	32					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF205	128	>128	128	64					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF240	128	>128	64	64					Ile (ATC)		Gly (GGA)		Gln (CAG)										
E. coli JF25	16	32	16	8					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF251	8	16	16	8					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF26	8	32	16	8					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF263	4	8	4	2					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF27	32	64	32	16							Lys (AAA)		Gln (CAG)										
E. coli JF270	64	64	32	16							Lys (AAA)		Gln (CAG)										
E. coli JF281	4	32	16	8					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF282	32	128	32	16					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF285	64	>128	128	32					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF286	64	128	128	64					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF290	32	64	32	16							Lys (AAA)		Gln (CAG)										
E. coli JF302	16	128	64	32					Ile (ATC)														
E. coli JF305	16	128	64	32					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF32	8	16	16	8							Lys (AAA)		Gln (CAG)										
E. coli JF36	16	32	16	16					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF41	>128	>128	128	128					Ile (ATC)		Gly (GGA)		Gln (CAG)										
E. coli JF45	32	>128	32	16					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF48	64	128	128	64					Arg (AGA)				Gln (CAG)										
E. coli JF50	32	>128	64	16					Ile (ATC)		Gly (GGA)		Gln (CAG)										
E. coli JF51	128	>128	128	64					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF77	16	64	16	16					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF83	64	128	64	64					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF88	32	32	>128	16					Ile (ATC)		Ala (GCA)		Gln (CAG)										
E. coli JF98	64	128	64	32							Lys (AAA)		Gln (CAG)										
E. coli JF301	32	32	16	8					Ile (ATC)														
E. coli JF128	32	128	16	16					Ile (ATC)														
E. coli JF141	128	>128	128	64					Ile (ATC)		Gly (GGA)												
E. coli JF202	64	128	32	16					Ile (ATC)														
E. coli JF275	>128	>128	>128	64					Ile (ATC)														
E. coli JF295	128	>128	128	32					Ile (ATC)														
E. coli JF129	8	16	16	8					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF106	128	>128	64	32					Ile (ATC)				Gln (CAG)										
E. coli JF178	8	64	8	8					Ser (AGT)				Gln (CAG)										
E. coli JF213	4	8	8	4					Arg (CGC)				Gln (CAG)		Gly (GGG)								
K. oxytoca ATCC13182																							
K. oxytoca JF165	32	64	64	32	Gly (GGC)				Tyr (TAT)		Ser (AGC)		Ala (GCC) Pro (CCA)				Ser (TCA)		Ser (TCA)				
K. oxytoca JF194	32	64	64	32	Gly (GGT)				Tyr (TAC)		Arg (CGC)						Ser (TCA)						
K. oxytoca RP1	8	16	8	4	Gly (GGT)				Tyr (TAC)		Ile (ATC)												
K. oxytoca RP103	64	16	64	16	Gly (GGT)				Tyr (TAC)		Ile (ATC)		Ala (GCT)										
K. oxytoca RP136	32	128	32	16	Gly (GGT)				Tyr (TAC)		Ile (ATC)				Ser (TCA)								
K. oxytoca RP181	16	128	16	8	Gly (GGT)				Tyr (TAC)		Ile (ATC)				Ser (TCA)								
K. oxytoca RP183	16	128	16	8	Gly (GGT)				Tyr (TAC)		Ile (ATC)				Ser (TCA)								
K. oxytoca RP184	16	64	16	8	Gly (GGT)				Tyr (TAC)		Ile (ATC)				Ser (TCA)								
K. oxytoca RP185	16	128	16	16	Gly (GGT)				Tyr (TAC)		Ile (ATC)				Ser (TCA)								
K. oxytoca RP186	16	64	16	16	Gly (GGT)				Tyr (TAC)		Ile (ATC)				Ser (TCA)								
K. oxytoca RP26	16	64	8	4	Gly (GGT)				Tyr (TAC)		Ile (ATC)		Ala (GCT)										
K. oxytoca RP3	8	16	8	2	Gly (GGT)				Tyr (TAC)		Ile (ATC)		Ala (GCT)										
K. pneumoniae ATCC 13883																							
K. pneumoniae JF10	4	16	4	4					Tyr (TAT)		Ser (AGC)												
K. pneumoniae JF16	4	16	4	4							Ile (ATC)												
K. pneumoniae JF6	8	64	16	8							Ile (ATC)												
K. pneumoniae JF7	8	32	8	8					Tyr (TAC)		Ile (ATC)												
K. pneumoniae JF160	4	16	4	4	sem mutação																		
K. pneumoniae JF17	4	8	8	2	sem mutação																		
K. pneumoniae JF230	16	64	32	16							Ile (ATC)												
K. pneumoniae JF299	128	>128	128	128							Ile (ATC)												
K. pneumoniae RP107	4	16	8	4	sem mutação																		
K. pneumoniae RP175	4	32	8	8	sem mutação																		
K. pneumoniae RP180	4	16	16	8	sem mutação																		
K. pneumoniae RP17	8	32	4	2	sem mutação																		
Providencia ATCC																							
P. stuartii JF29	32	>128	16	16							Ser (AGC)						Gln (CAA)						
Providencia JF244	64	128	64	128							Ser (AGT)						Gln (CAG)						
S. marcescens ATCC																							
S. marcescens JF271	8	64	32	16	sem mutação																		
S. marcescens JF56	16	128	16	16	sem mutação																		
CIM CIP = 2 µg/mL																							
E. coli ATCC 11775																							
E. coli JF180	2	4	1	2							Ser (AGC)						Gln (CAA)						
E. coli JF232	2	4	4	1							Ile (ATC)						Gln (CAG)						
E. coli JF249	2	4	4	2							Ile (ATC)												
E. coli JF199	2	64	16	16							Ile (ATC)						Gln (CAG)						
K. pneumoniae ATCC 13883																							
K. pneumoniae JF184	2	8	2	4	sem mutação																		
CIM CIP< 2 µg/mL																							
C. freundii ATCC 8090																							
C. freundii JF79	0,25	0,5	1	0,5	sem mutação																		
E. aerogenes ATCC 13048																							
E. aerogenes JF145	0,5	1	0,5	0,25	Val (GTG) Leu (TTG) Val (GTA) Leu (CTG)						Gln (CAA) Gln (CAG)		Pro (CCG) Pro (CCT)		Tyr (TAC) Tyr (TAT)		Val (GTA) Val (GTG)		Tyr (GAT) Tyr (GAC)		Cys (GGC) Trp (GGG)		
E. cloacae ATCC 13047																							
E. cloacae JF154	0,125	1	2	0,5	Gly (GGT) Val (GTA) Gly (GGC) Val (GTG)				Tyr (TAT) Tyr (TAC)				Arg (CGT) Tyr (TAC) Arg (CGC) Tyr (TAT)				Tyr (GAC) Tyr (GAT)		Gly (GGT) Gly (GGC)		Ala (GCA) Ala (GCG)		
E. cloacae JF277	0,5	1	1	0,5	Val (GTG)				Tyr (TAC)				Arg (CGC) Tyr (TAT)				Tyr (GAT)		Gly (GGC)		Ala (GCG)		
E. coli ATCC 11775																							
E. coli JF287	1	2	4	2					Gly (GGC)Ser (AGC)Ala (GCC)Ser (AGC)		Gln (CAA)								Cys (GGC)		Trp (GGG)		
E. coli JF224	1	4	2	1					Cys (TGC)		Ser (AGT)												
E. coli JF175	0,25	0,5	1	0,25					Ser (AGT)				Gln (CAG)										
E. coli JF49	<0,031	0,5	0,5	0,25					Ser (AGT)				Gln (CAG)										
E. coli JF74	0,125	0,5	0,5	1					Ser (AGT)				Gln (CAG)										
E. coli JF187	0,06	0,5	0,25	0,125									Gln (CAG)										
E. coli JF167	0,5	2	0,125	0,5							Ser (AGT)		Gln (CAG)										
E. coli RP167	1	4	4	2					Ser (AGT)				Gln (CAG)										
E. coli JF220	<0,031	<0,031	0,063	<0,031					Ser (AGT)				Gln (CAG)										
E. coli JF235	<0,031	64	0,06	4									Gln (CAG)										
E. coli JF303	1	4	2	1							Ala (GCT)		Gln (CAG)										
E. coli JF306	0,125	0,5	0,5	0,25									Gln (CAG)										
E. coli RP148	1	4	2	2	sem mutação																		

Amostra	CIM (µg/mL) de				Alterações de aminoácidos nas posições																	
	CIP	NOR	OFL	LVX	68	70	71	74	78	80	81	84	90	91	92	96	97	100	101	102	107	108
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883																						
<i>K. pneumoniae</i> JF113	1	1	2	1	sem mutação																	
<i>K. pneumoniae</i> JF292	0,5	4	2	1	sem mutação																	
<i>K. pneumoniae</i> JF43	0,25	1	1	0,5	sem mutação																	
<i>K. pneumoniae</i> RP105	1	0,5	0,125	0,063	sem mutação																	
<i>K. pneumoniae</i> RP176	1	8	4	2	sem mutação																	
<i>K. pneumoniae</i> RP19	1	2	1	1	sem mutação																	
<i>K. pneumoniae</i> RP21	0,5	8	4	1	sem mutação																	
<i>K. pneumoniae</i> RP48	0,5	1	0,5	0,25	sem mutação																	
<i>P. mirabilis</i> ATCC																						
<i>P. mirabilis</i> JF146	1	8	1	1	sem mutação																	

* CIM, concentração inibitória mínima; NAL, ácido nalidixico; CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; OFL, ofloxacina; LVX, levofloxacina.