UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Investigação dos mecanismos de resistência às fluorquinolonas
em isolados bacterianos ambientais**

Danilo Garcia Sanchez

**Ribeirão Preto
2018**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Investigação dos mecanismos de resistência às fluorquinolonas em isolados bacterianos ambientais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Danilo Garcia Sanchez

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 03/08/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

SANCHEZ, D.G.	Investigação dos mecanismos de resistência às fluorquinolonas em isolados bacterianos ambientais		MESTRADO FCFRP USP 2018
------------------	---	--	-------------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sanchez, Danilo Garcia

Investigação dos mecanismos de resistência às fluorquinolonas em isolados bacterianos ambientais

Ribeirão Preto, 2018.

83 p.: il.; 30 cm.

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Stehling, Eliana Guedes.

1. Solo. 2. Resistência. 3. Quinolonas. 4. Água. 5. Bactérias ambientais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Danilo Garcia Sanchez

Investigação dos mecanismos de resistência às fluorquinolonas em isolados bacterianos ambientais.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção
do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes
Stehling

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a meus pais Antônio e Ângela pelo amor e dedicação infinitos. Também a meu irmão Diego pelo amor e companheirismo nesses 25 anos.

AGRADECIMENTOS

À vida pela oportunidade de, através dela, aprender constantemente.

À Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling pela oportunidade de realizar o mestrado, por sua orientação, por compartilhar seus conhecimentos e pela sua imensurável dedicação para a realização deste trabalho.

À Inara Fernanda Lage Gallo pela imensa ajuda nos trabalhos do cotidiano, por sua paciência e compreensão, sem a qual este trabalho não teria sido realizado.

A Vinícius Vicente Martins por compartilhar seus conhecimentos sempre tão dedicadamente.

A minha amiga Fernanda Maciel por compartilhar sua sabedoria e serenidade e pela relação de trabalho que proporcionou grande aprendizado durante a realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biorremediação (LAMAB) pelos eternos ensinamentos e apoio técnico.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e ao Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP pelo financiamento deste projeto.

God, grant me the serenity to accept the things I cannot change,
Courage to change the things I can,
And wisdom to know the difference between them.

Serenity Prayer, Reinhold Niebuhr

RESUMO

SANCHEZ, D.G. Investigação dos mecanismos de resistência às fluorquinolonas em isolados bacterianos ambientais. 2018. 83F. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As fluorquinolonas são antimicrobianos frequentemente prescritos no Brasil e em outros países e utilizados no tratamento de diversos tipos de infecções, principalmente naquelas do trato urinário e gastrointestinal. A ação desses compostos ocorre devido a interação dos mesmos com a DNA-girase e a topoisomerase IV bacterianas. A DNA girase é codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB* e a topoisomerase IV, pelos genes *parE* e *parC*. Estudos evidenciaram existir nesses genes regiões nas quais as mutações ocorrem de modo mais frequente, sendo esses sítios chamados de *Quinolone Resistance Determining Regions* (QRDR). Mutações nas QRDR levam a substituição de aminoácidos nas topoisomerases, diminuindo a afinidade destas enzimas pelas quinolonas, acarretando, portanto, em um fenótipo de resistência para essa classe de antimicrobianos. Este mecanismo de resistência mostrou-se um dos principais responsáveis pela resistência antimicrobiana para essa classe de antimicrobiano em isolados clínicos. Entretanto, outros mecanismos de resistência podem estar presentes, entre eles a aquisição de determinantes plasmidiais (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *oqxA* e *oqxB*). A maioria dos estudos foi realizada utilizando isolados bacterianos clínicos, contudo, pouco tem sido investigado sobre os mecanismos de resistência com bactérias de origem ambiental. Diante disso, o presente trabalho objetivou identificar os principais mecanismos de resistência às quinolonas em isolados bacterianos ambientais e os principais gêneros dessa microbiota que os albergam. Para tanto, 69 isolados bacterianos ambientais foram selecionados. Os principais gêneros bacterianos selecionados foram *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum* e *Escherichia* para os quais foram pesquisados além dos genes *Plasmid Mediated Quinolone Resistance* (PMQR), mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parE* e *parC* e a tipagem plasmidial. No conjunto os resultados permitem evidenciar um padrão de mutações nos genes codificadores das topoisomerases semelhante ao observado em isolados bacterianos clínicos, atuando os genes PMQR de modo sinérgico na contribuição da elevação da concentração inibitória mínima (CIM) frente às fluorquinolonas. No entanto, mecanismos adicionais que possam contribuir com os níveis de resistência não podem ser descartados, sobretudo sistemas de efluxo. A tipagem plasmidial evidenciou que a maioria dos isolados apresenta plasmídeos da família ColE-like.

Palavras-chave: 1. Resistência 2. Fluorquinolonas 3. Solo 4. Água 5. Bactérias ambientais.

ABSTRACT

SANCHEZ, D.G. Investigation of resistance mechanisms to fluorquinolones in environmental bacterial isolates. 2018. 83F. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Fluoroquinolones are antimicrobials frequently prescribed in Brazil and in other countries and used in the treatment of various types of infections, especially those of the urinary tract and gastrointestinal tract. The action of these compounds occurs due to their interaction with bacterial DNA-gyrase and topoisomerase IV. The DNA gyrase is encoded by the *gyrA* and *gyrB* genes and the topoisomerase IV, by the *parE* and *parC* genes. Studies have shown that there are regions in which the mutations occur more frequently, these sites being called QRDR (Quinolone Resistance Determining Regions). Mutations in QRDR lead to amino acid substitution in topoisomerases, reducing the affinity of these enzymes for the quinolones, thus leading to a resistance phenotype for this class of antimicrobials. This mechanism of resistance was shown to be one of the main factors responsible for antimicrobial resistance for this class of chemotherapy in clinical isolates. However, other mechanisms of resistance may be present, among them the acquisition of plasmid determinants (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *oqxA* and *oqxB*). Most studies were carried out using clinical bacterial isolates, however, little research has been done on the mechanisms. The present work aimed to identify the main mechanisms of resistance to quinolones in environmental bacterial isolates and the main genera of this microbiota that harbor them. For this purpose, 69 bacterial isolates were selected from environmental samples. The main bacterial genera selected were *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum* and *Escherichia* for which the genes PMQR, *gyrA*, *gyrB*, *parE* and *parC* and the plasmid typing were investigated. The results pattern of mutations in the genes coding for topoisomerases are similar to that observed in clinical bacterial isolates, acting PMQR genes synergistically in the contribution of MIC elevation to fluoroquinolones. However, additional mechanisms that may contribute to resistance levels cannot be discarded, especially efflux systems. Plasmid typing evidenced that most of the isolates present plasmids from the ColE-*like* family.

Keywords: 1. Resistance 2. Fluoroquinolone 3. Soil 4. Water 5. Environmental bacteria.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DAS QUINOLONAS.	18
FIGURA 2. ESTRUTURA QUÍMICA DAS QUINOLONAS E FLUORQUINOLONAS: A) ÁCIDO NALIDÍXICO; B) ENOXACINA; C) CIPROFLOXACINA; D) NORFLOXACINA; E) LEVOFLOXACINA.	21
FIGURA 3. MODELOS DE TETRÂMEROS DE TOPOISOMERASES BACTERIANAS.	23
FIGURA 4. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS EM BACTÉRIAS.	24
FIGURA 5. MAPA DO BRASIL CONTENDO A LOCALIZAÇÃO DAS COLETAS DE AMOSTRAS DE SOLO E DE ÁGUA.	35
FIGURA 6. PORCENTAGEM DE BACTÉRIAS AMBIENTAIS ISOLADAS.	41
FIGURA 7. PORCENTAGEM DE GENES PMQR EM RELAÇÃO AOS 50 ISOLADOS BACTERIANOS. .	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DAS QUINOLONAS DE ACORDO COM AS SUAS GERAÇÕES.	19
TABELA 2. INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS E NA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS BACTERIANOS.	38
TABELA 3. INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS GENES PARA TIPAGEM PLASMIDIAL DOS PLASMÍDEOS DOS ISOLADOS BACTERIANOS.	39
TABELA 4. PESQUISA DE MUTAÇÕES NOS GENES CODIFICADORES DE TOPOISOMERASES, GENES PLASMIDIAIS MEDIADORES DE RESISTÊNCIA E TIPAGEM PLASMIDIAL NOS ISOLADOS DE <i>S. MALTOPHILIA</i>	43
TABELA 5. PESQUISA DE MUTAÇÕES NOS GENES CODIFICADORES DE TOPOISOMERASES, GENES PLASMIDIAIS MEDIADORES DE RESISTÊNCIA E TIPAGEM PLASMIDIAL NOS ISOLADOS DE <i>ACHROMOBACTER</i> SP.	44
TABELA 6. PESQUISA DE MUTAÇÕES NOS GENES CODIFICADORES DE TOPOISOMERASES, GENES PLASMIDIAIS MEDIADORES DE RESISTÊNCIA E TIPAGEM PLASMIDIAL NOS ISOLADOS DE <i>OCHROBACTRUM</i> SP.	45
TABELA 7. PESQUISA DE MUTAÇÕES NOS GENES CODIFICADORES DE TOPOISOMERASES, GENES PLASMIDIAIS MEDIADORES DE RESISTÊNCIA E TIPAGEM PLASMIDIAL NOS ISOLADOS DE <i>E. COLI</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	Do inglês: “Basic Local Alignment Search Tool”
DNA	Do inglês: “Deoxyribonucleic acid” - Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
pb	Pares de base
PCR	Do inglês: “polymerase chain reaction” – Reação em cadeia da polimerase
RNA	Do inglês: “ribonucleic acid” – Ácido ribonucleico
TAE	Tris acetato EDTA
Tris	Hidroximetilaminometado
U	Unidade(s)
USP	Universidade de São Paulo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
NOR	Norfloxacin
CIP	Ciprofloxacina
LVX	Levofloxacina
MIC/ CIM	Do inglês: “minimum inhibitory concentration”- Concentração inibitória mínima
CLSI	Do inglês: “Clinical Laboratory Standards Institute”
PMQR	Do inglês: “Plasmidial mediated quinolone resistance” – Genes plasmidiais mediadores de resistência às quinolonas
QRDR	Do inglês: “Quinolone resistance determining region”- Regiões determinantes de resistência às quinolonas
BGNF	Bacilos Gram-negativos não fermentadores

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
h	Horas
g	Grama
µg	Micrograma
mmol	Milimol
µmol	Micromol
pmol	Picomol
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
-	Negativo ou Menos
+	Positivo
%	Porcentagem
®	Marca Registrada
nm	Nanômetro
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1	Classificação e indicação terapêutica das quinolonas	19
1.2	Mecanismo de ação das quinolonas	22
1.3	Resistência às quinolonas.....	23
1.3.1	Mutações no DNA do cromossomo bacteriano.....	24
1.3.2	Determinantes plasmidiais de resistência às quinolonas	25
2.	RELEVÂNCIA DO ESTUDO.....	30
3.	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral.....	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
4.	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Obtenção das amostras de solo e de água.....	34
4.2	Isolamento de bactérias do solo e da água	34
4.3	Extração do DNA genômico	36
4.4	Caracterização molecular dos isolados.....	36
4.5	Eletroforese em gel de agarose.....	36
4.6	Sequenciamento	37
4.7	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	37
4.8	Pesquisa dos genes de resistência às quinolonas	38
4.9	Tipagem plasmidial	39
5.	RESULTADOS.....	41
5.1	Identificação dos isolados bacterianos	41
5.2	Análise do perfil de resistência, pesquisa de mutações na região QRDR e de genes PMQR e tipagem plasmidial nos isolados por gênero bacteriano	42
5.2.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	42
5.2.2	<i>Achromobacter</i> sp.	43
5.2.3	<i>Ochrobactrum</i> sp.....	45
5.2.4	<i>Escherichia coli</i>	46
5.3	Análise geral do perfil de resistência e de genes PMQR nos 50 isolados estudados	47
6.	DISCUSSÃO.....	49
7.	CONCLUSÕES.....	57
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são compostos que apresentam atividade antimicrobiana e podem ser denominados quimioterápicos ou antibióticos, dependendo, respectivamente, se são sintetizados pelo homem ou extraídos a partir de micro-organismos produtores dessas substâncias (SÁEZ-LLORENS et al., 2000). O marco inicial da era dos antibióticos ocorreu com a descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming. Em 1929 a Penicilina G ou benzilpenicilina foi descrita, tendo sido iniciado seu uso terapêutico em meados dos anos 1940. Essa descoberta inspirou, durante o período de 1940-1960, a prospecção de diversas culturas de micro-organismos em busca de novos antibióticos, como as cefalosporinas, a estreptomicina, a eritromicina, dentre outros (GUIMARÃES et al., 2010).

Por outro lado, o marco da síntese dos quimioterápicos é datado de 1910, quando o pesquisador Paul Ehrlich sintetizou a primeira droga a base de arsênico, a qual foi utilizada no tratamento da sífilis. Posteriormente, o ácido nalidíxico seria a primeira quinolona sintetizada a apresentar atividade antimicrobiana e introduzida na clínica médica em 1962. As quinolonas são antimicrobianos sintéticos muito eficazes no tratamento de várias infecções bacterianas e exercem suas atividades através da interação com as enzimas nucleares denominadas topoisomerases (BLONDEAU, 2004). São quimioterápicos estruturalmente constituídos por dois anéis quinolônicos com um átomo de nitrogênio na posição 1, um grupo carboxila na posição 3 e um grupo carbonila na posição 4 (Figura 1) (EMMERSON & JONES, 2003).

Figura 1. Estrutura química das quinolonas.

O avanço na síntese de novos quimioterápicos entre os anos de 1980 a 2000 explorou a inserção de diferentes substituintes no anel quinolônico (R1, R2 e R3) (Figura 1), permitindo a síntese de novas drogas com características farmacológicas distintas, como por exemplo, as fluorquinolonas, as quais possuem um átomo de flúor no carbono 6 do anel quinolônico, ampliando assim as aplicações terapêuticas das quinolonas (GUIMARÃES et al., 2010; BALL, 2000; HAWKEY, 2003). Recentemente foram desenvolvidas novas fluorquinolonas com amplo espectro de ação e grande atividade sobre bactérias Gram-positivas, como o *Streptococcus pneumoniae* (BOLON, 2011).

O fenômeno da resistência antimicrobiana tem sido observado desde a introdução da penicilina como alternativa terapêutica. A aquisição de resistência aos antimicrobianos pode surgir naturalmente através de mutações espontâneas, mesmo na ausência de pressão seletiva. Contudo, em condições onde há aumento da pressão seletiva, o equilíbrio natural é rompido, favorecendo a seleção de linhagens bacterianas resistentes aos diferentes antimicrobianos, inclusive para aqueles utilizados no tratamento de uma grande variedade de infecções, como as quinolonas e fluorquinolonas (BLONDEAU, 2004). Algumas pesquisas apontaram que isolados clínicos obtidos de hospitais nos Estados Unidos durante os anos de 1997-2001 apresentaram mais de 10% de resistência à ciprofloxacina (NEUHAUSER et al., 2003) e o estudo de Wang e colaboradores mostrou que 60% dos isolados de *E. coli* obtidos entre 1997-1999 na China foram resistentes às fluorquinolonas (WANG et al., 2003).

1.1 Classificação e indicação terapêutica das quinolonas

De acordo com a classificação proposta por Lee & Kanatani (1999) e Bolon (2011), as quinolonas são classificadas em quatro grupos ou quatro gerações, tendo como base o seu espectro de atividade (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das quinolonas de acordo com as suas gerações.

Primeira geração	Segunda geração	Terceira geração	Quarta geração
Ác. Nalidíxico	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Moxifloxacina
Ác. Pipemídico	Norfloxacina	Esparfloxacina	Gemifloxacina
Ác. Oxolínico	Ofloxacina	Grepafloxacina	Gatifloxacina
Cinoxacina	Lomefloxacina		Clinafloxacina
	Enoxacina		

A primeira geração de quinolonas apresenta atividade frente a bactérias Gram-negativas, incluindo membros da família *Enterobacteriaceae*, contudo, não apresenta atividade frente à *Pseudomonas aeruginosa*, Gram-positivos e anaeróbios obrigatórios. Neste grupo se destaca o ácido nalidíxico, primeira quinolona introduzida na clínica médica nos anos 60 (Figura 2a). Este antimicrobiano foi utilizado para o tratamento de infecções do trato urinário e teve seu uso descontinuado, sobretudo devido a sua pobre distribuição plasmática e tecidual (LEE & KANATANI, 1999).

A norfloxacin e a enoxacin são antimicrobianos representantes da segunda geração de quinolonas, patenteados respectivamente em 1978 e 1980 (APPELBAU & HUNTER, 2000) (Tabela 1). Esses antimicrobianos, assim como outras fluorquinolonas, apresentam concomitantemente a adição de um átomo de flúor na posição 6 do anel quinolônico e um anel piperazínico na posição 7 (Figura 2). O átomo de flúor nessas quinolonas aumentou a penetração dessas drogas na célula bacteriana e a atividade frente a bactérias Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae* e também sobre *P. aeruginosa*. O anel piperazínico na posição 7 também melhorou a distribuição tecidual e estabilidade metabólica desses fármacos, além de possibilitar aumento na absorção por via oral (GUIMARÃES et al., 2010). Além disso, essa geração de quimioterápicos também demonstra moderada atividade frente a espécies do gênero *Staphylococcus*.

A ciprofloxacina e a ofloxacina, que também fazem parte da segunda geração de quinolonas, são eficientes no tratamento de infecções do trato urinário, do trato respiratório, da pele, de demais tecidos moles e também como primeira escolha para o tratamento tópico de queratite oftálmica (LEE & KANATANI, 1999; LEIBOWITZ, 1991; O'BRIEN et al., 1995). A ciprofloxacina é o antimicrobiano que mais se destaca dentre os representantes da segunda geração de quinolonas. Isso ocorre porque houve melhora no espectro de ação dessas drogas devido a inserção de um substituinte ciclopropílico ligado ao N na posição 1 do anel e a substituição de um nitrogênio da posição 8 por um carbono (Figura 2c). Assim, a ciprofloxacina tornou-se o fármaco mais ativo frente a bactérias Gram-negativas, sendo muito utilizado em diversas infecções (GUIMARÃES et al., 2010).

Figura 2. Estrutura química das quinolonas e fluorquinolonas: a) ácido nalidíxico; b) enoxacina; c) ciprofloxacina; d) norfloxacina; e) levofloxacina.

Fonte: Autor.

A terceira geração de quinolonas apresenta maior atividade frente a bactérias Gram-positivas, permitindo o tratamento de infecções ocasionadas por bactérias do gênero *Streptococcus*, por exemplo. A grepafloxacina e a esparfloxacina são indicadas para o tratamento de pneumonias adquiridas na comunidade e alguns tipos de bronquite; já a levofloxacina é indicada para infecções do trato respiratório, urinário, infecções de pele, pneumonia, sinusite e pielonefrite aguda (ANDERSON & PERRY 2008;). A levofloxacina é um isômero da ofloxacina e apresenta como diferencial um anel entre o N1 e o C8 do anel das quinolonas (Figura 2e). A levofloxacina apresenta também boa atividade frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e anaeróbias, sendo inclusive mais ativa que a ciprofloxacina para bactérias Gram-positivas (HURST et al., 2002).

O desenvolvimento de protótipos da quarta geração de quinolonas, como moxifloxacina, trovafloxacina e gemifloxacina, permitiu uma maior eficiência frente aos cocos Gram-positivos e às bactérias anaeróbias (APPELBAUM & HUNTER, 2000).

1.2 Mecanismo de ação das quinolonas

As topoisomerasas são enzimas essenciais envolvidas no processo de replicação do material genético e constituem um alvo terapêutico para o tratamento de infecções bacterianas, uma vez que as quinolonas e fluorquinolonas atuam inibindo a ação da DNA-girase, uma topoisomerase do tipo II, e da topoisomerase tipo IV (WANG, 1996).

A DNA girase é composta por duas subunidades protéicas GyrA (97 kD) e duas subunidades GyrB (90 kDa), codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. A função desta enzima é a introdução de superespirais negativos e a retirada dos superespirais positivos que são acumulados na frente da forquilha de replicação na molécula de DNA (WANG, 2003). A ação da DNA girase permite que o DNA atinja uma conformação relaxada para que a replicação ocorra. Esta enzima é seletivamente inibida por fluorquinolonas em bactérias Gram-negativas (BOLON, 2009).

A topoisomerase IV consiste em duas subunidades ParC (75 kDa) codificadas pelo gene *parC* e duas subunidades ParE (70 kDa), codificadas pelo gene *parE*. Esse complexo enzimático atua permitindo a separação do cromossomo recém-duplicado através de um mecanismo que promove quebras transitórias no DNA bacteriano, liberando a molécula de DNA recém-sintetizada. Deste modo, esse mecanismo parece estar envolvido na etapa final do processo de replicação do material genético, permitindo que a molécula mãe e a molécula filha de DNA atinjam um estado não concatenado (DRLICA et al., 2008; WANG, 1996). A topoisomerase IV é a enzima preferencialmente inibida por fluorquinolonas em bactérias Gram-positivas (BOLON, 2009).

Alguns autores definem a atividade das quinolonas frente às bactérias como um efeito exclusivo da inibição da replicação do DNA após a interação da droga com a topoisomerase bacteriana (BLONDEAU, 2004, HOPKINS et al., 2005). Contudo, em uma revisão elaborada por Drlica e colaboradores em 2008 na qual a interação entre a droga e a topoisomerase é melhor compreendida, a atividade das quinolonas é constatada como um evento composto por duas etapas. A primeira delas, reversível, é a inibição da replicação do DNA bacteriano devido à formação do complexo DNA-topoisomerase-droga, o que apenas explica o efeito bacteriostático, uma vez que esse processo é mais demorado do que a rápida morte bacteriana observada após o tratamento com fluorquinolonas. Já o segundo passo, irreversível, resulta em eventos posteriores à liberação de fragmentos de DNA com ligações fosfodiéster comprometidas, os quais podem explicar o rápido efeito bactericida observado. Esse passo é atribuído à hipótese da fragmentação do cromossomo (DRLICA et. al., 2008).

Figura 3. Modelos de tetrâmeros de topoisomerases bacterianas.

À esquerda DNA girase composta por duas subunidades GyrA e duas GyrB. À direita topoisomerase IV composta por duas subunidades ParE e duas ParC. As setas apontam para os sítios de ligação ao ATP em GyrB e ParE (“ATP binding sites”) e os sítios catalíticos de ligação ao DNA em GyrA e ParC (“DNA binding catalytic sites”). Imagem obtida de Bisacchi et al., 2016 que utilizou os modelos das referências de Laponogov et al., 2013; Bellon et al., 2004; Brino et al., 2000 e Schmidt et al., 2012.

1.3 Resistência às quinolonas

Diferentes mecanismos têm sido descritos e caracterizados como responsáveis pela aquisição de resistência microbiana às quinolonas (CHÁVEZ –JACOBO et al., 2018). Esses mecanismos podem ser determinados de dois modos: (I) no DNA do cromossomo bacteriano e (II) através da aquisição de determinantes plasmidiais de resistência (PMQR), o que possibilita a disseminação horizontal de genes de resistência (JACOBY, 2005).

Um dos mecanismos é a alteração do sítio alvo da droga através de mutações nos genes cromossômicos do DNA bacteriano que codificam as topoisomerases, o qual tem sido frequentemente pesquisado em isolados bacterianos resistentes (Figura 4.1). Outro mecanismo é a presença de sistemas de bombas de efluxo, as quais promovem a diminuição da concentração do antimicrobiano no interior da célula bacteriana (Figura 4. 2c, 2b). Além disso, existem modificações nos sistemas de influxo através da redução da expressão de porinas (Figura 4. 3a) (JACOBY, 2005; HOOPER, 2003) e também a expressão de proteínas que atuam protegendo as enzimas da interação com as drogas (Figura 4. 2a) ou pela inativação desses quimioterápicos, como exemplo a Aac(6′)-Ib-cr, uma acetil transferase que atua inativando a ciprofloxacina e norfloxacina (Figura 4. 2b) (JACOBY, 2018).

Figura 4. Mecanismos de resistência às quinolonas em bactérias.

(1) Resistência mediada no alvo das quinolonas, mutações na DNA gyrase ou topoisomerase IV. (2) Resistência mediada por plasmídeos. (2a) Proteínas Qnr que atuam protegendo as enzimas da interação com as drogas. (2b) Aac(6')-Ib-cr, uma acetil transferase que atua inativando a ciprofloxacina e norfloxacina. (2c) Bombas de efluxo codificadas por plasmídeos que reduzem a concentração das drogas no interior da célula. (3) Resistência mediada pelo cromossomo. (3a) baixa expressão de porinas. (3b) Superexpressão de bombas de efluxo codificadas pelo cromossomo. Imagem obtida de Aldred et al., 2014.

1.3.1 Mutações no DNA do cromossomo bacteriano

As mutações no DNA cromossômico da bactéria ocorrem nos genes que codificam as topoisomerasas, as quais diminuem a afinidade dessas enzimas em relação aos antimicrobianos e permite que a bactéria cresça na presença de quinolonas, tornando-as resistentes. Em bactérias Gram-negativas essas mutações tendem a ocorrer primeiramente no gene *gyrA*, enquanto em bactérias Gram-positivas tendem a ocorrer primeiramente no gene *parC*.

O mecanismo de resistência envolve substituições de aminoácidos numa região denominada região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) (JACOBY, 2005). As mutações mais frequentes em GyrA ocorrem nas posições dos aminoácidos Ser-83 e Asp-87. Weigel e seus colaboradores (1998) observaram que uma única mutação no códon da Ser-83 na região QRDR de *E. coli* está associada a baixos níveis de suscetibilidade a fluorquinolonas e que a mutação em ambos os códons (83 e 87) resultou em altos níveis de resistência em *E. coli* para os mesmos antimicrobianos. Em GyrB, as mutações nas posições 426 e 447 são as mais frequentemente relatadas, contudo, a mutação na posição 447 é relacionada apenas com resistência ao ácido nalidíxico (SORLÓZANO et al., 2007).

1.3.2 Determinantes plasmidiais de resistência às quinolonas

A evidência científica demonstrando que um plasmídeo carreador de genes de resistência às quinolonas é capaz de ser transferido de forma horizontal foi demonstrada por Martínez-Martínez e colaboradores em 1998. Nesse trabalho foi proposta a denominação de “qnr” para o gene no plasmídeo responsável por mediar a resistência às quinolonas. Mais tarde, a proteína purificada Qnr demonstrou, *in vitro*, capacidade de ligar-se às topoisomerasas e proteger o sítio alvo da interação com as quinolonas (HOOPER, 2005; JACOBY, 2003).

Outros mecanismos de resistência associados a determinantes plasmidiais podem estar presentes, entre eles, *qepA*, *oqxA* e *oqxB*, os quais ocorrem de forma isolada ou associada (JACOBY, 2005; ROBICSEK et al., 2006; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; HANSEN et al., 2004).

1.3.2.1 Genes qnr

O primeiro determinante de resistência plasmidial às quinolonas foi descoberto em um plasmídeo denominado pMG252. Este plasmídeo foi obtido de um isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* e experimentos de conjugação demonstraram que bactérias não resistentes às quinolonas apresentaram um fenótipo resistente após receberem o plasmídeo pMG252 (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 1998). Em 2002, após o sequenciamento do vetor, foi demonstrado que o gene responsável pela resistência às quinolonas possuía uma sequência de 657 nucleotídeos e a proteína codificada por este gene foi chamada de QnrA. Sua caracterização permitiu verificar que a mesma possui 218 aminoácidos, a qual exerce sua função protegendo a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição por quinolonas (TRAN & JACOBY, 2002; TRAN et al., 2005). Trabalhos posteriores levaram a descoberta de variantes dessa proteína que passaram a ser denominadas sucessivamente de QnrB, QnrC, QnrD, QnrS, QnrVC e QnrE (JACOBY et al., 2006; WANG et al., 2009; CAVACO et al., 2009; HATA et al., 2005; FONSECA et al., 2008; ALBORNOZ et al., 2017). Cada uma dessas variantes representa uma família que geralmente difere em aproximadamente 35% em relação a sequência da família de determinantes QnrA. Além disso, cada família agrupa variantes

alélicos que diferem no máximo em 10% entre os seus membros como, por exemplo, os determinantes *qnrB1*, *qnrB2*, *qnrB3*, *qnrB4*, *qnrB5*, dentre outros (JACOBY et al., 2014).

O gene *qnrB* foi descoberto em um plasmídeo contendo também o gene codificador da β -lactamase CTX-M-15 em uma linhagem de *K. pneumoniae* isolada na Índia. O gene *qnrB* apresentou menos de 40% de identidade em seus aminoácidos quando comparado ao gene *qnrA* (JACOBY et al., 2006).

O gene *qnrC* foi descoberto e caracterizado em um isolado clínico de *Proteus mirabilis* obtido de um paciente com infecção do trato urinário em um hospital chinês. Experimentos de conjugação evidenciaram o fenótipo de baixa susceptibilidade às quinolonas na bactéria receptora do plasmídeo carreador do gene *qnrC* e o sequenciamento deste gene demonstrou a existência de uma proteína com 221 aminoácidos, com 64% de identidade com QnrA1 e 42% com QnrB2 (WANG et al., 2009).

A identificação e a caracterização da variante *qnrD* ocorreu a partir de isolados de *Salmonella entérica*. O fenótipo de baixa resistência às quinolonas foi verificado após transformação por eletroporação de linhagens de *E. coli* e o sequenciamento do gene permitiu deduzir uma sequência de 214 aminoácidos com 48% de similaridade com QnrA1 e 61% com QnrB1. Assim, se verificou uma relação filogenética mais próxima entre os genes *qnrD* e *qnrB* (CAVACO et al., 2009).

A descoberta do determinante *qnrS* ocorreu em linhagens de *Shigella flexneri* isoladas de pacientes em um surto alimentar que ocorreu no Japão em 2003. Experimentos de transconjugação confirmaram a correlação entre o novo determinante descoberto e a aquisição de baixos níveis de resistência às quinolonas. O sequenciamento desta nova variante permitiu a dedução de uma sequência de 218 aminoácidos apresentando 59% de identidade com proteínas Qnr (HATA et al., 2005).

Fonseca e colaboradores caracterizaram outro determinante de resistência às quinolonas presente em um integron de classe 1, o qual foi denominado *qnrVC1* e apresentou 57% de identidade com a proteína QnrA1. O gene foi identificado em uma linhagem de *Vibrio cholerae* resistente à ciprofloxacina obtida em 1998 durante uma epidemia de cólera (FONSECA et al., 2008).

Recentemente uma nova família de determinantes de resistência às quinolonas foi descoberta, *qnrE1*. Este gene foi encontrado em um isolado clínico de *K. pneumoniae* de uma amostra de urina de um paciente da Argentina e apresentou diferença de 25% em relação aos alelos da família de genes *qnrB* (ALBORNOZ et al., 2017).

Os genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* já foram identificados no cromossomo de espécies bacterianas aquáticas, sendo estas bactérias possíveis reservatórios desses genes. A expressão desses genes também foi avaliada após clonagem em *E. coli* onde se observou o mesmo fenótipo de resistência às quinolonas (POIREL et al., 2005). Além disso, eles já foram encontrados em plasmídeos com diversos pesos moleculares (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 1998). Curiosamente, o gene *qnrB* tem sido detectado com mais frequência do que os determinantes *qnrA* e *qnrS*, que, por sua vez, são ainda mais frequentes do que *qnrD*. Já, *qnrC* foi encontrado em um único isolado até o momento (JACOBY et al., 2014; WANG et al., 2009).

1.3.2.2 Genes *QepA* e *OqxAB*

Dois sistemas de efluxo, denominados QepA e OqxAB, são codificados por genes plasmidiais e responsáveis pela expulsão das quinolonas da célula bacteriana, tornando-a resistente à ação dessas drogas (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; HANSEN et al., 2004).

O gene *qepA* codifica uma proteína com 511 aminoácidos (sistema de efluxo QepA - *quinolone efflux pump*) que apresenta similaridade com transportadores da família 14-transmembrana, uma bomba de efluxo presente em actinomicetos de origem ambiental (POIREL et al., 2012). Este gene foi inicialmente identificado em uma linhagem de *E. coli* denominada C316, inserido em um elemento de transposição (YAMANE et al., 2007). A expressão deste determinante leva à redução da susceptibilidade às fluorquinolonas norfloxacin e ciprofloxacina (PÉRICHON et al., 2008). Estudos epidemiológicos demonstram baixa prevalência desse gene em isolados clínicos de *E. coli* do Japão e da França (YAMANE et al., 2008; CATTOIR et al., 2008). No entanto, um trabalho publicado em 2008 utilizando isolados clínicos de *E. coli* obtidos na França no ano de 2007 permitiu detectar uma variante desse gene, o *qepA2* (CATTOIR et al., 2008). Esse gene possui duas substituições nucleotídicas nas posições 99 e 113 em relação à sequência de 511 aminoácidos do gene *qepA*, renomeado para *qepA1* (CATTOIR et al., 2008).

OqxAB é um sistema de efluxo codificado pelos genes *oqxA* e *oqxB*, os quais levam ao fenótipo de resistência às fluorquinolonas e ao ácido nalidíxico (KIM et al., 2009). Estudos posteriores demonstraram reduzida suscetibilidade diante de outras substâncias como desinfetantes e detergentes, além de outros antimicrobianos não pertencente à classe das

quinolonas, e a capacidade de disseminação horizontal via transferência plasmidial entre membros da família *Enterobacteriaceae* (HANSEN et al., 2007). Alguns estudos relataram a disseminação dos genes *oqxAB* em isolados clínicos e ambientais de enterobactérias causadores de importantes infecções para os seres humanos, como *E. coli*, *Salmonella* sp. e *K. pneumoniae* (KIM et al., 2009; ZHAO et al., 2010; WONG & CHEN, 2013; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2013; LI et al., 2013). Um trabalho publicado em 2012 por Yuan e colaboradores mostrou a detecção de genes *oqxAB* em isolados de *E. coli* que apresentaram variações pontuais em aminoácidos, o que permitiu a caracterização de variantes alélicas denominadas de *oqxA2*, *oqxB2* e *oqxB3* (YUAN et al., 2012).

RELEVÂNCIA DO ESTUDO

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Em decorrência dos altos níveis de resistência aos antimicrobianos, a pesquisa dos mecanismos de aquisição e transferência de resistência por diferentes espécies de bactérias de interesse médico tem se mostrado de grande importância, no entanto, a grande maioria dos estudos sobre resistência a antimicrobianos é realizada com bactérias de origem clínica e poucos grupos de pesquisa estudam os mecanismos de resistência, bem como a presença e a distribuição de genes de resistência em bactérias isoladas do meio ambiente.

Além disso, as quinolonas e fluorquinolonas não são completamente removidas ou degradadas nas estações de tratamento de água, permitindo a concentração desses antimicrobianos em rios, lagos, solo, lençóis freáticos e águas destinadas ao abastecimento público, o que gera um ambiente propício à aquisição e disseminação de genes de resistência às quinolonas, bem como a seleção de micro-organismos resistentes a essas drogas (SILVA et al., 2013).

Nesse sentido, este trabalho pretende aprofundar o estudo na área de microbiologia ambiental para avaliar e identificar quais os principais mecanismos de resistência às quinolonas em isolados bacterianos obtidos do meio ambiente e identificar quais os principais gêneros dessa microbiota que carregam tais determinantes de resistência. O estudo também se fundamenta no fato de que a resistência bacteriana gera um grande impacto de saúde pública e que as fluorquinolonas representam um grupo de antimicrobianos sintéticos que teve seu uso aumentado nos últimos anos (APPELBAU & HUNTER, 2000). Portanto, o estudo poderá contribuir para um melhor entendimento sobre a resistência bacteriana em isolados de solo e de água.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar os mecanismos de resistência às fluorquinolonas em isolados bacterianos ambientais.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar bactérias do solo e de água resistentes a diferentes fluorquinolonas.
- Determinar quais os principais gêneros bacterianos obtidos do solo e de água com resistência às fluorquinolonas estudadas.
- Determinar o nível de resistência às fluorquinolonas de segunda (ciprofloxacina, norfloxacina) e terceira (levofloxacina) geração pela técnica da concentração inibitória mínima.
- Pesquisar mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*
- Pesquisar os genes de natureza plasmidial que estão envolvidos na resistência às quinolonas - *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *oqxA* e *oqxB*.
- Sequenciar e determinar a identidade dos genes de resistência plasmidiais às fluorquinolonas.
- Investigar a presença de plasmídeos, classificá-los pela análise dos grupos de incompatibilidade e relacionar a presença dos mesmos com o perfil de resistência encontrado.
- Determinar qual o principal mecanismo de resistência em cada gênero estudado.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras de solo e de água

Para a obtenção dos isolados bacterianos de solo e de água estudados foram estabelecidas parcerias com a empresa Ribersolo – Laboratório de Análise de Solo e Foliar, a qual forneceu amostras de solo de diferentes estados brasileiros cultivadas com diferentes plantios; com o Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Ribeirão Preto e com a Fazenda Experimental de Ribeirão Preto, os quais forneceram amostras de solo provenientes de diferentes cidades do estado de São Paulo. Essas amostras foram coletadas no período compreendido entre 2014 e 2016.

Para a obtenção dos isolados bacterianos de água foi estabelecida parceria com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), que forneceu amostras de água coletadas entre 2015 e 2016 de diferentes mananciais do estado de São Paulo.

4.2 Isolamento de bactérias do solo e da água

Para o isolamento das bactérias foram utilizadas 52 diferentes amostras de solo e 2 diferentes amostras de água. Essas amostras foram obtidas de 40 cidades brasileiras (Figura 6).

Para o isolamento bacteriano, 1g de cada amostra de solo coletada a uma profundidade de 15 cm ou 3 mL das amostras de água foram adicionados 5 mL de meio líquido Luria-Bertani (LB) (Oxoid, Reino Unido) e os tubos foram incubados à 37°C por 18-24 horas sob agitação (MUKHERJEE et al., 2011). Após esse período, um volume de 200 µL foi semeado com auxílio de uma alça de Drigalski em placas de ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Reino Unido) contendo separadamente 8 µg/mL, 16 µg/mL e 4 µg/mL dos antimicrobianos ciprofloxacina, norfloxacina e levofloxacina, respectivamente. Após o crescimento bacteriano, colônias com características morfológicas diferentes foram transferidas para caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, Reino Unido) com glicerol a 15% e mantidas em estoque a -20°C e -80°C.

Figura 5. Mapa do Brasil contendo a localização das coletas de amostras de solo e de água.

Legenda: Em destaque, com símbolos, encontram-se 40 cidades a partir das quais foram coletadas amostras de solo e de água utilizadas na obtenção dos isolados bacterianos. O mapa foi projetado utilizando a ferramenta online “GoogleMyMaps” (2018).

4.3 Extração do DNA genômico

O DNA genômico dos isolados foi extraído utilizando-se o *kit* GenElute™ Bacterial Genomic DNA (SIGMA), segundo as recomendações do fabricante, e utilizado como molde nas reações de PCR. Após a extração, a concentração do DNA foi determinada pelo DS-11 + Spectrophotometer (DeNovix, USA) utilizando os comprimentos de onda de 260 e 280 nm. As extrações com razão entre 1,6 e 1,9 foram consideradas de boa qualidade devido ao baixo nível de impurezas.

4.4 Caracterização molecular dos isolados

Os isolados bacterianos obtidos de amostras de solo e de água foram identificados molecularmente através da amplificação e do sequenciamento do gene 16S rRNA (WEISBURG et al., 1991) utilizando os iniciadores fD1 e rP2. Para cada reação de PCR foram utilizados 29,5 µL de água deionizada esterilizada, 3,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 5 µL do tampão PCR *buffer minus* Mg-10X, 1 µL de solução contendo 10 mmol.L⁻¹ de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 5 µL de DNA genômico (100 ng), 2 µL de cada *primer* (25 µM) (*forward* e *reverse*) e 2 µL (1,25 U) da enzima Taq DNA Polimerase (JumpStart™ Taq DNA Polimerase), obtendo um volume final de 50 µL. As condições utilizadas foram: 3 minutos a 94°C para desnaturação inicial, um total de 30 ciclos: 1 minuto a 94°C para desnaturação; 1 minuto a 57°C para anelamento; 2 minutos a 72°C para extensão e 5 minutos a 72°C para extensão final. A técnica de PCR foi realizada no termociclador ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems, Cingapura).

4.5 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose 1% horizontal foi realizada utilizando o tampão TAE 1X (solução estoque 50X – Tris 2 mol.L⁻¹, ácido acético 1 mol.L⁻¹ e EDTA 0,5 mol.L⁻¹ pH 8,0). Ao término da corrida, as bandas foram visualizadas em brometo de etídio (0,5 µg/mL⁻¹) no transluminador E-Gel Imager (LIFE Technologies, Israel). Os fragmentos de DNA amplificados foram comparados com o marcador de peso molecular de 100 pb plus DNA Ladder para determinação do tamanho dos mesmos.

4.6 Sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o *kit* GFX-TM PCR (GE Health Care). As reações de sequenciamento foram realizadas no Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP/HC/FMRP/USP) (<http://lgmb.fmrp.usp.br/nsb/>), no sequenciador ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems), com o *Kit* DYEnamic ET DyeTerminator (GE Health Care), segundo recomendações do fabricante. Os eletroferogramas das sequências obtidas foram analisados e os picos de boa qualidade utilizados para originar as sequências de nucleotídeos. Em seguida as sequências foram analisadas no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para comparação com outras sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

4.7 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos ciprofloxacina, levofloxacina e norfloxacina foi realizado pelo método de diluição em placa para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM), conforme recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

As colônias bacterianas foram ressuspensas em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%) até se obter uma turvação compatível com a escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Em seguida, foram adicionados 5 µL dessa solução em placas com meio MH contendo diferentes concentrações dos antimicrobianos norfloxacina, ciprofloxacina ou levofloxacina (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 µg/mL) e as placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 18-24 horas. As linhagens *E. coli* ATCC® 25922 e *P. aeruginosa* ATCC® 27853 foram utilizadas como controle neste experimento.

4.8 Pesquisa dos genes de resistência às quinolonas

Para a detecção dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* e dos genes plasmidiais de resistência às quinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *oqxA* e *oqxB*) foram realizadas reações de PCR utilizando os iniciadores descritos na tabela 2. Em seguida, os produtos de PCR dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* foram sequenciados para determinar a presença de mutações.

As reações de PCR e o sequenciamento do amplicons foram realizados como descrito nos itens 4.4 e 4.6, respectivamente. A linhagem *Escherichia coli* K12 foi utilizada como controle positivo para os genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE*. Como controles positivos dos genes *qepA*, *qnrB* e *qnrA* foram utilizadas as linhagens *E. coli* 64611, *K. pneumoniae* Kp15 e *E. coli* 16-00, respectivamente (PITOUT et al., 2008). Os isolados bacterianos contendo os genes *qnrS*, *oqxA* e *oqxB* confirmados por sequenciamento foram utilizados como controle positivo para detecção desses genes nos demais isolados bacterianos desse trabalho.

Tabela 2. Iniciadores utilizados nas reações de amplificação dos genes de resistência às quinolonas e na identificação molecular dos isolados bacterianos.

Gene	Iniciadores (5'-3')	T°C anelamento	Fragmento (pb)	Referência
<i>gyrA</i>	AACTCAACGCGCACAGCAACAAGCC CCAGTTCCTTTTCGTCGTAGTTGGG	58	300	Jia et al., 2015
<i>gyrB</i>	CTCCTCCCAGACCAAAGACA TCACGACCGATACCACAGCC	58	447	Vila et al., 1994
<i>parC</i>	TCGGCGACGGCCTGAAGCC CGGGATTTCGGTATAACGCAT	55	273	Jia et al., 2015
<i>parE</i>	GCCAGCGCCGTATGCGTGC GTTCGGATCAAGCGTGTTT	58	621	Komp et al., 2006
<i>qnrA</i>	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	55	580	Cattoiret Al. 2007
<i>qnrB</i>	GGMATHGAAATTCGCCACTG TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA	55	264	Cattoiret Al. 2007
<i>qnrS</i>	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	55	428	Cattoiret Al. 2007
<i>qepA</i>	TGGTCTACGCCATGGACCTCA TGAATTTCGGACACCGTCTCCG	56	1137	Karczmarczyk et al. 2011
<i>oqxA</i>	GACAGCGTCGCACAGAATG GGAGACGAGGTTGGTATGGA	62	339	Chen et al., 2012
<i>oqxB</i>	CGAAGAAAGACCTCCCTACCC CGCCGCCAATGAGATACA	62	240	Chen et al., 2012
16S rRNA	AGAGGATTTCTCACGCCAGG ACGGCTACCTTGTTACGACTT	57	1495	Weisburg et al., 1991

4.9 Tipagem plasmidial

Reações de PCR foram realizadas para tipagem plasmidial dos plasmídeos descritos a seguir: IncHI1, IncHI2, IncI1, IncX, IncL/M, IncN, IncFIA, IncFIB, IncW, IncP, IncFIC, IncA/C, IncT, IncFIIs, IncF_{repB}, IncK e IncB/O, IncY, IncU e IncR de acordo com Carattoli et al. (2005) e Garcia-Fernandez et al. (2009).

Tabela 3. Iniciadores utilizados nas reações de amplificação dos genes para tipagem plasmidial dos plasmídeos dos isolados bacterianos.

RT	Iniciadores (5'-3')	T°C anelamento	Fragmento (pb)	Referência
HI1	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	60	471	Carattoli et al., 2005
HI2	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	60	644	Carattoli et al., 2005
I1	CGAAAGCCGGACGGCAGAA TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	60	139	Carattoli et al., 2005
X	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTATAGC	60	376	Carattoli et al., 2005
W	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG GGTGCGCGGCATAGAACCGT	60	242	Carattoli et al., 2005
Y	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	60	765	Carattoli et al., 2005
P	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	60	534	Carattoli et al., 2005
L/M	GGATGAAAATATCAGCATCTGAAG CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	60	785	Carattoli et al., 2005
N	GTCTAACGAGCTTACCGAAG GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	60	559	Carattoli et al., 2005
FIA	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	60	462	Carattoli et al., 2005
FIB	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	60	702	Carattoli et al., 2005
FIC	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT	60	262	Carattoli et al., 2005
A/C	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	60	465	Carattoli et al., 2005
T	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	60	750	Carattoli et al., 2005
FIIS	CTGTGTAAGCTGATGGC CTCTGCCACAAACTTCAGC	60	270	Carattoli et al., 2005
FrepB	TGATCGTTTAAGGAATTTTG GAAGATCAGTCACACCATCC	52	270	Carattoli et al., 2005
K	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	60	160	Carattoli et al., 2005
B/O	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC TCTGCGTTCGCCAAGTTCGA	60	159	Carattoli et al., 2005
U	TCACGACACAAGCGCAAGGG TCATGGTACATCTGGGCGC	60	843	Garcia- Fernandez et al., 2009
R	TCGCTTCATTCTGCTTCAGC GTGTGCTGT GGT TATGCCTCA	60	251	Garcia- Fernandez et al., 2009
ColE- like	GTTCGTGCATACAGTCCA GGCGAAACCCGACAGGACT	60	187	Garcia- Fernandez et al., 2009

Legenda: *Replicon type*, RT.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Identificação dos isolados bacterianos

No presente estudo foram obtidos 69 isolados bacterianos ambientais a partir de 52 amostras de solo distintas e 2 diferentes amostras de água. A grande maioria dos isolados foi isolada das amostras de solo. Dentre esses isolados foram identificados 17 *Stenotrophomonas maltophilia*, 16 *Achromobacter* sp., 13 *Ochrobactrum* sp., 4 *Escherichia coli* e 19 isolados pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Pandoraea*, *Citrobacter*, *Cellulosimicrobium*, *Brevundimonas*, *Starkeya* e *Pseudomonas* (Figura 6). Todos os isolados estudados, de acordo com a cultura, gênero/espécie, origem e estado estão descritos no apêndice A. As amostras de solo e água estão numeradas em algarismos romanos de I a LX e os isolados bacterianos obtidos de solo foram numerados precedidos da letra S e os de água possuem as letras EW.

Entre os 69 isolados bacterianos obtidos, 50 deles foram selecionados para serem analisados e caracterizados quanto ao perfil e aos mecanismos de resistência às fluorquinolonas, bem como quanto à tipagem plasmidial. Os isolados estudados foram aqueles pertencentes aos gêneros *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum* e *Escherichia*, os quais possuem maior interesse e importância clínica. Esses isolados foram obtidos de diferentes amostras de solo.

Figura 6. Porcentagem de bactérias ambientais isoladas.

5.2 Análise do perfil de resistência, pesquisa de mutações na região QRDR e de genes PMQR e tipagem plasmidial nos isolados por gênero bacteriano

5.2.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

Dentre os isolados bacterianos deste estudo, 17 foram identificados como pertencente à espécie *S. maltophilia*. De acordo com o CLSI (2015), entre as fluorquinolonas indicadas para serem testadas, apenas a levofloxacina é preconizada para a determinação da concentração inibitória mínima. Entretanto, os 17 isolados foram analisados pelo teste da concentração inibitória mínima para às fluorquinolonas ciprofloxacina, norfloxacina e levofloxacina. Doze isolados foram considerados não suscetíveis (intermediário ou resistente) a levofloxacina, apresentando CIM entre 4 e 8 µg/mL e cinco deles foram suscetíveis, com CIM igual a 2 µg/mL (Tabela 4). A pesquisa dos genes plasmidiais de resistência nos isolados de *S. maltophilia* evidenciou a presença de 6 *qnrA*, 4 *qnrB*, 5 *qnrS*, 3 *oqxA*, 4 *oqxB* e nenhum *qepA* (Tabela 4).

Quanto ao perfil de mutações nos genes *gyrA* e *parC*, apenas o isolado S377 apresentou a mutação S80I no gene *parC* e os demais isolados não apresentaram nenhuma mutação nesses genes. Os genes *gyrB* e *parE* não foram analisados nesses isolados, visto que *gyrB* é um gene *housekeeping* usado na identificação das espécies e um número muito grande de mutações foi encontrada em *parE*, impossibilitando a correlação com o perfil de resistência. Quanto a tipagem plasmidial, os 17 isolados apresentam plasmídeos da família ColE-like e o isolado S428 apresentou também o plasmídeo IncL/M (Tabela 4).

Tabela 4. Pesquisa de mutações nos genes codificadores de topoisomerases, genes plasmidiais mediadores de resistência e tipagem plasmidial nos isolados de *S. maltophilia*.

Isolado	CIM (µg/mL)			Mutações		PMQR	Tipagem plasmidial
	CIP	LVX	NOR	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>		
S359	8	8	256	-	-	<i>qnrA, qnrB, qnrS, oqxA, oqxB</i>	ColE-like
S365	2	2	8	-	-	-	ColE-like
S369	2	4	16	-	-	<i>qnrS, oqxA, oqxB</i>	ColE-like
S370	2	4	16	-	-	-	ColE-like
S371	2	4	8	-	-	<i>oqxB</i>	ColE-like
S377	2	4	16	-	S80I	<i>qnrA, qnrB, qnrS, oqxA, oqxB</i>	ColE-like
S427	32	8	64	-	-	-	ColE-like
S428	32	4	64	-	-	<i>qnrA, qnrS</i>	ColE-like, IncL/M
S430	64	4	128	-	-	-	ColE-like
S432	64	2	128	-	-	-	ColE-like
S433	8	2	64	-	-	-	ColE-like
S434	32	4	128	-	-	<i>qnrA, qnrB, qnrS</i>	ColE-like
S435	32	4	32	-	-	<i>qnrA</i>	ColE-like
S436	32	2	128	-	-	<i>qnrA, qnrB</i>	ColE-like
S437	32	2	128	-	-	-	ColE-like
S445	32	4	128	-	-	-	ColE-like
S446	32	4	128	-	-	-	ColE-like

Legenda: Ciprofloxacina, CIP; Levofloxacina, LVX; Norfloxacina, NOR; Concentração inibitória mínima, CIM; Genes plasmidiais mediadores de resistência às quinolonas, PMQR.

5.2.2 *Achromobacter* sp.

Um total de 16 isolados bacterianos foi identificado como pertencendo ao gênero *Achromobacter*. Quanto ao perfil de resistência, todos os isolados foram não suscetíveis a norfloxacina, com CIM variando entre 8 e 64 µg/mL, 14 foram não suscetíveis a levofloxacina, com CIM variando entre 4 e 32 µg/mL e 15 foram não suscetíveis a ciprofloxacina, com CIM entre 2 e 32 µg/mL. (Tabela 5).

A detecção dos genes plasmidiais de resistência nos isolados de *Achromobacter* sp. mostrou que 8 isolados apresentaram o gene *qnrA*, 3 *qnrB*, 3 *qnrS*, 4 *oqxA*, 4 *oqxB*, e nenhum *qepA* (Tabela 5). Quanto ao perfil de mutações nos genes *gyrA* e *parC*, 5 isolados (S360, S361, S367, S368 e S478) apresentaram as mutações S83L/D87N em *gyrA*. Além dessa

mutação, os isolados S367 e S368 apresentaram as mutações S80I e S80I/E84A no gene *parC*, respectivamente (Tabela 5).

Em relação a tipagem plasmidial, 15 dos 16 isolados de *Achromobacter* sp. apresentaram plasmídeos da família ColE-like. O isolado S360 teve ainda um plasmídeo IncA/C e o S375 apresentou plasmídeos dos grupos IncFIB e IncA/C, enquanto no isolado S367 foram detectados também os plasmídeos IncFIB e IncP

Tabela 5. Pesquisa de mutações nos genes codificadores de topoisomerases, genes plasmidiais mediadores de resistência e tipagem plasmidial nos isolados de *Achromobacter* sp.

Isolado	CIM (µg/mL)			Mutações		PMQR	Tipagem plasmidial
	CIP	LVX	NOR	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>		
S360	2	4	32	S83L / D87N	-	<i>qnrA</i> ,	ColE-like, IncA/C
S361	2	4	32	S83L / D87N	-	<i>qnrA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>	ColE-like
S367	1	4	8	S83L / D87N	S80I	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>	ColE-like, IncFIB, IncP
S368	2	2	16	S83L / D87N	S80I / E84A	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>	ColE-like, IncFIB
S372	2	4	32	-	-	<i>qnrA</i> , <i>oqxB</i>	ColE-like
S375	2	4	8	-	-	<i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> , <i>oqxA</i>	ColE-like, IncFIB, IncA/C
S379	2	4	32	-	-	<i>qnrA</i> , <i>qnrS</i>	ColE-like
S387	32	32	32	-	-	-	ColE-like
S388	2	2	16	-	-	-	ColE-like
S473	8	4	16	-	-	-	ColE-like
S474	8	4	32	-	-	-	ColE-like
S475	8	4	16	-	-	-	ColE-like
S476	32	4	64	-	-	<i>qnrS</i>	ColE-like
S477	16	4	64	-	-	-	ColE-like
S478	32	4	32	S83L / D87N	-	-	ColE-like
S479	8	4	32	-	-	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i>	-

Legenda: Ciprofloxacina, CIP; Levofloxacina, LVX; Norfloxacina, NOR; Concentração inibitória mínima, CIM; Genes plasmidiais mediadores de resistência às quinolonas, PMQR.

5.2.3 *Ochrobactrum* sp.

Foram identificados 13 isolados de *Ochrobactrum* sp. Analisando o perfil de resistência observou-se que todos os isolados foram não suscetíveis a norfloxacin e a ciprofloxacina e 10 isolados foram não suscetíveis a levofloxacina, com CIM entre 4 e 8 µg/mL (Tabela 6).

Para a pesquisa de mutações nos genes *gyrA* e *parC* foram utilizados os 13 isolados de *Ochrobactrum* sp. e todos apresentaram a mutação A83Q no gene *gyrA* e nenhuma mutação no gene *parC* (Tabela 6). Houve detecção de 1 gene *qnrB*, 1 *qepA*, 4 *qnrS* e nenhum *qnrA*, *oqxA* e *oqxB* (Tabela 6). Em relação a tipagem plasmidial, 6 dos 13 isolados desse gênero apresentaram plasmídeos pertencentes à família ColE-like, enquanto os demais não apresentaram plasmídeos de nenhuma das famílias pesquisadas (Tabela 6).

Tabela 6. Pesquisa de mutações nos genes codificadores de topoisomerasas, genes plasmidiais mediadores de resistência e tipagem plasmidial nos isolados de *Ochrobactrum* sp.

Isolado	CIM (µg/mL)			Mutações		PMQR	Tipagem plasmidial
	CIP	LVX	NOR	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>		
S460	8	4	16	A83Q	-	<i>qnrS</i>	ColE-like
S461	8	2	8	A83Q	-	-	-
S462	4	2	8	A83Q	-	<i>qnrS</i>	-
S463	64	4	128	A83Q	-	-	-
S464	16	2	32	A83Q	-	-	-
S465	64	8	64	A83Q	-	<i>qnrS</i>	-
S466	32	4	64	A83Q	-	-	-
S467	32	4	64	A83Q	-	-	-
S468	32	8	32	A83Q	-	<i>qnrS</i>	ColE-like
S469	16	4	8	A83Q	-	-	ColE-like
S470	8	4	64	A83Q	-	-	ColE-like
S471	16	4	32	A83Q	-	<i>qepA</i>	ColE-like
S472	8	4	8	A83Q	-	<i>qnrB</i>	ColE-like

Legenda: Ciprofloxacina, CIP; Levofloxacina, LVX; Norfloxacin, NOR; Concentração inibitória mínima, CIM; Genes plasmidiais mediadores de resistência às quinolonas, PMQR.

5.2.4 *Escherichia coli*

Foram isoladas 4 bactérias da espécie *E. coli*. Na determinação da susceptibilidade às fluorquinolonas, todos os isolados foram classificados como não suscetíveis às três fluorquinolonas testadas, apresentando CIM entre 4 e > 256 µg/mL (Tabela 7).

Quanto ao perfil de mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parE* e *parC*, todos os isolados de *E. coli* apresentam as mutações S83L/D87N em *gyrA*. Para o gene *parC*, apenas o isolado S366 apresentou as mutações S80I/E84Q e os demais tiveram a mutação S80I. Todos os isolados apresentam mutação na posição 458 do gene *parE*, com exceção do isolado S373, e nenhum deles apresentou mutação no gene *gyrB*. Vários genes plasmidiais também foram detectados, sendo 2 *qnrA*, 2 *qnrB*, 1 *qnrS*, 4 *oqxA*, 2 *oqxB*, e 1 *qepA*, (Tabela 7).

A tipagem plasmidial mostrou que todos os isolados dessa espécie apresentam plasmídeos da família ColE-like e vários grupos Inc. O isolado S366 possui também IncFIB, IncA/C, IncN e IncHI1 e IncF_{repB}. O isolado S373 apresentou o IncFIB, IncY e IncF_{repB} e o S374 IncFIB, IncA/C, IncF_{repB}, enquanto o isolado S376 teve IncP e IncF_{repB} (Tabela 7).

Tabela 7. Pesquisa de mutações nos genes codificadores de topoisomerases, genes plasmidiais mediadores de resistência e tipagem plasmidial nos isolados de *E. coli*.

Isolado	CIM (µg/mL)			Mutações				PMQR	Tipagem plasmidial
	CIP	LVX	NOR	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>gyrB</i>	<i>parE</i>		
S366	64	16	> 256	S83L / D87N	S80I / E84Q	-	S458A	<i>qnrA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>	ColE-like, IncFIB, IncA/C, IncN, IncHI1, IncF _{repB}
S373	8	4	32	S83L / D87N	S80I	-	-	<i>oqxA</i>	ColE-like, IncFIB, IncY, IncF _{repB}
S374	64	16	> 256	S83L / D87N	S80I	-	S458T	<i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>	ColE-like, IncFIB, IncA/C, IncF _{repB}
S376	64	16	> 256	S83L / D87N	S80I	-	S458A	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qepA</i> , <i>oqxA</i>	ColE-like, IncP, IncF _{repB}

Legenda: Ciprofloxacina, CIP; Levofloxacina, LVX; Norfloxacina, NOR; Concentração inibitória mínima, CIM; Genes plasmidiais mediadores de resistência às quinolonas, PMQR.

5.3 Análise geral do perfil de resistência e de genes PMQR nos 50 isolados estudados

Analisando os resultados do perfil de resistência às fluorquinolonas dos 50 isolados se observa altos valores de CIM principalmente para a norfloxacin e altos níveis para as três fluorquinolonas testadas nos isolados de *E. coli*. Com relação à detecção dos genes plasmidiais de resistência, foram detectados *qnrA* em 16 isolados (32%), *qnrB* em 10 (20%), *qnrS* em 13 (26%), *oqxA* em 11(22%), *oqxB* em 10 (20%) e 2 *qepA* (4%) (Figura 7).

Figura 7. Porcentagem de genes PMQR em relação aos 50 isolados bacterianos.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

No meio ambiente são encontrados diferentes gêneros e espécies de bactérias resistentes a um ou mais antimicrobianos (D' COSTA et al., 2007; ADACHI et al., 2013; XU et al., 2015). Este processo acontece devido à produção natural de antibióticos por micro-organismos da microbiota do solo e também em decorrência de ações humanas, como o uso de doses subclínicas de antimicrobianos na forma de promotores de crescimento para animais e na agricultura e devido ao uso indiscriminado na clínica (WEGENER et al., 1997).

Alguns autores sugerem a necessidade de um maior número de pesquisas com isolados bacterianos de “habitats” não clínicos, como o meio ambiente, para a compreensão dos mecanismos de aquisição e disseminação de genes de resistência por bactérias, uma vez que evidências apontam que a origem da resistência antimicrobiana é ambiental (MARTINEZ, 2012). Pesquisas a respeito do gene *qnrA*, determinante plasmidial de resistência às fluorquinolonas, mostram sua provável origem em *Shewanella algae*, uma espécie de bactéria aquática (POIREL et al., 2005). Outros estudos verificaram a presença de proteínas homólogas à Qnr em isolados bacterianos ambientais da família *Vibrionaceae*. Em conjunto, essas evidências sugerem que bactérias ambientais podem servir como reservatórios de genes determinantes de resistência (GUAN et al., 2013) e corroboram a necessidade de estudos utilizando esses micro-organismos. Além disso, o estudo de bactérias de origem ambiental e as técnicas de metagenômica têm contribuído para a compreensão do resistoma intrínseco. Este termo tem sido utilizado para descrever a grande diversidade de genes de resistência em micro-organismos ambientais, o que poderia explicar também a ocorrência de bactérias multi-resistentes nesses ambientes (D' COSTA et al., 2007; RIESENFELD et al., 2004).

No presente estudo 69 isolados bacterianos foram obtidos a partir de amostras de solo e água. A identificação molecular permitiu agrupar 17 isolados de *S. maltophilia*, 16 *Achromobacter* sp., 13 *Ochrobactrum* sp. e 4 *E. coli*. Um total de 19 isolados pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Pandoraea*, *Citrobacter*, *Cellulosimicrobium*, *Brevundimonas*, *Starkeya* e *Pseudomonas* também foram identificados (Figura 6, Apêndice A).

Os resultados do perfil de resistência mostraram que a maioria dos isolados foram não suscetíveis às fluorquinolonas, principalmente à norfloxacin. Além disso, todos os genes plasmidiais de resistência foram detectados nos diferentes isolados, sendo o *qnrA* observado em 16 isolados (32%), *qnrB* em 10 (20%), *qnrS* em 13 (26%), *oqxA* em 11 (22%), *oqxB* em 10 (20%) e 2 *qepA* (4%) (Figura 7).

Os genes PMQR são frequentemente relatados em isolados clínicos e alguns relatos em isolados aquáticos já ocorreram (BÖNEMANN et al., 2006; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; TOMOVA et al., 2018). Até o ano de 2008, uma análise utilizando dados de mais de 70 publicações com um total de 20.960 isolados testados para PMQR mostrou uma frequência de 1.5%, 4.6%, 2.4% e 10.8% para os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr*, respectivamente (STRAHILEVITZ et al., 2009) e o gene *qepA* foi detectado em menor frequência, entretanto, alguns autores relatam que esse gene contribui para o aumento do MIC para fluorquinolonas, dependendo de variações relacionadas à expressão desse gene sob diferentes tipos de promotores (XU et al., 2007).

A pesquisa de genes PMQR tem sido direcionada, sobretudo, para enterobactérias e patógenos clássicos, entretanto, para os grupos das bactérias classificadas como bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF), esses genes são relatados apenas em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (JACOBY et al., 2014). A alta frequência na detecção de genes PMQR nos isolados do presente estudo mostra que bactérias ambientais podem atuar como reservatório de importantes genes de resistência às fluorquinolonas, o que é preocupante devido ao potencial de disseminação horizontal desses genes, uma vez que possuem natureza plasmidial.

Analizando separadamente o perfil geral de resistência encontrado por gênero bacteriano é possível observar que a maioria dos isolados de *S. maltophilia* foi não suscetível a levofloxacina (Tabela 4). Esse patógeno é classificado como BGNNF que pode ser encontrado em diversos locais, tanto no ambiente hospitalar, em aparelhos e instrumentais hospitalares, como no meio ambiente (BERG, 2009; BERG et al., 2005; LAI, et al. 2006). A habilidade para aderir e formar biofilmes em superfícies abióticas, como plástico e vidro explica a presença desta bactéria em dispositivos hospitalares como dispensers de aerosol, cateteres venosos centrais e sistemas de sucção (DE OLIVEIRA-GARCIA et al., 2002; OLIVEIRA-GARCIA et al., 2003; PUGÈS et al., 2015; LAI et al., 2006; O'DONNELL et al., 2005). *S. maltophilia* é um patógeno que atinge, sobretudo, pacientes imunocomprometidos, severamente debilitados, pacientes com HIV e fibrose cística (PARKE & GURIAN-SHERMAN, 2001; STEINKAMP et al., 2005).

Em 2008, Shimizu e colaboradores realizaram experimentos *in silico* utilizando a sequência do genoma de uma linhagem de *S. maltophilia* e encontraram nela uma região cuja codificação em aminoácidos demonstrou homologia de 61,5 % e 61% em relação às proteínas QnrB1 e QnrB2. Essa sequência, denominada *Smqnr*, foi clonada e os transformantes que expressaram a proteína SmQnr demonstraram reduzidos níveis de susceptibilidade às

quinolonas. Esses resultados permitiram caracterizar um gene de resistência às quinolonas localizado no cromossomo de *S. maltophilia*. Outros autores discutem que *S. maltophilia* de origem ambiental pode ser uma fonte para o surgimento de novos determinantes Qnr e que a superexpressão de SmeDEF nessa espécie explica situações nas quais é observada alta resistência às quinolonas na ausência de mutações em genes codificadores de topoisomerasas (SÁNCHEZ et al., 2008; GARCÍA-LEÓN et al., 2014). A presença desses genes poderia explicar o perfil encontrado no isolado S427, o qual é resistente às três fluorquinolonas testadas, mas não apresentou mutações nos genes *gyrA* e *parC* ou genes PMQR (Tabela 4).

Assim como observado por Ribera et al. (2002), as mutações em *gyrA* e *parC* não foram relevantes para a resistência às quinolonas, indicando que a aquisição de resistência em bactérias do gênero *Stenotrophomonas* não tem sido relacionada a mutações na região QRDR. Entre os 17 isolados estudados, nenhum apresentou mutações no gene *gyrA* e apenas o isolado S377 apresentou uma mutação no gene *parC*, portanto, os resultados indicam e confirmam que outros mecanismos são envolvidos na aquisição de resistência em *S. maltophilia*. Embora a grande maioria dos estudos aponte e correlacione a não suscetibilidade a fluorquinolonas com bombas de efluxo intrínsecas e adquiridas, como *smeABC*, *smeDEF*, *smeIJK*, *smeVWX* e *smrA* (SÁNCHEZ et al., 2015), o presente estudo mostra que isolados ambientais de *S. maltophilia* possuem diferentes genes plasmidiais mediadores de resistência, entre eles, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *oqxA* e *oqxB*, o que pode explicar o fenótipo observado.

O primeiro relato do gene *qnrS* em *S. maltophilia* foi descrito por Margaritis et al. (2017) e não há relatos de outros genes *qnr* e *oqxAB* nesta espécie. Alguns estudos investigaram os genes PMQR em isolados não suscetíveis à levofloxacina, entretanto, nenhum gene foi detectado (ZHANG et al., 2012; JIA et al., 2015; KANAMORI et al., 2015). Portanto, o presente estudo mostra, pela primeira vez, a presença dos genes *qnrA*, *qnrB* e *oqxAB* e a presença do gene *qnrS* pela segunda vez no mundo em *S. maltophilia*.

Em relação a tipagem plasmidial, em todos os isolados de *S. maltophilia* houve a detecção de plasmídeos da família ColE-like. Embora esses plasmídeos não sejam auto-mobilizáveis, eles podem ser transferidos na presença de plasmídeos conjugativos. No isolado S428 foi detectado um plasmídeo da família IncL/M, além dos genes *qnrA* e *qnrS* (Tabela 4). Membros plasmidiais dessa família têm sido associados aos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* (KIM et al., 2009) e em *Salmonella* sp. foi verificado o gene *qnrS1* estava localizado em plasmídeo da família ColE-like (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2008). O sequenciamento completo do plasmídeo pEI1573, pertencente à família IncL/M, mostrou ser o mesmo carreador dos genes *bla_{IMP-4}* e *qnrB2* (CARATTOLI, 2013). Assim, a correlação de genes *qnr* com plasmídeos da

família IncL/M já havia sido relatada em membros da família *Enterobacteriaceae*. Portanto, nossos resultados indicam que isolados ambientais de *S. maltophilia* abrigam vários genes de resistência mediados por plasmídeos e que esses genes estão intimamente relacionados aos plasmídeos do tipo ColE-like.

Bactérias pertencentes ao gênero *Achromobacter* são bacilos Gram-negativos aeróbios e não fermentadores de lactose. Sua distribuição é ubíqua, sendo encontrados no solo, na água e também no ambiente hospitalar (SWENSON & SADIKOT, 2015). O primeiro isolado deste gênero foi descrito por Yabuuchi e colaboradores em 1971. A maioria das espécies desse gênero não são patogênicas e a obtenção de isolados a partir de amostras de escarro não está necessariamente associada a infecções. No entanto, bactérias desse gênero também têm sido frequentemente associadas a infecções em pacientes imunocomprometidos, principalmente as espécies *Achromobacter xylosoxidans* e *Achromobacter denitrificans* (SWENSON & SADIKOT, 2015).

Dentre os 16 isolados do gênero *Achromobacter* estudados, todos foram não suscetíveis a norfloxacin, 14 foram não suscetíveis a levofloxacin e 15 a ciprofloxacin. Assim, observa-se um alto nível de resistência nesses isolados. Entretanto, Wood et al. (2017) relatam em seu estudo que existe um nível variado de suscetibilidade às fluorquinolonas em isolados de *A. xylosoxidans* e esses antimicrobianos não são indicados como primeira escolha no tratamento de infecções ocasionadas por esse patógeno.

Quanto ao perfil de mutações nos genes *gyrA* e *parC*, 5 isolados apresentaram as mutações S83L/D87N em *gyrA* e dois isolados apresentaram ainda as mutações S80I e S80I/E84A no gene *parC* (Tabela 5). Além das mutações descritas, alguns isolados apresentaram os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *oqxA* e *oqxB*. Contudo, os isolados S387, S388, S473, S474, S475 e S477 não apresentaram mutações nos genes QRDR e também não foi detectado nenhum gene PMQR. Portanto, é possível concluir que outros mecanismos podem contribuir com os diferentes níveis de suscetibilidade às fluorquinolonas, como o sistema de efluxo AxyXY-OprZ, por exemplo. Em 2011 esse sistema foi caracterizado como responsável pelos altos níveis de resistência intrínseca a multidrogas observado em *A. xylosoxidans* (BADOR et al., 2012; BADOR et al., 2011), tendo sido demonstrada a sua atuação diante de algumas fluorquinolonas, aminoglicosídeos, cefepime, carbapenênicos, tetraciclina e eritromicina (HU et al., 2015). Além dele, o sistema AxyABM também foi correlacionado a resistência intrínseca em *A. xylosoxidans* (BADOR et al., 2011; DOI et al., 2008; HU et al., 2015).

Na tipagem plasmidial observou-se que todos eles apresentaram plasmídios ColE-*like* e foram detectados plasmídeos do tipo IncFIB em 3 isolados, IncA/C em 2 isolados e IncP em 1 isolado (Tabela 5). Plasmídeos pertencentes à família IncF já foram observados em isolados de diferentes gêneros, principalmente em enterobactérias, mas não existem relatos desses plasmídeos associados a genes carreadores de resistência em isolados do gênero *Achromobacter*. Em enterobactérias eles foram encontrados associados a genes carreadores de resistência às β -lactamases e aos genes *qepA* e *qnrS1*, enquanto os genes *bla_{NDM}* e *qnrA* foram encontrados em um mesmo plasmídeo da família IncA/C (CARATTOLI, 2013). No isolado S375 foi detectado o gene *qnrS* e o plasmídeo da família IncFIB e no isolado S360 foi detectado o gene *qnrA* e plasmídeo da família IncA/C, entretanto, experimentos adicionais são necessários para confirmar a presença desses genes nos plasmídeos detectados.

O gênero *Ochrobactrum* foi primeiramente descrito por Holmes e colaboradores em 1998. Filogeneticamente ele é próximo ao gênero *Brucella*, o qual possui espécies responsáveis por ocasionar brucelose, uma zoonose (HERMAN & de RIDDER, 1992; MORENO et al., 1992; SCHMITT et al., 2017). As espécies pertencentes ao gênero *Ochrobactrum* são consideradas patógenos humanos oportunistas emergentes, sendo as espécies de *O. anthropi* e *O. intermedium* as mais frequentemente isoladas de pacientes imunocomprometidos, sendo associados a cateteres intravenosos (TEYSSIER et al., 2005; VELASCO et al., 1998), embora existam relatos de pacientes saudáveis com infecções ocasionadas por *O. anthropi* (MASTROIANNI et al., 1999). De acordo com Torres et al. (2014), a cada seis casos de bacteremia ocasionados por *O. anthropi*, cinco ocorrem em pacientes imunocomprometidos. Há também diversos trabalhos mostrando o isolamento de *O. anthropi* a partir de plantas e de amostras de solo (LEBUHN et al., 2000; VELASCO et al., 1998; HOLMES et al., 1998). Lebuhn e colaboradores relatam a abundância de *O. anthropi* no meio ambiente, fazendo desta bactéria uma ferramenta ideal para estudos ecológicos de diversidade microbiana. No presente estudo foram identificados 13 isolados de *Ochrobactrum* sp.

Analisando o perfil de resistência se observa que todos os isolados de *Ochrobactrum* sp. foram não suscetíveis a norfloxacin e a ciprofloxacina e 10 isolados foram não suscetíveis a levofloxacina (Tabela 6). Dentre as fluorquinolonas indicadas para o tratamento de infecções por *Ochrobactrum* destaca-se a ciprofloxacina (TORRES et al., 2014), para a qual todos os isolados deste estudo foram não suscetíveis.

A pesquisa de mutações nos genes *gyrA* e *parC* mostrou a mutação A83Q no gene *gyrA* em todos os isolados e nenhuma mutação no gene *parC*, indicando que esse pode ser um

mecanismo de resistência importante para esse grupo de isolados, uma vez que poucos genes PMQR foram detectados nos isolados resistentes.

Em relação à tipagem plasmidial, seis dos 13 isolados dessa espécie apresentaram plasmídeos pertencentes à família ColE-like, enquanto os demais não apresentaram plasmídeos de nenhuma das famílias pesquisadas. No entanto, sete isolados desse gênero não apresentaram os plasmídeos pesquisados, o que reforça a idéia de que o principal mecanismo de resistência às quinolonas parece ser cromossomal.

Entre os isolados de *E. coli* obtidos de amostras de solo, todos foram resistentes às fluorquinolonas testadas. *E. coli* é um bacilo de Gram-negativo pertencente à família das enterobactérias, são anaeróbias facultativas e colonizam o trato intestinal de diversos animais (SOUSA, 2006; HOOPER & GORDON, 2001). Os animais liberam esta bactéria no meio ambiente através das fezes, ocorrendo a contaminação de águas e solos (SAVAGEAU, 1983). Stürmer e colaboradores (2004) estudaram 406 isolados de *E. coli* obtidos de fezes de pacientes assintomáticos e observou que 0.7% deles foram não susceptíveis a ciprofloxacina e um estudo conduzindo por Zhanel e seus colaboradores (2006) utilizando 1.142 isolados de *E. coli* de pacientes de mais de 40 centros médicos da América do Norte com infecção urinária mostrou que 5,5 % deles foram não suscetíveis a ciprofloxacina. Alguns estudos mostram ainda que os níveis de resistência em isolados de *E. coli* obtidos de pacientes sintomáticos têm aumentando com o passar dos anos (ERB et al., 2007).

O presente estudo analisou quatro isolados de *E. coli*, os quais se destacam pelo alto nível de resistência para as três fluorquinolonas testadas. Quanto ao perfil de mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parE* e *parC*, os quatro isolados apresentam as mutações S83L/D87N em *gyrA*. Para o gene *parC*, um isolado (S366) apresentou as mutações S80I/E84Q e os demais a mutação S80I. Todos os isolados apresentam uma mutação na posição 458 no gene *parE*, com exceção do isolado S373 e nenhum deles apresentou mutação no gene *gyrB*.

Três dos isolados apresentaram diversos genes PMQR, contudo, o isolado S373 teve apenas o gene *oqxA* e foi também o único a apresentar os menores níveis de suscetibilidade às fluorquinolonas. Esse fenótipo poderia ser explicado devido à ausência de outros genes plasmidiais como *qnr* ou da mutação na posição 458 do gene *parE*, presente nos demais isolados. Outros estudos mostraram que os genes PMQR são capazes de aumentar o MIC para as fluorquinolonas quando associados a mecanismos cromossomais de mutação (STRAHILEVITZ et al., 2009). Além disso, alguns autores também observaram altos níveis de resistência às quinolonas em isolados de *E. coli* associados à presença de mutações duplas nas posições 83 e 87 do gene *gyrA* (SORLÓZANO et al., 2007).

Chung e colaboradores (2017) evidenciaram que as mutações na região QRDR foram as principais causas de não suscetibilidade à ciprofloxacina observada em 63 isolados de *E. coli* obtidos de animais domésticos e de seus donos, dos quais 37% apresentaram mutações nas posições S83L e D87N de *gyrA*, 37% tiveram mutações únicas em S80I de *parC* e 1 isolado apresentou as mutações S80I e E84G em *parC* (CHUNG et al., 2017). Nesse estudo, Chung e colaboradores também não encontraram mutações nos genes *gyrB*, resultado similar ao encontrado nos 4 isolados de *E. coli* do presente estudo.

Um estudo distinto utilizando 1.050 isolados de *E. coli* obtidos de humanos, animais, aves e meio ambiente na República Checa detectou que todos os isolados com altos níveis de resistência a ciprofloxacina possuíam duas ou três mutações em *gyrA*, combinadas com uma ou duas mutações em *parC*, sendo as mais frequentes nas posições 83 e 87 em *gyrA*, 80 e 84 em *parC* e 475 em *parE*. No entanto, as mutações em *parE* não foram correlacionadas a isolados resistentes a ciprofloxacina e também não houve detecção de mutações no gene *gyrB* (RÖDEROVA et al., 2017).

Em relação a tipagem plasmidial, todos os isolados de *E. coli* apresentaram plasmídeos da família ColE-like. O isolado S366 também apresentou plasmídeos IncFIB, IncA/C, IncN e IncHI1 e IncF_{repB}, enquanto o isolado S373 teve os plasmídeos IncFIB, IncY e IncF_{rep}. No isolado S374 foram detectados os grupos IncFIB, IncA/C e IncF_{repB} e no S376 os plasmídeos IncP e IncF_{repB}. IncF é uma das famílias plasmidiais mais frequentemente encontradas em enterobactérias (CARATTOLI, 2013) e comportam mais de uma região promotora de replicação denominadas de FIA, FII, FIB (VILLA et al., 2010). Os quatro isolados bacterianos ambientais de *E. coli* apresentam plasmídeo da família IncFIB e, embora trate-se de um pequeno número de bactérias da espécie *E. coli*, é possível verificar a prevalência desse tipo de plasmídeo. Plasmídeos pertencente à família IncN carreando os genes PMQR *qnrS1*, *qnrB19* e *qnrA1* também foram relatados por CARATTOLI (2013).

Assim, foi possível concluir que as principais bactérias de importância clínica isoladas do meio ambiente com resistência às fluorquinolonas estudadas foram *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* sp., *Ochrobactrum* sp. e *Escherichia coli* e que esses isolados apresentaram diferentes mecanismos de resistência.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- As principais bactérias isoladas do meio ambiente com resistência às fluorquinolonas foram *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* sp., *Ochrobactrum* sp. e *Escherichia coli*.
- A determinação do nível de resistência às fluorquinolonas pelo teste da Concentração Inibitória Mínima mostrou que os diferentes gêneros bacterianos apresentam altos níveis de resistência a esses antimicrobianos, em especial os isolados de *E. coli*.
- A pesquisa de mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* mostra um padrão semelhante ao observado com isolados clínicos relatados na literatura, inclusive para os isolados de *S. maltophilia*, onde não se observa mutações nesses genes.
- A pesquisa dos genes plasmidiais envolvidos na resistência às quinolonas mostrou que os mesmos estão distribuídos entre os diferentes gêneros bacterianos estudados, com maior frequência dos genes *qnrA* e *qnrS*.
- O presente estudo mostra, pela primeira vez, a presença dos genes *qnrA*, *qnrB* e *oqxAB* e a presença do gene *qnrS* pela segunda vez no mundo em *S. maltophilia*.
- A tipagem plasmidial mostrou que a maioria dos isolados apresentou plasmídeos da família ColE-like e que os isolados de *E. coli* apresentam um grande número de plasmídeos do grupo Inc.
- O fenótipo de resistência nesses isolados não pode ser atribuído apenas a um mecanismo, uma vez que mecanismos adicionais, sobretudo sistemas de efluxo, podem contribuir com a aquisição de resistência às fluorquinolonas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, F., YAMAMOTO, A., TAKAKURA, K. I., & KAWAHARA, R. 2013. Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolone-resistance genes in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 444, 508-514.

AKIYAMA, T., KHAN, A. A. 2012. Isolation and characterization of small *qnrS1*-carrying plasmids from imported seafood isolates of *Salmonella enterica* that are highly similar to plasmids of clinical isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 64(3):429-32.

ALBORNOZ, E., TIJET, N., DE BELDER, D., GOMEZ, S., MARTINO, F., CORSO, A. & PETRONI, A. 2017. *qnrE1*, a member of a new family of plasmid-located quinolone resistance genes, originated from the chromosome of *Enterobacter* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(5), e02555-16.

ALDRED, K. J., KERNS, R. J., & OSHEROFF, N. 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565-1574.

ALMUZARA, M., LIMANSKY, A., BALLERINI, V., GALANTERNIK, L., FAMIGLIETTI, A., & VAY, C. 2010. In vitro susceptibility of *Achromobacter* spp. isolates: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods. *International journal of antimicrobial agents*, 35(1), 68-71.

ALONSO, A., & MARTÍNEZ, J. L. 2000. Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(11), 3079-3086.

ALONSO, A., & MARTINEZ, J. L. 2001. Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(6), 1879-1881.

AMABILE-CUEVAS, CF., AND DEMPLE B. 1991. Molecular characterization of the *soxrs* genes of *Escherichia coli*: Two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res.* 19: 4479-4484.

AOIKE, N. L., SAGA, T., SAKATA, R., YOSHIZUMI, A., KIMURA, S., IWATA, M., YOSHIZAWA, S., SUGASAWA, Y., ISHII, Y., YAMAGUCHI, K., TATEDA, K. J. 2013. Molecular characterization of extraintestinal *Escherichia coli* isolates in Japan: relationship between sequence types and mutation patterns of quinolone resistance-determining regions analyzed by pyrosequencing. *Clin. Microbiol.* 51:1692-8.

APPELBAUM, P. C., & HUNTER, P. A. 2000. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International journal of antimicrobial agents*, 16(1), 5-15.

AVISON, M. B., HIGGINS, C. S., FORD, P. J., VON HELDREICH, C. J., WALSH, T. R., & BENNETT, P. M. 2002. Differential regulation of L1 and L2 β -lactamase expression in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(2), 387-389.

BADOR, J., AMOUREUX, L., DUEZ, J. M., DRABOWICZ, A., SIEBOR, E., LLANES, C., NEUWIRTH, C. 2011. First description of an RND-type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*, AxyABM. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:4912–4914.

BADOR, J., AMOUREUX, L., BLANC, E., & NEUWIRTH, C. 2012. The innate aminoglycoside resistance of *Achromobacter xylosoxidans* is due to AxyXY-OprZ, an RND-type multidrug efflux pump. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-01243.

BAILEY, A. M., PAULSEN, I. T., AND PIDDOCK, L. J. 2008. Rama confers multidrug resistance in *Salmonella enterica* via increased expression of *acrB*, which is inhibited by chlorpromazine. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 3604-3611.

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

BARCHIESI, J., CASTELLI, M., E., SONCINI F. C., AND VESCOVI E. G. 2008. Metaexpression is induced by *rob* overexpression and mediates a *Salmonella enteric* resistance phenotype. *J Bacteriol.* 190: 4951-4958.

BELLON, S., PARSONS, J. D., WEI, Y., HAYAKAWA, K., SWENSON, L. L., CHARIFSON, P. S. & GROSS, C. H. 2004. Crystal structures of *Escherichia coli* topoisomerase IV ParE subunit (24 and 43 kilodaltons): a single residue dictates differences in novobiocin potency against topoisomerase IV and DNA gyrase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(5), 1856-1864.

BERG, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84:11–18. 30.

BERG, G., EBERL, L., HARTMANN, A. 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ. Microbiol.* 7:1673–1685 239

BIALEK-DAVENET, Suzanne et al. Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 1, p. 81-88, 2014.

BLONDEAU, J. M. 2004. Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv.Ophthalmol.* 49: 73-78.

BOLON, M. K. 2009. The newer fluoroquinolones. *Med Clin North Am.* Jul. 95(4):793-817, viii.

BÖNEMANN, G., STIENS, M., PÜHLER, A., & SCHLÜTER, A. 2006. 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*, 50(9), 3075-3080.

BOULUND, F., JOHNNING, A., PEREIRA, M. B., LARSSON, D. J., & KRISTIANSSON, E. 2012. A novel method to discover fluoroquinolone antibiotic resistance (*qnr*) genes in fragmented nucleotide sequences. *BMC genomics*, 13(1), 695.

BOUSQUET, A., SOLER, C., MACNAB, C., LE, A. F., & HÉNO, P. 2016. *Arthrobacter albus* infected implantable cardioverter-defibrillator. *Medecine et maladies infectieuses*, 46(1), 59-60.

BREINES, D. V., OUABDESSELAM, S., NQ, EY, TANKOVIC, J., SHAH S., SOUSSY, C. J., HOOPER, D. C. 1997. 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.

BRIALES, A., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J, M., VELASCO, C., DE ALBA, P, D., RODRÍGUEZ-BAÑO, J., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., PASCUAL, A. 2012. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. 39:431-4.

BRINO, L., URZHUMTSEV, A., MOUSLI, M., BRONNER, C., MITSCHLER, A., OUDET, P., & MORAS, D. 2000. Dimerization of *Escherichia coli* DNA-gyrase B provides a structural mechanism for activating the ATPase catalytic center. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9468-9475.

BROOKE, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 25(1), 2-41.

BERG, G., EBERL, L., & HARTMANN, A. 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 7(11), 1673-1685.

BUSSE, H. J. 2016. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter* sensu lato, proposal to reclassify selected species of the genus

Arthrobacter in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 66(1), 9-37.

CAPOOR, M. R., NAIR, D., WALIA, N. S., ROUTELA, R. S., GROVER, S. S., DEB, M., AGGARWAL, P., PILLAI, P. K AND BIFANI, P. J. 2009. Molecular analysis of high level ciprofloxacin resistance in *Salmonella enteric* serovar *typhi* and *S. Paratyphi* A: Need to expand the QRDR region? Epidemiol Infect. 137: 871-878.

CARATTOLI, A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53(6), 2227-2238.

CARATTOLI, A. 2013. Plasmids and the spread of resistance. International Journal of Medical Microbiology, 303(6-7), 298-304.

CARATTOLI, A., BERTINI, A., VILLA, L., FALBO, V., HOPKINS, K. L., THRELFALL, E. J. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods. 63(3):219-228. doi: 10.1016/j.mimet.2005.03.018.

CARMODY, L. A., SPILKER, T., & LIPUMA, J. J. 2011. Reassessment of *Stenotrophomonas maltophilia* phenotype. Journal of clinical microbiology, 49(3), 1101-1103.

CATTOIR, V., POIREL, L., ROTIMI, V., SOUSSY, C. J., NORDMANN, P. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. J Antimicrob Chemother. 60:394-397.

CATTOIR, V., POIREL, L., & NORDMANN, P. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. Antimicrobial agents and chemotherapy, 52(10), 3801-3804.

CAVACO, L. M., HASMAN, H., XIA, S., & AARESTRUP, F. M. 2009. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53(2), 603-608.

CHÁVEZ-JACOBO, V. M., HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, K. C., ROMO-RODRÍGUEZ, P., PÉREZ-GALLARDO, R. V., CAMPOS-GARCÍA, J., GUTIÉRREZ-CORONA, J. F., ... & RAMÍREZ-DÍAZ, M. I. 2018. Novel Ciprofloxacin-Modifying Enzyme (CrpP) Encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 Plasmid. Antimicrobial agents and chemotherapy, AAC-02629.

CHEN, X.1., ZHANG, W., PAN, W., YIN, J., PAN, Z., GAO, S., JIAO, X. 2012. Prevalence of *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *Antimicrob Agents Chemother.* 56: 3423-7.

CHUNG, Y. S., HU, Y. S., SHIN, S., LIM, S. K., YANG, S. J., PARK, Y. H., & PARK, K. T. 2017. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from companion animals, pet-owners, and non-pet-owners. *Journal of veterinary science*, 18(4), 449-456.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne PA. CLSI M100-S23.

COENYE, T., LIU, L., VANDAMME, P., & LIPUMA, J. J. 2001. Identification of *Pandoraea* species by 16S ribosomal DNA-based PCR assays. *Journal of clinical microbiology*, 39(12), 4452-4455.

CONN, H. J., & DIMMICK, I. 1947. Soil bacteria similar in morphology to *Mycobacterium* and *Corynebacterium*. *Journal of bacteriology*, 54(3), 291.

COX, G., & WRIGHT, G. D. 2013. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 287-292.

CROSSMAN, L. C., GOULD, V. C., DOW, J. M., VERNIKOS, G. S., OKAZAKI, A., SEBAIHIA, M., & ADLEM, E. 2008. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome biology*, 9(4), R74.

CUMMINGS, D. E., ARCHER, K. F., ARRIOLA, D. J., BAKER, P. A., FAUCETT, K. G., LAROYA, J. B., PFEIL, K. L., RYAN, C. R., RYAN, K. R., ZUILL, D.E., 2011. Broad dissemination of plasmid-mediated quinolone resistance genes in sediments of two urban coastal wetlands. *Environ. Sci. Technol.* 4: 447–454.

D'COSTA, V. M., GRIFFITHS, E., & WRIGHT, G. D. 2007. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Current opinion in microbiology*, 10(5), 481-489.

DALKMANN, P., BROSZAT, M., SIEBE, C., WILLASCHEK, E., SAKINC, T., HUEBNER, J., AMELUNG, W., GROHMANN, E., SIEMENS, J. 2012. Accumulation of pharmaceuticals, *Enterococcus*, and resistance genes in soils irrigated with wastewater for zero to 100 years in Central Mexico. *PLoS One* 7: e45397.

DE MAJUMDAR, S., VELEBA, M., FINN, S., FANNING, S., & SCHNEIDERS, T. 2013. Elucidating the regulon of multidrug resistance regulator RarA in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(4), 1603-1609.

DE OLIVEIRA-GARCIA, D., DALL'AGNOL, M., ROSALES, M., AZZUZ, A. C., MARTINEZ, M. B., & GIRÓN, J. A. 2002. Characterization of flagella produced by clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 918.

DEGAND, N., LOTTE, R., LE BUTOR, C. D., SEGONDS, C., THOUVEREZ, M., FERRONI, A., ... & CARRÈRE, J. 2015. Epidemic spread of *Pandoraea pulmonicola* in a cystic fibrosis center. *BMC infectious diseases*, 15(1), 583.

DEMPLE, B. 1996. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxrs oxidative stress regulon-a review. *Gene*. 179: 53-57.

DENTON, M., & KERR, K. G. 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 57-80.

DENTON, M., RAJGOPAL, A., MOONEY, L., QURESHI, A., KERR, K. G., KEER, V., ... & CONWAY, S. P. 2003. *Stenotrophomonas maltophilia* contamination of nebulizers used to deliver aerosolized therapy to inpatients with cystic fibrosis. *Journal of Hospital Infection*, 55(3), 180-183.

DESJARDINS, P., & CONKLIN, D. 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (45).

DING, L., HIROSE, T., & YOKOTA, A. 2009. Four novel *Arthrobacter* species isolated from filtration substrate. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(4), 856-862.

DOI, Y., POIREL, L., PATERSON, D. L., & NORDMANN, P. 2008. Characterization of a naturally occurring class D β -lactamase from *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(6), 1952-1956.

DRIDI, L., TANKOVIC, J., BURGHOFFER, B., BARBUT, F., & PETIT, J. C. 2002. *gyrA* and *gyrB* mutations are implicated in cross-resistance to ciprofloxacin and moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(11), 3418-3421.

DRLICA, K., MALIK, M., KERNS, R. J., & ZHAO, X. 2008. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(2), 385-392.

EMMERSON, A. M., & JONES, A. M. 2003. The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(suppl_1), 13-20.

ERB, A., STÜRMER, T., MARRE, R., & BRENNER, H. 2007. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(2), 83-90.

FALCÃO, J. M., PISCO, A. M., SIMÕES, J. A., FALCÃO, I. M., PIMENTA, Z. P., NUNES, B. 2003. Prescrição de antibacterianos em clínica geral: um estudo na rede médicos-sentinela. *Rev Port Clin Geral*. 19:315-29.

FERA, M. T., MAUGERI, T. L., GUGLIANDOLO, C., BONANNO, D., LA CAMERA, E., PAPASERGI, S., & CARBONE, M. 2007. Occurrence of *Burkholderia cepacia* complex, *Ralstonia* and *Pandoraea* species DNAs in the coastal environment of the Straits of Messina (Italy). *Marine pollution bulletin*, 54(6), 803-808.

FONSECA, É. L., DOS SANTOS FREITAS, F., VIEIRA, V. V., & VICENTE, A. C. 2008. New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerging infectious diseases*, 14(7), 1129.

FORSBERG, K. J., REYES, A., WANG, B., SELLECK, E. M., SOMMER, M. O., & DANTAS, G. 2012. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *science*, 337(6098), 1107-1111.

FUNKE, G., HUTSON, R. A., BERNARD, K. A., PFYFFER, G. E., WAUTERS, G., & COLLINS, M. D. 1996. Isolation of *Arthrobacter* spp. from clinical specimens and description of *Arthrobacter cumminsii* sp. nov. and *Arthrobacter woluwensis* sp. nov. *Journal of clinical microbiology*, 34(10), 2356-2363.

FUNKE, G., PAGANO-NIEDERER, M., SJÖDÉN, B., & FALSEN, E. 1998. Characteristics of *Arthrobacter cumminsii*, the most frequently encountered *Arthrobacter* species in human clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 36(6), 1539-1543.

FUNKE, G., VON GRAEVENITZ, A., CLARRIDGE, J. 3., & BERNARD, K. A. 1997. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 10(1), 125-159.

GALBRAITH, K. M., NG, A. C., EGGERS, B. J., KUCHEL, C. R., EGGERS, C. H., & SAMUELS, D. S. 2005. *parC* mutations in fluoroquinolone-resistant *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(10), 4354-4357.

GARAU, J., XERCAVINS, M., RODRÍGUEZ-CARBALLEIRA, M., GÓMEZ-VERA, J. R., COLL, I., VIDAL, D., ... & RUÍZ-BREMÓN, A. 1999. Emergence and Dissemination

of Quinolone-Resistant *Escherichia coli* in the Community. Antimicrobial agents and chemotherapy, 43(11), 2736-2741.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A., FORTINI, D., VELDMAN, K., MEVIUS, D., & CARATTOLI, A. 2009. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 63(2), 274-281.

GARCÍA-LEÓN, G., HERNÁNDEZ, A., HERNANDO-AMADO, S., ALAVI, P., BERG, G., & MARTÍNEZ, J. L. 2014. A function of *SmeDEF*, the major quinolone resistance determinant of *Stenotrophomonas maltophilia*, is the colonization of plant roots. Applied and environmental microbiology, 80(15), 4559-4565.

GERKEN H, MISRA R. 2004. Genetic evidence for functional interactions between *TolC* and *AcrA* proteins of a major antibiotic efflux pump of *Escherichia coli*. MolMicrobiol. 54:620-631.

GIRAUD, E., BAUCHERON, S. AND CLOECKAERT, A. 2006. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: Emerging mechanisms and resistance prevention strategies. Microbes Infect. 8: 1937-1944.

GLUPCZYNSKI, Y., HANSEN, W., FRENEY, J., & YOURASSOWSKY, E. 1988. In vitro susceptibility of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* to 24 antimicrobial agents. Antimicrobial agents and chemotherapy, 32(2), 276-278.

GLUPCZYNSKI, Y., HANSEN, W., FRENEY, J., & YOURASSOWSKY, E. 1988. In vitro susceptibility of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* to 24 antimicrobial agents. Antimicrobial agents and chemotherapy, 32(2), 276-278.

GONZÁLEZ, I., GEORGIU, M., ALCAIDE, F., BALAS, D., LIÑARES, J., & ADELA, G. 1998. Fluoroquinolone resistance mutations in the *parC*, *parE*, and *gyrA* genes of clinical isolates of viridans group streptococci. Antimicrobial agents and chemotherapy, 42(11), 2792-2798.

GUAN, X., XUE, X., LIU, Y., WANG, J., WANG, Y., WANG, J., & WANG, N. 2013. Plasmid-mediated quinolone resistance—current knowledge and future perspectives. Journal of International Medical Research, 41(1), 20-30.

GUIMARÃES, D. O., MOMESSO, L. D. S., & PUPO, M. T. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Química Nova, 33(3), 667-679.

GULAY, Z., BICMEN, M., AMYES, S. G. B., & YULU, N. 2000. Beta-lactamase patterns and beta-lactam/clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* isolated from fecal samples from healthy volunteers. *Journal of chemotherapy*, 12(3), 208-215.

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

HANSEN, L. H., JOHANNESSEN, E., BURMOLLE, M., SØRENSEN, A. H., SØRENSEN, S. J. 2004. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3332–3337.

HANSEN, L. H., JENSEN, L. B., SØRENSEN, H. I., & SØRENSEN, S. J. 2007. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(1), 145-147.

HATA, M., SUZUKI, M., MATSUMOTO, M., TAKAHASHI, M., SATO, K., IBE, S., & SAKAE, K. 2005. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(2), 801-803.

HAWKEY, P. M. 2003. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemother.* 51 Suppl 1:29-35.

HAYASHI, K., NAKASHIMA, R., SAKURAI, K., KITAGAWA, K., YAMASAKI, S., NISHINO, K., & YAMAGUCHI, A. 2016. AcrB-AcrA fusion proteins that act as multidrug efflux transporters. *Journal of bacteriology*, 198(2), 332-342.

HEISIG, P., & TSCHORNY, R. 1994. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(6), 1284-1291.

HERMAN, L. I. E. V. E., & DE RIDDER, H. 1992. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Applied and environmental microbiology*, 58(6), 2099-2101.

HIRAKATA, Y., SRIKUMAR, R., POOLE, K., GOTOH, N., SUEMATSU, T., KOHNO, S. & SPEERT, D. P. 2002. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Experimental Medicine*, 196(1), 109-118.

HOLMES, B., POPOFF, M., KIREDJIAN, M. & KERSTERS, K. 1988. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *Int J Syst Bacteriol* 38, 408–416.

HOOPER, D. C. 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. Clin Infect Dis. 31Suppl 2: S24-28.

HOOPER, D. C. 2003. Mechanisms of quinolone resistance. In Quinolone Antimicrobial Agents, Third Edition (pp. 41-67). American Society of Microbiology.

HOOPER, L. V., & GORDON, J. I. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. Science, 292(5519), 1115-1118.

HOPKINS, K. L., DAVIES, R. H., AND THRELFALL, E. J. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. Int J Antimicrob Agents. 25: 358-373.

HOU, X. G., Y. KAWAMURA, F. SULTANA, S. SHU, K. HIROSE, K. GOTO, AND T. EZAKI. 1998. Description of *Arthrobacter creatinolyticus* sp. nov., isolated from human urine. Int. J. Syst. Bacteriol. 48:423-429.

HU, Y., ZHU, Y., MA, Y., LIU, F., LU, N., YANG, X., ... & ZHU, B. 2015. Genomic insights into intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in *Achromobacter xylosoxidans*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 59(2), 1152-1161.

HUANG, Y., ZHAO, N., HE, L., WANG, L., LIU, Z., YOU, M., & GUAN, F. 2005. *Arthrobacter scleromae* sp. nov. isolated from human clinical specimens. Journal of clinical microbiology, 43(3), 1451-1455.

HUNT, D. E., KLEPAC-CERAJ, V., ACINAS, S. G., GAUTIER, C., BERTILSSON, S., AND POLZ, M. F. 2006. Evaluation of 23S RNA PCR Primers for use Phylogenetic Studies of Bacterial Diversity. Applied and Environmental Microbiology. 72: 2221-2225.

HURST, M., LAMB, H. M., SCOTT, L. J., & FIGGITT, D. P. 2002. Levofloxacin. Drugs, 62(14), 2127-2167.

JACKOWSKI, J. T., SZEPEFALUSI, Z., WANNER, D. A., SEYBOLD, Z., SIELCZAK, M. W., LAUREDO, I. T. & WANNER, A. 1991. Effects of *P. aeruginosa*-derived bacterial products on tracheal ciliary function: role of O₂ radicals. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 260(2), L61-L67.

JACOBY, G. A., WALSH, K. E., MILLS, D. M., WALKER, V. J., OH, H., ROBICSEK, A., HOOPER, D. C. 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 50: 1178-1182.

JACOBY, G. A. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis. 41 Suppl 2: S120-126.

JACOBY, G. A. 2018. Study of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Bacteria. In DNA Topoisomerases (pp. 317-325). Humana Press, New York, NY.

JACOBY, G. A., & HOOPER, D. C. 2013. Phylogenetic analysis of chromosomally determined *qnr* and related proteins. Antimicrobial agents and chemotherapy, 57(4), 1930-1934.

JACOBY, G. A., STRAHILEVITZ, J., & HOOPER, D. C. Plasmid-mediated quinolone resistance. Microbiol Spectr. 2014; 2 (2). doi: 10.1128/microbiolspec. PLAS-0006-2013.

JACOBY, G. A., WALSH, K. E., MILLS, D. M., WALKER, V. J., OH, H., ROBICSEK, A., & HOOPER, D. C. 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy, 50(4), 1178-1182.

JEONG, H. S.I., KIM, J.A., SHIN, J.H., CHANG, C.L., JEONG, J., CHO, J.H., KIM, M.N., KIM, S., KIM, Y.R., LEE, C.H., LEE, K., LEE, M.A., LEE, W.G., SHIN, J.H., LEE, J. N. 2011. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and mutations in the gyrase and topoisomerase IV genes in *Salmonella* isolated from 12 tertiary-care hospitals in Korea. Microb Drug Resist. 17:551-557.

JIA, W., WANG, J., XU, H., LI, G. 2015. Resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* to Fluoroquinolones: Prevalence in a University Hospital and Possible Mechanisms. Int J Environ Res Public Health. 12(5):5177-5195. doi: 10.3390/ijerph120505177.

JOHNSON, L. N., HAN, J. Y., MOSKOWITZ, S. M., BURNS, J. L., QIN, X., & ENGLUND, J. A. 2004. Pandoraea bacteremia in a cystic fibrosis patient with associated systemic illness. The Pediatric infectious disease journal, 23(9), 881-882.

JULIET, C., & FERNÁNDEZ, A. 2006. *Stenotrophomonas maltophilia*. Revista chilena de infectología, 23(3), 247-248.

KAHLMETER, G. 2003. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO· SENS Project. Journal of antimicrobial Chemotherapy, 51(1), 69-76.

KARCZMARCZYK, M1., MARTINS, M., QUINN, T., LEONARD, N., FANNING, S. 2011. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. Appl Environ Microbiol. 77 : 7113-20.

KANAMORI, H., YANO, H., TANOUCHI, A., KAKUTA, R., ENDO, S., ICHIMURA, S., ... & AOYAGI, T. 2015. Prevalence of *Smqnr* and plasmid-mediated quinolone resistance determinants in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* from Japan: novel variants of *Smqnr*. *New microbes and new infections*, 7, 8-14.

KIM, H. B., WANG, M., PARK, C. H., KIM, E. C., JACOBY, G. A., & OOPER, D. C. 2009. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(8), 3582-3584.

KIM, S. Y., LEE, S. K., PARK, M. S., & NA, H. T. 2016. Analysis of the fluoroquinolone antibiotic resistance mechanism of *Salmonella enterica* isolates. *J Microbiol Biotechnol*, 26(9), 1605-1612.

KIM, S. Y., PARK, Y. J., YU, J. K., KIM, Y. S., & HAN, K. 2009. Prevalence and characteristics of *aac(6')-Ib-cr* in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*: a multicenter study from Korea. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 63(3), 314-318.

KNAPP, C. W., DOLFING, J., EHLERT, P. A., & GRAHAM, D. W. 2009. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental science & technology*, 44(2), 580-587.

KOMP, LINDGREN, P1., KARLSSON, A., HUGHES, D. 2003. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 47(10):3222-32.

LAI, C. H., WONG, W. W., CHIN, C., HUANG, C. K., LIN, H. H., CHEN, W. F., ... & LIU, C. Y. 2006. Central venous catheter-related *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia and associated relapsing bacteraemia in haematology and oncology patients. *Clinical microbiology and infection*, 12(10), 986-991.

LAPONOGOV, I., VESELKOV, D. A., CREVEL, I. M. T., PAN, X. S., FISHER, L. M., & SANDERSON, M. R. 2013. Structure of an 'open' clamp type II topoisomerase-DNA complex provides a mechanism for DNA capture and transport. *Nucleic acids research*, 41(21), 9911-9923.

LEBUHN, M., ACHOUAK, W., SCHLOTER, M., BERGE, O., MEIER, H., BARAKAT, M., ... & HEULIN, T. 2000. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2207-2223.

LEE, M. K., KANATANI, M. S. 1999. Quinolones: which generation for which microbe? *West J Med*. 170(6):359-61.

LEIBOWITZ, H. M. 1991. Clinical evaluation of ciprofloxacin 0.3% ophthalmic solution for treatment of bacterial keratitis. *American journal of ophthalmology*, 112(4 Suppl), 34S-47S.

LI, L., LIAO, X., YANG, Y., SUN, J., LI, L., LIU, B., ... & LIU, Y. 2013. Spread of *oqxAB* in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium predominantly by IncHI2 plasmids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(10), 2263-2268.

LI, X. Z., LIVERMORE, D. M., & NIKAIDO, H. 1994. Role of efflux pump (s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(8), 1732-1741.

LINDGREN, P. K., KARLSSON, Å., & HUGHES, D. 2003. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(10), 3222-3232.

LIPUMA, J.J. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Apr;23(2):299-323.

LOMOVSKAYA, O., WARREN, M. S., LEE, A., GALAZZO, J., FRONKO, R., LEE, M. & LEGER, R. 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(1), 105-116.

LOONEY, W. J., NARITA, M., & MÜHLEMANN, K. 2009. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *The Lancet infectious diseases*, 9(5), 312-323.

LUTZ, L., PARIS, F. D., VIEIRA, M. I., MARQUES, E. D. A., & BARTH, A. L. 2011. Bacteriologia da fibrose cística. *Revista HCPA. Porto Alegre*. Vol. 31, n. 2 (2011), p. 168-184.

MARRS, C. F., ZHANG, L., & FOXMAN, B. 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?. *FEMS microbiology letters*, 252(2), 183-190.

MARTÍNEZ, J. L. 2012. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Frontiers in microbiology*, 3, 1.

MARTINEZ-MARTINEZ, L., PASCUAL, A., JACOBY G.A. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. 351: 797-799.

MARGARITIS, A., GALANI, I., CHATZIKONSTANTINO, M., PETRIKKOS, G., & SOULI, M. 2017. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among Gram-negative bacteraemia isolates: a hidden threat. *Journal of medical microbiology*, 66(3), 266-275.

MASTROIANNI, A., CANCELLIERI, C., & MONTINI, G. 1999. *Ochrobactrum anthropi* bacteremia: case report and review of the literature. *Clinical microbiology and infection*, 5(9), 570-573.

MATHER, R., KARENCHAK, L. M., ROMANOWSKI, E. G., & KOWALSKI, R. P. 2002. Fourth generation fluoroquinolones: new weapons in the arsenal of ophthalmic antibiotics. *American journal of ophthalmology*, 133(4), 463-466.

MAZZARIOL, A., TOKUE, Y., KANEGAWA, T.M., CORNAGLIA, G., AND NAKAIDO, H. 2000. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3441–3443.

MENDES, R. E., KIYOTA, K. A., MONTEIRO, J., CASTANHEIRA, M., ANDRADE, S. S. ET AL. 2007. Rapid Detection and Identification of Metallo-B-lactamase-Encoding Genes by Multiplex Real-Time PCR Assay and Melt Curve Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 544-557.

MORENO, E., CLOECKAERT, A., & MORIYÓN, I. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary microbiology*, 90(1-4), 209-227.

MUKHERJEE K. et al. 2011. Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain from soil that can degrade polyurethane diol. *Biodegradation*, 22:377-388.

MUSUMECI, R., RAUSA, M., GIOVANNONI, R., CIALDELLA, A., BRAMATI, S., SIBRA, B., GILTRI, G., VIGANÒ, F., COCUZZA, C. E. 2012. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolated in a teaching hospital of northern Italy. *Microb Drug Resist.* Feb; 18:33-41.

NAKAE, T., NAKAJIMA, A., ONO, T., SAITO, K., YONEYAMA, H., 1999. Resistance to betalactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1301–1303

NAKATSU, C. H., FULTHORPE, R. R., HOLLAND, B. A., PEEL, M. C., & WYNDHAM, R. C. 1995. The phylogenetic distribution of a transposable dioxygenase from the Niagara River watershed. *Molecular ecology*, 4(5), 593-604.

NATARO, J. P., & KAPER, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical microbiology reviews, 11(1), 142-201.

NEUHAUSER, M. M., WEINSTEIN, R. A., RYDMAN, R., DANZIGER, L. H., KARAM, G., & QUINN, J. P. 2003. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *Jama*, 289(7), 885-888.

O'DONNELL, M. J., TUTTLEBEE, C.M., FALKINER, F.R., COLEMAN, D. C. 2005. Bacterial contamination of dental chair units in a modern dental hospital caused by leakage from suction system hoses containing extensive bio- film. *J. Hosp. Infect.* 59:348 –360.

O'BRIEN, T. P., MAGUIRE, M. G., FINK, N. E., ALFONSO, E., & MCDONNELL, P. 1995. Efficacy of ofloxacin vs cefazolin and tobramycin in the therapy for bacterial keratitis: report from the Bacterial Keratitis Study Research Group. *Archives of Ophthalmology*, 113(10), 1257-1265.

OKAZAKI, A., & AVISON, M. B. 2008. Induction of L1 and L2 β -lactamase production in *Stenotrophomonas maltophilia* is dependent on an AmpR-type regulator. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(4), 1525-1528.

OLIVEIRA-GARCIA, D., DALL'AGNOL, M., ROSALES, M., AZZUZ, A. C., ALCÁNTARA, N., MARTINEZ, M. B., & GIRÓN, J. A. 2003. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cellular microbiology*, 5(9), 625-636.

OTEO, J., LÁZARO, E., DE ABAJO, F. J., BAQUERO, F., & CAMPOS, J. 2005. Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 11(4), 546.

PARK, C. H., ROBICSEK, A., JACOBY, G. A., SAHM, D., HOOPER, D.C. 2006. Prevalence of *aac(6')Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.; 50: 3953–55.

PARKE, J. L., & GURIAN-SHERMAN, D. 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual review of phytopathology*, 39(1), 225-258.

PÉRICHON, B., BOGAERTS, P., LAMBERT, T., FRANGEUL, L., COURVALIN, P., & GALIMAND, M. 2008. Sequence of conjugative plasmid pIP1206 mediating resistance to aminoglycosides by *16S* rRNA methylation and to hydrophilic fluoroquinolones by efflux. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(7), 2581-2592.

PIDDOCK, L. J. 2006. Multidrug-resistance efflux pumps not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 629.

PITOUT, J.D., WEI Y., CHURCH, D.L., GREGSON, D.B. 2008. Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of aac(6')-Ib-cr. *J Antimicrob Chemother*, 61(5), 999-1002.

PLOY, M. C., DENIS, F., COURVALIN, P., LAMBERT, T. 2000. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother*. 44:2684-8.

POIREL, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.M., MAMMERI, H., LIARD, A., NORDMANN, P. 2005. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QnrA*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 3523 - 3525.

POIREL, L., CATTOIR, V., & NORDMANN, P. 2012. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. Analyzing possible intersections in the resistome among human, animal and environment matrices, 96.

PUGÈS, M., DEBELLEIX, S., FAYON, M., MÉGRAUD, F., & LEHOURS, P. 2015. Persistent infection because of *Pandoraea sputorum* in a young cystic fibrosis patient resistant to antimicrobial treatment. *The Pediatric infectious disease journal*, 34(10), 1135-1137.

RAMASWAMY, Venkata Krishnan et al. Molecular rationale behind the differential substrate specificity of bacterial RND multi-drug transporters. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 8075, 2017.

RIESENFELD, C. S., GOODMAN, R. M., & HANDELSMAN, J. 2004. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environmental microbiology*, 6(9), 981-989.

ROBICSEK, A., JACOBY, G. A., AND HOOPER, D.C. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet InfectDis*. 6: 629-640.

RÖDEROVA, M., HALOVA, D., PAPOUSEK, I., DOLEJSKA, M., MASARIKOVA, M., HANULIK, V., ... & BARDON, J. 2017. Characteristics of quinolone resistance in *Escherichia coli* Isolates from humans, animals, and the environment in the Czech Republic. *Frontiers in microbiology*, 7, 2147.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M., CANO, M.E., VELASCO, C., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., PASCUAL, A. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J. Infect. Chemother*.17:149 –182.

ROLSTON, K. V., & MESSER, M. 1990. The in-vitro susceptibility of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* to 40 anti-microbial agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 26(6), 857-859.

ROSS, R. A, MARZEC, G. 1984. The bacterial diseases of reptiles. Their epidemiology, control, diagnosis and treatment, p 3, 7–10, 14 –18.

RIBERA, A., DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A., RUIZ, J., BENEDI, V. J., JIMENEZ DE ANTA, M. T., & VILA, J. 2002. Mutations in *gyrA* and *parC* QRDRs are not relevant for quinolone resistance in epidemiological unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Microbial Drug Resistance*, 8(4), 245-251.

ROTSCHAFER, J. C., ULLMAN, M. A., SULLIVAN, C. J. 2011. Optimal use of fluoroquinolones in the intensive care unit setting. *CritCareClin.* 27: 95–106.

RUIZ, E., SÁENZ, Y., ZARAZAGA, M., ROCHA-GRACIA, R., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., ARLET, G., TORRES, C. 2012. *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J Antimicrob Chemother.* 67: 886-97.

SAEZ-LLORENS, X., DE WONG, M. M. C., CASTANO, E., DE SUMAN, O., DE MORÖS, D., & DE ATENCIO, I. 2000. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. *The Pediatric infectious disease journal*, 19(3), 200-206.

SAGA, T., SABTCHEVA, S., MITSUTAKE, K., ISHII, Y., TATEDA, K., YAMAGUCHI, K., & KAKU, M. 2013. Characterization of *qnrB*-like genes in *Citrobacter* species of the American Type Culture Collection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(6), 2863-2866.

SALMA, R., DABBOUSSI, F., KASSAA, I., KHUDARY, R., & HAMZE, M. 2013. *gyrA* and *parC* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Nini Hospital in north Lebanon. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19(1), 77-81.

SANCHEZ, M. B., HERNANDEZ, A., & MARTINEZ, J. L. 2009. *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance. *Future microbiology*, 4(6), 655-660.

SÁNCHEZ, M. B., HERNÁNDEZ, A., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., & MARTÍNEZ, J. L. 2008. Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. *BMC microbiology*, 8(1), 148.

SAVAGEAU, M. A. 1983. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. The american naturalist, 122(6), 732-744.

SCHMIDT, B. H., OSHEROFF, N., & BERGER, J. M. 2012. Structure of a topoisomerase II–DNA–nucleotide complex reveals a new control mechanism for ATPase activity. Nature Structural and Molecular Biology, 19(11), 1147.

SCHMITT, C. I., KRUG, F. D. M., CERESER, N. D., & de Rezende PINTO, F. 2017. Brucelose: uma questão de saúde pública. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 18(9), 1-17.

SCHRECKENBERGER, P. C., & VON GRAEVENITZ, A. 1999. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Methylobacterium*, and other nonfermentative gram-negative rods. Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, 539-560.

SHIMIZU, K., KIKUCHI, K., SASAKI, T., TAKAHASHI, N., OHTSUKA, M., ONO, Y., & HIRAMATSU, K. 2008. *Smqnr*, a new chromosome-carried quinolone resistance gene in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 52(10), 3823-3825.

SILBAQ, F. S. 2009. Viable ultramicrocells in drinking water. Journal of applied microbiology, 106(1), 106-117.

SILVA, C. R., MANIERO, M. G., PERES, M.S., GUIMARÃES, J.R. 2013. Ocorrência e degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados. Química Nova, v. XY.

SILVA, M. P., CAVALLI, D. R., & OLIVEIRA, T. C. R. M. 2006. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. Ciênc Tecnol Aliment, 26(2), 352-9.

SINGHAL, L., KAUR, P., & GAUTAM, V. 2017. *Stenotrophomonas maltophilia*: From trivial to grievous. Indian journal of medical microbiology, 35(4), 469.

SINGHAL, N., KUMAR, M., KANAUIA, P. K., & VIRDI, J. S. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in microbiology, 6, 791.

SORLÓZANO, A., GUTIÉRREZ, J., DE DIOS LUNA, J., OTEO, J., LIÉBANA, J., SOTO, M. J., & PIÉDROLA, G. 2007. High presence of extended-spectrum β -lactamases and resistance to quinolones in clinical isolates of *Escherichia coli*. Microbiological research, 162(4), 347-354.

SORLOZANO, A., GUTIERREZ, J., JIMENEZ, A., DE DIOS LUNA, J., & MARTÍNEZ, J. L. 2007. Contribution of a new mutation in *parE* to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *Journal of clinical microbiology*, 45(8), 2740-2742.

SOUSA, C. P. 2006. The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 12(3), 363-373.

STEINKAMP, G., WIEDEMANN, B., RIETSCHER, E., KRAHL, A., GIELEN, J., BÄRMEIER, H., & RATJEN, F. 2005. Prospective evaluation of emerging bacteria in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis*, 4(1), 41-48.

ZHANG, L., LI, X. Z., & POOLE, K. 2001. SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(12), 3497-3503.

STRAHILEVITZ, J., JACOBY, G. A., HOOPER, D. C., & ROBICSEK, A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 664-689.

SULAVIK, M. C., DAZER, M., AND MILLER, P. F. 1997. The *Salmonella typhimurium* mar locus: Molecular and genetic analyses and assessment of its role in virulence. *J Bacteriol.* 179: 1857-1866.

SWENSON, C. E., & SADIKOT, R. T. 2015. *Achromobacter* respiratory infections. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(2), 252-258.

TEYSSIER, C., MARCHANDIN, H., JEAN-PIERRE, H., DIEGO, I., DARBAS, H., JEANNOT, J. L., & JUMAS-BILAK, E. 2005. Molecular and phenotypic features for identification of the opportunistic pathogens *Ochrobactrum* spp. *Journal of medical microbiology*, 54(10), 945-953.

TORRES, A. H., GÓMEZ, J. R., VÁZQUEZ, E. G., & GÓMEZ, J. G. 2014. *Ochrobactrum anthropi* Bacteraemia: Report of Six Cases and Review of the Literature. *Intern Med*, 4(134), 2.

TOMOVA, A., IVANOVA, L., BUSCHMANN, A. H., GODFREY, H. P., & CABELLO, F. C. 2018. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Genes and Class 1 Integrons in Quinolone-Resistant Marine Bacteria and Clinical Isolates of *Escherichia coli* from an Aquacultural Area. *Microbial ecology*, 75(1), 104-112.

TRAN, J. H., & JACOBY, G. A. 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5638-5642.

TRAN, J. H., JACOBY, G. A., & HOOPER, D. C. 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein *Qnr* with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(1), 118-125.

VELASCO, J., ROMERO, C., LÓPEZ-GOÑI, I., LEIVA, J., DÍAZ, R., & MORIYÓN, I. 1998. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(3), 759-768.

VELEBA, M., HIGGINS, P. G., GONZALEZ, G., SEIFERT, H., & SCHNEIDERS, T. 2012. Characterization of *RarA*, a novel *AraC* family multidrug resistance regulator in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(8), 4450-4458.

VESTERGAARD, M., LENG, B., HAABER, J., BOJER, M. S., VEGGE, C. S., & INGMER, H. 2016. Genome-wide identification of antimicrobial intrinsic resistance determinants in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in microbiology*, 7, 2018.

VILA, J., RUIZ, J., GOÑI, P., DE ANTA MT. 1996. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 491-3.

VILA, J., RUIZJ., MARCOF., BARCELOA., GOÑIP., GIRALTE., AND JIMENEZ, DE ANTAT. 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2477-2479.

VILLA, L., GARCÍA-FERNÁNDEZ, A., FORTINI, D., & CARATTOLI, A. 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(12), 2518-2529.

VILA, J., RUIZ, J., MARCO, F., BARCELO, A., GOÑI, P., GIRALT, E., JIMENEZ DE ANTA T. 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother.* 38(10):2477-2479.

WANG, J. C. 1996. DNA Topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry*, 65: 635-692.

WANG, M., GUO, Q., XU, X., WANG, X., YE, X., WU, S., ... & WANG, M. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(5), 1892-1897.

WANG, M., TRAN, J. H., JACOBY, G. A., ZHANG, Y., WANG, F., & HOOPER, D. C. 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(7), 2242-2248.

WANG, Q., & XIE, S. 2012. Isolation and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strain. *International biodeterioration & biodegradation*, 71, 61-66.

WASYL, D. 2014. Prevalence and characterization of quinolone resistance mechanisms in commensal *Escherichia coli* isolated from slaughter animals in Poland, 2009-2012. *Microb Drug Resist.* 20: 544-549.

WAUTERS, G., CHARLIER, J., JANSSENS, M., & DELMÉE, M. 2000. Identification of *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteolus* sp. nov., and *Arthrobacter albus* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 38(6), 2412-2415.

WEBBER, M. A., & PIDDOCK, L. J. V. 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9-11.

WEGENER, H. C., BAGER, F., & AARESTRUP, F. M. 1997. Surveillance of antimicrobial resistance in humans, food stuffs and livestock in Denmark. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles. European communicable disease bulletin*, 2(3), 17-19.

WEIGEL, L. M., STEWARD, C. D., & TENOVER, F. C. 1998. *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(10), 2661-2667.

WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, B.A., LANE, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173(2):697–703.

WONG, M. H. Y., & CHEN, S. 2013. First detection of *oqxAB* in *Salmonella* spp. isolated from food. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 658-660.

WOOD, G. C., JONAP, B. L., MAISH III, G. O., MAGNOTTI, L. J., SWANSON, J. M., BOUCHER, B. A. & FABIAN, T. C. 2017. Treatment of *Achromobacter* Ventilator-Associated Pneumonia in Critically Ill Trauma Patients. *Annals of Pharmacotherapy*, 1060028017730838.

WRIGHT, G. D. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 5(3), 175.

XU, X., WU, S., YE, X., LIU, Y., SHI, W., ZHANG, Y., & WANG, M. 2007. Prevalence and expression of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA1*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(11), 4105-4110.

XU, Y., YU, W., MA, Q., & ZHOU, H. 2015. Occurrence of (fluoro) quinolones and (fluoro) quinolone resistance in soil receiving swine manure for 11 years. *Science of the Total Environment*, 530, 191-197.

YABUUCHI, E., KAWAMURA, Y., KOSAKO, Y., & EZAKI, T. 1998. Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Rüger and Tan) comb. nov. *Microbiology and immunology*, 42(6), 429-438.

YAMANE, K., WACHINO, J., SUZUKI, S., KIMURA, K., SHIBATA, N., KATO, H., SHIBAYAMA, K., KONDA, T., ARAKAWA, Y. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51: 3354-3360.

YAMANE, K., WACHINO, J. I., SUZUKI, S., & ARAKAWA, Y. 2008. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(4), 1564-1566.

YANAT, B., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M., & TOUATI, A. 2017. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Enterobacteriaceae*: a systematic review with a focus on Mediterranean countries. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(3), 421-435.

YANG, F., ZHANG, S., SHANG, X., WANG, L., LI, H., & WANG, X. 2018. Characteristics of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in China. *Journal of dairy science*.

YUAN, J., XU, X., GUO, Q., ZHAO, X., YE, X., GUO, Y., & WANG, M. 2012. Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(7), 1655-1659.

ZECHIEDRICH, E. L., KHODURSKY, A. B., & COZZARELLI, N. R. 1997. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes & development*, 11(19), 2580-2592.

ZHANEL, G. G., HISANAGA, T. L., LAING, N. M., DECORBY, M. R., NICHOL, K. A., WESHNOWESKI, B. & HOBAN, D. J. 2006. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *International journal of antimicrobial agents*, 27(6), 468-475.

ZHANG, Z., MENG, X., WANG, Y., XIA, X., WANG, X., XI, M., MENG, J., SHI X., WANG, D., YANG, B. 2014. Presence of *qnr*, *aac(6')-Ib*, *qepA*, *oqxAB*, and mutations in gyrase and topoisomerase in nalidixic acid-resistant *Salmonella* isolates recovered from retail chicken carcasses. *Foodborne Pathog Dis.* 11:698-705.

ZHANG, R., SUN, Q., HU, Y. J., YU, H., LI, Y., SHEN, Q. & ZHOU, H. W. 2012. Detection of the *Smqnr* quinolone protection gene and its prevalence in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* in China. *Journal of medical microbiology*, 61(4), 535-539.

ZHAO, J., CHEN, Z., CHEN, S., DENG, Y., LIU, Y., TIAN, W. & ZENG, Z. (2010). Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(10), 4219-4224.

Apêndice A. Correlação de bactérias identificadas com as respectivas culturas, cidades e estados de obtenção de amostras ambientais.

Solo			Bactérias Isoladas	
Cultura/ Local	Cidade/ Estado	Nº Solo	Numeração	Identificação
Banana	Teresina/ PI	XXIII	S359	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Cajú	Jardinópolis/ SP	XXIX	S365	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Aterro Sanitário	Ribeirão Preto/ SP	XXXVII	S369	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Aterro Sanitário	Ribeirão Preto/ SP	XXXVIII	S370	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
-	Jardinópolis/ SP	XXXI	S371	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Girassol	Chapadão do Sul/ MS	XVI	S377	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Milho	Ribeirão Preto/ SP	XLII	S427	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Café	Tabatinga/ SP	LIX	S428	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Soja	Maringá/ PR	XX	S430	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Cana	Tambaú/ SP	LVII	S432	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Cana	São Sebastião do Paraíso/ MG	XVII	S433	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Citrus	Água de Santa Bárbara/ SP	XXVII	S434	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Amendoim	Cafelândia/ SP	XLIV	S435	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Morango	Atibaia/ SP	XXVI	S436	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Café	Pedregulho/ SP	LII	S437	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Soja	Jardinópolis/ SP	XXXIII	S445	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Cana	Jardinópolis/ SP	XXXII	S446	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Girassol	Chapadão do Sul/ MS	XVI	S360	<i>Achromobacter</i> sp.
Girassol	Chapadão do Sul/ MS	XVI	S361	<i>Achromobacter</i> sp.
Aterro Sanitário	Ribeirão Preto/ SP	XXXVI	S367	<i>Achromobacter</i> sp.
-	Dumont/ SP	XLV	S368	<i>Achromobacter</i> sp.
-	Jardinópolis/ SP	XXXI	S372	<i>Achromobacter</i> sp.
Cana	Ribeirão Preto/ SP	XLIII	S375	<i>Achromobacter</i> sp.
Girassol	Chapadão do Sul/ MS	XVI	S379	<i>Achromobacter</i> sp.
-	Rio Preto/ SP	LV	S387	<i>Achromobacter</i> sp.
-	São Carlos/ SP	LVI	S388	<i>Achromobacter</i> sp.
Milho	Maringá/PR	XXI	S473	<i>Achromobacter</i> sp.
Café	Pedregulho/SP	LII	S474	<i>Achromobacter</i> sp.
Pera	Tabapuã/SP	LVIII	S475	<i>Achromobacter</i> sp.
Cana	Gavião Peixoto/SP	LIII	S476	<i>Achromobacter</i> sp.
Milho	Casa Branca/SP	XLVIII	S477	<i>Achromobacter</i> sp.
Pastagem	Edeia/GO	XV	S478	<i>Achromobacter</i> sp.
Café	Altinópolis/SP	XXV	S479	<i>Achromobacter</i> sp.
Pastagem	São Pedro do Boaçuí/MG	XIX	S460	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Soja	Prata/MG	XVIII	S461	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Coco	Cruzeiro do Sul/AC	I	S462	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Girassol	Chapadão do Sul/MS	XVI	S463	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Abacate	Jardinópolis/SP	XXXIV	S464	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Café	Tabatinga/SP	LIX	S465	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Cana-de-açúcar	Arealva/SP	LX	S466	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Milho	Teresina/PI	XXII	S467	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Pastagem	Cristalina/GO	XIII	S468	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Pastagem	Água Fria de Goiás/GO	IX	S469	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Pastagem	Formosa/GO	X	S470	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Pastagem	Padre Bernardo/GO	XIV	S471	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Pastagem	Formosa/GO	X	S472	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Goiaba	Jardinópolis/SP	XXX	S366	<i>Escherichia coli</i>
Aterro Sanitário	Ribeirão Preto/ SP	XXXIX	S373	<i>Escherichia coli</i>
Aterro Sanitário	Ribeirão Preto/ SP	XL	S374	<i>Escherichia coli</i>
Jaboticaba	Jardinópolis/SP	XXXV	S376	<i>Escherichiacoli</i>
Braquiaria	Porto Velho/ RR	XXIV	S319	<i>Arthrobacter</i> sp.
Soja	Santa Juliana/ MG	XV	S317	<i>Arthrobacter</i> sp.

Citrus	Brasília/ DF	VII	S330	<i>Arthrobacter</i> sp.
Soja	Santa Juliana/ MG	XV	S345	<i>Arthrobacter</i> sp.
-	Manaus/ AM	VI	S325	<i>Arthrobacter</i> sp.
Eucalipto	Formosa/ GO	XI	S333	<i>Arthrobacter</i> sp.
Eucalipto	Formosa/ GO	XI	S332	<i>Arthrobacter</i> sp.
Graviola	Formosa/ GO	XII	S353	<i>Arthrobacter</i> sp.
Milho	Chapadão do Sul/ MS	XVII	S362	<i>Pandoraea</i> sp.
Milho	Tiros/ MG	XIV	S356	<i>Pandoraea</i> sp.
Ponte na SP-255	Bonfim Paulista/ SP	XLVI	EW53	<i>Citrobacter freundii</i>
Córrego Ribeirão/ Sertãozinho	Ribeirão Preto/ SP	XLI	EW386	<i>Citrobacter freundii</i>
Mamão	Manaus/ AM	III	S322	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.
Salsinha	Manaus/ AM	V	S318	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.
Mamão	Manaus/ AM	III	S320	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.
Florestal	Manaus/ AM	II	S335	<i>Brevundimonas</i> sp.
Florestal	Manaus/ AM	II	S326	<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>
Beterraba	Manaus/ AM	IV	S363	<i>Starkeya</i> sp.
Ribeirão da Onça	Palmares Paulista/ SP	LIV	EW58	<i>Pseudomonas</i> sp.

Legenda: Não disponível, -