UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Investigação de resistência adquirida e epidemiologia molecular em
enterobactérias produtoras de AmpC cromossômica isoladas de pacientes
hospitalizados**

Isabela Araújo Justino

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Investigação de resistência adquirida e epidemiologia molecular em
enterobactérias produtoras de AmpC cromossômica isoladas de pacientes
hospitalizados**

Dissertação de Mestrado apresentado 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

Orientada: **Isabela Araújo Justino**

Orientador: **Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia da Costa
Darini**

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia em 11/04/2018. A versão original encontra-se disponível na
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP.

Ribeirão Preto - SP
2018

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

Araújo, Isabela Justino

Investigação de resistência adquirida e epidemiologia molecular em enterobactérias produtoras de AmpC cromossômica isoladas de pacientes hospitalizados
67p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: Darini, Ana Lúcia da Costa.

1. Resistência aos antibióticos
2. Quinolonas
3. Beta-lactâmicos
4. AmpC
5. PMQR

FOLHA DE APROVAÇÃO

Isabela Araújo Justino

Investigação de resistência adquirida e epidemiologia molecular em enterobactérias produtoras de AmpC cromossômica isoladas de pacientes hospitalizados

Dissertação de Mestrado apresentado 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

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia da Costa Darini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre escutar minhas preces e nunca me deixar esmorecer frente às dificuldades da vida.

Agradeço à minha mãe Margareth por toda paciência nos momentos difíceis, por todo o amor, força e dedicação. Por sempre comemorar minhas vitórias como se fossem suas. Por não medir esforços para a minha felicidade.

Agradeço ao meu pai Augusto por acreditar na minha capacidade e fornecer todas as condições para o meu bem-estar. Pelo carinho e orações.

Agradeço ao meu irmão André pela amizade inabalável, pelo incentivo, por ser um espelho de bondade e alegria de viver. Pelo encorajamento, por acreditar em mim mais do que eu mesma.

Agradeço ao meu querido Vítor pela força, amor, paciência, companheirismo e amizade. Por se alegrar com minhas pequenas conquistas e por me ensinar a ser melhor a cada dia.

Agradeço à minha amiga Laiza pela amizade sincera, apoio, carinho e por estar comigo em todos os momentos.

Agradeço à minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Ana Lucia da Costa Darini pela oportunidade e ensinamentos. Meu respeito e admiração.

Agradeço aos amigos do LEBEM Anelise Stella Ballaben, Deise Rafaela Ústulin, Ludmilla Tonani, Renata Galetti, Rubens Eduardo da Silva e em especial Joseane Cristina Ferreira e Leonardo Neves de Andrade pela amizade, ajuda, conselhos, compartilhamento de conhecimentos e convívio diário. Aprendi muito com vocês, minha eterna gratidão.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por ceder gentilmente os isolados do estudo. Ao Dr. Roberto Martinez pela ajuda e colaboração.

Agradeço às aprimorandas Priscila e Karina por montarem a coleção de isolados primorosamente.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP (2014/14494-8) pelo apoio financeiro para a realização do estudo.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização desse trabalho.

Dedico esse trabalho à minha querida família, meus pais Margareth e Augusto, meu irmão André e meu noivo Vítor. Meu sincero agradecimento pelo apoio, incentivo e amor. Sem vocês nada teria valido a pena.

“Aprenda como se fosse viver para sempre. Viva como se fosse morrer amanhã”

Santo Isidoro de Sevilha

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	iv

1. Introdução

1.1. Micro-organismos.....	2
1.2. Antibióticos beta-lactâmicos.....	4
1.2.1. Resistência aos antibióticos beta-lactâmicos.....	4
1.3. Quinolonas.....	5
1.3.1. Resistência às quinolonas.....	6
1.4. Aminoglicosídeos.....	7
1.4.1. Resistência aos aminoglicosídeos.....	7
1.5. Resistência intrínseca.....	9
1.6. Plasmídeos.....	10
1.7. Verificação de clonalidade bacteriana por PFGE.....	10

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12

3. Material e métodos

3.1. Isolados do estudo.....	14
3.2. Linhagens controle.....	15
3.3. Testes de sensibilidade aos antibióticos.....	15
3.4. Testes fenotípicos da produção de beta-lactamases.....	16
3.5. Pesquisa de genes plasmídeos de resistência a antibióticos.....	16
3.6. Sequenciamento.....	18
3.7. Tipagem molecular.....	18
3.7.1. Dos isolados bacterianos.....	18
3.7.2. Dos plasmídeos.....	18
3.8. Perfil plasmídeo.....	19

4. Resultados

4.1. Isolados do estudo.....	21
4.2. Perfil de sensibilidade dos isolados.....	21

4.3. Pesquisa de genes de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos.....	23
4.4. Pesquisa de genes de resistência às quinolonas/ aminoglicosídeos.....	24
4.5. Clonalidade dos isolados.....	24
4.6. Pesquisa e caracterização de plasmídeos.....	27
5. Discussão.....	34
6. Conclusões.....	43
7. Referências bibliográficas.....	45

RESUMO

ARAÚJO, I. J. **Investigação de resistência adquirida e epidemiologia molecular em enterobactérias produtoras de AmpC cromossômica isoladas de pacientes hospitalizados.** 2018. 67f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018

Enterobactérias produtoras de AmpC cromossômica, especialmente *Citrobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Proteus* e *Morganella*, entre outros, são patógenos oportunistas e estão implicados em infecção relacionada a assistência à saúde. Uma vez que mecanismos de resistência adquiridos a antibióticos são cada vez mais frequentemente encontrados nesses micro-organismos, o gerenciamento das infecções causadas por eles tem sido desafio para a escolha da antibioticoterapia, pois existem poucos dados fenotípicos e moleculares sobre essas espécies. O objetivo deste trabalho foi a investigação de genes de resistência adquiridos (mediados por plasmídeos) aos antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro e quinolonas, bem como a determinação da epidemiologia molecular das enterobactérias produtoras de AmpC cromossômica, isoladas de pacientes ambulatoriais e internados em hospital universitário. Foram estudadas e comparadas bactérias isoladas em 2007 e 2016 durante o período de cinco meses em cada ano. Foi investigada fenotipicamente a produção de ESBL e AmpC associadas à resistência aos beta-lactâmicos de amplo espectro. Adicionalmente, também foram pesquisados genes de resistência adquiridos aos beta-lactâmicos de amplo espectro e quinolonas tão bem como plasmídeos carreando tais genes. Foram encontrados dois genes *bla_{SHV-5}* e um *bla_{CTX-M-2}*, além de, um gene *qnrS2*, dois *qnrB6*, dezenove genes *qnrD1* e vinte e um *aac(6')-Ib*, sendo que desses oito apresentaram a variante *aac(6')-Ib-cr*. O gene *qnrD1* já estava presente no hospital estudado antes do primeiro relato do gene no Brasil. Sequenciamento de plasmídeos carreando gene *qnrD1* mostra que pelo menos dois plasmídeos distintos estão envolvidos em sua disseminação. Por PFGE foi possível observar que não houve disseminação clonal dos isolados bacterianos no hospital nos períodos estudados. Foi determinada a epidemiologia molecular comparativa das bactérias do estudo. Este conhecimento torna-se fundamental para que, haja informações consistentes sobre as bactérias do estudo, fornecendo subsídio para o tratamento dos pacientes e contribuindo para o melhor prognóstico e gerenciamento das infecções bacterianas.

Palavras chave: *Enterobacteriaceae*, AmpC, PMQR resistência, quinolonas, beta-lactâmicos

ABSTRACT

ARAÚJO, I. J. **Investigation of acquired resistance and molecular epidemiology in enterobacteria producing chromosomal AmpC isolated from hospitalized patients.** 2018. 67f. Dissertation (Masters). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018

Enterobacteria producing chromosomal AmpC, especially *Citrobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Proteus* and *Morganella*, among others, are opportunistic pathogens implicated in nosocomial infections. Since antibiotic resistance mechanisms are increasingly found in these microorganisms, the management of infections caused by them has been challenging on choosing the antibiotic therapy, as there are few phenotypic and molecular data on these species. The aim of this study was the investigation of acquired (plasmid-mediated) resistance genes to broad-spectrum beta-lactam antibiotics and quinolones, as well as the determination of the molecular epidemiology of chromosomal AmpC-producing enterobacteria isolated from outpatients and inpatients in a university education hospital. Bacteria isolated in 2007 and 2016 during the five-month period each year were studied and compared. The production of ESBL and AmpC associated with resistance to broad-spectrum beta-lactams was phenotypically investigated. In addition, acquired resistance genes from broad-spectrum beta-lactams and quinolones were also screened as well as plasmids carrying such genes. Two *bla_{SHV-5}* genes and one *bla_{CTX-M-2}* were found, in addition to one *qnrS2*, two *qnrB6*, nineteen genes *qnrD1* and twenty-one *aac(6')-Ib*, of which eight presented the *aac(6')-Ib-cr* variant. *qnrD1* gene was already present in the hospital studied before the first report of such gene in Brazil. Sequencing of plasmids carrying *qnrD1* gene shows that at least two distinct plasmids are involved in its dissemination. Through PFGE it was possible to observe that there was no clonal dissemination of the bacterial isolates in the hospital during the periods studied. Comparative molecular epidemiology of the bacteria in the study was determined. This knowledge becomes critical for consistent information about the bacteria in the study, providing subsidy for the treatment of patients and contributing to the better prognosis and management of bacterial infections.

Key words: Enterobacteriaceae, AmpC, resistance PMQR, quinolones, beta-lactams

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Representação do sentido de amplificação de plasmídeo utilizando *primers* *pqnrDF* e *pqnrDR* a partir do gene *qnrD*
- Figura 2-** Porcentagem de resistência dos isolados de 2007 aos diferentes antibióticos testados
- Figura 3-** Porcentagem de resistência dos isolados de 2016 aos diferentes antibióticos testados
- Figura 4 -** Avaliação da clonalidade dos isolados de *S. marcescens*. A, B. Padrões de macrorrestrição de crDNA obtidos por PFGE após digestão do DNA genômico com enzima de restrição *XbaI* (A, isoladas em 2007, B, em 2016); C, dendrograma de similaridade genômica
- Figura 5 -** Avaliação da clonalidade dos isolados de *M. morganii* (2007/2016). A, Padrões de macrorrestrição de crDNA obtidos por PFGE após digestão do DNA genômico com enzima de restrição *XbaI* e B, dendrograma de similaridade genômica.
- Figura 6 -** Esquema de sequenciamento dos plasmídeos carreando *qnrDI* em relação ao plasmídeo guia p39224
- Figura 7 -** Esquema de sequenciamento dos plasmídeos carreando *qnrDI* em relação ao plasmídeo guia p22499

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍGLAS E SÍMBOLOS

µg	Micrograma (s)
µl	Microlitro (s)
°C	Graus Centígrados
%	Porcentagem
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetros
Cr	Cromossomo
CTI	Centro de Terapia Intensiva
DDS	<i>Double Disc Synergism</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ESBL	<i>Extended spectrum beta-lactamase</i>
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
IRAS	Infecção Relacionada à Assistência a Saúde
LEBEM	Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular
M	Molar (es)
mA	Miliamper (es)
MER	Meropenem
mg	Miligramma (s)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro (s)
mM	Milimolar (es)
mm	Milímetro (s)

NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma (s)
ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	Pares de base
PBP	<i>Penicillin-binding proteins</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol (es)
q.s.p.	Quantidade suficiente para
s	Segundo (s)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris, EDTA e água
U	Unidade
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
USP	Universidade de São Paulo
V	Volts
X	Vezes
Zn⁺⁺	Íon zinco
β	Beta

•¹ A dissertação e as referências bibliográficas estão apresentadas segundo “Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP”, 3ª edição Revisada, Ampliada e Modificada, 2016, parte I (ABNT) <http://dx.doi.org/10.11606/9788573140606>

1. INTRODUÇÃO

1.1. Micro-organismos

Bacilos gram-negativos como enterobactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter sp.*, assim como os não fermentadores de glicose *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.*, estão entre os principais patógenos causadores de infecção hospitalar, principalmente devido ao frequente fenótipo *multidrug-resistance* (MDR).

Enterobactérias produtoras de AmpC cromossômica, especialmente as do comumente chamado grupo CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Providência*), *Proteus*, *Morganella*, *Hafnia*, entre outros, são patógenos oportunistas e causadores de infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS). As infecções hospitalares atualmente são denominadas IRAS e estão também associadas a ambientes não hospitalares, nos quais são realizados procedimentos e práticas de assistência à saúde, tais como clínicas, consultórios e atendimento de *home care* (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO DISTRITO FEDERAL, 2017). Bactérias do grupo CESP até pouco tempo não eram relatadas como agentes causadores de IRAS, no entanto, devido ao aumento de pacientes imunocomprometidos, por doença ou terapia, esses gêneros bacterianos têm representado um desafio no gerenciamento de doenças infecciosas, pois existem poucos dados sobre a estrutura populacional, genética e perfil de resistência aos antibióticos (WOODFORD et al., 2011).

Citrobacter, *Serratia*, *Providencia*, *Proteus* e *Morganella* são bactérias oportunistas que causam doenças principalmente em pacientes comprometidos imunologicamente. Além de existirem poucos dados fenotípicos e moleculares sobre tais micro-organismos estes ainda exibem uma série de resistências intrínsecas. A soma desses fatos contribui para a dificuldade no tratamento de infecções por eles causadas. Dessa maneira, estudos com relação aos perfis de sensibilidade e possíveis genes de resistência que carregam, podem ajudar equipes clínicas na condução do tratamento de pacientes, já que tais informações permitem a elaboração de protocolos de tratamento empírico com antibioticoterapia adequada.

O gênero *Citrobacter* é composto por 12 espécies das quais três estão mais comumente envolvidas em IRAS como *C. freundii*, *C. koseri* e *C. braakii*. São importantes agentes de doenças infecciosas em neonatos e em pacientes imunologicamente debilitados. Atualmente há aumento significativo de isolamento dessas bactérias em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) neonatais, causando sepse neonatal, abscesso cerebral, meningite entre outras doenças graves. Geralmente fazem parte de infecções polimicrobianas, associadas a altas taxas de mortalidade e longas estadias em hospitais. Usualmente são de baixa virulência, porém podem causar infecções do trato urinário (ITU) e respiratório em pacientes imunocomprometidos, e ultimamente têm sido isolados de diversas amostras clínicas como

secreção purulenta e sangue (KHADKA; THAPA; MAHAT, 2012; FORSYTHE; ABBOTT; PITOUT, 2015; PRAHARAJ, 2016).

Há relatos recentes de *Citrobacter* spp. produtores de ESBL (TEM-3, SHV-2, CTX-M) e carbapenemases metalo-beta-lactamases (IMP e VIM) mediadas por plasmídeos (FORSYTHE; ABBOTT; PITOUT, 2015).

Serratia sp. é considerado patógeno oportunista emergente causador de doenças infecciosas principalmente em idosos e crianças em UTIs neonatais, estando também relacionado a periodontites. Outras infecções também têm sido relatadas, como infecção do trato respiratório e urinário, bacteremia e infecção em feridas, geralmente resultando em altas taxas de morbimortalidade. (REHMAN; MOORE; SEOANE, 2012; PARENTE et al., 2016; SEO et al., 2016). É micro-organismo causador de infecção hospitalar (IH) com transmissão predominantemente de pessoa a pessoa. Surto estão frequentemente ligados à contaminação das mãos, no entanto, dispositivos médicos e fluidos estão também associados à sua propagação. Cateteres, principalmente aqueles associados a infecções urinárias, constituem reservatórios desse micro-organismo (MAHLEN, 2011; FORSYTHE; ABBOTT; PITOUT, 2015; GRUBER, 2015).

Morganella morganii tem sido pouco isolada em infecção humana, entretanto, trata-se de micro-organismo que exibe resistência intrínseca a muitos antibióticos beta-lactâmicos e não beta-lactâmicos, o que reduz significativamente as opções terapêuticas para tratamento de doenças infecciosas, fato relevante principalmente quando se trata de indivíduos imunodeficientes (SEIJA, 2015; LEYLABADLO et al., 2016).

Proteus mirabilis, importante causa de infecções oportunistas, é responsável por variadas doenças infecciosas adquiridas tanto em hospitais quanto na comunidade. É um dos principais agentes de ITU, principalmente em pacientes portando cateteres intravesicais, entretanto pode causar também infecções do trato respiratório, de pele e bacteremia. Essa espécie apresenta muitos fatores de virulência que auxiliam na aderência a cateteres e podem, inclusive, formar biofilmes (JACOBSEN et al., 2008).

O gênero *Providencia* consiste de 9 espécies. Dentre elas, *P. alcalifaciens* tem sido considerada causa de diarreia em crianças e viajantes em países em desenvolvimento. *P. rettgeri* é bactéria patogênica oportunista que causa variadas doenças infecciosas, especialmente ITU associadas a cateteres (CARVALHO-ASSEF et al., 2013; TADA et al., 2014; SHIMA et al., 2015).

1.2. Antibióticos beta-lactâmicos

Antibióticos beta-lactâmicos são amplamente utilizados e estão na linha de frente do tratamento de infecções bacterianas. São assim denominados devido à presença de anel beta-lactâmico em sua estrutura base. Atuam na inibição da síntese da parede celular bacteriana causando lise. Os principais representantes são penicilinas e derivados, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (HUTTNER, et al., 2015).

1.2.1. Resistência aos antibióticos beta-lactâmicos

A produção de enzimas beta-lactamases têm sido o principal mecanismo de resistência a esse grupo de antibióticos, inativando-os por meio da clivagem do anel beta-lactâmico. Existem duas formas de classificação das enzimas, a de Ambler que as divide em classes A, B, C e D, de acordo com sua sequência de aminoácidos; e a de Bush-Jacoby-Medeiros na qual são classificadas de acordo com suas propriedades funcionais (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; BUSH; JACOBY, 2010). As principais beta-lactamases produzidas por bacilos gram-negativos são AmpC, ESBL e carbapenemases.

Beta-lactamases AmpC são produzidas por quase todos os bacilos gram-negativos. São expressas naturalmente em baixas concentrações e estão relacionadas com o fenótipo de resistência intrínseca, em geral, às penicilinas, cefamicinas e cefalosporinas de menor espectro de ação (1ª a 2ª gerações). AmpCs, quando hiperproduzidas, são capazes de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro de ação (3ª geração) e aztreonam. A hiperprodução de AmpC não confere resistência às cefalosporinas de 4ª geração e aos carbapenêmicos. Genes que codificam enzimas AmpCs (ex.: CMY, DHA, ACT) também podem ser carreados por plasmídeos e serem transferidos por meio destes entre diferentes bactérias (ZAVASCKI et al., 2010; HARRIS, 2015).

Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês *Extended Spectrum β -lactamase*), são enzimas capazes de hidrolisar todas as penicilinas, cefalosporinas (1ª, 2ª, 3ª e 4ª geração) e aztreonam, mantendo a sensibilidade das bactérias às cefamicinas e carbapenêmicos. ESBL são enzimas, em geral, inibidas por inibidores de beta-lactamases clássicos como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. São enzimas codificadas por genes cromossômicos ou plasmídeos, sendo que as ESBL mais frequentemente encontradas pertencem às famílias CTX-M, SHV e TEM (THOMSON, 2010).

As enzimas CTX-M são as ESBL mais frequentes no Brasil, sendo que as variantes CTX-M-2 e CTX-M-15 são as mais prevalentes, especialmente no Sudeste, onde essas variantes são frequentemente detectadas. CTX-M-2 também é a ESBL mais frequente em toda

a América do Sul e recentemente foi descrita na Europa Ocidental. Fora da América do Sul, as únicas regiões que mostram predominância de *bla*_{CTX-M-2}, antes de 2004, eram Japão e Israel (YAGI et al., 2000; KARFUNKEL et al., 2013; BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017). O gene *bla*_{CTX-M-2} foi primeiramente identificado em 1997 em isolado de *P. mirabilis* de paciente de UTI no Estado do Rio de Janeiro. Posteriormente o mesmo gene foi detectado em isolados de *E. coli* de pacientes no Estado de Minas Gerais. CTX-M-15 foi encontrada em isolados de pacientes diagnosticados com meningite e neoplasia, no nordeste e sudeste do Brasil (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2015).

CTX-M-15 é de disseminação pandêmica. Na Polônia e outros países do leste europeu CTX-M-3 é prevalente. CTX-M-65 é disseminada na China e CTX-M-14 é disseminada na Espanha e Reino Unido (COQUE et al., 2008; PARTRIDGE et al., 2011; BARANIAK et al., 2002; HE et al., 2013; VALVERDE et al., 2009; COTTELL et al., 2011; DHANJI et al., 2012; STOKES et al., 2012).

Carbapenemases são enzimas com potencial de hidrólise de carbapenêmicos e geralmente conferem resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos e têm sido encontradas em muitos bacilos gram-negativos. São divididas em dois grandes grupos: serina-beta-lactamases e metalo-beta-lactamases. A principal representante das serinas-beta-lactamases é a enzima KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase) e das metalo-beta-lactamases, IMP e NDM. O gene *bla*_{KPC} tem sido localizado em plasmídeos e/ou transposons que são elementos genéticos transferíveis intra e intergêneros (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014.). Bactérias produtoras de ESBL e carbapenemases frequentemente podem apresentar co-resistência a antibióticos não beta-lactâmicos, como por exemplo aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, o que tem dificultado a terapia antimicrobiana (THOMSON, 2010).

1.3. Quinolonas

Quinolonas são antibióticos de origem sintética, de amplo espectro de ação obtidos através da síntese da cloroquina, tendo como protótipo o ácido nalidíxico. A estrutura de anel bicíclico da primeira quinolona serviu de modelo para produção de fármacos mais potentes e com melhor farmacocinética (NAEEM et al., 2016).

São classificadas de acordo com sua estrutura química, espectro de ação e características farmacocinéticas (KOCSIS; DOMOKOS e SZABO, 2016). Por se tratar de uma das classes de antibióticos mais prescritas em todo mundo e, devido ao seu uso

indiscriminado, a frequência de bactérias resistentes às quinolonas vem aumentando vertiginosamente desde a década de 90 (ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014).

1.3.1. Resistência às quinolonas

Os alvos das quinolonas são enzimas, mais especificamente topoisomerases IV e DNA girases, que desempenham diversos papéis significativos nos processos de replicação e enovelamento do DNA. Tais antibióticos não apresentam ação significativa em moléculas individuais de DNA ou topoisomerases sozinhas, a interação entre DNA e enzima é a responsável pela ligação bactericida (MITSCHER, 2005).

A causa mais prevalente de resistência às quinolonas geralmente são mutações cromossômicas em regiões conhecidas como determinantes de resistência às quinolonas (QRDR, do inglês *quinolone resistance-determining region*) que ocorrem em um resíduo de serina altamente conservado na subunidade A das referidas enzimas, alterando o sítio alvo das quinolonas. DNA girase e topoisomerase IV são formadas por duas unidades promotoras, *gyrA* e *gyrB*; *parC* e *parE* respectivamente (ALDRED et al., 2013).

Diminuição da sensibilidade às quinolonas mediada por genes adquiridos por plasmídeos (PMQR, do inglês *plasmid-mediated quinolone resistance*) está disseminada em diferentes espécies bacterianas com três mecanismos de resistência implicados. O primeiro deles é a codificação de genes *qnr* (do inglês *quinolone resistance*) e atualmente há vários descritos como *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* e *qnrVC*. Recentemente Albornoz e colaboradores (2017) descobriram o gene *qnrE* em *K. pneumoniae*, novo gene na família *qnr*. Enzimas *Qnr* pertencem à família PRP (do inglês *pentapeptide repeat protein*) e protegem a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição por quinolonas. O segundo mecanismo de diminuição de sensibilidade é a produção de enzimas modificadoras, *aac(6')-Ib-cr*, uma variante da aminoglicosídeo acetiltransferase *aac(6')-Ib*, capaz de reduzir a atividade de ciprofloxacino. O terceiro mecanismo se trata da extrusão de quinolonas por bombas de efluxo denominadas QepA e/ou OqxAB (WANG, et al., 2009; RODRÍGEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Em 1998, o primeiro PMQR foi relatado, o gene *qnrA1* (RUIZ et al., 2012). *qnrA* foi seguido pela descoberta de *qnrS*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrVC*. Genes *qnr* geralmente diferem em 35% ou mais de *qnrA* e um do outro. As variações alélicas diferem em 10% ou menos. Os genes *qnr* podem estar localizados em plasmídeos ou como parte de elementos conjugativos de integração (JACOBY, 2017). O gene *qnrB* é o que possui mais relatos das famílias *qnr*, com o maior número de alelos, 91 no total. O gene *qnrD* e o recentemente descoberto *qnrE*

são os menos descritos, com 2 e 1 alelos respectivamente (<http://www.lahey.org/qnrstudies>). O gene *qnrD* é PMQR mais frequente nos gêneros *Proteus* e *Providencia* (GUILLARD et al., 2014). Tal gene foi descrito em plasmídeos pequenos e não conjugativos que podem abrigar genes *mob* permitindo sua mobilização. Estudo realizado na França, em 2014, com isolados de *Proteus sp.* que abrigavam plasmídeos carreando *qnrD*, apresentaram o gene rodeado por sequências de inserção (“*mobile insertion cassette*”) o que também pode explicar sua disseminação (CAVACO et al., 2009; ZANG et al, 2013; GUILLARD et al., 2014). O gene *qnrD* foi recentemente relatado (alelos *qnrD1* e *qnrD2*) e está pouco descrito até o momento, em comparação com os outros genes da família *qnr*.

1.4. Aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos são antibióticos naturais ou semissintéticos derivados de actinomicetos. São potentes, de amplo espectro e agem sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas na inibição da síntese de proteínas; são particularmente eficientes contra enterobactérias. A primeira representante da classe é a estreptomicina, isolada de *Streptomyces griseus*. Muitos outros representantes foram introduzidos nessa classe ao longo dos anos como neomicina, canamicina, gentamicina, netilmicina, tobramicina e amicacina. O aumento da resistência a essa classe de antimicrobianos aliado ao maior conhecimento dos mecanismos que levam à resistência, renovaram o interesse no desenvolvimento de novos aminoglicosídeos como arbekacina e plazomicina, potentes contra micro-organismos MDR (KRAUSE et al., 2016).

1.4.1. Resistência aos Aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos se ligam ao sítio de reconhecimento aminoacil-tRNA denominado sítio “A” que constitui a subunidade ribossômica 30S, levando à inibição da síntese de polipeptídios. A resistência aos aminoglicosídeos pode ocorrer com base em alguns mecanismos tais como: modificação (inativação) enzimática pelas chamadas enzimas modificadoras de aminoglicosídeo (AMEs, do inglês *aminoglycoside modifying enzymes*), como aminoglicosídeo acetil-transferases (AAC), nucleotidiltransferases ou adeniltransferases (ANT) e/ou fosfatotransferases (APH); efluxo aumentado; diminuição da permeabilidade e modificações na subunidade ribossômica 30S, o que interfere na ligação dos aminoglicosídeos. Mutações e modificações pós transcricionais também têm sido associadas à resistência, como mutações pontuais em 16S rRNA (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016).

aac(6')-Ib tem sido relatada frequentemente como sendo a AME mais prevalente e confere resistência à tobramicina, amicacina e canamicina. O gene *aac(6')-Ib-cr* é uma variante de *aac(6')-Ib* que pode conferir diminuição de sensibilidade aos aminoglicosídeos e quinolonas simultaneamente. Esse gene foi descrito em vários locais do mundo, incluindo Estados Unidos, Canadá, Argentina, Portugal, França, China, Espanha e Brasil (KIM et al., 2011; LEIGUE et al., 2014).

Metiltransferases do RNA 16S ribossômico (16S-RMTases ou, nesse contexto, comumente denominadas “Metilases”), são enzimas que adicionam grupamentos metil ao nucleotídeo citosina. Geralmente, bactérias produtoras de metilases apresentam Concentração Inibitória Mínima (CIM) > 256 µg/mL ou halo de inibição igual a zero para antibióticos aminoglicosídeos. Canamicina é o antibiótico mais importante como marcador fenotípico para a produção de metilases (BUENO et al., 2013).

O primeiro gene mediado por plasmídeos que confere resistência aos aminoglicosídeos identificado foi o *armA*, posteriormente mais genes foram descobertos sendo destaque *npmA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, e *rmtD* (COURVALIN, 2008).

1.5. Resistência intrínseca

Bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a diferentes classes de antibióticos, além de sua capacidade de adquirir genes de resistência. Essa é uma característica universalmente encontrada no genoma bacteriano, independente de pressão seletiva exercida por antibióticos e não se deve à transferência horizontal de genes (COX e WRIGHT, 2013).

As enterobactérias exibem fenótipo de resistência intrínseca, listadas abaixo (Quadro - 1) segundo o *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016).

Quadro 1 - Resistências intrínsecas apresentadas pelas espécies bacterianas produtoras de AmpC cromossômica

Agente Antimicrobiano Microorganismo	Ampicilina	Amoxicilina- sulbactam	Ampicilina-sulbactam	Piperacilina	Ticarcilina	Cefalosporina I: Cefazolina, Cefotetan	Cefamicinas: Cefoxitina,	Cefalosporina II: Cefuroxime	Imipenem	Tetraciclina/ Tigeciclina	Nitrofurantoína	Polimixina B Colistina
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R			R	R	R				
<i>Citrobacter koseri</i>	R			R	R					R	R	R
<i>Morganella morganii</i>	R	R				R		R	-*	R	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>	Não apresenta resistência intrínseca a penicilinas e cefalosporinas								-*	R	R	R
<i>Proteus penneri</i>	R					R		R	-*	R	R	R
<i>Proteus vulgaris</i>	R					R		R	-*	R	R	R
<i>Providencia rettgeri</i>	R	R				R			-*	R	R	R
<i>Providencia stuartii</i>	R	R				R			-*	R	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R			R	R	R			R	R

CLSI, 2016 adaptada

*O CLSI (2016) não reporta resistência intrínseca ao IMP, mas segundo o EUCAST (2017), é comum CIM baixa para este antibiótico em bactérias *Morganella* spp., *Proteus* spp. e *Providencia* spp.

1.6. Plasmídeos

Plasmídeos são elementos genéticos móveis, extracromossômicos e têm a capacidade de se autorreplicar. Geralmente carregam genes que conferem vantagem adaptativa às bactérias, como resistência a antibióticos e fatores de virulência (CARATTOLI, 2011). Contribuem para a disseminação da resistência bacteriana por transmissão horizontal de genes intra e interespecies e gêneros (CARATTOLI, 2013).

Para possibilitar a rastreabilidade de plasmídeos que conferem diferentes tipos de resistência a antibióticos, foi descrita tipagem baseada em PCR (PBRT, do inglês *Polymerase Chain Reaction Based on Replicon Typing*), que possibilita a tipagem dos diversos replicons, que representam a maior parte dos grupos de incompatibilidade (Inc) que circulam entre bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, sendo eles: HI2, HI1, I1- γ , X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A/C, T, K, B/O, FrepB, FII2, R e U. (CARATTOLI, 2005; GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2009).

1.7. Verificação de clonalidade bacteriana por PFGE

Eletroforese em campo pulsado (PFGE- *Pulsed-field gel electrophoresis*) é de grande importância em análises epidemiológicas, na diferenciação de linhagens e também na monitorização da sua disseminação. Trata-se de técnica padrão devido à sua acurácia e reprodutibilidade entre diferentes laboratórios, permitindo comparar perfis de macrorrestrição do DNA genômico bacteriano mediante ação de enzima específica para cada espécie estudada.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a presença e identificar genes de resistência adquiridos aos antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro e quinolonas em enterobactérias produtoras de AmpC cromossômica isoladas em 2007 e 2016 de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (HCFMRP-USP) e determinar epidemiologia molecular de bactérias de mesma espécie.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar fenotipicamente a produção de diferentes beta-lactamases e avaliar a concordância com testes moleculares.
- Investigar e identificar genes codificadores de ESBL, e genes de resistência adquiridos às quinolonas e aminoglicosídeos (*aac(6')-Ib*).
- Conhecer a variabilidade genética das bactérias de mesma espécie.
- Realizar tipagem de plasmídeos presentes e analisar sua diversidade entre as bactérias do estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados do estudo

Foram estudadas duas coleções de enterobactérias isoladas de diversas amostras clínicas de diferentes pacientes, em 2007 e 2016, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). Os isolados fazem parte de estudos de controle de resistência realizados pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) em colaboração com o Laboratório de Microbiologia do hospital. Esse projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (HCRP nº 1925/2009) e da FCFRP-USP (Proc. nº CEP/FCFRP-USP 1.886.066)

O critério de seleção das bactérias foi a resistência aos beta-lactâmicos de amplo espectro (cefalosporinas de 3^a e 4^a geração, aztreonam e/ou carbapenêmicos), e/ou quinolonas, e/ou aminoglicosídeos excetuando-se casos de resistências intrínsecas. Não foram incluídas no estudo bactérias do gênero *Enterobacter*. Os isolados foram reunidos em um período de aproximadamente cinco meses em ambos os anos.

A identificação dos isolados foi feita pelo Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP, utilizando os aparelhos Vitek1 e Vitek2 (bioMérieux) para os isolados de 2007 e 2016, respectivamente.

Para confirmação de espécie, quando necessário, utilizou-se o sistema API 20 E (bioMérieux). Trata-se de versão miniaturizada de provas bioquímicas convencionais. Consiste em uma tira de plástico composta por 20 microtubos individuais, cada um contendo um meio de cultura desidratado; após a inoculação da suspensão do micro-organismo a ser testado, os meios ficam hidratados. Posteriormente à inoculação, a tira de plástico é incubada em estufa (18-24h a 35-37° C). A identificação consiste na leitura dos testes que gera um número de 7 dígitos (*profile index number*). Esse número é pré-determinado pelo API 20 E *Profile Index Booklet* ou por um programa de computador designado API 20 E PRS (*Profile Recognition System*).

3.2. Linhagens controle

As linhagens controle utilizadas no estudo e suas características estão listadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Linhagens-controle e características

Bactérias-controle	Característica
<i>E. coli</i> ^a	Produtora de CTX-M-15
<i>E. coli</i> ^b	Produtora de CTX-M-2
<i>E. aerogenes</i> ^b	Produtora de CTX-M-8
<i>E. coli</i> ^b	Produtora de CTX-M-9
<i>E. coli</i> ^c	Produtora de CTX-M-25
<i>E. coli</i> J62 ^d	Produtora de TEM-1
<i>E. coli</i> J53 ^d	Produtora de SHV-5
<i>E. coli</i> DH5α	<i>qnrA</i>
<i>E. coli</i> DH5α	<i>qnrB</i>
<i>E. coli</i> DH5α	<i>qnrS</i>

^aLinhagens cedidas pela Dr^a Teresa Coque, *Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria*, Madri, Espanha.

^bLinhagens cedidas pelo Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio, *Laboratório Fleury Medicina Diagnóstica*, São Paulo, Brasil.

^cLinhagens cedidas pelo Dr. Laurent Poirel, *Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre*, Paris, França.

^dLinhagens gentilmente cedidas pelo Professor Dr^o David Livermore, *Antibiotic Resistance Monitoring and Reference Laboratory*, Londres, Inglaterra.

3.3. Teste de sensibilidade aos antibióticos

O teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) foi realizado no HCFMRP-USP pelo Vitek1 (2007) e Vitek2 (2016) para os seguintes antibióticos: ampicilina (AMP), ampicilina-sulbactam (AMS), amoxicilina-clavulanato (AMC), piperacilina-tazobactam (TZP)*, cefepime (CEP)*, ertapenem (ERT)*, imipenem (IMP), meropenem (MER), ácido-nalidíxico (NAL)*, norfloxacino (NOR)*, ciprofloxacino (CIP), amicacina (AMI), gentamicina (GEN) e colistina (COL)*. Os antibióticos foram testados de acordo com as amostras clínicas e, quando necessário, o teste de Disco Difusão (para antibióticos complementares e/ou para antibiótico não testado para determinada amostra), foi realizado para complementação dos resultados. Tal teste foi realizado de acordo com o recomendado e padronizado pelo CLSI (CLSI, 2016).

Alguns dos antibióticos complementares foram (Oxoid): ticarcilina-clavulanato (TIM, 75/10 µg), cefotaxime (CTX, 30 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg), cefoxitina (FOX, 30 µg), aztreonam (ATM, 30 µg), doripenem (DOR, 10 µg), sulfametoxazol-trimetropim (SXT,

*Antibióticos testados no hospital e no laboratório.

1,25/ 23,75 µg), tobramicina (TOB, 10 µg), canamicina (KAN, 30 µg), doxiciclina (DOX, 30 µg), minociclina (MNO, 30 µg), tetraciclina (TET, 15 µg), cloranfenicol (CHL, 30 µg), polimixina B (POL, 300 unidades), tigeciclina (TIG, 15 µg), moxifloxacino (MFX, 05 µg), fosfomicina (FOS, 200 µg).

A interpretação do teste foi feita segundo o CLSI, 2007 e 2016 de acordo com o ano da coleção. A bactéria foi definida como MDR quando não sensível a pelo menos 1 antimicrobiano em 3 ou mais classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012).

3.4. Testes fenotípicos da produção de beta-lactamases

Dois testes foram realizados para triagem de bactérias suspeitas de produzirem ESBL: teste de disco aproximação (DDST, do inglês *Double Disk Screening Test*) e teste de Disco Combinado (DC). DDST fundamenta-se no método de difusão em disco, com aproximação de discos de cefalosporinas de amplo espectro e inibidor de beta-lactamase para triagem e detecção de ESBL (JARLIER et al., 1988). Os seguintes antibióticos foram utilizados (Oxoid): AMC, CAZ, CTX, CEP e ATM. Após o período de incubação, as placas foram analisadas para a verificação da presença de zona de sinergismo.

DC foi realizado utilizando discos de CTX e CAZ associados e não associados ao ácido clavulânico. O teste confirmatório baseia-se na inibição da atividade da enzima na presença de ácido clavulânico. Após o período de incubação de 18-24hs a 37 °C, a bactéria foi considerada produtora de ESBL quando observada diferença ≥ 5 mm entre os discos com e sem inibidor correspondente (CARTER et al., 2000).

Adicionalmente, hiperprodução de AmpC foi investigada usando discos de CTX e CAZ acrescidos e não acrescidos de 10 µL de solução de cloxacilina (inibidor de AmpC). A bactéria foi considerada produtora de AmpC quando observada diferença ≥ 5 mm entre os discos com e sem inibidor correspondente. Também com a finalidade de avaliar a indução da produção de AmpC, o disco de FOX (indutor da produção da enzima) foi colocado próximo a discos de CTX e CAZ. A presença de zona de achatamento dos halos de inibição (D-Teste) representa forte indução da hiperprodução de AmpC (JACOBY, 2009).

3.5. Pesquisa de genes plasmideais de resistência a antibióticos

Foram pesquisados genes de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos.

O DNA genômico bacteriano utilizado na PCR foi extraído segundo o método de Bolano e colaboradores (2001), com modificações. A extração baseia-se na lise mecânica das

células, utilizando-se pérolas de vidro tratadas. O protocolo foi adaptado para bactérias, não sendo necessária a adição de enzimas de lise da parede celular e membrana plasmática. O DNA foi quantificado em aparelho *Nanodrop 2000 Espectrophotometer* (Thermo Scientific).

Os genes codificadores de ESBL (*bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*), quinolonas (*qnr*, *qepA*, *oqxAB* e *aac(6')-Ib-cr*) e, aminoglicosídeos (*aac(6')-Ib*) (**Quadro 3**) foram pesquisados por PCR convencional utilizando termociclador *Mastercycler Gradiente* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

Quadro 3- Genes a serem pesquisados, referência de condição de amplificação/*primers*

Gene	Referência
<i>bla_{CTX-M}</i>	Andrade et al., (2010)
<i>bla_{SHV}</i>	Andrade et al. (2010)
<i>armA</i> , <i>rmtA</i> , <i>rmtB</i> , <i>rmtC</i> , <i>rmtD</i> e <i>npmA</i>	Berçot; Poirel; Nordmann (2008)
<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i>	Cattoir et al., (2007)
<i>qnrC</i>	Wang (2009)
<i>qnrD</i>	Cavaco (2009)
<i>qepA</i>	Yamane (2007)
<i>oqxAB</i>	Kim et al., (2009)
<i>aac(6')-Ib</i>	Tamang et al., (2012)

Para a realização da PCR foram utilizados os seguintes componentes: produto de extração de DNA 60ng, solução tamponante para PCR 1X (Plantinum® taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen – Life Technologies), dNTP (mistura dos 4 nucleotídeos, A, T, C e G) 0,2mM (Eppendorf), *primer mix* 25pmol, taq-DNA polimerase 0,625 U (Plantinum® taq DNA Polymerase High Fidelity [Invitrogen – Life Technologies]), MgCl₂ 2mM, e água ultrapura para PCR (W-3500, Sigma). Para a corrida eletroforética dos produtos de PCR gerados, o gel de agarose 1,5% foi adicionado de Sybr Safe (Invitrogen – Life Technologies) para ser posteriormente observado e fotografado utilizando o sistema AlphaImager® (Alpha Innotech).

3.6. Sequenciamento

Primeiramente, os produtos amplificados foram purificados utilizando-se o *kit* de purificação GFX-TM PCR (Amershan Bioscience) e sequenciados no sequenciador automático *ABI Solid Sequencing* (Life Technologies)².

As sequências obtidas (eletroferogramas) foram analisadas visualmente no *software ChromasPro* versão 1.33 (Technelysium Pty LTDA) e comparadas às sequências disponíveis no banco de dados *GenBank*. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html>).

O amplicon de *aac(6')-Ib* de 482bp obtido na PCR teve seu sequenciamento realizado com *primer* específico segundo descrito por Park et al., 2006.

3.7. Tipagem molecular

3.7.1. Dos isolados bacterianos

PFGE foi realizada como descrito por Gautom (1997), utilizando o aparelho CHEF-DRIII System (Bio-Rad) para bactérias da mesma espécie, isoladas em 2007 e 2016 para avaliar a clonalidade entre elas.

O DNA bacteriano total, fixado em bloco de agarose, foi digerido por enzima de restrição *XbaI*. Posteriormente, o bloco de agarose foi incorporado em gel de agarose 1% e submetido à eletroforese em campo pulsado. A corrida eletroforética foi realizada a 14°C e 6 V, com pulsos de 10 e 40 por 24 horas no aparelho CHEF-DRIII (BioRad). Após esse procedimento, o gel foi corado em brometo de etídio e fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação AlphaImager® (Alpha Innotech). Os perfis de PFGE foram analisados visualmente e interpretados via software Bionumerics.

Os dendrogramas de similaridade genômica foram dados pelo coeficiente de Dice, gerados pelo método UPGMA, utilizando o programa BioNumerics 5.01, a partir do perfil de macrorrestrição do crDNA (DNA genômico) clivado com enzima *XbaI* apresentado pela PFGE.

3.7.2. Dos plasmídeos

Para enterobactérias portadoras de genes de interesse foi realizada a tipagem de *replicons* dos plasmídeos presentes para determinar grupos de incompatibilidade como descrito por Carattoli et al. (2005). Dezoito pares de *primers* foram utilizados em 5 PCR multiplex e 3 PCR simplex para pesquisar os *replicons* FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-I_γ, L/M,

² O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano – USP.
<http://www.genoma.ib.usp.br/>

N.P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, FII, FrepB, FII2. Foram também investigados plasmídeos R, U e plasmídeos ColE-like (García-Fernández et al., 2009).

3.8. Análise de plasmídeos

A investigação da presença de plasmídeos (pDNA) foi realizada por PFGE após utilização da enzima S1 nuclease (Fermentas), S1-PFGE. A avaliação baseia-se na ação seletiva da S1 nuclease que cliva totalmente o crDNA e converte o pDNA circular em pDNA linear, proporcionalmente ao seu tamanho. A reação foi realizada segundo recomendações do fabricante da enzima.

Os blocos contendo DNA foram aplicados no gel de agarose 1%. A corrida eletroforética foi realizada a 14°C e 6 V, com pulsos de 2,2 e 63,8 por 19 horas no aparelho CHEF-DRIII (BioRad). Após a corrida eletroforética o gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL) durante 20 minutos, observado e fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação AlphaImager® (Alpha Innotech, EUA).

Foi desenhado no *software* ChromasPro 1.33 (technelysium Pty Ltd) par de primers (*pqrDF*: GAGCTTGATGCAAGGCGAAT; *pqrDR*: GCGATTTCACAGTTCGC) para amplificar o plasmídeo contendo gene *qnrD* (Figura 1) (Mazzariol et al., 2012), para posterior sequenciamento.

Figura 1- Representação do sentido de amplificação de plasmídeo utilizando *primers* *pqrDF* e *pqrDR* a partir do gene *qnrD*

Fonte: autora

A-B: *primers* para sequenciamento do gene *qnrD* (Cavaco, 2009)

C-D: *primers* para sequenciamento do plasmídeo carreador do gene *qnrD* (C: *pqrDR*, D: *pqrDF*)

4. RESULTADOS

4.1. Isolados do estudo

Do ano de 2007 foram selecionadas 15 enterobactérias: 5 *S. marcescens*, 2 *C. freundii*, 3 *M. morganii*, 3 *P. mirabilis*, 1 *P. stuart* e 1 *C. braakii*, provenientes de amostras de urina, escarro, pele, ferida cirúrgica, boca, hemocultura, abscesso e cateter. E do ano de 2016, foram selecionadas 43 enterobactérias: 20 *M. morganii*, 11 *S. marcescens*, 7 *P. mirabilis*, 2 *C. freundii*, 2 *C. koseri* e 1 *P. stuart*, provenientes de urina, urina sonda, ferida, cateter, escarro, sangue, aspirado traqueal, boca e biópsia de pele.

4.2. Perfil de sensibilidade dos isolados

Co-resistência às cefalosporinas (beta-lactâmicos) de amplo espectro, quinolonas e aminoglicosídeos foi apresentada por cinco isolados da coleção de 2007; a coleção de 2016 apresentou dez isolados co-resistentes às classes de antibióticos usadas no critério de seleção (Tabela 1).

As Figuras 2 e 3 fornecem um panorama geral das resistências apresentadas pelos gêneros bacterianos envolvidos na produção de AmpC cromossômica.

De acordo com os perfis de sensibilidade dos isolados das duas coleções, determinados pelos testes de sensibilidade, perfil MDR foi apresentado por 52/58 bactérias. Os antimicrobianos aos quais as bactérias da coleção de 2007 apresentaram maior resistência foram: cefepime (67%), ceftazidima (60%), aztreonam (53%), ceftriaxona (40%), gentamicina (40%), sulfametoxazol-trimetoprim (46%), ácido nalidíxico (60%), norfloxacino (67%), levofloxacino (53%) e cloranfenicol (47%). Aos antibióticos ticarcilina, cefoxitina, doripenem, moxifloxacino, doxicilina, minociclina e tetraciclina foram apresentadas baixas resistências pelos isolados (7 a 13% dos isolados). Resistência aos antimicrobianos amoxicilina-sulbactam, imipenem, ertapenem, tigeciclina, polimixina B e colistina não foi apresentada por nenhum isolado. (Figura 2).

Figura 2: Porcentagem de resistência dos isolados de 2007 aos diferentes antibióticos testados

Fonte: autora

Maior resistência à ceftazidima foi apresentada pelos gêneros *Citrobacter* (100%), *Serratia* (100%) e *Morganella* (100%). Em relação ao ácido nalidíxico os gêneros predominantemente resistentes foram *Serratia* e *Morganella*; em relação ao cefepime, *Serratia* e *Citrobacter*. Resistência à norfloxacino foi apresentada por todos os gêneros.

Resistência aos antibióticos amoxicilina-sulbactam, imipenem, ertapenem e tigeciclina não foi apresentada por nenhum isolado. *C. freundii* foram sensíveis à polimixina e colistina, ressaltando que apenas essa espécie não apresenta resistência intrínseca a esses antibióticos.

Maior resistência aos antimicrobianos ácido-nalidíxico (35%), cefoxitina (54%), amoxicilina-clavulanato (37%), ceftazidima (42%), cefotaxima (35%), imipenem (23%) e gentamicina (23%) foi apresentada pelas bactérias da coleção de 2016. Nenhuma resistência foi demonstrada à piperacilina-tazobactam, ceftriaxona, doripenem e minociclina pelos isolados. Menos de 10% de resistência foi apresentada aos antibióticos amoxicilina-sulbactam, ticarcilina-clavulanato, ticarcilina, cefepime, aztreonam, ertapenem, canamicina, sulfametoxazol, levofloxacino, doxiciclina, moxifloxacino, tetraciclina, tigeciclina, polimixina, colistina e cloranfenicol pelos isolados (Figura 3).

Figura 3: Porcentagem de resistência dos isolados de 2016 aos diferentes antibióticos testados

Fonte: autora

Maior resistência à amoxicilina-clavulanato foi apresentada pelos gêneros *Morganella*, *Proteus* e *Serratia*, respectivamente. Resistência à ceftazidima foi exibida predominantemente pelos gêneros *Morganella* e *Serratia*. Resistência à ácido-nalidíxico foi apresentada por todos os gêneros (*Citrobacter*, *Serratia* e *Morganella* além de *Proteus* e *Providencia*).

Sensibilidade aos piperacilina-tazobactam, ceftriaxona e doripenem foi apresentada por todos os gêneros. O mesmo ocorre para o antibiótico minociclina, considerando apenas *C. freundii* que não apresenta resistência intrínseca ao mesmo.

4.3. Pesquisa de genes de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos

A partir da interpretação de DDST e DC dos 15 isolados de 2007, fenótipo ESBL foi apresentado por duas bactérias, *S. marcescens* HC 199 e *S. marcescens* HC 221. O mesmo perfil de macrorrestrição em PFGE foi exibido pelos dois isolados e neles o gene *bla_{SHV-5}* foi detectado entre os genes codificadores de beta-lactamases de espectro estendido pesquisados. O gene *bla_{CTX-M-2}* foi apresentado apenas por *M. morganii* PK429 isolado em 2016 (Tabela 1).

4.4. Pesquisa de genes de resistência às quinolonas/ aminoglicosídeos

Às quinolonas foi apresentada resistência em 11 das 15 bactérias da coleção de 2007. Genes *qnrD1* foram apresentados por dois isolados (*M. morganii* HC 172 e *P. stuartii* HC 111) e gene *qnrB6* apresentado por um (*M. morganii* HC 388). O gene *aac(6')-Ib* foi apresentado por seis isolados e a variante *aac(6')-Ib-cr* não estava contida em nenhum deles (Tabela 1).

Resistência às quinolonas foi exibida em 20 das 43 bactérias da coleção de 2016. Em 17 isolados foi detectado o gene *qnrD1*, sendo que em dois desses isolados, os genes *qnrS2* e *qnrB6* se apresentaram em associação. O gene *aac(6')-Ib* foi encontrado em 15 isolados na coleção de 2016 e a variante *aac(6')-Ib-cr* foi encontrada em 8 dos 15 isolados, confirmados por sequenciamento (Tabela 1).

4.5. Clonalidade dos isolados

Foi verificada a clonalidade por PFGE para os isolados de *S. marcescens* (Figura 4) e *M. morganii* (Figura 5) das duas coleções.

Para *S. marcescens*, de acordo com o dendrograma foram visualizados 16 perfis clonais nomeados de Sm-A a Sm-R. Perfis clonais idênticos foram apresentados por apenas *S. marcescens* HC 199 e HC 221. Perfis distintos foram apresentados pelo restante das bactérias, demonstrando grande diversidade genética. Dois grandes clusters foram formados, o das bactérias da coleção de 2007 e o das bactérias da coleção de 2016 com 56% de similaridade entre eles. Nenhum clone das bactérias da coleção de 2007 foi detectado no hospital em 2016 (Figura 4).

De acordo com o dendrograma, para *M. morganii* foram visualizados 22 perfis clonais nomeados de Mm-A a Mm-V. Dois grandes clusters foram formados, com similaridade inferior a 40%, sendo que em um deles só estavam presentes isolados de 2016 e no outro tanto isolados de 2007 quanto de 2016, mas a similaridade genômica entre essas diferentes coleções foi de no máximo 65%. Não houve clone predominante no hospital nos períodos analisados. O mesmo perfil de macrorrestrição foi apresentado apenas por *M. morganii* PK 59 e PK 86, isoladas em 2016 (Figura 5).

Figura 4- Avaliação da clonalidade dos isolados de *S. marcescens*. A, B. Padrões de macrorrestrrição de crDNA obtidos por PFGE após digestão do DNA genômico com enzima de restrição *Xba*I (A, isoladas em 2007, B, em 2016); C, dendrograma de similaridade genômica

C

Fonte: autora

Figura 5: Avaliação da clonalidade dos isolados de *M. morganii* (2007/2016). Padrões de macrorrestrrição de crDNA obtidos por PFGE após digestão do DNA genômico com enzima de restrição *Xba*I (A) e dendrograma de similaridade genômica (B).

1;14 ,26. *S. braenderup*, 2. *M. morganii* PK 27, 3. *M. morganii* PK 59, 4. *M. morganii* PK 86, 5. *M. morganii* PK 107, 6. *M. morganii* PK 111, 7. *M. morganii* PK 126, 8. *M. morganii* HC 388, 9. *M. morganii* PK 151, 10. *M. morganii* PK 174, 11. *M. morganii* HC 238, 12. *M. morganii* PK 239, 13. *M. morganii* PK 250, 15. *M. morganii* PK 281, 16. *M. morganii* PK 299, 17. *M. morganii* PK 301, 18. *M. morganii* PK 336, 19. *M. morganii* PK 382, 20. *M. morganii* PK 415, 21. *M. morganii* PK 429, 22. *M. morganii* PK 442, 23. *M. morganii* PK 465, 24. *M. morganii* PK 470, 25. *M. morganii* HC 172

4.6. Pesquisa e caracterização de plasmídeos

Na maioria dos isolados não houve plasmídeos tipáveis pelo PBRT, com exceção do plasmídeo do grupo de incompatibilidade Inc FIC, apresentado por *P. mirabilis* PK 469. Plasmídeos ColE-like foram detectados na maioria dos isolados.

Utilizando a técnica S1-PFGE foi possível detectar plasmídeo no isolado *S. marcescens* PK 011, carreando gene *qnrD1*. Houve hibridação com sonda específica para o gene *qnrD*. Não foi possível a determinação do tamanho do plasmídeo por essa técnica, pois a banda do mesmo ficou abaixo da menor marcação do padrão *S. braenderup*, de 20,5 Kb.

Fragmentos correspondentes ao plasmídeo foram amplificados por apenas 6 dos 19 isolados, contendo *qnrD*, em PCR realizada com o par de *primers* *pqnrDF* e *pqnrDR* (Figura 1). Pela análise do gel de eletroforese correspondente à corrida dos fragmentos amplificados gerados em PCR seus tamanhos aproximados são 2Kb, e somando-se o fragmento correspondente ao gene, de 644pb, os plasmídeos têm aproximadamente 2.700 pb. Foi feito sequenciamento com o mesmo par de *primers* da amplificação. Após análise em banco de dados foi verificado que dois plasmídeos p39224 de *P. mirabilis* (Genbank MF062094.1) e p22499 de *P. penneri* (Genbank MF062092.1) apresentaram identidade com os plasmídeos sequenciados dos isolados deste estudo. Identidade com o plasmídeo p39224 foi apresentada por três desses fragmentos e com o plasmídeo p22499 pelos outros três fragmentos.

Os plasmídeos que carregam o gene *qnrD1* dos isolados *P. stuartii* HC 111, *M. morganii* PK 111 e *S. marcescens* PK 128 foram parcialmente sequenciados (cerca de 75%) e mostraram 100% de identidade com o plasmídeo p39224 (Figura 6).

Figura 6: Esquema de sequenciamento dos plasmídeos carreando *qnrD1* em relação ao plasmídeo guia p39224

qnrD1: sequenciamento do gene *qnrD1*

AD-7: sequenciamento com *pqnrDF*

AD-8: sequenciamento com *pqnrDR*

p39224: plasmídeo guia (Genbank MF062094.1)

Os plasmídeos que carregam o gene *qnrD1* dos isolados *S. marcescens* PK 14, *M. morganii* PK 27 e *M. morganii* PK 174 foram parcialmente sequenciados (cerca de 70%) e mostraram 100% de similaridade com o plasmídeo p22499 (Figura 7).

Figura 7: Esquema de sequenciamento dos plasmídeos carregando *qnrD1* em relação ao plasmídeo guia p22499

Fonte: autora *software ChromasPro* versão 1.33

qnrD1: sequenciamento do gene *qnrD1*

AD-3: sequenciamento com *pqnrDF*

AD-4: sequenciamento com *pqnrDR*

p22499: plasmídeo guia (Genbank MF062092.1)

Tabela 1 – Características fenotípicas e moleculares dos isolados das coleções de 2007 e 2016

Coleção 2007	Espécime clínico/ Setor	Resistência aos Antibióticos*1	Tipagem molecular cromossômica PFGE	Fenótipo		Genes de resistência			Plasmídeos Grupo Inc/outros
				DDST/ DC	Hiper AmpC	bla	Qnr	aac (6')-Ib/ aac (6')-Ib- cr	
<i>P. stuartii</i> HC 111	Pele/ Clínica médica	TZP, CAZ, CEP, NAL, NOR, CIP, LEV, MFX, CHL	nr	- / -	-	-	qnrD1	- / -	-
<i>P. mirabilis</i> HC 194	Urina/ Hematologia	AMC, TIC, NAL, NOR	nr	- / -	-	-	-	- / -	-
<i>P. mirabilis</i> HC 352	Abscesso/Urologia	AMC, CEP, SXT	nr	- / -	-	-	-	- / -	-
<i>P. mirabilis</i> HC 72	ni	TIC, CTX, CAZ, FOX, ATM, NOR, LEV, MXF, CHL	nr	- / -	-	-	-	+ / -	-
<i>C. freundii</i> HC 355	Urina/ Berçário	AMC, TZP, CRO, CTX, CAZ, ATM, SXT, MNO	nr	- / -	+	-	-	- / -	-
<i>C. freundii</i> HC 381	Urina/ Unidade transplante renal	CRO, CAZ, CEP, SXT, NAL, NOR, CIP, LEV, MFX, DOX, MNO, TET	nr	- / -	+	-	-	- / -	-
<i>C. braakii</i> HC 413	Urina/ Clínica médica	TZP, TIM, CRO, CTX, CAZ, CEP, FOX, GEN, TOB, KAN, NOR, CIP, LEV, MFX, CHL	nr	- / -	+	-	-	- / -	-
<i>S. marcescens</i> HC 066	Ferida Cirúrgica/ Clínica médica	CTX, CAZ, CEP, ATM, GEN, AMI, TOB, KAN, NAL, NOR, MFX, CHL	Sm-A	- / -	-	-	-	- / -	-
<i>S. marcescens</i> HC 129	Urina/ Urologia	TIM, CAZ, CEP, ATM, GEN, AMI, KAN, SXT, NAL, NOR, LEV, MFX, CHL	Sm-B	- / -	-	-	-	+ / -	-
<i>S. marcescens</i> HC 138	Escarro/ Pneumologia	CTX, CAZ, CEP, ATM, GEN, AMI, SXT	Sm-C	- / -	+	-	-	- / -	-
<i>S. marcescens</i> HC 199	ni	TIM, CRO, CAZ, CEP, ATM, GEN, AMI, KAN, SXT, NAL, NOR, CIP, LEV	Sm-D	+ / +	-	SHV-5	-	+ / -	-
<i>S. marcescens</i> HC 221	Cateter/ Moléstia Infecciosa	TZP, TIM, CTX, CEP, ATM, TOB, KAN	Sm-D	+ / +	+	SHV-5	-	+ / -	-
<i>M. morganii</i> HC 388	ni	TZP, CRO, CTX, CAZ, NAL	Mm-V	- / -	-	-	qnrB6	- / -	-
<i>M. morganii</i> HC 238	Urina/ Recuperação	CRO, CAZ, CEP, ATM, DOR, GEN, SXT, NAL, NOR, CIP, LEV, CHL	Mm-U	- / -	+	-	-	+ / -	-
<i>M. morganii</i> HC 172	ni	CAZ, CTX, TIM, TOB, NAL, NOR, LEV, MXF, CHL	Mm-K	- / -	+	-	qnrD1	+ / -	-

Continua

Continuação									
Coleção 2016	Espécime clínico/ Setor	Resistência aos Antibióticos*1	Tipagem molecular cromossômica PFGE	Fenótipo		Genes de resistência			Plasmídeos Grupo Inc/outros
				DDST/DC	Hiper AmpC	bla	Qnr	aac (6')-Ib/ aac (6')-Ib- cr	
<i>C. freundii</i> PK046	Urina/ Urologia	STX, NAL, MOX	nr	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>C. freundii</i> PK 164	Escarro/ Ambulatório	CTX, CAZ, TOB, KAN, NAL, CIP, DOX, TET, TIG, COL, POL, CHL	nr	- / -	+	-	qnrD1	+ / -	ColE
<i>C. koseri</i> PK 019	Cateter/Gatro	FOX, TOB, KAN, NAL	nr	- / -	-	-	qnrD1	- / +	ColE
<i>C. koseri</i> PK 127	Urina/ Proctologia	TOB, NAL, MXF	nr	- / -	-	-	qnrD1	+ / -	ColE
<i>M. morganii</i> PK 239	Sangue/ CTI	CTX, CAZ, FOX, IMP, CHL	Mm-A	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>M. morganii</i> PK 250	Biopsia de pele/ Dermatologia	AMC, FOX, IMP, GEN, TOB, NAL, NOR, CIP, LEV, MXF, CHL	Mm-B	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>M. morganii</i> PK 281	Urina/ Geriatria	AMC, NAL, NOR, CIP, LEV, MXF	Mm-C	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>M. morganii</i> PK 086	Boca/ Moléstia Infecciosa	AMC, FOX, TOB, GEN, NAL, NOR, CIP, ÇEV, MXF, CHL	Mm-D	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>M. morganii</i> PK 301	Cateter/ Nefrologia	FOX, IMP, GEN	Mm-E	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>M. morganii</i> PK 382	Urina/ Oncologia	AMC, CTX, CAZ, FOX, IMP, NAL, CHL	Mm-F	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>M. morganii</i> PK 336	Urina/ Urologia	AMC, CTX, CAZ, FOX, CHL	Mm-G	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>M. morganii</i> PK 299	Urina/ Urologia	AMC, NAL, CIP, MXF	Mm-H	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>M. morganii</i> PK 415	Metatarso/ Vascular	AMC, FOX, IMP, GEN, NAL, NOR, CIP, LEV, MXF, CHL	Mm-I	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>M. morganii</i> PK 107	Osso/ Vascular	AMC, FOX, IMP, GEN, NAL, NOR, CIP, LEV, MXF	Mm-J	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>M. morganii</i> PK 059	ni	AMC, FOX, IMP, GEN, NAL, NOR, CIP, LEV, MXF, CHL	Mm-D	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>M. morganii</i> PK 126	Urina/ Cardiologia	AMC, CTX, CAZ, FOX, NAL	Mm-L	- / -	+	-	qnrD1	- / +	ColE
<i>M. morganii</i> PK 151	Ferida Cirúrgica/ Dermatologia (Hansen)	CTX, CAZ, FOX	Mm-M	- / -	+	-	qnrD1	- / +	ColE
<i>M. morganii</i> PK 174	Urina/ Hemocentro	AMC, CAZ, FOX, NAL, NOR, CIP, STX	Mm-N	- / -	+	-	qnrD1	- / +	ColE
<i>M. morganii</i> PK 470	Ferida Cirúrgica	AMC, CAZ, CTX, FOX	Mm-O	- / -	+	-	qnrD1, qnrB6	+ / -	ColE

Continua

Continuação									
Coleção 2016	Espécime clínico/ Setor	Resistência aos Antibióticos*1	Tipagem molecular cromossômica PFGE	Fenótipo		Genes de resistência			Plasmídeos Grupo Inc/outras
				DDST/ DC	Hiper AmpC	bla	Qnr	aac (6')Ib/ aac (6')-Ib- cr	
<i>M. morganii</i> PK 027	Sangue/ Pneumologia	CAZ, FOX, IMP, GEN, KAN, NAL, CIP	Mm-P	- / -	-	-	qnrD1	- / +	ColE
<i>M. morganii</i> PK 111	Ferida Cirúrgica/ Proctologia	CAZ, FOX, IMP, GEN, CIP	Mm-Q	- / -	+	-	qnrD1, qnrS2	- / +	ColE
<i>M. morganii</i> PK 465	Ferida Cirúrgica/ Vascular	AMC, CAZ, CTX, FOX	Mm-R	- / -	-	-	qnrD1	-	-
<i>M. morganii</i> PK429	ni	CAZ, FOX, IMP, LEV	Mm-S	+ / +	+	CTX-M-2	qnrD1	+ / -	ColE
<i>M. morganii</i> PK 442	Aspirado traqueal/ Neurocirurgia	AMC, FOX, NAL, NOR, CIP	Mm-T	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>P. mirabilis</i> PK 337	Urina sonda/ Endocrinologia	AMC, AMS, FOX, SXT, GEN, NAL, NOR, CIP, LEV, MXF, CHL	nr	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>P. mirabilis</i> PK 121	Urina/ Ambulatório	NAL, NOR, CIP	nr	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>P. mirabilis</i> PK 217	Urina sonda/ Moléstia Infecciosa	AMC, FOX, NAL, NOR, CIP, LEV, MFX, CHL	nr	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>P. mirabilis</i> PK 308	Urina/ Oncologia	CAZ, CTX, STX	nr	- / -	+	-	-	- / -	ColE
<i>P. mirabilis</i> PK 384	Urina/ Oncologia	AMC, AMS, GEN, SXT, NAL, NOR, CIP, LEV, MXF	nr	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>P. mirabilis</i> PK 405	Cateter/ Proctologia	AMC, IMP, LEV	nr	- / -	-	-	-	- / -	ColE
<i>P. mirabilis</i> PK 469	Ferida Cirúrgica/ Neurocirurgia	AMS, CAZ, CTX, FOX, LEV	nr	- / -	+	-	qnrD1	- / -	FIC; ColE
<i>P. stuartii</i> PK 048	Urina sonda/ Urologia	AMC, AMS, TIM, CTX, CEP, FOX, ATM, GEN, SXT, NAL, NOR, CIP, LEV, MFX, CHL	nr	+ / +	+	-	-	- / -	ColE
<i>S. marcescens</i> PK 392	Ferida Cirúrgica/ Mastologia	CAZ, CTX, TIG	Sm-H	- / -	+	-	-	- / -	ColE
<i>S. marcescens</i> PK 406	Escarro/ Pneumologia	CAZ, CTX, MXF, DOX, CHL	Sm-J	- / -	+	-	-	- / -	ColE

Continua

Conclusão Coleção 2016	Espécime clínico/ Setor	Resistência aos Antibióticos* ¹	Tipagem molecular cromossômica PFGE	Fenótipo		Genes de resistência			Plasmídeos Grupo Inc/outros
				<i>DDST/ DC</i>	<i>Hiper AmpC</i>	<i>bla</i>	<i>Qnr</i>	<i>aac (6')Ib/ aac (6')-Ib- cr</i>	
<i>S. marcescens</i> PK 109	Aspirado traqueal/ Pós-operatório	CAZ, CTX, TET	Sm-K	- / -	+	-	-	- / -	<i>ColE</i>
<i>S. marcescens</i> PK 441	Cateter/ Urologia	AMC, CTX, CAZ	Sm-L	- / -	+	-	-	- / -	<i>ColE</i>
<i>S. marcescens</i> PK 263	Urina Sonda/ Urologia	CTX, CAZ, LEV	Sm-N	- / -	+	-	-	- / -	<i>ColE</i>
<i>S. marcescens</i> PK 291	Urina/ Urologia	ERT, NAL	Sm-O	- / -	-	-	-	- / -	<i>ColE</i>
<i>S. marcescens</i> PK 011	Ferida Coluna/ Neurologia	TOB, NAL, MFX	Sm-P	- / -	-	-	<i>qnrD1</i>	+ / -	<i>ColE</i>
<i>S. marcescens</i> PK 219	Urina/ Neurologia	AMC, NAL	Sm-Q	- / -	-	-	<i>qnrD1</i>	- / +	<i>ColE</i>
<i>S. marcescens</i> PK 014	Escarro/ Pneumologia	CAZ, TOB, NAL	Sm-R	- / -	+	-	<i>qnrD1</i>	+ / -	<i>ColE</i>
<i>S. marcescens</i> PK 128	Urina/ Urologia	AMC, CTX, TOB, KAN, NAL	Sm-S	- / -	+	-	<i>qnrD1</i>	+ / -	<i>ColE</i>
<i>S. marcescens</i> PK 012	Pele/ Dermatologia	CAZ, CTX, TIC, NAL	Sm-T	- / -	+	-	<i>qnrD1</i>	- / +	<i>ColE</i>

Sombreado azul: isolados com genes de resistência de interesse; negrito: antibióticos que fazem parte do critério de seleção. (+) positivo/ contém; (-) negativo/ não contém; (nr) não realizado; (ni) não informado pelo hospital

*¹AMC, amoxicilina; AMS, amoxicilina-sulbactam; TIM, ticarcilina-clavulanato; TZP, piperacilina-tazobactam; TIC, ticarcilina; CRO, ceftriaxona; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; CEP, cefepime; FOX, cefoxitina; ATM, aztreonam; IMP, imipenem; ERT, ertapenem; DOR, doripenem; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; STX, sulfametoxazol-trimetoprim; NAL, ácido nalidixico; NOR, norfloxacin; CIP, ciprofloxacino; LEV, levofloxacino; MXF, moxifloxacino; DOX, doxiciclina; MNO, minociclina; TET, tetraciclina; TIG, tigeciclina; POL, polimixina; COL, colistina; CHL, cloranfenicol

Embora exista grande diferença entre o número de isolados das coleções de 2007 e 2016, foram feitas comparações dos dados para análise do panorama de resistência dos gêneros envolvidos, produtores de AmpC cromossômica, embora neste estudo não tenha sido abordado o gênero *Enterobacter*. Aumento significativo do número de isolados ocorreu em 2016 em relação a 2007 (aproximadamente 35%). O isolamento de bactérias dos gêneros estudados pode ter aumentado devido ao crescente número de pacientes imunocomprometidos por causas naturais, doença ou terapia, como idosos, pacientes acometidos por AIDS, em tratamento quimioterápico, transplantados, vítimas de desnutrição e de outras morbidades, situações fortemente associadas ao aumento de suscetibilidade a infecções (MACHADO, et al., 2004). Os mesmos gêneros foram encontrados em 2007 e 2016, porém o número de isolados de *M. morganii*, *S. marcescens* e *P. mirabilis* aumentou em 2016.

Maior resistência aos antibióticos testados foi apresentada pelas espécies *M. morganii* e *S. marcescens*, além das resistências intrínsecas exibidas. Essas bactérias oportunistas são potenciais ameaças, sobretudo para o grupo de pacientes que geralmente acometem, os imunodebilitados. Tal fato acarreta diminuição considerável de opções terapêuticas para o tratamento de infecções por elas causadas. Em geral tais micro-organismos não estão entre as espécies multirresistentes mais preocupantes e relatadas. Ao redor do mundo as bactérias MDR mais alarmantes são *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (CERCEO et al., 2016), poucos estudos tratam de isolados oportunistas produtores de AmpC cromossômica como no presente trabalho, fato alarmante, pois com dados epidemiológicos escassos, pode haver prejuízo para o tratamento dos pacientes. Terapia empírica inicial de amplo espectro diminui a mortalidade, porém o uso prolongado e irracional dos antimicrobianos, além da multirresistência, pode elevar o risco de toxicidade, interações medicamentosas e problemas intestinais (DA SILVA e JUNIOR, 2015), sendo assim o conhecimento da epidemiologia pode direcionar melhor o tratamento, sem a necessidade de múltiplas tentativas.

Co-resistência às três classes de antibióticos do critério de seleção foi apresentada por cinco isolados em 2007 (33%) e 10 isolados em 2016 (23%).

Houve mudança no perfil de resistência dos isolados de 2007 para 2016. Sem considerar, entre outros aspectos, o estado do paciente, a conduta clínica e o espécime clínico do qual o micro-organismo foi isolado, os antibióticos mais eficazes (100% sensibilidade) em 2007 foram amoxicilina-sulbactam, imipenem, ertapenem e tigeciclina e em 2016 os antibióticos piperacilina-tazobactam, ceftriaxona e doripenem. As opções terapêuticas foram alteradas e diminuídas, situação comum tendo em vista as necessidades e disponibilidades de

antibióticos atuais bem como o aumento da resistência a determinados antimicrobianos dentro das mesmas classes, tornando necessário o uso de antibióticos diferentes. Há também redução da disponibilidade de novos antimicrobianos no mercado o que em partes se deve ao aumento de linhagens resistentes à novas drogas, o que possivelmente desestimula maiores investimentos da indústria farmacêutica (LEBLEBICIOGLU, et al., 2014).

Considerando que as bactérias desse estudo são hiperprodutoras de AmpC, não deveriam apresentar sensibilidade à amoxicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam (penicilinas) e ceftriaxona (cefalosporina de 3ª geração). *In vitro* tal situação pode ocorrer, mas não é segura a indicação de tais antibióticos para o tratamento de infecções causadas pelos isolados em questão, visto que a chance de falha terapêutica em terapias prolongadas é grande, pois mesmo que a bactéria ainda não esteja hiperproduzindo AmpC, pode vir a hiperproduzir pelo estímulo provocado por antibióticos beta-lactâmicos. Em nota, a Anvisa seguindo recomendações do CLSI diz que se os antibióticos das classes citadas forem prescritos ao paciente, “(...) é recomendado solicitar novas culturas após o início do tratamento, para acompanhar a evolução do perfil de sensibilidade destas enterobactérias, pois a hiperprodução de AmpC pode implicar em resistência às cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações”. Para não correr riscos desnecessários que podem conferir maiores danos ao paciente, a nota segue: “Como opções terapêuticas, podem ser utilizadas cefalosporinas de quarta geração, carbapenems, quinolonas e aminoglicosídeos, quando sensíveis pelo antibiograma” (ANVISA).

Alteração no ponto de corte foi apresentada por vários antibióticos de 2007 para 2016 (por exemplo, em 2007 para o antibiótico ceftazidima com 16mm de halo de inibição o isolado era considerado intermediário, já em 2016, considerado resistente - CLSI). Os valores dos pontos de corte demonstraram, em geral, a tendência de diminuição em função do aumento da resistência bacteriana ao longo dos anos, com a finalidade de promover maior segurança no tratamento dos pacientes.

Destaca-se que desde novembro de 2010 está em vigor a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 44 da ANVISA, que “dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências”, prevê que “antibióticos vendidos nas farmácias e drogarias do país só poderão ser entregues ao consumidor mediante receita de controle especial em duas vias. A primeira via ficará retida no estabelecimento farmacêutico e a segunda deverá ser devolvida ao paciente com carimbo para comprovar o atendimento” (ANVISA, 2010) (resolução substituída pela RDC 20/2011). Essa medida pode ter

contribuído para o uso mais racional dos antibióticos, diminuindo a pressão seletiva, ou seja, a seleção de isolados mais resistentes na comunidade. Considerando que antes de uma possível internação o paciente já possuía história clínica prévia e, possível uso irracional de antibióticos pode ter contribuído para a seleção de bactérias resistentes em seu organismo. Além disso, no ambiente hospitalar, antibióticos considerados mais potentes são prescritos somente após concordância da CCIH, o que contribui para a diminuição de isolados multirresistentes no ambiente hospitalar.

Noventa por cento dos isolados desse estudo foram considerados MDR. Diante da gravidade das infecções causadas por essas bactérias e das escassas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento, é necessário investir em prevenção. A melhor tática para reduzir a seleção de linhagens resistentes, sobretudo em UTIs, é por meio de estratégias de uso racional dos antimicrobianos (KOLLEF, 2001).

Resistência às quinolonas tornou-se comum entre as enterobactérias desde a introdução das fluoroquinolonas nos anos 1980, afetando diferentes gêneros bacterianos. Tal fato se deve à transferência horizontal de genes mediados por plasmídeos (PMQR) que contribuem para a diminuição da sensibilidade às quinolonas (STRAHILEVITZ et al., 2009). Há anos a resistência às quinolonas tem aumentado, sobretudo em enterobactérias (LIVERMORE, 2012). Neste estudo, em 2007, 66% (10/15) das bactérias eram resistentes a pelo menos um antibiótico da classe das quinolonas, e em 2016, 70% (30/43).

Os isolados de *S. marcescens* foram apresentados em dois diferentes clusters a partir dos perfis de PFGE. O mesmo perfil clonal em PFGE foi apresentado pelos isolados carreando gene *bla_{SHV-5}*, se tratando de mesmo clone; já perfis clonais diferentes foram apresentados pelos isolados carreando *qnrD1* e *aac(6')-Ib/aac(6')-Ib-cr*. Os isolados de *M. morganii* também foram apresentados em dois clusters, sendo que um deles havia tanto bactérias de 2007 quanto de 2016. Perfis clonais diferentes também foram apresentados pelos isolados carreando *qnrD1* e *aac(6')-Ib/aac(6')-Ib-cr*. Neste estudo foram encontrados apenas dois clusters e os isolados apresentaram grande variabilidade genética.

Apesar das bactérias estudadas serem sabidamente hiperprodutoras de AmpC, nem todas elas estavam expressando tal fenótipo quando da realização do teste. Para os isolados de 2007 pode ter havido dessensibilização devido ao tempo de estocagem em freezer a -80°C, já os isolados de 2016 podem não ter sofrido prévia exposição a antibióticos beta-lactâmicos.

A descoberta de PMQR indica a transferência horizontal dos genes de resistência às quinolonas e alerta para sua disseminação rápida e facilitada. PMQR conferem baixos níveis de resistência às quinolonas às bactérias, mas especula-se que devido à sua presença as

bactérias consigam sobreviver a concentrações sub-inibitórias dos antibióticos desta classe. Assim há pesquisadores os quais sugerem que a existência de PMQR pode contribuir para o aumento da ocorrência de mutações espontâneas em QRDR (STRAHILEVITZ et al., 2009; RUIZ et al., 2012).

O gene *qnrD* foi descrito pela primeira vez em 2009 em *Salmonella enterica* serovar Kentucky de isolado clínico humano e três isolados de *S. enterica* serovar Bovismorbificans na China (CAVACO et al., 2009). Genes *qnrD* são conhecidos como PMQR, e na maioria das vezes, são carregados por plasmídeos pequenos, e não conjugativos, porém mobilizáveis, denominados ColE-like (CARATTOLI, 2009).

O gene *qnrD* foi encontrado na Ásia (China, Taiwan), África (Tunísia, Algéria, Nigéria), Europa (Itália, França, Polônia) (GUILLARD et al., 2012; MOKRACKA, GRUSZCZYŃSKA e KAZNOWSKI et al., 2012; KOCSIS, et al. 2013; YAICHE et al., 2014; SEIJA et al., 2015; YANAT et al., 2017; KAO et al., 2017; OGBOLU et al., 2017). Até 2014 não havia descrição sobre isolados carregando genes *qnrD* nas Américas e tampouco no Brasil. O primeiro relato de *qnrD* feito nas Américas, ocorreu na Argentina, em isolados de *P. mirabilis* e *P. vulgaris* de amostras clínicas (ALBORNOZ et al., 2014) e o único relato de *qnrD* no Brasil foi feito em 2015 em isolado de *Salmonella* Thipymurium proveniente de alimento animal (PRIBUL et al., 2016).

No presente estudo, o gene *qnrD* foi detectado em diferentes espécies de bactérias isoladas de amostras clínicas em 2007 (*P. stuartii* e *M. morganii*), demonstrando que já estava presente no hospital mesmo antes do primeiro relato acontecer na América do Sul. Nos isolados de 2016 o gene *qnrD* foi encontrado em outros gêneros/espécies tais como *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *C. freundii* e *C. koseri*, além de *M. morganii*. Até o momento não há relatos desse gene em bactérias do gênero *Citrobacter* provenientes de amostras clínicas. Esse é um fato importante pois essa bactéria pode causar diversas infecções em pacientes de UTIs neonatais (KHADKA; THAPA; MAHAT, 2012), principalmente meningites, e uma vez que esses pacientes ainda não são imunologicamente competentes, a presença de gene de resistência pode diminuir ainda mais as opções terapêuticas.

Foi notado por análise dos dados que acompanham os isolados que esse gene está disseminado em bactérias de diferentes setores do hospital. Bactérias provenientes de ambulatório, cardiologia, neurocirurgia, pneumologia, urologia/ proctologia, dermatologia e hematologia carregavam o gene *qnrD1*. Situação de extrema importância por se tratar de disseminação de gene que favorece seleção e persistência do micro-organismo.

Os seis plasmídeos carreadores de *qnrD1* amplificados com o par de *primers* desenhado para este estudo (*pqnrDF* e *pqnrDR*), foram parcialmente sequenciados (cerca de 70% e 75%) e esses fragmentos mostraram 100% de identidade com os plasmídeos já descritos p22499 (Genbank MF062092.1) e p39224 (Genbank MF062094.1) respectivamente. Ambos são provenientes de diferentes espécies de *Proteus* (*P. penneri* e *P. vulgaris*) isolados de cão e cabra na França. Tais plasmídeos são pequenos, ambos com 2.683pb, nesses plasmídeos estão contidos apenas o gene *qnrD1*, proteínas hipotéticas e duas *Open Reading Frame* (ORFs). O plasmídeo similar ao plasmídeo p39224 foi encontrado em isolados de *P. stuartii*, *M. morganii* e *S. marcescens* de 2007 e 2016, portanto estava presente em diferentes gêneros no hospital nesses dois períodos.

O gene *qnrB1* foi descrito em 2006 por Jacoby e colaboradores, tal gene era proveniente de *K. pneumoniae* da Índia. O gene *qnrB* possui a maior variabilidade de alelos de todos os genes *qnr*, 91 no total, com ampla disseminação mundial (<http://www.lahey.org/qnrStudies/>, 2018). Até hoje, a maioria dos genes *qnrB* foi reportada em plasmídeos grandes e conjugativos que carregam vários genes de resistência a diferentes antibióticos (LASCOLS et al., 2008).

Apesar de ser o gene mais amplamente disseminado ao redor do mundo, o gene *qnrB6* foi encontrado em apenas 2 das 58 bactérias desse estudo, *M. morganii* HC 388 isolada em 2007, e em *M. morganii* PK 470 isolada em 2016 (que também apresentou gene *qnrD1*), isolados estes de diferentes padrões de macrorrestrição em PFGE. O alelo encontrado também não é dos mais comuns entre os já relatados em estudos brasileiros. Predominância do gene *qnrB2* foi observada 2008 por Minarini e colaboradores em enterobactérias de amostras hospitalares e de infecções comunitárias. Outros estudos conduzidos no Brasil nos anos de 2011 a 2013 relataram a presença dos genes *qnrB1*, *qnrB2* e *qnrB19* em bactérias provenientes de diferentes amostras clínicas (FERRARI et al. 2011, PAIVA et al. 2012, e VIANA et al., 2013). Em estudo realizado em Barcelona, em 2009, por Sanchez-Cespedes e colaboradores, a variante *qnrB6* foi encontrada em dois isolados de *C. freundii* e em um isolado *Citrobacter werkmanii* provenientes de amostras de sangue. Em estudo realizado na Croácia foi encontrada forte associação entre carbapenemases do tipo *bla_{VIM}* e *qnrB6* em enterobactérias isoladas de amostras clínicas (ATALIĆ, et al., 2014). Tal alelo não foi descrito em nenhum isolado de *M. morganii*.

Resistência às quinolonas foi apresentada por *C. braakii* HC 413, *C. freundii* HC 381 e *S. marcescens* HC 066 sem a presença de genes de resistência adquiridos pesquisados por PCR. Tal fenótipo geralmente é conferido principalmente por mutações específicas em QRDR, não investigadas (PAZHANI, et al., 2011).

O gene *aac(6')-Ib* foi mais frequentemente encontrado nas bactérias de 2007 (6 entre as 15) e nas bactérias da coleção de 2016 (15 das 43 apresentaram). É o único gene responsável pela resistência aos aminoglicosídeos, dentre os genes pesquisados.

A variante *aac(6')-Ib-cr* também PMQR, foi apresentada por oito dos isolados de 2016, o que significa que juntamente com *qnrB*, *qnrD* e *qnrS* também pode ter contribuído para a diminuição de sensibilidade às quinolonas. Há diversos relatos da variante ao redor do mundo, apesar disso sua frequência pode estar sendo subestimada, uma vez que tal gene costumava ser associado somente à resistência aos aminoglicosídeos (ROBICSEK et al., 2006). Posto que apenas duas substituições são necessárias para a codificação da variável *-cr*, *aac(6')-Ib* é fator que pressupõe aumento da probabilidade de co-resistência nos isolados. O gene *aac(6')-Ib*, e a variante *aac(6')-Ib-cr*, estão geralmente associados a elementos genéticos móveis como plasmídeos (carreadores de múltiplos genes de resistência inclusive outros genes PMQR), transposons (sobretudo *Tn1331*), integrons de classe 1, sequências de inserção (especialmente IS26), além de poderem estar inseridos no cromossomo (RAMIREZ et al., 2013; MACHUCA et al., 2016).

Em ambas as coleções foram encontrados diferentes genes, entre os pesquisados, em um só isolado, como: em *C. freundii* PK 164 foram encontrados *qnrD1* e *aac(6')-Ib*, em *M. morgani* PK 174 foram encontrados *qnrD1* e *aac(6')-Ib-cr*, em *M. morgani* PK 111 foram encontrados *qnrD1*, *qnrS2* e *aac(6')-Ib-cr* e em *M. morgani* PK 429 foram encontrados *qnrD1*, *bla_{CTX-M-2}* e *aac(6')-Ib-cr*. Em *S. marcescens* HC 199 e *S. marcescens* HC 221, que tem o mesmo perfil de macrorrestrição, foram encontrados os genes *bla_{SHV-5}* e *aac(6')-Ib* pode-se inferir que trata-se do mesmo clone. Estudo conduzido na Polônia demonstrou que cepas apresentando genes *qnr* foram mais propensas a produzir ESBL do que cepas que não apresentaram o gene *qnr*, o que pode sugerir associação entre *qnr* e ESBL (CHMIELARCZYK et al., 2015). Isso ocorreu para o isolado carreando *bla_{CTX-M-2}* mas não para o isolado carreando *bla_{SHV-5}*. Por outro lado, segundo alguns autores é bastante comum a associação entre dois ou mais PMQR (YANG et al., 2014; EFTEKHAR, 2015), o que foi demonstrado tanto para bactérias de 2007 quanto para bactérias de 2016.

Análise de genes de resistência em *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* isoladas no HCFMRP-USP foi realizada por Minarini e colaboradores (2008) e foram encontradas ao todo 147 produtores de ESBL, dentre eles, 30 com gene *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M-2}*. As enzimas CTX- M são as ESBL mais prevalentes no Brasil e em todo o mundo. CTX-M são consideradas endêmicas na América Latina e desempenham papel importante no panorama de resistência

no Brasil, principalmente CTX-M-2 e CTX-M-15 (MINARINI et al., 2008; DROPA et al., 2015).

Neste estudo, o gene *bla*_{CTX-M-2} foi apresentado apenas por *M. morganii* PK 429. Nesse isolado *bla*_{CTX-M-2} foi detectado apenas por técnica molecular, DDST foi negativo para ESBL.

No Brasil, ESBL SHV (SHV-5, SHV-12) são frequentemente relatadas. Em 2009, foi realizado estudo com a finalidade de avaliar a prevalência de ESBLs provenientes de infecções de comunidade com isolados de Juiz de Fora, no estado de Minas Gerais. Os isolados foram coletados durante período de 5 anos, totalizando 257. Dentre eles, 24 apresentaram produção de ESBL, das quais 6 eram do tipo SHV-5 (MINARINI et al., 2009). Outro estudo realizado no Brasil com isolados provenientes de hospital universitário no nordeste do estado de São Paulo detectou 1 isolado produtor de *bla*_{SHV-5} dentre 65 *K. pneumoniae* analisadas (TOLLENTINO et al., 2011). Caracterização molecular de surto produzido por *S. marcescens* resistente à cefalosporina em hospital mexicano em 1999 foi realizada por De los Monteros e colaboradores (2008). Isolados foram coletados de 20 pacientes, uma equipe médica e três soluções desinfetantes de clorexidina. A letalidade desse surto foi de 26%. Resultados de PFGE, padrões de beta-lactamase e perfis plasmídeos apontaram que o surto ocorreu devido à disseminação de *S. marcescens* produtora de SHV-5 (DE LOS MONTEROS et al., 2008).

No presente estudo, foram encontrados dois genes *bla*_{SHV-5} em dois isolados *S. marcescens* de 2007.

Resistência ao IMP foi apresentada por *P. mirabilis* PK 405 e 8 isolados de *M. morganii* (PK 27, PK 111; PK 239; PK 250; PK 301; PK 382; PK 405; PK 429). CIMs baixas foram apresentadas pelos micro-organismos para esse antibiótico (2 µg/ml (intermediário), 4 e 8 µg/ml (resistente) para os isolados citados – dados não mostrados), porém tal resistência não se deve a mecanismo enzimático (carbapenemases). Segundo o EUCAST (2017) esse é um comportamento comum em bactérias dos gêneros *Morganella*, *Proteus* e *Providencia* mas não caracteriza resistência intrínseca.

Divergências entre fenótipo e genótipo foram apresentadas por alguns isolados. Resistência à cefalosporina de quarta geração (CEP), foi apresentada por alguns isolados (Tabela 1), mas não foram detectados genes codificadores de ESBL. Sugere-se que isso possa ocorrer devido a outros mecanismos que levam à resistência como diminuição do número de porinas na membrana externa da célula bacteriana, que acarreta em diminuição de sua permeabilidade, mutações no sítio alvo do antibiótico que não mais consegue se ligar e

hiperexpressão de sistemas de efluxo que externalizam o antibiótico que tenha conseguido adentrar na bactéria. Esses mecanismos podem se manifestar em conjunto ou separadamente, contribuindo para a resistência e explicando o fato de não terem sido encontrados genes que justificariam o fenótipo de resistência (PFEIFER, CULLIK e WITTE, 2010).

6. CONCLUSÕES

- Foi verificada a produção de ESBL dos tipos SHV-5 e CTX-M-2. Genes codificadores de beta-lactamases não foram tão frequentemente identificados quanto genes PMQR.
- As bactérias do estudo constituem importante reservatório de PMQR pois além de genes *qnr* muitas bactérias apresentaram também gene *aac(6')-Ib-cr*.
- Apenas duas bactérias da coleção de 2007 (*S. marcescens* HC 199 e *S. marcescens* HC 221) e duas bactérias da coleção de 2016 (*M. organii* PK 59 e *M. organii* PK 86) tratam-se de mesmo clone, indicando que não houve prevalência e disseminação clonal das bactérias do estudo.
- PBRT não foi eficiente para tipagem de plasmídeos nesse estudo.
- O gene *qnrDI* pode ser carregado e disseminado por plasmídeos distintos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBORNOZ, E. et al. Analysis of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of the tribe *Proteeae* from Argentina: First report of *qnrD* in the Americas. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 2, n. 4, p. 322-326, 2014.
- ALBORNOZ, E. et al. *qnrE1*, a Member of a New Family of Plasmid-Located Quinolone Resistance Genes, Originated from the Chromosome of *Enterobacter* Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. e02555-16, 2017.
- ALDRED, K. J. et al. Overcoming Target-Mediated Quinolone Resistance in Topoisomerase IV by Introducing Metal-Ion-Independent Drug-Enzyme Interactions. **ACS chemical biology**, v. 8, n. 12, p. 2660-2668, 2013.
- ALDRED, K. J.; KERNS, R. J.; OSHEROFF, N. Mechanism of quinolone action and resistance. **Biochemistry**, v. 53, n. 10, p. 1565-1574, 2014.
- AMBLER, R. P. The Structure of latex-beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.
- ANDRADE, L.N. et al. Dissemination of bla_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (*IncFII*, *IncN*, *IncL/M*) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, p.3579-83, 2011.
- ATALIĆ, V. Z. et al. Diversity of carbapenemases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Croatia - the results of a multicentre study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 11, p. O894-O903, 2014.
- BARANIAK, A. et al. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. **Antimicrob. Agents Chemother.** 46, 151–159, 2002.
- BERÇOT, B; POIREL, L; NORDMANN, P. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 12, p. 4526-4527, 2008.
- BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Infecção Relacionada à assistência à saúde**, 2004 Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/iras> Acesso em 18 ago. 2016.
- BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Orientações para Prevenção de Infecção Primária de Corrente Sanguínea**, 2010. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/>> Acesso em 25 set. 2015.
- BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resistência Microbiana-Mecanismos e Impacto Clínico**, 2016 Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramn_lacta5.htm> Acesso em 26 jun. 2016.
- BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos - Base Teóricas e Uso Clínico**, 2016 Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/legis.htm>> Acesso em 20 jun. 2016
- BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Controle de Infecção em Serviços de Saúde**, 2016 Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/legis.htm>> Acesso em 20 jun. 2016.

BRASIL, ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº: 44, de 26 de outubro de 2010. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0044_26_10_2010.html>. Acesso em: 08 de mar. 2016.

BUENO, M. F. C. et al. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2397-2400, 2013.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A. Functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211, 1995.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6, p. 298-304, 2013.

CARATTOLI, A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 654-658, 2011.

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

CARTER, W. M., et al. Detection of Extended-Spectrum beta-lactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid Combination Disk Method. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, p. 4228–4232, 2000.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D. A. et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956-2957, 2013.

CATTOIR, V. et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 394-397, 2007.

CAVACO, L. M. et al. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 603-608, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CDC- EUA. Healthcare Associated- infections, Data and Statistics, 2016. Disponível em <http://www.cdc.gov/hai/surveillance/progress-report/index.html>. Acesso em 20 de jul, 2016.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE SÃO PAULO, CVE-SP. Infecção Hospitalar, 2015. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/cve_ihb.html>. Acesso em 22 jun. 2016.

CERCEO, Elizabeth et al. Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in the hospital setting: overview, implications for clinical practice, and emerging treatment options. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 5, p. 412-431, 2016.

CHMIELARCZYK, A. et al. The high prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance among very low birth-weight infants in Poland. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 4, p. 391-397, 2015.

CLSI - **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. ed.26. CLSI Document M-100. Wayne: CLSI, 2016.

COQUE, T. M et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. **Emerging Infectious Diseases**. 14, 195–200, 2008.

COREN-SP - CONSELHO REGIONAL DE ENFERMAGEM DE SÃO PAULO. CCIH/SCIH: a enfermagem à frente da prevenção de infecções hospitalares: a adesão dos profissionais de saúde e o envolvimento de pacientes e familiares nas medidas de prevenção reduzem o risco de contaminação. Jornalista responsável: Carla Espino. Texto: Alexandre Gavioli e Antonio Cazalli. São Paulo, **Enfermagem em Revista**, n. 7, fev./abr. 2014. Disponível em: <http://portal.coren-sp.gov.br/sites/default/files/40_ccih.pdf#overlay-context=node/39376>. Acesso em: 26 jul 2016

COTTELL, J. L. et al. Complete sequence and molecular epidemiology of IncK epidemic plasmid encoding *bla*_{CTX-M-14}. **Emerging Infectious Diseases**. 17, 645–652, 2011.

COURVALIN, P. New plasmid-mediated resistances to antimicrobial agents. **Archives of microbiology**, v. 189, n. 4, p. 289-291, 2008.

COUTO, R.C.; PEDROSA, T.M.G.; CUNHA, A.F.A; AMARAL D.B. Infecção hospitalar e outras complicações não-infecciosas da doença: epidemiologia, controle e tratamento. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6, p. 287-292, 2013.

DA SILVA, C. D. R.; JÚNIOR, M. S. Estratégias para uso adequado de antibioticoterapia em unidade de terapia intensiva. **Einstein (16794508)**, v. 13, n. 3, 2015.

DE LOS MONTEROS, LE Espinosa et al. Outbreak of infection by extended-spectrum β -lactamase SHV-5-producing *Serratia marcescens* in a Mexican hospital. **Journal of Chemotherapy**, v. 20, n. 5, p. 586-592, 2008.

DHANJI, H. et al. Dissemination of pCT-like IncK plasmids harboring CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase among clinical *Escherichia coli* isolates in the United Kingdom. **Antimicrob. Agents Chemother**. 56, 3376–3377, 2012.

DI PILATO, V. et al. Complete genome sequence of the first KPC-type carbapenemase-positive *Proteus mirabilis* strain from a bloodstream infection. **Genome Announcements**, v. 4, n. 3, p. e00607-16, 2016.

DOI, Y.; WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 523-537, 2016.

DROPA, Milena et al. Complex class 1 integrons harboring CTX-M-2-encoding genes in clinical *Enterobacteriaceae* from a hospital in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 08, p. 890-897, 2015.

- EFTEKHAR, F. Prevalence of *qnr* and *aac (6')-Ib-cr* Genes in clinical isolates of *Klebsiella Pneumoniae* from Imam Hussein Hospital in Tehran. **Iranian journal of medical sciences**, v. 40, n. 6, p. 515, 2015.
- FERRARI, R. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* strains isolated in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 06, p. 496-498, 2011.
- FORSYTHE, S. J.; ABBOTT S. L.; PITOUT J. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Cronobacter, Serratia, Plesiomonas*, and other *Enterobacteriaceae*. Cap.38, p.728 e 728 In: CARROLL, K. C.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 2015.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; CARATTOLI, A. Plasmid double locus sequence typing for IncHI2 plasmids, a subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum β -lactamase and quinolone resistance genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dkq101, 2010.
- GAUTOM, R. K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2977–2980, 1997.
- GRUBER, T. M. et al. Pathogenicity of pan-drug-resistant *Serratia marcescens* harbouring *bla_{NDM-1}*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 4, p. 1026-1030, 2015.
- GUILLARD, T. et al. Description of a 2,683-base-pair plasmid containing *qnrD* in two *Providencia rettgeri* isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 565-568, 2012.
- GUILLARD, T. et al. Mobile insertion cassette elements found in small non-transmissible plasmids in *Proteaceae* may explain *qnrD* mobilization. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e87801, 2014.
- HARRIS, P. N. A. Clinical management of infections caused by *Enterobacteriaceae* that express extended-spectrum β -lactamase and AmpC enzymes. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. Thieme Medical Publishers, p. 056-073, 2015.
- HE, L. et al. Complete nucleotide sequence of pHN7A8, an F33:A-:B-type epidemic plasmid carrying *bla_{CTX-M-65}*, *fosA3* and *rmtB* from China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 68, 46–50, 2013.
- HEGGENDORN, L. H. et al. Epidemiological profile and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from nosocomial infections. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 25-48, 2016.
- HUTTNER, A. et al. Therapeutic drug monitoring of the β -lactam antibiotics: what is the evidence and which patients should we be using it for?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 12, p. 3178-3183, 2015.
- JACOBSEN, S. Á. et al. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 1, p. 26-59, 2008.
- JACOBY, G. A. AmpC β -lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 1, p. 161-182, 2009.

- JACOBY, G. A. et al. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1178-1182, 2006.
- JACOBY, G. A. Plasmid-mediated quinolone resistance. In: **Antimicrobial Drug Resistance**. Springer, Cham, p. 265-268, 2017.
- JACOBY, G. A.; GRIFFIN, C.; HOOPER, D. C. *Citrobacter spp.* as a source of *qnrB* alleles. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 05187-11, 2011.
- JARLIER, V. et al. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactamases agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. **Review Infectious Diseases**, v. 10, p. 867-878, 1988
- KAO, C. Y. et al. Molecular characterization of antimicrobial susceptibility of *Salmonella isolates*: First identification of a plasmid carrying *qnrD* or *oqxAB* in Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n. 2, p. 214-223, 2017.
- KHADKA, S. B.; THAPA, B.; MAHAT, K. Nosocomial *Citrobacter* infection in neonatal intensive care unit in a hospital of Nepal. **Journal of Nepal Paediatric Society**, v. 31, n. 2, p. 105-109, 2011.
- KIM, H. B. et al. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3582-3584, 2009.
- KIM, Y.T. et al. Identification of strain harboring both *aac*-(6')-Ib and *aac*-(6)-Ib-cr variant simultaneously in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **BMB Rep**, v. 44, n. 4, p. 262-266, 2011.
- KOCSIS, B. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* strains isolated in North-East Italy. **Journal of Chemotherapy**, v. 25, n. 1, p. 36-40, 2013.
- KOCSIS, B.; DOMOKOS, J.; SZABO, D. Chemical structure and pharmacokinetics of novel quinolone agents represented by avarofloxacin, delafloxacin, finafloxacin, zabofloxacin and nemonoxacin. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 1, 2016.
- KOLLEF, M. H. Optimizing antibiotic therapy in the intensive care unit setting. **Critical Care**, v. 5, n. 4, p. 189, 2001
- KRAUSE, K. M. et al. Aminoglycosides: An Overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 6, p. a027029, 2016.
- LASCOLS, C. et al. A plasmid-borne *Shewanella algae* gene, *qnrA3*, and its possible transfer in vivo between *Kluyvera ascorbata* and *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 15, p. 5217-5223, 2008.
- LEBLEBICIOGLU, H. et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) national report on device-associated infection rates in 19 cities of Turkey, data summary for 2003–2012. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 51, 2014.
- LEIGUE, L. et al. MDR ST2179-CTX-M-15 *Escherichia coli* co-producing RmtD and AAC (6')-Ib-cr in a horse with extraintestinal infection, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 4, p. 1263-1265, 2014.

- LEYLABADLO, H. E. et al. Persistent infection with metallo-beta-lactamase and extended spectrum β -lactamase producer *Morganella morganii* in a patient with urinary tract infection after kidney transplantation. **Journal of Natural Science, Biology, and Medicine**, v. 7, n. 2, p. 179, 2016.
- MACHADO, P. R. L et al. Immune response mechanisms to infections. **An Bras Dermatol**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.
- MACHUCA, J. et al. Impact of *aac*-(6')-Ib-cr in combination with chromosomal-mediated mechanisms on clinical quinolone resistance in *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dkw258, 2016.
- MAGIORAKOS, A.P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.
- MAHLEN, S. D. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 755-791, 2011.
- MARKOVSKA, R. et al. Dissemination of a Multidrug-Resistant VIM-1-and CMY-99-Producing *Proteus mirabilis* Clone in Bulgaria. **Microbial Drug Resistance**, 2016.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. J. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: types and molecular epidemiology. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 32, p. 4-9, 2014.
- MAZZARIOL, A. et al. Description and plasmid characterization of *qnrD* determinants in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, 2012
- MINARINI, L. A. R et al. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella spp.* at a university hospital in Brazil. **Current microbiology**, v. 56, n. 6, p. 587-591, 2008.
- MINARINI, L. A., et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 62, n. 3, p. 474-8, 2008.
- MINARINI, L.A.R et al. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 65, n. 2, p. 202-206, 2009.
- MITSCHER, L. A. Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. **Chemical reviews**, v. 105, n. 2, p. 559-592, 2005.
- MOKRACKA, J.; GRUSZCZYŃSKA, B.; KAZNOWSKI, A. Integrons, β -lactamase and *qnr* genes in multidrug resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *P. vulgaris*. **Apmis**, v. 120, n. 12, p. 950-958, 2012.
- NAEEM, A. et al. The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 268, 2016.
- OGBOLU, D. O. et al. Distribution of plasmid-mediated quinolone resistance in Gram-negative bacteria from a tertiary hospital in Nigeria. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 322, 2016.

- PAIVA, M. C. et al. The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac (6)-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 687-689, 2012.
- PARENTE, T. M. A. L. et al. *Serratia marcescens* resistance profile and its susceptibility to photodynamic antimicrobial chemotherapy. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 14, p. 185-190, 2016.
- PARK, C. H. et al. "Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme ." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 50.11 (2006): 3953–3955. *PMC*. Web. 5 Apr. 2017.
- PARTRIDGE, S. R. et al. Complete sequence of pJIE143, a *pir*-type plasmid carrying ISEcp1-*bla*_{CTX-M-15} from an *Escherichia coli* ST131 isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.** 55, 5933–5935, 2011.
- PAZHANI, G. P. et al. QRDR mutations, efflux system & antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from an outbreak of diarrhoea in Ahmedabad, India. **Indian Journal of Medical Resistance**. 134, 214-23, 2011.
- PFEIFER, Yvonne; CULLIK, Angela; WITTE, Wolfgang. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 6, p. 371-379, 2010.
- POIREL, L. et al. Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. 1730-1733, 2011.
- POIREL, L. et al. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QnrA*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3523-3525, 2005.
- PRAHARAJ, A. K. et al. Phenotypic detection and molecular characterization of beta-lactamase genes among *Citrobacter* species in a tertiary care hospital. **Avicenna journal of medicine**, v. 6, n. 1, p. 17, 2016.
- PRIBUL, B. R. et al. Characteristics of Quinolone Resistance in *Salmonella* spp. Isolates from the Food Chain in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- RAMIREZ M. S., NIKOLAIDIS N., TOLMASKY M. E. Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the *aac(6')-Ib* paradigm. **Frontiers in Microbiology**. v.17, p. 4-121, 2013.
- REHMAN, T.; MOORE, T. A.; SEOANE, L. *Serratia marcescens* necrotizing fasciitis presenting as bilateral breast necrosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 10, p. 3406-3408, 2012.
- ROBICSEK, A. et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. **Nature medicine**, v. 12, n. 1, p. 83-88, 2006.
- ROCHA, F. R.; PINTO, V. P. T.; BARBOSA, F. C. B. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum beta-lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, 2015.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 17, n. 2, p. 149-182, 2011.

- RUIZ J, PONS M. J, GOMES C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. **International Journal of Antimicrob Agents**, v. 40, n. 3, p.196-203, 2012.
- SABBUBA, N. A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; STICKLER, D. J. Molecular epidemiology of *Proteus mirabilis* infections of the catheterized urinary tract. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 11, p. 4961-4965, 2003.
- SEIJA, V. et al. Sepsis caused by New Delhi metallo- β -lactamase (bla NDM-1) and *qnrD*-producing *Morganella morganii*, treated successfully with fosfomycin and meropenem: case report and literature review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 30, p. 20-26, 2015.
- SEO, J. et al. Cutaneous *Serratia marcescens* infections in Korea: a retrospective analysis of 13 patients. **The Journal of dermatology**, v. 43, n. 2, p. 149-155, 2016.
- SEPTIMUS, E. J.; MOODY, J. Prevention of Device-Related Healthcare-Associated Infections. **F1000Research**, v. 5, 2016.
- SHIMA, Ayaka et al. Prevalence of *Providencia* strains among patients with diarrhea and retail meats in Thailand. **Japanese journal of infectious diseases**, n. 0, 2015.
- β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes Disponível em <<http://www.lahey.org/studies/>>. Acesso em 12 fev. 2017.
- STARLING, C. E. F.; COUTO, B. R. G. M.; PINHEIRO, S. M. C. Applying the centers for disease control and prevention and national nosocomial surveillance system methods in Brazilian hospitals. **American journal of infection control**, v. 25, n. 4, p. 303-311, 1997.
- STOKES, M.O. et al. Detection and characterization of pCT-like plasmid vectors for *bla*_{CTX-M-14} in *Escherichia coli* isolates from humans, turkeys and cattle in England and Wales. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 67, 1639–1644, 2012.
- STRAHILEVITZ, J. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 4, p. 664-689, 2009.
- TADA, T. et al. NDM-1 Metallo- β -Lactamase and ArmA 16S rRNA methylase producing *Providencia rettgeri* clinical isolates in Nepal. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.
- TAMANG, M. D. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among *Escherichia coli* isolated from food animals in Korea. **Foodborne pathogens and disease**, v. 9, n. 12, p. 1057-1063, 2012.
- THOMSON, K. S. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1019-1025, 2010.
- TOLLENTINO, F. M. et al. High Prevalence of *bla*_{CTX-M} Extended Spectrum Beta-Lactamase Genes in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Tertiary Care Hospital: First report of *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{SHV-38}, and *bla*_{CTX-M-15} in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 1, p. 7-16, 2011.
- TURRINI, R.N.T; SANTO, A. H. Infecção hospitalar e causas múltiplas de morte. **Jornal de Pediatria**. Rio de Janeiro, v. 78, n. 6, p. 485-90, 2002.

- VALVERDE, A. Spread of *bla*_{CTX-M-14} is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 53, 5204–5212, 2009.
- VIANA, A. L. M. et al. Extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae isolated in Brazil carry distinct types of plasmid-mediated quinolone resistance genes. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 9, p. 1326-1331, 2013.
- WANG, M. et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 1892-1897, 2009.
- YAICHE, M. N. et al. Type II and type IV topoisomerase mutations in clinical isolates of *Morganella morganii* harbouring the *qnrD* gene. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 34, 2014.
- YAMANE, K. et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *QepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3354-3360, 2007.
- YANAT, Betitera et al. Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in High-Level Quinolone-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates from the Community: First Report of *qnrD* Gene in Algeria. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 1, p. 90-97, 2017.
- YANG, T. et al. The association between occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolates of different origins. **Veterinary microbiology**, v. 170, n. 1-2, p. 89-96, 2014.
- ZAVASCKI, A. P. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Review of Anti-infective therapy**, v.8, p.71-93, 2010.