UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Perfil Fenotípico e Genotípico de *Escherichia coli* Resistente a Quinolonas
Isoladas de Hemocultura**

Alexandre Inácio Cruz de Paula

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:
Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Perfil Fenotípico e Genotípico de *Escherichia coli* Resistente a Quinolonas
Isoladas de Hemocultura**

Alexandre Inácio Cruz de Paula

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:
Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo
2012

Alexandre Inácio Cruz de Paula

**Perfil Fenotípico e Genotípico de *Escherichia coli* Resistente a Quinolonas
Isoladas de Hemocultura**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio
Orientador/Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, ____ de _____ de ____.

DEDICATÓRIA

À Deus e minha família.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, em especial, meu pai Celso e minha mãe Maria, obrigado por todo carinho, paciência e amor.

Ao Prof^o Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio, meu orientador, pelo apoio, ensinamentos e paciência. Meus sinceros agradecimentos.

A Prof^a Dra. Elsa Masae Mamizuka pelo constante estímulo a favor do meu crescimento profissional.

A Prof^a Dra. Ana Cristina Gales por disponibilizar cepas de referências de genes plasmidiais.

Em especial, a aluna de mestrado Juliana Coutinho por toda ajuda nas reações de PCR e sequenciamento.

Ao Instituto Fleury, principalmente Patrícia Sacramento e Cintia Reis por todos os reagentes oferecidos para realização dos sequenciamentos de DNA.

Aos meus colegas de laboratório de microbiologia clínica pela compreensão e apoio.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	09
1.1	Quinolonas	09
1.2	Mecanismo de ação das quinolonas	11
1.3	Epidemiologia da resistência às quinolonas em enterobactérias	16
1.4	Mecanismos Cromossômicos de Resistência às Quinolonas	17
1.5	Mecanismos Plasmidiais de Resistência às Quinolonas	19
1.6	Motivação	22
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Isolados Bacterianos	24
3.2	Extração de DNA	25
3.3	Amplificação para sequenciamento parcial de <i>parC</i> e <i>gyrA</i>	25
3.4	Deteção dos genes <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	25
3.5	Sequenciamento	28
3.6	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR)	28
3.7	Determinação da susceptibilidade antimicrobiana	29
3.8	Diluição em ágar	29
3.9	Avaliação fenotípica das β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL)	30
3.10	Controle de qualidade	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Perfil de susceptibilidade	31
4.2	Deteção da produção de ESBL	31
4.3	Determinação das concentrações inibitórias mínimas	32
4.4	Substituições em GyrA e ParC	33
4.5	Deteção dos genes plasmidiais <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	34
4.6	Avaliação da clonalidade dos isolados	36
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
	ANEXO A	48

RESUMO ESTRUTURADO EM PORTUGUÊS

DE PAULA, A.I.C., Perfil fenotípico e genotípico de *Escherichia coli* isoladas de corrente sanguínea e resistente as quinolonas. **Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2011.

Introdução: Atualmente o uso de fluoroquinolonas na prática clínica tem sido associado a um aumento da incidência da infecção com bactérias resistentes as quinolonas, especialmente *Escherichia coli*. O Brasil tem uma das mais altas taxas de resistência as quinolonas entre os países da America Latina. Diferentes mecanismos de resistência estão envolvidos no desenvolvimento de resistência as quinolonas. Os principais mecanismos dividem se em três categorias: i) alteração na DNA girase e topoisomerase IV; ii) diminuição do acúmulo de antibióticos no interior da bactéria e iii) produção de proteínas protetoras da DNA girase e topoisomerase IV. No ano de 2010 foram observadas elevadas taxas de resistência às fluorquinolonas em *Escherichia coli* isoladas de hemoculturas de pacientes atendidos em hospitais privados da cidade de São Paulo, pelo Fleury Medicina e Saúde. As taxas de resistência à ciprofloxacina variaram de 26,1% a 43,9% em três hospitais diferentes. Considerando que há determinantes cromossômicos não transferíveis e determinantes plasmidiais transferíveis da resistência às fluorquinolonas, a avaliação da clonalidade dos isolados e dos determinantes genéticos da resistência às fluorquinolonas poderá contribuir para o entendimento de alguns dos fatores que possam contribuir para essa progressiva elevação nas taxas de resistência a essa classe de antimicrobianos. **Objetivo:** Avaliar o fenótipo, a diversidade genética, determinantes cromossômicos e plasmidiais da resistência a fluorquinolonas em *Escherichia coli* isoladas de corrente sanguínea. **Materiais e métodos:** Foram estudados 47 *E. coli* resistentes a ciprofloxacina isoladas de hemoculturas de pacientes atendidos em cinco centros hospitalares da cidade de São Paulo. A caracterização fenotípica foi realizada por determinação da concentração mínima inibitória para fluoroquinolonas. A confirmação genotípica da resistência foi confirmada por PCR para os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*. As regiões determinantes da resistência a fluorquinolonas dos genes *gyrA*, *parC* foram sequenciadas. A tipagem molecular foi realizada pela técnica de ERIC-PCR. **Resultados e conclusões:** Os genes *qnrA* e *qnrS* não foram detectados nos isolados avaliados neste estudo. Os genes *qnrB* foram detectados em 42,5% dos isolados. Em todos os isolados, exceto o F4991, foram detectadas as substituições S83L e D87N na GyrA. Em todos os isolados, exceto o F4991, foram detectadas as substituições S80I em ParC. Foi detectada a substituição E84V em ParC 23,4% dos isolados. Foi observada a disseminação dos grupos clonais ERIC1 e ERIC2 entre hospitais e disseminação intrahospitalar dos grupos clonais ERIC5, ERIC6 e ERIC7.

RESUMO ESTRUTURADO EM INGLÊS

DE PAULA, A.I.C., Phenotypic and Genotypic Profile of Quinolone-Resistant *Escherichia coli* isolated from Blood Cultures. **Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2011.

Introduction: The use of fluoroquinolones in clinical practice has been associated with an increased incidence of infection with bacteria resistant to quinolones, especially *Escherichia coli*. Brazil has one of the highest rates of resistance to quinolones among the countries in Latin America. Different resistance mechanisms are involved in the development of resistance to quinolone. The main mechanisms fall into three categories: i) alteration in DNA gyrase and topoisomerase IV, ii) reduction in the accumulation of antibiotics within the bacterium and iii) production of proteins that protect DNA gyrase and topoisomerase IV. In the year of 2010 high rates of resistance to fluoroquinolones in *E. coli* were observed blood cultures isolates from of patients from private hospitals in São Paulo. Ciprofloxacin resistance rates ranged from 26.1 to 43% 9% at three different hospitals. There are chromosomal and transferable plasmid-determined resistance to fluoroquinolones. The evaluation of the clonality of the isolates and the genetic determinants of resistance to fluoroquinolones may contribute to the understanding of some of the factors that may contribute to the progressive increase in resistance rates to this class of antimicrobials. **Objective:** To evaluate the phenotype, genetic diversity, chromosomal and plasmid determinants of resistance to fluoroquinolones in *E. coli* isolated from bloodstream. **Materials and methods:** We studied 47 ciprofloxacin resistant *E. coli* isolated from blood cultures of patients treated at five hospitals in the city of Sao Paulo. Phenotypic characterization was performed by determining the minimum inhibitory concentration for fluoroquinolones. Genotypic resistance was confirmed by PCR to genes *qnrA*, *qnrB* and *qnrS*. The quinolone resistance determining regions of genes *gyrA* and *parC* were sequenced. Molecular typing was performed using ERIC-PCR. **Results and conclusions:** The *qnrA* and *qnrS* genes were not detected in the isolates evaluated in this study. The *qnrB* genes were detected in 42.5% of isolates. In all isolates, except for F4991, substitutions were detected in *gyrA* S83L and D87N. In all isolates, except for F4991, substitution S80I were detected in ParC. E84V substitution in ParC was detected in 23.4% of isolates. We observed the spread of clonal groups ERIC1 and ERIC2 and between hospitals and also intra-hospital spread of clonal groups ERIC5, and ERIC6 ERIC7.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Quinolonas

As quinolonas e fluoroquinolonas (FQs) representam uma classe de antimicrobianos sintéticos composta por drogas quimicamente semelhantes e altamente eficazes no tratamento de uma série de infecções, sobretudo de etiologia bacteriana, cuja atividade consiste fundamentalmente na inibição da replicação do DNA (Hopkins, Davies et al. 2005).

O desenvolvimento das quinolonas teve início com a identificação do ácido nalidíxico, a partir de um subproduto da síntese da cloroquina, o 6-cloro-1-H-etil-4-oxoquinolona-3-ácido carboxílico (Leshner, Froelich et al. 1962). Devido à sua atividade contra bactérias Gram-negativas aeróbias, o ácido nalidíxico foi uma boa opção terapêutica para o tratamento de infecções urinárias nos anos 60. Entretanto, sua considerável ligação protéica e as reduzidas concentrações séricas e teciduais, somadas ao surgimento de resistência, restringiram sua indicação ao tratamento de infecções sistêmicas (Barlow 1963).

Nos anos 70, outras quinolonas foram sintetizadas, como o ácido oxolínico e a cinoxacina. No entanto, apesar da atividade antimicrobiana discretamente superior ao ácido nalidíxico, tais compostos não tiveram grande significância. Em estudos realizados na mesma época no Japão, foi desenvolvido o ácido pipemídico, cujas modificações realizadas na estrutura molecular levaram à síntese, nos anos 80, de compostos do grupo das fluoroquinolonas ou quinolonas de 2ª geração (Appelbaum and Hunter 2000).

A estrutura química geral das quinolonas (Figura 1) contém dois anéis quinolônicos, com um átomo de nitrogênio na posição 1, um grupo carbonila na posição 4 e um grupo carboxila na posição 3. De acordo com a composição química desses anéis, as quinolonas são classificadas em diferentes grupos.

Figura 1. Fórmula estrutural genérica das quinolonas. Fonte: (Blondeau 2004).

Para aumentar a atividade contra bactérias Gram-negativas foi realizada uma substituição na posição R7 com piperazida que originou o ácido pipemídico. Apesar de várias tentativas de aumentar a atividade antimicrobiana o uso de quinolonas permaneceu restrito ao tratamento de infecções urinárias em função de seu restrito espectro de ação (Appelbaum and Hunter 2000). A incorporação da molécula de flúor na posição 6 do anel quinolônico originou a terceira geração, que aumentou a afinidade de ligação específica e facilitou a penetração desses agentes na célula bacteriana, proporcionando um importante aumento na potência destes fármacos contra bactérias Gram-negativas, e ampliando o espectro de ação para as Gram-positivas. A primeira quinolona do grupo de fluoroquinolonas foi a norfloxacin, disponibilizada em 1986 (Domagala, Hanna et al. 1986). Este antimicrobiano apresentava ação contra bacilos Gram-negativos, inclusive *Pseudomonas* spp. e ação limitada contra Gram-positivos (Ito, Hirai et al. 1980). Com as substituições nos radicais R8 e R1, por nitrogênio obteve-se a ciprofloxacina, e adição de piridobenzoxacin em R1 e R8 originou a ofloxacina. Além de serem potencialmente ativas e apresentarem amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mostraram alta absorção intestinal e excelente penetração na maioria dos órgãos e tecidos. A levofloxacina, isômero da ofloxacina, apresenta atividade também contra *Streptococcus pneumoniae* (Appelbaum and Hunter 2000).

Novas modificações deram origem aos análogos di e tri-fluorados do ácido nalidixico, criando novas quinolonas, como a esparfloxacina (1997), temafloxacina (1992), grepafloxacina (1998) e lomefloxacina. Apesar de terem ótima atividade contra bactérias Gram-positivas, especialmente a *Streptococcus pneumoniae* e apresentarem meia-vida longa, a toxicidade foi ampliada, limitando o uso de alguns tri-fluorados. O primeiro composto desta geração, a temafloxacina, foi lançado no início da década de 90 e retirada rapidamente do mercado por apresentar efeitos tóxicos,

que incluem principalmente vasculites, alterações do sistema hemostático e hepatotoxicidade (Blum, Graham et al. 1994).

Com o aumento da resistência bacteriana a essa classe de antimicrobianos uma nova geração foi desenvolvida, desta forma caracterizando a quarta geração destes compostos (Appelbaum and Hunter 2000). A adição do grupo metoxi na posição R8 originou a moxifloxacina que ligado na posição R7 apresenta um anel bicíclico enquanto a gatifloxacina apresenta um grupamento metil no anel piperazinílico. Esta modificação reduz a sua utilização como substrato para sistemas bacterianos de efluxo e aumenta a sua potencia, principalmente contra o *Staphylococcus aureus* resistente a outras quinolonas (Fukuda, Hori et al. 1998).

Devido à diversidade de indicações clínicas, ciprofloxacina têm sido o antimicrobiano mais amplamente utilizado nas últimas décadas (Hopkins, Davies et al. 2005). As quinolonas são amplamente utilizadas no tratamento de infecções em humanos e animais. São frequentemente utilizadas no tratamento de infecções do trato respiratório como sinusite e pneumonia. É a classe atualmente mais utilizada para o tratamento de infecções urinárias, incluindo pielonefrite, infecções de pele e partes moles, osteomielites e infecções gastrointestinais. Tem sido utilizadas também no tratamento de doenças sexualmente transmissíveis causadas por *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus ducreyi*, assim como no tratamento empírico das salpingites (Babinchak and Fass 1989). Tem sido amplamente utilizadas como parte do esquema antimicrobiano aplicados a pacientes neutropênicos ou imunocomprometidos (Andriole 2005; Saito, Sato et al. 2006).

1.2 Mecanismo de Ação das Quinolonas

O cromossoma bacteriano é formado por uma dupla fita de DNA circular. Estudos realizados com *Escherichia coli* demonstram que o cromossomo bacteriano encontra-se em alto grau de compactação ou superespiralização. Essa espiralização é necessária para que o volume por ele ocupado seja compatível com o volume total da célula bacteriana, já que em extensão o cromossomo bacteriano é cerca de 1500 vezes maior que a maior dimensão de um bacilo Gram-negativo (Figura 2). Esse enovelamento determina a formação de domínios, que são regiões de cerca de 50 Kb do cromossomo, que formam alças. O número desses domínios varia de 30 a

200. O mecanismo de ancoramento desses domínios não está totalmente esclarecido, mas elementos de sequências repetidas (REP), além de proteínas, podem estar envolvidos (Cozzarelli 1980; Cozzarelli 1980; Kreuzer and Cozzarelli 1980).

Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão obtida após ruptura da parede bacteriana e relaxamento do cromossomo (Kleinschmidt, Lang et al. 1962).

O volume do cromossomo bacteriano é extremamente reduzido pelas dobras na formação dos domínios em alças, que por sua vez ainda sofrem um processo de superespiralização negativa. Essa denominação decorre do fato de que a superespiralização é feita no sentido contrário ao sentido da hélice do DNA na sua forma linear. O processo de superespiralização reduz o volume do DNA, mas principalmente favorece as ligações entre as fitas de DNA intra-alça e evita o emaranhado de alças vizinhas.

Devido à característica compacta do DNA, a duplicação do cromossoma bacteriano passa por problemas topológicos durante a divisão celular. Com o início da replicação do DNA, a enzima DNA helicase desenrola a fita dupla de DNA antes que a enzima DNA polimerase exerça sua função. Com a abertura da fita em conjunto com a ação da polimerase é gerado uma tensão na forquilha de replicação. Também a transcrição de certos genes resulta em superespiralização positiva (Figura 3), dessa forma interferindo na progressão da RNA polimerase. Outro ponto importante de destaque é o final da duplicação cromossômica, sendo que o novo cromossomo permanece entrelaçado com o original até que ocorra a ação da topoisomerase (Reece and Maxwell 1991).

A replicação do DNA bacteriano tem início em uma sequência específica do cromossomo, e prossegue em sentido bidirecional até que as fitas se encontrem na extremidade oposta da molécula ou se deparem com sequências terminadoras da replicação. A replicação do cromossomo bacteriano resulta na formação de superespirais positivas à frente da forquilha de replicação. Se essa superespiralização não for corrigida, pode impossibilitar a progressão e finalização do processo (Piddock 2002). Para solucionar os problemas topológicos do DNA, como a separação das fitas e a remoção da superespiralização positiva do DNA (Figura 3), enzimas chamadas topoisomerases agem tornando a replicação mais eficiente (Drlica and Zhao 1997; Hopkins, Davies et al. 2005). Estas enzimas têm a função de romper a fita de DNA (Figura 4), passar a outra fita pelo local e reparar o local rompido. As enzimas que rompem e restauram apenas uma das fitas do DNA são classificadas como topoisomerases tipo I que são representadas pelas topoisomerases I e III. As topoisomerases tipo II rompem ambas as fitas do DNA e são a DNA girase e a topoisomerase IV (Reece and Maxwell 1991; Reece and Maxwell 1991).

Figura 3. Esquema representativo das superespiralizações positiva e negativa do cromossomo bacteriano.

A DNA girase é um tetrâmero formado por duas subunidades A e duas subunidades B, codificadas por *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. A topoisomerase IV, também duas subunidades, codificadas pelos genes *parC* e *parE*. As quinolonas inibem a síntese de DNA bacteriano e, em concentrações elevadas, inibem também a síntese de RNA. Esses efeitos são mediados pela habilidade destes compostos em estabilizar o complexo formado entre o DNA e a topoisomerase IV ou DNA girase (Hooper 2001).

Figura 4. Mecanismo de ação das topoisomerases do tipo II (Champoux 2001).

O principal alvo das quinolonas em bactérias Gram-negativas é o DNA girase, que tem a função na replicação e transcrição do DNA, principalmente com a função de promover e reverte a superespiralização negativa do DNA. Também atua na inibição da topoisomerase IV, que tem função similar a DNA girase (Drlica and Zhao 1997). As quinolonas ligam-se à DNA girase ou topoisomerase IV na presença de DNA, alterando a conformação das enzimas (Figura 5). Atuam inibindo a função dessas enzimas e ainda promovem um efeito tóxico para a célula criando um complexo fármaco-enzima-DNA, no qual as fitas rompidas do DNA são mantidas juntas pelas enzimas (Drlica 1999). As quinolonas estabelecem pontes de hidrogênio, entre os grupos carbonila e carboxila dos anéis quinolônicos e as bases do DNA, sendo que os grupamentos adjacentes são unidos a mesma fita, orientados em sentidos opostos para evitar repulsão de cargas (Drlica and Zhao 1997).

Figura 5. Diagrama esquemático do mecanismo de ação das quinolonas (Kohanski, Dwyer et al. 2010).

O bloqueio da replicação do DNA pode ocorrer por duas vias. A principal envolve a remoção do complexo quinolona-DNA girase, liberando a dupla fita rompida de DNA. O DNA após o relaxamento de suas espirais passa a ocupar um maior volume dentro do limitado corpo bacteriano. Além disso, as extremidades livres do DNA induzem a síntese descontrolada de RNA mensageiro e proteínas com a produção de exonucleases e degradação cromossômica. A segunda via consiste na dissociação da enzima complexada ao DNA. Ocorre liberação das pontas de DNA ligadas às subunidades das enzimas levando à morte celular. Esta

via ocorre quando as células são tratadas com altas concentrações de quinolonas (Hooper 1998).

1.3 Epidemiologia da resistência as quinolonas em enterobactérias

Os antibióticos da classe das quinolonas apresentam potente atividade contra grande número de bactérias gram-positivas e gram-negativas e ainda apresentam conveniência quanto ao uso e a sua biodisponibilidade (Hurst, Lamb et al. 2002). Como resultado do amplo espectro de ação, e adequada biodisponibilidade quando administradas por via oral, as fluoroquinolonas têm sido extensivamente prescritas como terapia empírica em muitos casos de infecções relacionadas aos cuidados com a saúde e na comunidade (Hurst, Lamb et al. 2002; Chenia, Pillay et al. 2006). O isolamento de *Escherichia coli* resistente a quinolonas (QREC) permaneceu rara até 1990, quando se iniciou o uso generalizado de fluoroquinolonas para o tratamento das infecções do trato urinário e para a profilaxia em pacientes com neutropenia ou cirrose hepática. Desde então tem havido um aumento progressivo na frequência de estirpes resistentes às fluoroquinolonas. Assim, as QREC estão sendo isolados com frequência crescente tanto em pacientes provenientes da comunidade como os hospitalizados. A introdução das fluoroquinolonas na prática clínica tem sido associada a um aumento da incidência de QREC, mas também nas demais enterobactérias e em *Staphylococcus aureus* (Peleg and Hooper 2010; Palou, Pigrau et al. 2011).

O Brasil tem uma das mais altas taxas de resistência as quinolonas entre os países da América Latina. De acordo com um estudo realizado pelo “SENTRY Antimicrobial Surveillance Program”, o qual analisou dados referentes ao perfil de sensibilidade de vários patógenos isolados na América Latina, entre os anos de 2008 e 2010, os dados referentes ao Brasil mostram que 27,3% das *Escherichia coli* são resistentes a ciprofloxacina (Gales, Castanheira et al. 2012). Outra publicação, em 2006, por este mesmo programa apresenta a percentagem de resistência ao ácido nalidíxico mais alta na América Latina (15%) comparada a América do Norte (6,3%), sendo considerada mais alta no México (50%) e no Brasil (33,6%) (Biedenbach, Toleman et al. 2006). Pereira e colaboradores reportaram um aumento

na resistência às quinolonas em diversos hospitais brasileiros entre os anos de 2002 e 2003 (Pereira, Andrade et al. 2007).

A publicação mais recente evidenciou que a *Escherichia coli* representa 19% dos isolados em bacteremias e de 1517 cepas isoladas de diversos sítios infecciosos apresenta a taxa de resistência a ciprofloxacina de 40,2%. Atualmente o Brasil apresenta ainda a terceira maior taxa de resistência dos países da América Latina com índice de 27,3% das *E. coli* resistente a ciprofloxacina, apenas atrás do México (64,6%) e Chile (35,4%) (Gales, Castanheira et al. 2012).

1.4 Mecanismos Cromossômicos de Resistência às Quinolonas

As primeiras publicações sobre mecanismo de resistência às quinolonas evidenciaram substituições de nucleotídeos nos genes cromossômicos que codificam GyrA, GyrB, ParC e ParE (Ruiz 2003).

Geralmente as mutações no gene *gyrA* estão localizadas nas porções N-terminal, entre os nucleotídeos 199 e 318 na sequência do gene, em *Escherichia coli*, em uma área designada região determinante de resistência às quinolonas (QRDR), próximo ao sítio Tyr122, o qual liga momentaneamente o DNA clivado durante a atividade enzimática (Yoshida, Bogaki et al. 1990). Estas mutações são encontradas, mais frequentemente, nos códons 83 e 87, próximo ao sítio de restrição HinfI, sendo Ser83 o ponto mais comum em *E.coli*. Estes códons interagem com radicais nas posições R1 e R7 da estrutura das quinolonas (Cattoir and Nordmann 2009).

Mutações nos códons 51, 67, 81, 82, 84, e 106 no gene *gyrA* também podem causar resistência às quinolonas (Vila, Ruiz et al. 1994; Friedman, Lu et al. 2001). Apenas uma mutação nas regiões QRDR de *gyrA* pode gerar altos níveis de resistência ao ácido nalidíxico, porém para haver resistência contra as fluoroquinolonas é necessário mais de uma mutação no gene *gyrA* e/ou no gene *parC*.

Foi observado que a presença de mutações no gene *gyrB* confere resistência às quinolonas, sendo a principal localizada nos códons 426 e 447 (Ruiz 2003). Porém a frequência de mutação em *gyrB* em bactérias Gram-negativas é menor comparada com *gyrA* (Deguchi, Yasuda et al. 1996).

Alterações em *parC* são mais prevalentes que em *parE*. Mutações no gene *parC* de *E. coli* associadas à resistência às quinolonas ocorrem mais frequentemente nos códons 78, 80 e 84 (Everett, Jin et al. 1996; Navia, Ruiz et al. 1999). As alterações nos referidos códons geram resistências às quinolonas apenas quando associadas com a presença de mutação no gene *gyrA*,; portanto exercem um papel secundário na resistência às fluoroquinolonas (Breines, Ouabdesselam et al. 1997).

A diminuição da entrada na célula bacteriana, ou a expulsão das quinolonas da célula bacteriana podem levar a resistência. Alterações nas estruturas por onde as quinolonas entram na célula bacteriana, como porinas externas e bicamada fosfolipídica pode modificar a sensibilidade bacteriana frente às quinolonas (Hooper 1999).

As bombas de efluxo nas bactérias Gram-negativas também podem estar ligadas a outras proteínas capazes de facilitar a expulsão da droga através do periplasma e da membrana externa. Nessas bactérias, o sistema de efluxo possui, tipicamente, três componentes: uma bomba de efluxo localizada na membrana citoplasmática, uma proteína de membrana externa e uma proteína de fusão. Esta tem a função de ligar a bomba de efluxo à proteína de fusão da membrana AcrA e a proteína de membrana externa TolC (Figura 6). Os genes que fazem parte do sistema MAR, e que irão regular o sistema de efluxo AcrAB, são *marA*, *acrR*, *robA* e *soxS*. Mutações cromossômicas nesses genes levam a superexpressão do sistema e, conseqüentemente, à resistência às fluoroquinolonas (Hooper 2001; Cattoir and Nordmann 2009).

Figura 6. Diagrama esquemático do sistema de efluxo AcrAB-TolC.

1.5 Mecanismos plasmidiais de resistência às quinolonas

O primeiro determinante plasmidial de resistência a quinolonas foi descoberto quando uma quinolona foi utilizada como antibiótico seletor em experimentos realizados para caracterizar um plasmídeo chamado pMG252, que continha vários genes de resistência. A linhagem de *E. coli* receptora, após a aquisição deste plasmídeo, mostrou um aumento da concentração inibitória mínima (CIM) de 8 e 64 vezes. Posteriormente, o gene responsável pela resistência às quinolonas foi clonado e apresentou uma sequência de 657 nucleotídeos, sendo a proteína codificada por esse gene designada de Qnr. Essa proteína protege a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição por quinolonas, ligando-se a elas em competição com o DNA bacteriano (Martinez-Martinez, Pascual et al. 1998; Tran and Jacoby 2002; Robicsek, Jacoby et al. 2006).

Devido à descoberta de variantes dessa proteína, ela foi denominada QnrA e atualmente tem sido descritas em enterobactérias na Ásia, em muitos países europeus e, recentemente na América do Sul, destacando-se o Brasil (Cambau, Lascols et al. 2006; Ellington and Woodford 2006; Wu, Ko et al. 2007; Lavilla, Gonzalez-Lopez et al. 2008; Minarini, Poirel et al. 2008). Já foram encontradas seis variantes QnrA (QnrA1-QnrA6) em diversos países (Cattoir, Weill et al. 2007; Xu, Wu et al. 2007; Lavilla, Gonzalez-Lopez et al. 2008).

Trabalhos demonstram que essa proteína de 218 aminoácidos, protege a DNA girase e a topoisomerase IV da ligação das quinolonas, competindo com as quinolonas na fixação nas enzimas. Desta forma aumentando os níveis de resistência as fluoroquinolonas e conferindo resistência ao ácido nalidíxico (Tran and Jacoby 2002; Robicsek, Jacoby et al. 2006).

Outros genes foram isolados na Ásia, Europa e América do Sul e denominados *aac (6')-Ib*, *qepA*, *qnrS1*, *qnrS2* e *qnrB* com 49 variantes (*qnrB1-qnrB49*) que diferem entre si por pelo menos um aminoácido (Jacoby, Walsh et al. 2006; Kehrenberg, Friederichs et al. 2006; Cattoir, Weill et al. 2007; Park, Yu et al. 2007; Literak, Micudova et al. 2012; Paiva, Nascimento et al. 2012). No Japão foi detectado pela primeira vez o gene *qnrS* em cepa de *Shigella flexneri* (Hata, Suzuki et al. 2005). Em seguida nos Estados Unidos, Taiwan, Vietnam, França, Espanha, Alemanha e Suíça (Robicsek, Jacoby et al. 2006; Robicsek, Strahilevitz et al. 2006; Lavilla, Gonzalez-Lopez et al. 2008).

O gene *qnrS* codifica uma proteína de 218 aminoácidos com similaridade de 59% em relação à QnrA (Hata, Suzuki et al. 2005). Uma nova variante do gene *qnrS* foi identificada nos Estados Unidos em *Salmonella enterica*. Essa proteína apresentava 91% de similaridade com a sequência de aminoácidos da proteína QnrS1 e foi denominada QnrS2 (Gay, Robicsek et al. 2006). Novas variantes foram encontradas como a *qnrS3* (Yue, Jiang et al. 2008). Na Dinamarca foi encontrado *qnrS4* (Cavaco, Frimodt-Moller et al. 2008).

O gene *qnrB1* foi identificado primeiramente nos Estados Unidos por Robicsek e colaboradores em amostras originadas da Índia e posteriormente foi encontrado no Kuwait e Coreia, Suíça, Taiwan e Brasil. A variante sendo o *qnrB2* codifica uma proteína de 214 aminoácidos e difere do *qnrB1* em 5 códons. Em 2006 foram verificados novas variantes *qnrB3*, que diferem em 2 códons e *qnrB4*, que diferem em 14 códons. Essas variantes foram encontradas em enterobactérias. Na

Coréia do Sul foram encontrados os genes *qnrB13*, *qnrB14* e *qnrB15* (Robicsek, Jacoby et al. 2006; Cattoir, Weill et al. 2007; Veldman, van Pelt et al. 2008). Em um estudo de prevalência de genes *qnr* em coleção de *Enterobactereaceae*, foi evidenciado a presença de *qnrB16* (Sanchez-Cespedes, Marti et al. 2009).

Em 2009 na China foi encontrado uma variante *qnr* em uma cepa de isolado clínico identificado como *Proteus mirabilis* diferente das demais variantes em 30% nas sequências de aminoácidos, mas que também causa baixos níveis de resistência as quinolonas, sendo designada *qnrC* (Wang, Guo et al. 2009). Neste mesmo ano foi descoberta outra variante apresentada como *qnrD*, em *Salmonella enterica* com sensibilidade reduzida às quinolonas. O gene apresenta 48% de similaridade com *qnrA* e a transferência do plasmídio para *E. coli* resultou em aumento de 32 vezes da concentração inibitória mínima para quinolonas (Cavaco, Hasman et al. 2009).

Considerando a origem dos genes *qnr*, acredita-se que *Shewanella algae* seja o reservatório dos genes *qnrA*, por serem encontradas variantes destes genes em seu cromossomo, além disso, proteínas com repetições pentapeptídicas com 40 a 67% de similaridade frente a *qnrA* foram identificadas nesta espécie (Poirel, Liard et al. 2005). A quantidade de guanina e citosina contida em um gene muito parecido com *qnrA*, extraído do genoma de *S. algae* sugere que *qnrA* originou-se deste microrganismo. Portanto, *Vibrionaceae* pode constituir um reservatório para *qnr* determinando a resistência as quinolonas. Também foram descritos a presença de *qnrB* em bactérias marinhas e genes *qnrS* em *Aeromonas* (Picao, Poirel et al. 2008). Com a ação das integrases estes genes foram disseminados através de plasmídeos (Poirel, Cattoir et al. 2008).

Em 2004, Robicsek e colaboradores descreveram uma nova variante do gene *aac(6')-Ib* chamado *aac(6')-Ib-cr*, que expressa uma enzima capaz de degradar ciprofloxacina e desta forma reduzindo a sua atividade. Esta enzima também tem a habilidade de acetilar as moléculas de aminoglicosídeos, principalmente a amicacina (Robicsek, Strahilevitz et al. 2006).

No Japão foi isolada em 2007 uma cepa de *E. coli* que carregava um plasmídeo (figura 6) que apresentava um gene codificador de bomba de efluxo. Essa proteína designada QepA apresenta maior similaridade com bombas de efluxo de Actinomicetos (Yamane, Wachino et al. 2007).

Figura 6. Diagrama esquemático da inserção da proteína QepA na membrana plasmática demonstrando estrutura de QepA (Yamane, Wachino et al. 2007).

1.6 Motivação

No ano de 2010 foram observadas elevadas taxas de resistência às fluoroquinolonas em *Escherichia coli* isoladas de hemoculturas de pacientes atendidos em hospitais privados da cidade de São Paulo, pelo Fleury Medicina e Saúde. As taxas de resistência à ciprofloxacina variaram de 26,1% a 43,9% em três hospitais diferentes. Considerando que há determinantes cromossômicos não transferíveis e determinantes plasmidiais transferíveis da resistência às fluoroquinolonas, a avaliação da clonalidade dos isolados e dos determinantes genéticos da resistência às fluoroquinolonas poderá contribuir para o entendimento de alguns dos fatores que possam contribuir para essa progressiva elevação nas taxas de resistência a essa classe de antimicrobianos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a diversidade genética e determinantes cromossômicos e plasmidiais da resistência a fluoroquinolonas em *Escherichia coli* isoladas de corrente sanguínea

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil de sensibilidade a cefalotina, ceftriaxona, cefepima, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, imipenem, meropenem, ertapenem, amikacina, gentamicina;
- Determinar a concentração inibitória mínima para ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina e gatifloxacina;
- Determinar a frequência dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*;
- Avaliar a presença de mutações nas regiões QRDR dos genes *gyrA* e *parC*;
- Investigar a diversidade genética por ERIC-PCR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolados Bacterianos

Foram analisadas *Escherichia coli* resistentes a ciprofloxacina isoladas hemoculturas de pacientes hospitalizados e atendidos pelo Fleury Medicina e Saúde durante o ano de 2010 na cidade de São Paulo. O total de isolados foi de 47, um isolado único por paciente, detectados em quatro hospitais privados da cidade de São Paulo, designados A, B, C e D. Todos os isolados foram identificados utilizando-se o sistema Viek2 e cartão GN. Os isolados foram subcultivados em ágar MacConkey para confirmação da pureza e a seguir uma colônia foi reisolada em ágar BHI para experimentos subsequentes. Foram mantidos estoques a -80°C, em caldo TSB ou BHI contendo 10% de glicerol.

Tabela 1. Distribuição dos isolados segundo hospital de origem

Hospital A	Hospital B	Hospital C	Hospital D
F0312	F1111	F3950	F2363
F1077	F1596	F3678	F0871
F3679		F1606	F0594
F3441		F2139	F3766
F1442		F4025	F0979
F3280		F3581	F3832
F3504		F0857	F3738
F2947		F4002	F4423
F1965		F1868	F4658
F3525		F4448	F 4991
F3866		F3420	
F3688		F1893	
F2639		F1623	
F0223		F1286	
F4890		F4460	
		F4520	
		F4564	
		F4609	
		F5194	

3.2 Extração de DNA

Pelo método de lise térmica, os lisados foram preparados a partir de crescimento bacteriano obtido em ágar BHI, após incubação a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. As suspensões bacterianas foram preparadas em água grau reagente estéril, de modo a atingir uma turbidez equivalente ao padrão 3 da escala de McFarland. A seguir foram fervidas por 10 minutos e congeladas a -20°C por um mínimo de 10 minutos. No momento de uso, os lisados foram descongelados à temperatura ambiente, homogeneizados e centrifugados a $12.000 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para reações de amplificação e os lisados mantidos a -80°C .

Para os ensaios de ERIC-PCR e PCRs para *gyrA* e *parC* foi extraído o DNA genômico utilizando-se o kit Illustra Bacteria Genomic Prep Min Spin (GE Healthcare), segundo as instruções do fabricante.

3.3 Amplificação para sequenciamento parcial de *parC* e *gyrA*

O DNA genômico foi utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação das regiões determinantes da resistência a fluoroquinolonas dos genes *gyrA* e *parC*. Os produtos de amplificação foram obtidos utilizando-se as seguintes concentrações de reagentes: 1x PCR Buffer; 2.5mM MgCl_2 ; 200 μM dNTP; 0.16 μM de cada primer; 1.25U AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). As sequências dos oligonucleotídeos e as condições da reação estão descritas na (Tabela 2).

3.4 Detecção dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*

Para a amplificação do gene *qnrA*, foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: 1x *Pfx50* PCR Mix; 1.3mM MgSO_4 ; 300 μM dNTP; 0.3 μM de cada primer; 5U *Pfx50* DNA Polymerase (Invitrogen). As sequências dos oligonucleotídeos e as condições da reação estão descritas na (Tabela 2).

Para a amplificação dos genes *qnrB* e *qnrS* foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: 1x PCR Buffer; 1.5mM MgCl_2 ; 125 μM dNTP; 0.2 μM de

cada primer; 1U Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). As sequências dos oligonucleotídeos e as condições da reação estão descritas na (Tabela 2).

O protocolo utilizado para multiplex PCR para detecção dos genes *qnr B* e *qnrS* foi descrito por Jacoby e colaboradores (Jacoby, Gacharna et al. 2009). Foi preparada uma solução contendo tampão da reação (Tris-HCl 10mM pH 8,3 KCl 50 nM), 1,5mM, 200mM de cada deoxinucleotideo trifosfato, 20 pmol de cada primer e 2,5 U de Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen) (Tabela 2).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Em seguida, foram corados com Gel Red® (Uniscience) e visualizados em transiluminador UV. Os mesmos oligonucleotídeos foram utilizados para o sequenciamento dos amplicons.

Tabela 2. Iniciadores e condições utilizados nos ensaios de PCR.

Gene	Sequência do primer 5'-3'	Tamanho do fragmento	Ciclo de Amplificação	Alvo	Referências
gyrA-K12-6-23-F	CGACCTTGCGAGAGAAAT	625 bp	95°C – 5 min.;	gyrA	(Mammeri, Van De Loo et al. 2005)
gyrA-K12-631-614-R	GTTCCATCAGCCCTTCAA		30X: 95°C – 15s, 58°C – 15s, 72°C – 1 min.;		
			72°C – 7 min.		
parC-QRDR-69-90-F	GTACGTGATCATGGACCGTGCG	337 bp	95°C – 5 min.;	parC	(Mammeri, Van De Loo et al. 2005)
parC-QRDR-406-386-R	GCTCGCTCAATAGCAGCTCGG		30X: 95°C – 15s, 58°C – 15s, 72°C – 1 min.;		
			72°C – 7 min.		
Qnr A mult-F	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	468 bp	94°C – 2 min.;	qnrA	(Jacoby, G. A., Gacharna, N. et al., 2009)
Qnr A mult-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		36X: 94°C – 15s, 58°C – 20s, 68°C – 30s;		
			68°C – 5 min.		
Qnr B mult-F	CGACCTKAGCGGCACTGAAT	513 bp	94°C – 10 min.;	qnrB	(Jacoby, G. A., Gacharna, N. et al., 2009)
Qnr B mult-R	GAGCAACGAYGCCTGGTAGYTG		36X: 94°C – 30s, 60°C – 40s, 72°C – 50s.;		
			72°C – 5 min.		
Qnr S mult-F	ACTGCAAGTTCATTGAACAG	431 bp	94°C – 10 min.;	qnrS	(Jacoby, G. A., Gacharna, N. et al., 2009)
Qnr S mult-R	GATCTAAACCGTCGAGTTCG		36X: 94°C – 30s, 60°C – 40s, 72°C – 50s.;		
			72°C – 5 min.		

3.5 Sequenciamento

O sequenciamento e purificação das amostras foram realizados nas dependências do Instituto Fleury. Os produtos amplificados foram purificados com o kit GFX (GE Healthcare) e a seguir quantificado por espectrometria a 260 nm no espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop® Technologies INC, Wilmington, DE, EUA). Todas as etapas de sequenciamento foram realizadas em microplacas de 96 poços. Para a reação de sequenciamento foi utilizado Kit BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), aplicando em cada poço 2 µL de BigDye, 2 µL de cada iniciador na concentração de 1,6 pmol/ µL, 1 µL tampão do kit e 5 µL do DNA quantificado a 8 ng/µL.

As reações foram precipitadas adicionando-se 1,0 µL de solução de acetato de sódio (3,0 M; pH 4,6) e 25 µL de etanol absoluto. A mistura foi incubada à temperatura ambiente ao abrigo da luz por 15 minutos antes de centrifugação a 2.000 g por 45 minutos. A placa foi invertida sobre papel absorvente, e foi novamente centrifugada a 150 x g por 1 minuto. Foram adicionados a cada poço 150 µL de etanol a 70% antes de centrifugação a 2.000 g por 15 minutos. A placa foi novamente invertida sobre papel absorvente e centrifugada a 150 x g por 1 minuto. Foram adicionados 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) a cada tubo e a seguir a placa foi mantida ao abrigo da luz a -15°C até o momento de sua introdução no sequenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Uma vez obtidos os eletroferogramas, a sequência consenso foi determinada utilizando-se o programa DNABaser. As sequências foram então comparadas com aquelas disponíveis no GenBank, utilizando o programa BLAST.

3.6 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR)

As regiões conservadas do DNA das cepas deste estudo foram amplificadas pela técnica de PCR utilizando-se um único tipo de primer ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC-3' (Aydin, Gumussoy et al. 2007). A reação de amplificação consistiu de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos seguida de etapa de amplificação com 30 ciclos constituída de uma etapa de

desnaturação a 94°C de 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto e etapa de extensão a 72°C por 8 minutos. Por fim, uma extensão final a 72°C por 16 minutos. A separação dos fragmentos foi obtida por eletroforese em gel de agarose a 2,5% e a seguir foi corado com Gel Red® (Uniscience) para posterior visualização em transiluminador de luz UV.

Para a análise da clonalidade a partir dos perfis de amplificação foi utilizado o coeficiente de DICE com tolerância de 2% e o programa Bionumerics (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

3.7 Determinação da susceptibilidade antimicrobiana

Foram realizados os antibiogramas utilizando o método de Kirby-Bauer, estabelecidos pelo CLSI 2010, para obter o perfil de resistência aos antibióticos ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina, amicacina, cefepima, ceftriaxona, cafalotina, cefoxetina, piperacila/tazobactam, imipenem, meropenem (Oxoid, Cambrige, UK). Para as quinolonas foram utilizados o método de diluição em ágar para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para ciprofloxacina, moxiflocina e levofloxacina. Para gatifloxacina foi utilizado a metodologia de fita gradiente (Etest Biomerieux) segundo as instruções do fabricante.

3.8 Diluição em ágar

Para a diluição em ágar, os antimicrobianos foram testados na faixa de 0,125 a 1024µg/mL. As diluições seriadas foram realizadas a partir de uma solução estoque, contidas em tubos de 19 mL de ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Cambrige, UK) esterilizados, e logo após, mantidos aproximadamente a 50°C. Após as etapas anteriores, a solução concentrada em 20 vezes foi adicionada para cada tubo. No primeiro tubo foi adicionado 1 mL da solução contendo 20480 µg/mL do antimicrobiano, no segundo tubo foi adicionado 1 mL da solução contendo 1024µg/mL, e assim sucessivamente. Logo após, os tubos foram homogeneizados e o conteúdo foi transferido para placas de Petri de 90 x 15 mm.

Para o cultivo das bactérias, 10 µL das bactérias cultivadas overnight em Muller-Hinton (Oxoid, Cambridge, UK) foram subcultivadas em 2 mL de caldo Muller-Hinton (Oxoid, Cambridge, UK) e incubadas a 37°C durante três a quatro horas até atingir a turbidez de 0,5 na escala MacFarland.

As suspensões foram diluídas na proporção de 1:10 em caldo Muller-Hinton (Oxoid, Cambridge, UK), resultando de 10^7 UFC/mL. Posteriormente, foi depositado cerca de 300 µL, desta solução diluída de cada cepa, na base do inoculador de Steers, previamente esterilizado. Logo após, foi aplicado de 1 a 3 µL desta solução bacteriana em Agar Muller Hinton contendo diferentes concentrações de antimicrobianos.

Após incubação a 37°C por 24 horas, as placas foram lidas e CIM foi definida como a menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano.

3.9 Avaliação fenotípica das β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL)

Para avaliar a presença de ESBLs foi feita o teste de dupla difusão utilizando os substratos aztreonam (30 µg), ceftriaxona (30 µg) e cefotaxima (30 µg). Os discos contendo os antibióticos foram alinhados a uma distância de dois centímetros de um disco único contendo o inibidor ácido clavulânico. Para a confirmação foram utilizadas fitas Etest (Biomerieux) contendo ceftriaxona e ceftriaxona juntamente com o inibidor ácido clavulânico.

3.10 Controle de qualidade

Todos os testes foram validados com controle de qualidade dos insumos utilizando-se as seguintes cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. A interpretação dos testes, isto é, a categorização das amostras em resistente, intermediária ou sensível, foi realizada de acordo com a padronização recomendada pelo CLSI (2010).

4 RESULTADOS

4.1 Perfil de susceptibilidade

Todos os isolados apresentaram sensibilidade aos três carbapenêmicos testados. Quanto às cefalosporinas, houve resistência concomitante às de terceira geração – ceftriaxona e cefotaxima – em 34,1% dos isolados. Em contraste 27,7% dos isolados foram sensíveis à cefepima. A resistência intermediária ou total à cefoxitina ocorreu em 17,1% dos casos. Quanto aos aminoglicosídeos, todos os isolados foram sensíveis à ampicacina e 80,8% foram sensíveis à gentamicina (Figura 7).

Figura 7. Perfil de susceptibilidade dos isolados utilizados neste estudo

4.2 Detecção da produção de ESBL

Os testes de disco-aproximação com ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima e clavulanato, assim como o Etest com clavulanato e ceftazidima detectaram a presença de ESBL em sete isolados (15,1%): F0871, F1077, F0594, F3504, F3688, F4520 e F4609.

4.3 Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM)

Os isolados foram avaliados por diluição em ágar para ciprofloxacina, moxifloxacina e levofloxacina. Para determinação das CIMs para gatifloxacina foi utilizado método do gradiente em ágar (Etest) (Tabela 4).

Tabela 3. Distribuição dos isolados segundo CIM, substituições em GyrA, ParC e presença de *qnrB*.

Cepa	CIM (µg/mL)				Alteração em gyrA		Alteração em parC		Presença de <i>qnrB</i>
	CIPRO	MOXI	LEVO	GATI					
F0223	16	16	8	4	S83L	D87N	S80I		
F0312	256	256	128	>32	S83L	D87N	A56T S80I		POS
F0594	8	8	8	1,5	S83L	D87N	S80I		
F0857	8	16	8	3	S83L	D87N	S80I		POS
F0871	8	16	8	>32	S83L	D87N	S80I		
F0979	128	64	16	12	S83L	D87N	S80I		POS
F1077	128	64	64	>32	S83L	D87N	S80I		
F1111	64	64	64	16	S83L	D87N	S80I E84V		POS
F1286	32	16	8	4	S83L	D87N	S80I A108T		
F1442	16	16	8	3	S83L	D87N	S80I		
F1596	64	32	32	8	S83L	D87N	S80I		POS
F1606	16	32	8	4	S83L	D87N	S80I D101N		
F1623	256	32	16	6	S83L	D87N	S80I		
F1868	128	64	32	12	S83L	D87N	S80I		POS
F1893	32	32	16	4	S83L	D87N	S80I E84V		
F1965	16	64	32	>32	S83L	D87N	S80I		
F2139	128	256	128	6	S83L	D87N	S80I		POS
F2163	64	64	16	8	S83L	D87N	S80I		
F2639	256	128	128	24	S83L	D87N	S80I		
F2904	64	64	32	>32	S83L	D87N	S80I		POS
F2947	32	16	16	4	S83L	D87N	S80I E84V		
F3280	64	32	16	4	S83L	D87N	S80I		
F3420	32	32	16	6	S83L	D87N	S80I		POS
F3441	64	16	16	3	S83L	D87N	S80I E84V		POS
F3504	128	64	32	8	S83L	D87N	Y74S S80I		
F3525	128	32	32	24	S83L	D87N	S80I		POS
F3581	256	64	64	>32	S83L	D87N	S80I		
F3678	16	32	8	3	S83L	D87N	S80I		
F3679	16	16	8	3	S83L	D87N	E84K		POS
F3688	64	64	32	>32	S83L	D87N	S80I		
F3738	128	128	32	>32	S83L	D87N	A56T S80I		
F3766	64	32	16	8	S83L	D87N	S80I E84V		POS
F3832	64	32	16	8	S83L	D87N	S80I E84V		
F3866	64	32	16	>32	S83L	D87N	S80I		
F3950	256	128	64	>32	S83L	D87N	S80I		POS

Continua...

Cepa	CIM (µg/mL)				Alteração em gyrA	Alteração em parC	Presença de qnrB
	CIPRO	MOXI	LEVO	GATI			
F4002	64	64	16	6	S83L D87N	S80I	
F4025	64	32	16	8	S83L D87N	S80I E84V	
F4423	64	32	16	8	S83L D87N	S80I E84V	POS
F4448	32	32	16	3	S83L D87N	S80I	POS
F4460	32	32	16	4	S83L D87N	S80I	
F4520	128	32	32	2	S83L D87N	S80I E84V	POS
F4564	32	32	16	8	S83L D87N	S80I	POS
F4609	256	64	16	3	S83L D87N	S80I	
F4658	32	16	16	6	S83L D87N	S80I	
F4890	32	16	8	4	S83L D87N	S80I E84V	POS
F4991	32	32	16	4	NM	NM	
F5194	64	128	128	8	S83L D87N	S80I	POS

Legenda: NM: Nenhuma mutação; CIPRO: Ciprofloxacina; MOXI: Moxifloxacina; LEVO: Levofloxacina; GATI: Gatifloxacina.

Todas as cepas apresentaram CIM acima do ponto de corte de sensibilidade descrito no CLSI para ciprofloxacina ($\leq 1\text{mg/L}$), gatifloxacina ($\leq 2\text{mg/L}$) e levofloxacina ($\leq 2\text{mg/L}$), ou pelo EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) para a moxifloxacina ($\leq 0,5\text{mg/L}$) (Tabela 3). As CIM50 (64 µg/mL) e CIM90 (256 µg/mL) mais elevadas foram observadas com ciprofloxacina. Em todos os lotes de testes a cepa de controle de qualidade *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada e os resultados obtidos situaram-se dentro dos limites aceitáveis (CLSI – M100-S20).

Tabela 4. Concentrações inibitórias mínimas para 50% e 90% dos isolados estudados.

	CIPRO	MOXI	LEVO	GATI
	(µg/mL)			
CIM50	64	32	16	8
CIM90	256	128	64	>32

Legenda: CIPRO: Ciprofloxacina; MOXI: Moxifloxacina; LEVO: Levofloxacina; GATI: Gatifloxacina.

4.4 Substituições em GyrA e ParC:

Em todos os isolados, excetuando o F4991, foram observadas as substituições S83L e D87N na subunidade GyrA, na região QRDR (Tabela 3). Ao

analisar as sequências de aminoácidos de ParC observou-se em todos os isolados exceto o F4991 a presença da substituição S80I. A substituição E84V em ParC foi detectada em 11 (23,4%) isolados. Outras substituições, como A56T, Y74S, D101N e A108T individualmente em apenas um isolado cada.

4.5 Detecção dos genes plasmidiais *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*

A PCR multiplex para os genes *qnrA* e *qnrS* foi realizada conforme descrito por Jacoby e colaboradores em 2003 (Jacoby, Chow et al. 2003). Os controles positivos foram cedidos pela Prof^a. Dra. Ana Gales (Unifesp) e pela Prof^a. Dra. Ana Lúcia Darini (USP-RP). Houve amplificação adequada dos controles, mas não houve amplificação quando as reações foram realizadas com os 47 isolados estudados neste trabalho (Figura 8).

Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de amplificação obtidos com PCR multiplex para os genes *qnrA* e *qnrS*. M: marcador 1 Kb plus (Invitrogen); CN: controle negativo. Temperatura de anelamento: 60°C.

As PCRs para os genes *qnrA* e *qnrS* foram realizadas separadamente e também não houve amplificação em nenhum isolado testado, mas apenas com os controles positivos.

Em um total de 20 isolados houve amplificação de fragmento de aproximadamente 510 pb, compatível com *qnrB*. Seis desses isolados foram

selecionados para sequenciamento, sendo confirmada a detecção de genes *qnrB* (Figura 9).

Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de amplificação obtidos com primers específicos para os genes *qnrB* (513 pb). M: marcador 1 Kb plus (Invitrogen); 1: F0312; 2: F1111; 3: F2139; 4: F3679; 5: F5194. Temperatura de anelamento: 62°C.

As sequências obtidas foram traduzidas e alinhadas utilizando-se o programa Bioedit. O alinhamento da sequência da cepa controle, com aquelas obtidas dos isolados testados neste estudo evidencia que nenhum deles tem sequência idêntica àquela do controle (Figura 10). As sequências nucleotídicas dos isolados foram traduzidas utilizando-se o programa BioEdit, e a seguir foram comparadas com aquelas originais de cada variante *qnrB*, cujos depósitos estão disponíveis no GenBank. O fragmento estudo não permitiu a diferenciação entre *qnrB5* e *qnrB19*, *qnrB2* e *qnrB20*; portanto os isolados avaliados neste estudo podem corresponder a *qnrB5* ou *qnrB19* e *qnrB2* ou *qnrB20* (Tabela 5) .

Figura 10. Alinhamento da sequência de aminoácidos do gene *qnrB* do controle positivo e 6 isolados. Notar que o a sequencia do controle difere daquelas dos isolados.

Tabela 5. Análise da similaridade dos genes *qnrB* detectados.

Isolado	Descrição	Nº depósito GenBank	Similaridade
F0312	<i>Escherichia coli</i> R4525 QnrB19	EU432277.1	100%
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Berta QnrB5	DQ303919.1	100%
F1111	<i>Escherichia coli</i> QnrB20	AB379831.1	100%
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Keurmassar QnrB2	AM234698.1	100%
F2139	<i>Escherichia coli</i> R4525 QnrB19	EU432277.1	100%
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Berta QnrB5	DQ303919.1	100%
F3950	<i>Escherichia coli</i> QnrB20	AB379831.1	100%
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Keurmassar QnrB2	AM234698.1	100%
F3679	<i>Escherichia coli</i> QnrB20	AB379831.1	100%
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Keurmassar QnrB2	AM234698.1	100%
F5194	<i>Escherichia coli</i> QnrB20	AB379831.1	100%
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Keurmassar QnrB2	AM234698.1	100%
<i>qnrB</i> controle positivo	<i>Escherichia coli</i> QnrB4	DQ303921.2	100%

4.6 Avaliação da clonalidade dos isolados

Utilizando-se o ERIC-PCR e índice de similaridade mínimo de 93% para definição de grupos clonais, foram detectados sete grupos clonais designados ERIC1 a ERIC7 (Figura 11). Nos grupos clonais ERIC1 e ERIC2 há 100% de similaridade entre os perfis, enquanto nos demais grupos a similaridade variou de

93,1% a 96,6%. Digno de nota, o grupo clonal ERIC1 tem isolados de três hospitais distintos, caracterizando disseminação clonal entre hospitais A, B e D. Foi observado também disseminação intrahospitalar na instituição C, evidenciada pelos grupos clonais ERIC5, ERIC6 e ERIC7. Os genes *qnrB* estão presentes em diferentes grupos clonais, e apenas o grupo ERIC1 os genes *qnrB* foram detectados em todos os indivíduos. O isolado F4991, que não apresentou substituições nas regiões analisadas ou genes *qnr*, não pertence a nenhum dos sete grupos clonais.

Figura 11. Análise da clonalidade e correlação com a presença do gene *qnrB* e/ou fenótipos de AmpC plasmidial ou ESBL.

5 DISCUSSÃO

A taxa de resistência às cefalosporinas de terceira geração (34%) contrasta com a positividade do teste confirmatório para ESBL (15,1%). A resistência à cefoxitina, marcador para potenciais produtores de AmpC plasmidial, foi de 17,1%. Analisando esses dados em conjunto é plausível supor: que a detecção de ESBL possa ter sido prejudicada pela presença concomitante de AmpC plasmidial e que parte da amostragem expressa AmpC plasmidial (Coudron 2005; Robberts, Kohner et al. 2009). Os determinantes de betalactamases podem ser albergados no mesmo plasmídio no qual estão localizados os genes *qnr* ou em plasmídios distintos dentro da mesma célula bacteriana (Rodriguez-Martinez, Pascual et al. 2003).

Geralmente as mutações no gene *gyrA* estão localizadas nas porções N-terminal da proteína, e são mais frequentemente observadas nos códons 83 e 87. Estes resíduos de aminoácidos interagem com radicais nas posições R1 e R7 da estrutura das quinolonas (Cattoir and Nordmann 2009). Neste estudo observamos essas substituições (S83L e D87N) em todos os isolados exceto o F4991. Nossos achados são, portanto, concordantes com a literatura. Mutações nos códons 51, 67, 81, 82, 84, e 106 no gene *gyrA* também podem causar resistência as quinolonas (Vila, Ruiz et al. 1994; Friedman, Lu et al. 2001), mas não foi evidenciada em GyrA nenhuma outra substituição neste estudo.

Neste estudo foi detectada a substituição S80I em todos os isolados exceto o F4991, e em 11 isolados foi observada a substituição E84V em ParC. Sabidamente as substituições em ParC mais frequentemente associadas à resistência às quinolonas ocorrem nos códons 78, 80 e 84. Essas alterações geram resistências às quinolonas apenas quando associadas com a presença de mutação no gene *gyrA* (Breines, Ouabdesselam et al. 1997).

Os genes *qnrB* foram detectados em 20 (42,5%) isolados. As evidências acumuladas até hoje indicam que a presença dessa proteína está relacionada ao aumento da CIM para fluorquinolonas, mas não é suficiente, isoladamente, para conferir resistência a essa classe de antimicrobianos. Essas proteínas protegem a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição por quinolonas, (Martinez-Martinez, Pascual et al. 1998; Tran and Jacoby 2002; Robicsek, Jacoby et al. 2006). A expressão desses genes tem sido apontada como um dos fatores que facilitam a seleção de mutantes resistentes a altos níveis de fluorquinolonas, já que

sabidamente essa resistência se dá usualmente por um somatório de mutações em GyrA e ParC.

O isolado F4991 não apresenta substituições em ParC ou GyrA, tampouco genes *qnr*. Um possível mecanismo poderia ser a expressão de *aac(6')-Ib-cr*, que codifica enzima capaz de degradar ciprofloxacina e acetilar amicacina (Robicsek, Strahilevitz et al. 2006); entretanto o isolado é sensível à amicacina e à gentamicina, o que exclui essa possibilidade. Outra possibilidade poderiam ser a expressão de sistemas de efluxo como QepA, que tem codificação plasmidial (Yamane, Wachino et al. 2007). A permeabilidade reduzida em função da perda de porinas pode ser uma das explicações, mas a sensibilidade à cefoxitina torna pouco provável essa hipótese. A alternativa mais provável poderia ser a expressão de sistemas de efluxo, a exemplo do sistema AcrABTolC. Sabidamente mutações nos genes *marA*, *acrR*, *robA* e *soxS* de localização cromossômicas levam à superexpressão do sistema e, consequentemente, à resistência às fluoquinolonas (Hooper 2001; Cattoir and Nordmann 2009).

Não há um consenso quanto ao critério interpretativo para perfis gerados por ERIC-PCR, mas pela elevada sensibilidade do método, 100% de similaridade usualmente correlacionam-se com identidade clonal quando os isolados são reavaliados por PFGE (Silbert, Pfaller et al. 2004).

Neste trabalho observamos a presença de isolados de um mesmo grupo clonal em hospitais distintos – grupos clonais ERIC1 e ERIC2. Esse achado indica disseminação de *Escherichia coli* resistente a fluorquinolonas entre instituições hospitalares e aponta a necessidade de reavaliação da epidemiologia tradicional desses casos.

6 CONCLUSÕES

- Os genes *qnrA* e *qnrS* não foram detectados nos isolados avaliados neste estudo;
- Os genes *qnrB* foram detectados em 42,5% dos isolados;
- Em todos os isolados, exceto o F4991, foram detectadas as substituições S83L e D87N na GyrA;
- Em todos os isolados, exceto o F4991, foram detectadas as substituições S80I em ParC;
- Foi detectada a substituição E84V em ParC 23,4% dos isolados;
- Foi observada a disseminação dos grupos clonais ERIC1 e ERIC2 entre hospitais;
- Foi observada a disseminação intrahospitalar dos grupos clonais ERIC5, ERIC6 e ERIC7.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andriole, V. T. (2005). "The quinolones: past, present, and future." Clin Infect Dis **41 Suppl 2**: S113-119.
- Appelbaum, P. C. and P. A. Hunter (2000). "The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives." Int J Antimicrob Agents **16**(1): 5-15.
- Aydin, F., K. S. Gumussoy, et al. (2007). "Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR." J Appl Microbiol **103**(1): 27-35.
- Babinchak, T. J. and R. J. Fass (1989). "Quinolone antibacterial agents for the treatment of genitourinary tract infections." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **8**(12): 1111-1116.
- Barlow, A. M. (1963). "Nalidixic Acid in Infections of Urinary Tract. Laboratory and Clinical Investigations." Br Med J **2**(5368): 1308-1310.
- Biedenbach, D. J., M. Toleman, et al. (2006). "Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004)." Diagn Microbiol Infect Dis **54**(1): 13-21.
- Blondeau, J. M. (2004). "Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance." Surv Ophthalmol **49 Suppl 2**: S73-78.
- Blum, M. D., D. J. Graham, et al. (1994). "Temafloracin syndrome: review of 95 cases." Clin Infect Dis **18**(6): 946-950.
- Breines, D. M., S. Ouabdesselam, et al. (1997). "Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV." Antimicrob Agents Chemother **41**(1): 175-179.
- Cambau, E., C. Lascols, et al. (2006). "Occurrence of *qnrA*-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005." Clin Microbiol Infect **12**(10): 1013-1020.
- Cattoir, V. and P. Nordmann (2009). "Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update." Curr Med Chem **16**(8): 1028-1046.
- Cattoir, V., F. X. Weill, et al. (2007). "Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France." J Antimicrob Chemother **59**(4): 751-754.
- Cavaco, L. M., N. Frimodt-Moller, et al. (2008). "Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark." Microb Drug Resist **14**(2): 163-169.
- Cavaco, L. M., H. Hasman, et al. (2009). "*qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin." Antimicrob Agents Chemother **53**(2): 603-608.

- Champoux, J. J. (2001). "DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism." Annu Rev Biochem **70**: 369-413.
- Chenia, H. Y., B. Pillay, et al. (2006). "Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens." J Antimicrob Chemother **58**(6): 1274-1278.
- Coudron, P. E. (2005). "Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*." J Clin Microbiol **43**(8): 4163-4167.
- Cozzarelli, N. R. (1980). "DNA gyrase and the supercoiling of DNA." Science **207**(4434): 953-960.
- Cozzarelli, N. R. (1980). "DNA topoisomerases." Cell **22**(2 Pt 2): 327-328.
- Deguchi, T., M. Yasuda, et al. (1996). "Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: correlation of alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV with antimicrobial susceptibility profiles." Antimicrob Agents Chemother **40**(4): 1020-1023.
- Domagala, J. M., L. D. Hanna, et al. (1986). "New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay." J Med Chem **29**(3): 394-404.
- Drlica, K. (1999). "Mechanism of fluoroquinolone action." Curr Opin Microbiol **2**(5): 504-508.
- Drlica, K. and X. Zhao (1997). "DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones." Microbiol Mol Biol Rev **61**(3): 377-392.
- Ellington, M. J. and N. Woodford (2006). "Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure?" J Antimicrob Chemother **57**(6): 1026-1029.
- Everett, M. J., Y. F. Jin, et al. (1996). "Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals." Antimicrob Agents Chemother **40**(10): 2380-2386.
- Friedman, S. M., T. Lu, et al. (2001). "Mutation in the DNA gyrase A Gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region." Antimicrob Agents Chemother **45**(8): 2378-2380.
- Fukuda, H., S. Hori, et al. (1998). "Antibacterial activity of gatifloxacin (AM-1155, CG5501, BMS-206584), a newly developed fluoroquinolone, against sequentially acquired quinolone-resistant mutants and the *norA* transformant of *Staphylococcus aureus*." Antimicrob Agents Chemother **42**(8): 1917-1922.
- Gales, A. C., M. Castanheira, et al. (2012). "Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010)." Diagn Microbiol Infect Dis **73**(4): 354-360.

- Gay, K., A. Robicsek, et al. (2006). "Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*." Clin Infect Dis **43**(3): 297-304.
- Hata, M., M. Suzuki, et al. (2005). "Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b." Antimicrob Agents Chemother **49**(2): 801-803.
- Hooper, D. C. (1998). "Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance." Clin Infect Dis **27 Suppl 1**: S54-63.
- Hooper, D. C. (1999). "Mechanisms of fluoroquinolone resistance." Drug Resist Updat **2**(1): 38-55.
- Hooper, D. C. (2001). "Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones." Clin Infect Dis **32 Suppl 1**: S9-S15.
- Hopkins, K. L., R. H. Davies, et al. (2005). "Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments." Int J Antimicrob Agents **25**(5): 358-373.
- Hurst, M., H. M. Lamb, et al. (2002). "Levofloxacin: an updated review of its use in the treatment of bacterial infections." Drugs **62**(14): 2127-2167.
- Ito, A., K. Hirai, et al. (1980). "In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog." Antimicrob Agents Chemother **17**(2): 103-108.
- Jacoby, G. A., N. Chow, et al. (2003). "Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance." Antimicrob Agents Chemother **47**(2): 559-562.
- Jacoby, G. A., N. Gacharna, et al. (2009). "Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes." Antimicrob Agents Chemother **53**(4): 1665-1666.
- Jacoby, G. A., K. E. Walsh, et al. (2006). "qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance." Antimicrob Agents Chemother **50**(4): 1178-1182.
- Kehrenberg, C., S. Friederichs, et al. (2006). "Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis." J Antimicrob Chemother **58**(1): 18-22.
- Kleinschmidt, A. K., D. Lang, et al. (1962). "[Preparation and length measurements of the total desoxyribonucleic acid content of T2 bacteriophages]." Biochim Biophys Acta **61**: 857-864.
- Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, et al. (2010). "How antibiotics kill bacteria: from targets to networks." Nat Rev Micro **8**(6): 423-435.
- Kreuzer, K. N. and N. R. Cozzarelli (1980). "Formation and resolution of DNA catenanes by DNA gyrase." Cell **20**(1): 245-254.
- Lavilla, S., J. J. Gonzalez-Lopez, et al. (2008). "Prevalence of qnr genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain." J Antimicrob Chemother **61**(2): 291-295.

- Leshner, G. Y., E. J. Froelich, et al. (1962). "1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents." J Med Pharm Chem **91**: 1063-1065.
- Literak, I., M. Micudova, et al. (2012). "Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Fecal Bacteria from Rooks Commonly Wintering Throughout Europe." Microb Drug Resist.
- Mammeri, H., M. Van De Loo, et al. (2005). "Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe." Antimicrob Agents Chemother **49**(1): 71-76.
- Martinez-Martinez, L., A. Pascual, et al. (1998). "Quinolone resistance from a transferable plasmid." Lancet **351**(9105): 797-799.
- Minarini, L. A., L. Poirel, et al. (2008). "Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil." J Antimicrob Chemother **62**(3): 474-478.
- Navia, M. M., J. Ruiz, et al. (1999). "Analysis of the mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates of *Citrobacter freundii*." J Antimicrob Chemother **44**(6): 743-748.
- Paiva, M. C., A. M. Nascimento, et al. (2012). "The first report of the qnrB19, qnrS1 and aac(6)-Ib-cr genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **107**(5): 687-689.
- Palou, J., C. Pigrau, et al. (2011). "Etiology and sensitivity of uropathogens identified in uncomplicated lower urinary tract infections in women (ARESC Study): implications on empiric therapy." Med Clin (Barc) **136**(1): 1-7.
- Park, Y. J., J. K. Yu, et al. (2007). "Prevalence and diversity of qnr alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea." J Antimicrob Chemother **60**(4): 868-871.
- Peleg, A. Y. and D. C. Hooper (2010). "Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria." New England Journal of Medicine **362**(19): 1804-1813.
- Pereira, A. S., S. S. Andrade, et al. (2007). "Evaluation of the susceptibility profiles, genetic similarity and presence of qnr gene in *Escherichia coli* resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals." Braz J Infect Dis **11**(1): 40-43.
- Picao, R. C., L. Poirel, et al. (2008). "Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake." J Antimicrob Chemother **62**(5): 948-950.
- Piddock, L. J. (2002). "Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals." FEMS Microbiol Rev **26**(1): 3-16.
- Poirel, L., V. Cattoir, et al. (2008). "Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem?" Clin Microbiol Infect **14**(4): 295-297.
- Poirel, L., A. Liard, et al. (2005). "*Vibrionaceae* as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants." J Antimicrob Chemother **56**(6): 1118-1121.

- Reece, R. J. and A. Maxwell (1991). "The C-terminal domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase A subunit is a DNA-binding protein." Nucleic Acids Res **19**(7): 1399-1405.
- Reece, R. J. and A. Maxwell (1991). "DNA gyrase: structure and function." Crit Rev Biochem Mol Biol **26**(3-4): 335-375.
- Robberts, F. J., P. C. Kohner, et al. (2009). "Unreliable extended-spectrum beta-lactamase detection in the presence of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli* clinical isolates." J Clin Microbiol **47**(2): 358-361.
- Robicsek, A., G. A. Jacoby, et al. (2006). "The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance." Lancet Infect Dis **6**(10): 629-640.
- Robicsek, A., J. Strahilevitz, et al. (2006). "Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase." Nat Med **12**(1): 83-88.
- Robicsek, A., J. Strahilevitz, et al. (2006). "*qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States." Antimicrob Agents Chemother **50**(8): 2872-2874.
- Rodriguez-Martinez, J. M., A. Pascual, et al. (2003). "Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase." J Antimicrob Chemother **52**(4): 703-706.
- Ruiz, J. (2003). "Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection." J Antimicrob Chemother **51**(5): 1109-1117.
- Saito, R., K. Sato, et al. (2006). "[Mutations of DNA gyrase and topoisomerase IV in clinical isolates of fluoroquinolone-resistant *Proteus mirabilis*]." Jpn J Antibiot **59**(1): 41-43.
- Sanchez-Cespedes, J., S. Marti, et al. (2009). "Two chromosomally located *qnrB* variants, *qnrB6* and the new *qnrB16*, in *Citrobacter* spp. isolates causing bacteraemia." Clin Microbiol Infect **15**(12): 1132-1138.
- Silbert, S., M. A. Pfaller, et al. (2004). "Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli." Infect Control Hosp Epidemiol **25**(10): 847-851.
- Tran, J. H. and G. A. Jacoby (2002). "Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5638-5642.
- Veldman, K., W. van Pelt, et al. (2008). "First report of *qnr* genes in *Salmonella* in The Netherlands." J Antimicrob Chemother **61**(2): 452-453.
- Vila, J., J. Ruiz, et al. (1994). "Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs." Antimicrob Agents Chemother **38**(10): 2477-2479.
- Wang, M., Q. Guo, et al. (2009). "New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*." Antimicrob Agents Chemother **53**(5): 1892-1897.

- Wu, J. J., W. C. Ko, et al. (2007). "Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital." Antimicrob Agents Chemother **51**(4): 1223-1227.
- Xu, X., S. Wu, et al. (2007). "Prevalence and expression of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA1." Antimicrob Agents Chemother **51**(11): 4105-4110.
- Yamane, K., J. Wachino, et al. (2007). "New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate." Antimicrob Agents Chemother **51**(9): 3354-3360.
- Yoshida, H., M. Bogaki, et al. (1990). "Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **34**(6): 1271-1272.
- Yue, L., H. X. Jiang, et al. (2008). "Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*." Vet Microbiol **132**(3-4): 414-420.

ANEXO A

Tabela 7: Susceptibilidade antimicrobiana dos 47 isolados de *Escherichia coli* utilizados neste estudo.

Cepa	CF	FEP	FOX	CTR	TAX	AM	TZP	AMX	MEM	IMI	ERT	CIP	NOR	GEN	NA
F0312	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S
F2163	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F0871	R	R	R	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R	S	S
F1077	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F1111	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S
F0594	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S
F3679	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F3441	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F1442	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S
F3766	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S
F3280	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	R	S	S
F3950	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S
F3678	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F1606	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
F2139	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F0979	R	S	S	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R	S	S
F2904	R	S	I	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F3504	R	R	S	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R	S	S
F1596	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S
F4025	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F3581	R	R	R	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R	R	S
F0857	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F2947	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F1965	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F3525	R	R	S	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R	S	S
F3832	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S
F3866	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	R	S	S
F4002	R	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	I	S
F3738	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F1868	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F3688	R	R	S	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R	S	S
F4423	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S
F4448	R	I	I	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F3420	R	S	I	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F1893	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F2639	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F1623	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F1286	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S

F0223	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F4460	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F4520	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S
F4564	I	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S
F4609	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S
F4658	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F4890	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F4991	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
F5194	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S