

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANDRÉ LUIZ MACHADO VIANA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA AOS
ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS E QUINOLONAS EM
BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE
AMOSTRAS CLÍNICAS**

Alfenas/MG
2012

ANDRÉ LUIZ MACHADO VIANA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA AOS
ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS E QUINOLONAS EM
BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE
AMOSTRAS CLÍNICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Orientadora: Profa. Dra. Luciene Andrade da Rocha Minarini.

Co-orientadora: Profa. Dra. Marília Caixeta Franco Ariosi.

Alfenas/MG

2012

Viana, André Luiz Machado.

Detecção e caracterização de determinantes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e quinolonas em bactérias Gram-negativas isoladas de amostras clínicas. - 2012.

55 f. -

Orientador: Luciene Andrade da Rocha Minarini.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2012.

Bibliografia.

1. Quinolonas. 2. Enterobactérias. I. Minarini, Luciene Andrade da Rocha. II. Título.

CDD: 616.96901

ANDRÉ LUIZ MACHADO VIANA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA AOS
ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS E QUINOLONAS EM
BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE
AMOSTRAS CLÍNICAS**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Aprovada em:

Profa. Dra. Luciene Andrade da Rocha
Minarini

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Amanda Latercia Tranches
Dias

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

Instituição: UFMG

Assinatura:

Dedico este trabalho a Deus, a minha amada Olimpia pela dedicação e companheirismo. Aos meus queridos pais Aguida e Luiz, aos meus irmãos Hayane, Daniel e Gustavo pelo apoio e orações.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Luciene Andrade da Rocha Minarini, pela confiança depositada, incentivo e exemplo a ser seguido. Agradeço também pela oportunidade, orientação, conhecimentos científicos e compreensão durante o desenvolvimento deste estudo.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Marília Caixeta Franco Ariosa, pela disponibilização do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos para a execução de parte do trabalho.

À Profa. Dra. Cassia Carneiro Avelino pelo auxílio nas parcerias estabelecidas com os hospitais que cederam as amostras bacterianas avaliadas neste estudo.

Aos diretores e microbiologistas dos Laboratórios Clínicos do Hospital Santa Casa de Alfenas e Hospital Samuel Libânio, os quais acreditaram neste trabalho e cederam as amostras bacterianas para este estudo. Em especial, agradeço à Adriana Trindade Landre e ao João Marcelo de Almeida Matozzo, que foram responsáveis pela triagem e manutenção dos isolados clínicos.

À Profa. Dra. Ana Cristina Gales pela colaboração nas análises realizadas no Laboratório Alerta da UNIFESP - SP.

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, UNIFAL-MG, em especial ao Jorge Pamplona Pagnossa, Tamara Leite dos Santos e Gabriella Puccinelli pela ajuda nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos e experimentos de extração de plasmídeos.

Aos colegas do Laboratório Alerta, UNIFESP-SP, em especial ao Rodrigo Cayô da Silva e Rachel Girardello pela colaboração durante os experimentos de determinação de concentração inibitória mínima e técnica de sequenciamento.

À secretaria da pós-graduação, Thiago Bueno Pereira e Fabiana da Silva pela paciência e prontidão em atendimento.

Aos colegas de trabalho do Lacen-UNIFAL-MG, em especial à Maria Rita Rodrigues pelo apoio e confiança.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho e não foram aqui citados, minha eterna gratidão.

RESUMO

O presente trabalho teve como principal objetivo a detecção e caracterização dos genes plasmideais de resistência às quinolonas *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA*, e ainda, os genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*, codificadores de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) em coleções de enterobactérias isoladas a partir de amostras clínicas obtidas em dois hospitais do estado de Minas Gerais. No período de junho a outubro de 2010, foram isoladas 873 enterobactérias das quais 106 (12%) foram triadas para este estudo por apresentarem diminuição de sensibilidade ao ácido nalidíxico. A identificação bacteriana foi realizada através de testes bioquímicos convencionais e pelo sistema automatizado MicroScan - autoSCAN[®]-4. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi determinado pelo método de disco difusão e a concentração inibitória mínima foi determinada por microdiluição em caldo, como descrito e recomendado pelo "Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI", para os isolados produtores do gene *qnr* e seus respectivos transconjugantes. A detecção dos genes associados aos mecanismos de resistência estudados e a análise das mutações presentes nos genes cromossômicos *gyrA* e *parC* foram realizadas por PCR e sequenciamento. A extração de plasmídeos das bactérias e seus transconjugantes, contendo os determinantes *qnr*, foi realizada segundo a técnica de Kieser. Os resultados obtidos pela eletroforese em campo pulsado foram interpretados segundo os critérios estabelecidos por Tenover et al., 1995. A coleção bacteriana foi composta por: *Escherichia coli* (n=61; 57,6%), *Enterobacter cloacae* (n=23; 21,7%), *Klebsiella pneumoniae* (n=16; 15,1%), *Proteus mirabilis* (n=3; 2,8%), *Serratia marcescens* (n=2; 1,9%) e *Proteus vulgaris* (n=1; 0,9%). A maioria das enterobactérias (82%) foi isolada de infecções do trato urinário seguido de hemoculturas, swab de secreções, aspirado traqueal e ponta de cateter. De acordo com os critérios do CLSI, 94% (n=100) das enterobactérias foram resistentes ao ácido nalidíxico, 71% (n=75) foram resistentes à ciprofloxacina e 76% (n=81) apresentaram diminuição de sensibilidade a ceftazidima e/ou cefotaxima. A pesquisa de *qnr* resultou na detecção dos genes *qnrB* e *qnrS* em treze isolados, incluindo *E. cloacae* (n=6), *K. pneumoniae* (n=5) e *E. coli* (n=2). O gene *qnrB1* foi o mais prevalente, seguido de *qnrS1*, *qnrB2* e *qnrB19*. Nas amostras *qnr* positivas, foram detectados 4 isolados positivos para o gene *aac(6')-Ib-cr*, 6 isolados para *bla_{SHV}*, 11 isolados para *bla_{CTX-M}* e 11 isolados para o gene *bla_{TEM}*. O determinante *qepA* não foi detectado. Este trabalho indica a disseminação de mecanismos de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos (PMQR) em amostras clínicas no Brasil. A coexistência de genes ESBL e PMQR demonstra a complexidade dos plasmídeos carreando determinantes de resistência entre os membros da família *Enterobacteriaceae*.

Palavras-chave: Quinolonas. Enterobactérias. Determinante *qnr*. ESBL.

ABSTRACT

The main objective of this work was to characterize the *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* plasmid genes, and also the *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes, encoding for extended spectrum β -lactamases - ESBL in a collection of Enterobacteriaceae isolated from clinical samples obtained in two hospitals in the state of Minas Gerais, Brazil. A total of 873 Enterobacteriaceae were isolated in the period of June to October 2010 of which 106 (12%) were screened for this study showing decreased susceptibility to nalidixic acid. The bacterial identification was performed by conventional biochemical tests and by the automated system MicroScan autoSCAN[®]-4. The antimicrobial susceptibility profile was determined by diffusion disk and the minimum inhibitory concentration was determined by broth microdilution for the isolates carrying the *qnr* genes e their respective transconjugants according with the recommendations of the "Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI". PCR and sequencing were performed to detect plasmid-mediated quinolone resistant (PMQR) genes as well as the analysis of mutations in chromosomal encoded genes, *gyrA* and *parC* by. The extraction of plasmids and their transconjugants containing *qnr* determinants was performed using the technique of Kieser. The results obtained by pulsed field gel electrophoresis were interpreted according with Tenover et al., 1995. The collection was composed as follow: *Escherichia coli* (n = 61, 57.6%), *Enterobacter cloacae* (n = 23, 21.7%), *Klebsiella pneumoniae* (n = 16, 15.1%), *Proteus mirabilis* (n= 3, 2.8%), *Serratia marcescens* (n = 2, 1.9%) and *Proteus vulgaris* (n = 1, 0.9%). Most of the enterobacteria (82%) was isolated from urine followed by blood, swab of secretions, tracheal aspirate and catheter tip. A total of 100 (94%) isolates were resistant to nalidixic acid, 75 (71%) were resistant to ciprofloxacin and 81 (76%) showed reduced susceptibility to ceftazidime and/or cefotaxime. The *qnr* plasmidic determinant research resulted in the detection of *qnrB* and *qnrS* genes in 13 isolates, including *E. cloacae* (n=6), *K. pneumoniae* (n=5) and *E. coli* (n=2). *QnrB1* was the most prevalent gene, followed by *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19*. In four *qnr* positive isolates also carried the *aac(6')-Ib-cr* gene, to *bla*_{SHV-like} (n=6), *bla*_{CTX-M} (n=11) and *bla*_{TEM} gene (n=11). The *qepA* gene was not detected. This work indicates the dissemination of PMQR in clinical specimens in Brazil. The coexistence of ESBL and PMQR genes demonstrate the complexity of plasmids carrying resistant genes among members of the family *Enterobacteriaceae*.

Keywords: Quinolone. Enterobacterial. *Qnr* determinants. ESBL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura básica das quinolonas.....	10
Figura 2- Representação esquemática do perfil de macrorestrição do plasmídeo pMG252.....	18

1	INTRODUÇÃO	9
2.	REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1	QUINOLONAS	10
2.1.1	Mecanismo de ação	12
2.1.2	Epidemiologia da resistência	13
2.1.3	Resistência às quinolonas em enterobactérias	14
2.1.3.1	Resistência às quinolonas de origem cromossômica	15
2.1.3.2	Resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR).....	17
2.1.3.2.1	Determinante Qnr	17
2.1.3.2.2	Determinante AAC(6')-Ib-cr	21
2.1.3.2.3	Determinante QepA.....	22
2.1.4	Resistência aos β -lactâmicos e quinolonas em enterobactérias	23
3	RESULTADOS	26
3.1	Artigo	26
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

O início da utilização de antibióticos na terapêutica representou um marco histórico na revolução da saúde pública. Inicialmente, a terapia antimicrobiana dificilmente apresentava falhas em decorrência da resistência bacteriana. Atualmente, a descoberta de novos antibióticos configura um desafio frente à emergência de linhagens bacterianas multirresistentes.

O laboratório de microbiologia clínica, por meio de testes que identificam a espécie bacteriana envolvida no processo infeccioso e seu perfil de sensibilidade aos antibióticos, desempenha papel fundamental para obtenção do sucesso terapêutico a partir do uso racional dos agentes antimicrobianos. Os antibióticos das classes quinolonas e β -lactâmicos estão entre os agentes terapêuticos mais importantes e utilizados nas infecções hospitalares e comunitárias.

A ocorrência frequente de quadros infecciosos envolvendo enterobactérias multirresistentes representa um grave e atual problema de saúde pública mundial, tendo em vista a inexistência de uma terapia antimicrobiana eficaz. Em microrganismos Gram-negativos, a resistência à classe das quinolonas é principalmente atribuída a alterações nas enzimas DNA girase e topoisomerase IV, envolvidas no processo de replicação bacteriana, e/ou à perda da expressão de proteínas de membrana externa, como as porinas. Para os antibióticos β -lactâmicos, o principal mecanismo de resistência refere-se à produção de enzimas denominadas β -lactamases ou a alterações estruturais nas proteínas ligadoras da penicilina (PBPs), alvos de ligação desses antibióticos.

Pelo exposto, estudos regionais fenotípicos e moleculares que detectam e caracterizam os determinantes de resistência aos antibióticos da classe das quinolonas e β -lactâmicos auxiliam a conduta terapêutica, estabelecendo-se estratégias racionais na utilização de antimicrobianos. Assim, esses estudos contribuem para obtenção do sucesso terapêutico e diminuição da seleção de linhagens resistentes pelo efeito da pressão seletiva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUINOLONAS

Os antimicrobianos da classe das quinolonas estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados em todo o mundo no tratamento das infecções bacterianas. Sua ampla utilização ocorre, principalmente, devido a seu amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sua eficácia e conveniências farmacocinéticas (BALL, 2000; BAMBEKE et al., 2005).

Quinolonas são moléculas sintéticas produzidas por modificações estruturais no núcleo básico da 4-quinolona, formado por dois anéis hexagonais com um átomo de nitrogênio na posição R1 e um átomo de oxigênio na posição R4 da molécula (BLONDEAU, 2004). A estrutura básica das quinolonas está demonstrada na Figura 1.

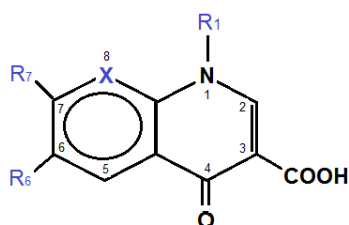


Figura 1- Estrutura básica das quinolonas (Adaptado de PETRI, 2011).

A primeira quinolona foi sintetizada em 1962, por Lescher e colaboradores e, em 1967, foi introduzida no mercado para uso clínico. Durante a síntese de compostos antimaláricos, o subproduto da síntese da cloroquina apresentou atividade antibacteriana, sendo denominado ácido nalidíxico, o primeiro representante da classe das quinolonas (LESCHER et al., 1962).

A aplicação clínica do ácido nalidíxico se restringiu ao tratamento das infecções não complicadas do trato urinário devido a seu restrito espectro de atividade e limitações farmacocinéticas, como por exemplo, concentração sérica

reduzida após sua administração oral. Modificações estruturais na molécula originaram o ácido oxolínico e a cinoxacina, porém essas novas quinolonas não apresentaram vantagens terapêuticas em relação ao ácido nalidíxico. Avanços mais importantes na ampliação do espectro de atividade, incluindo atividade antipseudomonas, foram alcançados com o ácido pipemídico, originado a partir da introdução de um grupo piperazínico na posição R7 do núcleo básico das quinolonas. Apesar das modificações estruturais, essa geração de fármacos permaneceu pouco aplicada à terapia clínica devido a sua baixa biodisponibilidade sistêmica e risco de toxicidade renal (APPELBAUM; HUNTER, 2000; EMMERSON; JONES, 2003; BLONDEAU, 2004; BAMBEKE, 2005).

Ampliação significativa da potência e do espectro antibacteriano só foi possível a partir de novas modificações na estrutura básica da 4-quinolona realizadas na segunda geração da classe. As fluoroquinolonas foram obtidas pela adição de um átomo de flúor na posição R6 e de um grupo piperazinílico na posição R7 do núcleo básico. A fluoração na molécula aumentou, significativamente, a atividade antibacteriana contra Gram-negativos e Gram-positivos e tornou a molécula mais solúvel em meio aquoso (APPELBAUM; HUNTER, 2000; OWENS; AMBROSE, 2000; FRANZCO, 2007).

A norfloxacinina foi a primeira quinolona introduzida no tratamento de conjuntivites bacterianas. Sua solubilidade em soluções oftalmológicas e ação contra Gram-negativos, incluindo atividade antipseudomonas, permitiu o aumento das possibilidades terapêuticas das quinolonas (BLONDEAU, 2004).

A adição de um radical ciclopropil na posição R1 e de piridobenzoxazina entre R1 e R8 originou a ciprofloxacina e ofloxacina, respectivamente. O desenvolvimento desses últimos fármacos representou um grande avanço terapêutico já que apresentaram amplo espectro de atividade antimicrobiana e mostraram-se mais eficazes quando administrados via oral (BLONDEAU, 2004; FRANZCO, 2007).

Fluoroquinolonas são classicamente utilizadas em infecções do trato urinário e no tratamento de doenças sexualmente transmissíveis. Recentemente, esses fármacos também são empregados em infecções gastrointestinais, na pele, em tecidos moles e em algumas infecções respiratórias. Fluoroquinolonas mais recentes, tais como ofloxacina, gatifloxacina e moxifloxacina, mostraram-se candidatos promissores no tratamento politerápico da tuberculose (RUSTOMJEE et al., 2008).

Os efeitos adversos das fluoroquinolonas são geralmente pouco frequentes e toleráveis. Entretanto, efeitos mais graves pelo uso da trovafloxacin, como toxicidade hepática e pancreática, a anemia hemolítica autoimune pela temafloxacin e a hipoglicemia e fototoxicidade pela clinafloxacin, ocasionaram a retirada desses fármacos do mercado (FRANZCO, 2007).

Gatifloxacin, moxifloxacin, gemifloxacin e garenoxacin integram a quarta geração da classe quinolonas. Essas novas moléculas apresentam atividade potencializada contra cocos Gram-positivos, incluindo pneumococos, e contra anaeróbios (APPELBAUM; HUNTER, 2000; OWENS; AMBROSE, 2000; JONES; BIEDENBACH, 2003; LIEBERTRAU et al., 2003).

2.1.1 Mecanismo de ação

As quinolonas interagem com a DNA girase (topoisomerase II) e a topoisomerase IV, enzimas importantes na manutenção conformacional da topologia do DNA bacteriano nos processos de transcrição e replicação (REECE, MAXWELL, 1991; BOLON, 2011).

A DNA girase é formada por duas subunidades GyrA e duas subunidades GyrB, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. A subunidade GyrA confere ao DNA bacteriano uma forma super-helicoidal negativa necessária para ocorrer a ruptura dos filamentos de DNA a fim de expor o código genético e, conseqüentemente, a replicação ou transcrição do DNA bacteriano (DRLICA; ZHAO, 1997).

A topoisomerase IV, codificada pelos genes *parC* e *parE*, também é constituída de quatro subunidades que catalisam a separação do DNA bacteriano resultante do processo de replicação (HOOPER, 2000a; BOLON, 2011).

As quinolonas interagem com as enzimas topoisomerasas do cromossomo bacteriano formando um complexo ternário quinolona-enzima-DNA causando rupturas em um único filamento que impede a passagem contínua de DNA nos processos de transcrição e replicação. Em concentrações mais elevadas de

quinolonas, os dois filamentos são rompidos, o processo torna-se irreversível resultando na morte da célula bacteriana (REECE; MAXWELL, 1991).

2.1.2 Epidemiologia da resistência

O uso crescente das fluoroquinolonas na terapia empírica em âmbito hospitalar e comunitário é resultado de seu amplo espectro de ação contra grande variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, de conveniências terapêuticas com um número relativamente pequeno de efeitos colaterais e da alta frequência de resistência a outras classes de antibióticos (NEUHAUSER et al., 2003; CHENIA; PILLAY; PILLAY, 2006). O elevado consumo de quinolonas, especialmente fluoroquinolonas e sua utilização inadequada são apontados como as principais causas do aparecimento de resistência bacteriana a esta classe de antibióticos (HOOPER, 2002; CHENIA; PILLAY; PILLAY, 2006; BERGMAN et al., 2009).

Nos últimos anos, desde a introdução das fluoroquinolonas na terapêutica, a resistência bacteriana a esta classe de antibióticos tem aumentado significativamente em vários países e trata-se, geralmente, de linhagens não clonais, isto é, o desenvolvimento da resistência está ocorrendo continuamente em linhagens que anteriormente eram sensíveis às quinolonas (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Um recente estudo mundial de monitoramento de perfis e percentuais de resistência antimicrobiana detectou um reduzido percentual de *Escherichia coli* sensível às quinolonas (8-21,6%) em uma coleção de 6.644 enterobactérias isoladas entre os anos 2002 a 2007 a partir de infecções intra-abdominais complicadas e resistentes a pelo menos duas classes de antibióticos (HOBAN et al., 2010). Na França, Decousser e colaboradores (2010) realizaram um estudo que monitorou a sensibilidade aos antimicrobianos em enterobactérias e detectaram um aumento significativo dos percentuais de resistência no período de 1996 a 2007. Neste estudo foram avaliadas 7.708 enterobactérias isoladas de hemocultura de pacientes hospitalizados. Neste período, foi observada uma redução na sensibilidade às fluoroquinolonas entre *Enterobacteriaceae* (96 para 90%), sendo que em *E. coli*

essa redução foi ainda mais significativa (98 para 89%). Na Irlanda, foi observado um aumento de resistência à ciprofloxacina de 5% para 15% entre os anos 2004 a 2007 (AOGÁIN, 2010). Yu e colaboradores (2011) detectaram em um hospital pediátrico na China 64,5% de resistência à ciprofloxacina em isolados de *S. typhimurium*.

Na América Latina foi realizado, em 2008, um estudo dos perfis de sensibilidade aos antimicrobianos que avaliou 1.003 enterobactérias isoladas de infecções intra-abdominais em 23 centros médicos de 10 países. Neste trabalho foi encontrado um alto percentual de patógenos resistentes às fluoroquinolonas e cefalosporinas de amplo espectro. Nessas enterobactérias, as taxas de sensibilidade à ciprofloxacina foram de 60% em *Escherichia coli*, 58% em *Klebsiella pneumoniae* e 87% em *Enterobacter cloacae* (VILLEGAS et al., 2011). Um estudo realizado em 2004 pelo SENTRY, “Antimicrobial Surveillance Program”, revelou que o Brasil está entre os países da América Latina com as mais altas taxas de resistência às quinolonas. Nesse último estudo, isolados clínicos de *Enterobacter* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* obtidos em laboratórios brasileiros no ano de 2001 apresentaram taxas entre 8,9% a 17,5% de resistência e/ou diminuição de sensibilidade à ciprofloxacina (SADER et al., 2004).

2.1.3 Resistência às quinolonas em enterobactérias

Enterobactérias são bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos membros da família *Enterobacteriaceae* encontrados em reservatórios ambientais como solo, água e vegetais e na microbiota do trato intestinal de seres humanos e animais. Os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* e *Shigella* pertencem a esse grupo e são encontrados com frequência causando infecções intestinais, urinária, respiratória, meningite e sepse, em âmbito hospitalar e comunitário (FARMER; BOATWRIGHT; JANDA, 2007).

O fenótipo de resistência às quinolonas é o resultado da interação de diferentes mecanismos atuando em combinação ou isoladamente. Atualmente, os três mecanismos de resistência às quinolonas mais importantes são: alterações nas enzimas DNA girase e topoisomerase IV; impermeabilidade de membrana externa e/ou hiperexpressão de bomba de efluxo e mecanismos de resistência às quinolonas

mediados por plasmídeos (PMQR), tais como os determinantes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA* (HOOPER, 2003; RUIZ, 2003).

O principal mecanismo de resistência às quinolonas é o acúmulo de mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, codificadores das enzimas alvos da ação desses fármacos (DNA girase e topoisomerase IV). Para apresentar um nível de resistência clinicamente significativo, são necessárias múltiplas mutações. Entretanto, sabe-se que esses eventos genéticos são raros, o que contrasta com a alta frequência de resistência encontrada nos isolados clínicos. Nesse contexto, a alta prevalência de resistência às quinolonas é melhor explicada quando há a presença de outros mecanismos de resistência, horizontalmente transferíveis, conferindo baixos níveis de resistência às quinolonas, porém favorecendo a sobrevivência das células bacterianas enquanto ocorrem mutações de forma sequencial nos genes codificadores das enzimas alvos das quinolonas (MARTINEZ-MARTINEZ; PASCUAL; JACOBY, 1998; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

2.1.3.1 Resistência às quinolonas de origem cromossômica

Em bactérias Gram-negativas, o principal alvo das quinolonas é a DNA girase, enquanto que em Gram-positivas, a enzima topoisomerase IV é preferencialmente inibida. Em algumas bactérias Gram-positivas, a DNA girase pode funcionar como o principal alvo de algumas quinolonas, como por exemplo, a esparfloxacina. Além disso, quinolonas de quarta geração, tais como, moxifloxacina e clinafloxacina apresentam afinidade semelhante para as duas enzimas (MOON et al., 2010).

Mutações nos genes codificadores dessas enzimas podem acarretar em mudanças na sequência de aminoácidos na sua estrutura primária e, conseqüentemente, alterar sua conformação espacial, o que poderia diminuir a afinidade de ligação entre a DNA girase ou topoisomerase IV e as quinolonas, resultando no desenvolvimento da resistência bacteriana (RUIZ, 2003; HAWKEY; JONES, 2009). Entretanto, os níveis de resistência causados pelas mutações nesses genes dependem da posição do códon alterado. Níveis de resistência clinicamente importantes são ocasionados por alterações na região da enzima que

interage com as moléculas de quinolonas. Esta porção da enzima é designada região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) (CABRAL et al., 1997; OGBOLU et al., 2011).

Em *E. coli*, as mutações mais frequentes envolvidas na resistência às quinolonas e fluoroquinolonas ocorrem no gene *gyrA*, principalmente na porção QRDR. Alterações nos códons 83 e 87 são as mais frequentes detectadas nos isolados clínicos resistentes às fluoroquinolonas e em seguida aparecem as alterações nos códons 81 e 84. Alterações nos códons 51, 67, 82 e 106 também conferem resistência, entretanto, não foram detectados em isolados de origem clínica (WEIGEL; STEWARD; TENOVER, 1998; RUIZ, 2003; MOON et al., 2010).

As mutações no gene *gyrB* são tão frequentes quanto as que ocorrem no gene *gyrA*, porém estas últimas são detectadas com maior frequência nos isolados clínicos. Na subunidade de *gyrB* da enzima DNA girase, mutações no códon 426 foram descritas conferindo resistência às fluoroquinolonas enquanto que as alterações ocorridas no códon 447 atuaram conferindo resistência apenas ao ácido nalidíxico (YOSHIDA et al., 1991; LEE et al., 2005).

Em *E. coli*, as mutações nos códons 78, 80 e 84 no gene *parC* ocorrem com maior frequência que as detectadas no códon 445 de *parE*. As alterações em topoisomerase IV de isolados clínicos de enterobactérias foram detectadas apenas em linhagens bacterianas que também apresentaram mutações em *gyrA* ou *gyrB* (RUIZ, 2003; LEE et al., 2005).

Geralmente, uma única mutação no gene *gyrA* em enterobactérias leva à diminuição de sensibilidade ao ácido nalidíxico. Porém, alterações adicionais em *gyrA*, *gyrB* ou *parC* podem conferir níveis elevados de resistência às fluoroquinolonas, como ciprofloxacina e levofloxacina (BARNARD; MAXWELL, 2001).

2.1.3.2 Resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR)

2.1.3.2.1 Determinante Qnr

Durante a realização de experimentos para caracterização do plasmídeo pMG252 em meados dos anos 90, Luis Martínez-Martínez e colaboradores (1998) perceberam que tratava-se de um elemento móvel que abrigava vários genes de resistência, incluindo um novo determinante que codificava níveis de resistência à quinolona, fenômeno não evidenciado até então. Surpreendentemente, detectou-se aumento expressivo da concentração inibitória mínima, entre 8 e 64 vezes, para ácido nalidíxico em transconjugante obtido após conjugação, usando linhagem receptora caracterizada por ter suas porinas intactas. Tal plasmídeo foi inicialmente extraído de uma linhagem de *Klebsiella pneumoniae* isolada de urocultura, em 1994, de um paciente que recebeu atendimento no Centro Médico da Universidade de Alabama, em Birmingham.

Após clonagem e sequenciamento, a sequência do gene que expressou o fenótipo de diminuição da sensibilidade às quinolonas foi determinada. A proteína codificada por esse gene apresentou 218 aminoácidos e foi designada Qnr, o que abrevia o termo “resistente à quinolona”. Tal expressão não se trata exatamente de resistência clínica; seu significado está relacionado com a diminuição de sensibilidade às quinolonas (TRAN; JACOBY, 2002; ROBICSEK; JACOBY; HOOPER, 2006). Atualmente, sabe-se que mutações em genes cromossômicos codificadores de topoisomerasas II e IV ocorrem com maior frequência em linhagens selvagens que apresentam plasmídeo contendo o gene *qnr*, desenvolvendo, dessa forma, resistência clínica (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; PASCUAL; JACOBY, 1998).

Decorridos quatro anos após a descoberta do gene *qnr* no plasmídeo pMG252, Tran e Jacoby caracterizaram, por meio de experimentos de clonagem, seu contexto genético (TRAN; JACOBY, 2002). Nessa descrição, o gene *qnr* estava localizado no integron In6 e In7, na posição imediatamente anterior ao gene *qacEΔ1* e *sul1*, determinantes de resistência aos compostos de amônio quaternário e

sulfonamidas, respectivamente, seguido pelo elemento conservado ISCRI (Figura 2). Devido à emergência de novas variantes do gene *qnr*, a sequência inicialmente descrita foi designada *qnrA1*

O produto do gene *qnr* é uma proteína pertencente à família de pentapeptídeos repetidos. Duas proteínas dessa família apresentam grande importância no estudo do mecanismo de ação das proteínas Qnr. O McbG é um desses componentes, cuja função é proteger a célula bacteriana da produção de microcina B17 (MccB17), um pentapeptídeo de 31 kilodaltons que bloqueia a replicação do DNA, de forma semelhante ao mecanismo da ciprofloxacina. Outro membro importante é a proteína MfpA, produto de um gene clonado de *Mycobacterium smegmatis*. A presença de MfpA na célula bacteriana aumenta em 4 vezes a resistência à ciprofloxacina, quando o gene que codifica MfpA é inativado, esse aumento de resistência desaparece. O mecanismo desta proteção à bactéria conferida pelo MfpA ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que essa proteína não está relacionada à bomba de efluxo ou permeabilidade de membrana (TRAN; JACOBY, 2002).

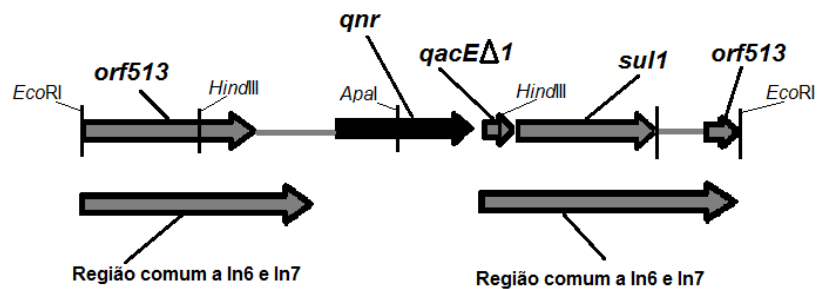


Figura 2. Representação esquemática do perfil de macrorestrição do plasmídeo pMG252. Adaptado de TRAN; JACOBY, 2002.

O mecanismo de ação da proteína Qnr está relacionado à proteção da DNA girase e/ou topoisomerase IV da inibição por quinolonas. A proteína Qnr interage com as topoisomerasas de forma competitiva com o DNA bacteriano, o que confere resistência ao ácido nalidíxico e diminuição de sensibilidade às fluoroquinolonas

(TRAN; JACOBY, 2002; ROBICSEK; JACOBY; HOOPER, 2006; STRAHILEVITZ et al., 2009).

Após a descrição do primeiro relato do determinante *qnrA*, foi detectado em *Klebsiella oxytoca* isolada em uma província da China, o variante *qnrA2*, o qual codifica uma proteína, QnrA2, que se distingue por quatro aminoácidos da proteína QnrA1 (NORDMAN; POIREL, 2005). Poirel e colaboradores realizaram, em 2005, um estudo com 48 isolados de bactérias Gram-negativas obtidas de fontes ambientais, objetivando elucidar a origem dos genes *qnr*. Esse estudo resultou na descoberta de três novas variantes *qnrA*, *qnrA3*, *qnrA4* e *qnrA5*, presentes no cromossomo de *Shewanella algae*, linhagem considerada provável reservatório aquático do determinante *qnr* (POIREL et al., 2005).

Em 2003, linhagens de *Shigella flexneri* isoladas em um surto de enterocolite no Japão apresentaram resistência à quinolona mediada por um único plasmídeo conjugativo. Experimentos de clonagem identificaram o gene, posteriormente denominado *qnrS1* o qual codifica uma proteína com 218 aminoácidos da família de pentapeptídeos repetidos, apresentando 59% de identidade com a proteína QnrA1 (HATA et al., 2005).

Durante estudos de PMQR em linhagens de *Klebsiella pneumoniae* obtidas na Índia, foram encontrados isolados que apresentaram plasmídeos que conferiam diminuição de sensibilidade às quinolonas determinada por um gene com sequência nucleotídica diferente da descrita previamente para os genes *qnrA* ou *qnrS*. A proteína codificada por esse gene foi chamada de QnrB1 e apresentou 214 aminoácidos com identidade de 39,5% e 37,4%, respectivamente, quando comparada ao QnrA e QnrS. O determinante *qnrB* apresenta maior número de variantes do que os genes *qnrA* e *qnrS* (*qnrB1-qnrB24*) (JACOBY et al., 2006; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). De acordo com banco de dados disponível em <http://www.lahey.org/qnrStudies>, até o momento, foram detectadas e publicadas 42 variantes do gene *qnrB* (*B1-B42*), 5 variantes de *qnrS* (*S1-S5*) (dados extraídos em 25/11/2011), sendo estas associadas a sequências de inserção (IS), responsáveis pela mobilização do gene.

Em 2009, uma linhagem de *Proteus mirabilis* isolada na China apresentou PMQR, ao qual não estavam associados aos determinantes *qnrA*, *qnrB* ou *qnrS*. O produto codificado pelo gene responsável por esse fenótipo, denominado QnrC, resultou numa proteína da família de pentapeptídeos repetidos com 221

aminoácidos, compartilhando 64, 42 e 59% de identidade com as proteínas QnrA1, QnrB1 e QnrS1, respectivamente (WANG et al., 2009). Nesse mesmo ano, Cavaco e colaboradores (2009) também relataram na China a presença de um novo determinante plasmideal de resistência às quinolonas encontrado em quatro isolados de *Salmonella enterica*. Este novo gene que codificou uma proteína de 214 aminoácidos recebeu o nome *qnrD*. A proteína *qnrD* apresentou 48, 61 e 32% de similaridade com *qnrA1*, *qnrB1* e *qnrS1*, respectivamente.

Os genes *qnr*, de modo geral, atuam diminuindo a sensibilidade das enterobactérias às fluoroquinolonas, podendo conferir resistência ao ácido nalidíxico, quando são considerados os pontos de corte estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011).

Transconjugantes avaliados após o recebimento do plasmídeo pMG252 contendo o gene *qnrA1*, demonstraram aumento em 8 vezes da CIM para ácido nalidíxico (4 para 32 µg/mL) e aumento em 33 vezes da CIM para ciprofloxacina (0,015 para 0,5 µg/mL). Já quando a receptora recebeu o plasmídeo pMG298 carreando o gene *qnrB1*, houve aumento em 4 vezes da CIM para ácido nalidíxico (4 para 16 µg/mL) e aumento em 67 vezes da CIM para ciprofloxacina (0,015 para 1 µg/mL). Variação semelhante foi constatada quando transconjugantes contendo os novos variantes *qnrC* e *qnrD* foram avaliados (WANG et al., 2009, CAVACO et al., 2009).

Os determinantes *qnr* já foram encontrados em países de todos os continentes. Devido às dificuldades de triagem desse mecanismo de resistência por metodologias fenotípicas, a frequência real dos genes *qnr* não é totalmente conhecida. Trabalhos científicos têm indicado a prevalência dos genes *qnr* variando de menos de 1% a mais de 50%, dependendo do microrganismo avaliado e mecanismos de resistência presentes (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

No Brasil, o gene *qnr* (*qnrA*) foi reportado pela primeira vez em 2007 por Minarini e colaboradores em *Enterobacter cloacae* isolada em 2005 em uma amostra de ferida de um homem de 62 anos (MINARINI; GALES; DARINI, 2007). Após este relato, o determinante *qnrA* foi descrito em *E. coli* (CASTANHEIRA et al., 2007; PEREIRA et al., 2007) e *S. enteritidis* (FERRARI et al., 2011). Os determinantes *qnrB2* e *qnrB8* foram encontrados em linhagens de *E. coli*, *C. freundii* e *K. pneumoniae* (MINARINI et al., 2008) e, recentemente, o gene *qnrB19* foi detectado em *S. corvallis* (FERRARI et al., 2011). Dos determinantes *qnr* o gene *qnrS* foi o

menos detectado no Brasil. Até o momento, sua presença foi relatada em um isolado de *K. pneumoniae* isolada no estado de São Paulo (NICOLETTI; PICÃO, 2009).

2.1.3.2.2 Determinante AAC(6')-Ib-cr

Em 2005, Robicsek e colaboradores (2006), durante estudos com plasmídeos contendo o gene *qnrA* em amostras de Shanghai, detectaram e caracterizaram um novo determinante plasmideal que conferia diminuição de sensibilidade à ciprofloxacina. Pode-se observar que diferentes plasmídeos que abrigavam o gene *qnrA1* conferiam níveis mais elevados de resistência às fluoroquinolonas, fato não detectado anteriormente. Este encontro incentivou os pesquisadores a tentarem explicar o motivo dessas variações de CIM obtidas. Vale ressaltar que linhagens selvagens de *E. coli* geralmente apresentam CIM para ciprofloxacina de 0,008 µg/mL e, que, a maioria dos estudos reporta transconjugantes *qnrA1* com valores de CIM próximas a 0,25 µg/mL. No entanto, os transconjugantes obtidos das enterobactérias de Shanghai apresentaram CIM de até 2,0 µg/mL (ROBICSEK et al., 2006, STRAHILEVITZ et al., 2009).

Uma possível causa para essa variação do nível de resistência seria o aumento da expressão ou do número de cópias do gene *qnrA1*, porém experimentos mais específicos descartaram essa possibilidade. Após a caracterização do plasmídeo contendo o gene *qnrA1*, constatou-se que este estava inserido num integron que apresentava múltiplos genes de resistência, incluindo o gene *aac(6')-Ib*, que foi identificado como um dos responsáveis pelo aumento de resistência à ciprofloxacina. O novo gene então denominado *aac(6')-Ib-cr* (do inglês, ciprofloxacin resistance) codifica uma enzima que contém duas alterações de aminoácidos, Trp102Arg e Asp179Tyr, em relação a sua sequência original (ROBICSEK et al., 2006).

O gene *aac(6')-Ib-cr* codifica um enzima acetiltransferase que inativa aminoglicosídeos e confere diminuição de sensibilidade à ciprofloxacina e norfloxacina pela acetilação do átomo de nitrogênio no grupo piperazinil. O aumento da CIM para ciprofloxacina conferido pela acetiltransferase é geralmente menor que

o conferido pelos genes *qnr*. Porém, a importância desse gene foi destacada quando ensaios de mutagênese demonstraram que isolados de *E. coli* com o gene variante "cr" foram recuperados em concentração de 1,6 µg/mL de ciprofloxacina, concentração muito próxima àquela alcançada durante a terapia clínica. Esse resultado sinalizou a possibilidade de falência na terapia com ciprofloxacina ou norfloxacina. Uma enterobactéria portadora do gene que codifica a acetilase mutada pode conseguir aumentar sua sobrevivência na presença do antibiótico em concentrações terapêuticas e selecionar células bacterianas com mutações nos genes codificadores da DNA girase e/ou topoisomerase IV (ROBICSEK et al., 2006, STRAHILEVITZ et al., 2009).

O gene *aac(6')-Ib-cr* está amplamente distribuído nos continentes. Em um estudo com *K. pneumoniae* isoladas na Eslovênia durante os anos de 2000 à 2005, foi demonstrada a prevalência de 34% para o determinante *aac(6')-Ib-cr*. Em 2009, foram publicados dois estudos demonstrando alta prevalência de PMQR, detectando-se o gene *aac(6')-Ib-cr* na frequência de 19% e 18,8% nos isolados de enterobactérias na França e China, respectivamente. O gene *aac(6')-Ib-cr* é relatado com frequência associado a outros mecanismos PMQR (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *qepA*). (AVGUŠTIN et al., 2007; MA et al., 2009; CRÉMET et al., 2011; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

2.1.3.2.3 Determinante QepA

Mecanismos de resistência relacionados ao efluxo de antibióticos da célula bacteriana podem ser codificados por DNA cromossômico ou plasmideal e podem atuar no transporte de um ou mais antibióticos (PUTMAN; VAN VEEN; KONINGS, 2000).

Em 2002, foi descoberto um novo sistema de efluxo codificado pelo gene *qepA* encontrado no plasmídeo pHPA da linhagem *E. coli* C316 isolada de amostra de urina de um paciente do Japão. O gene *qepA* foi relacionado à diminuição de sensibilidade às fluoroquinolonas (YAMANE et al., 2007).

A proteína QepA é composta por 511 aminoácidos, apresentando sequência muito semelhante às proteínas transportadoras pertencentes à família 14-transmembrana (bomba de efluxo tipo MFS, do inglês “Major Facilitators”). Quando o efeito do plasmídeo carreando o gene *qepA* foi avaliado em transconjugantes, foi observado aumento da CIM em 2, 32 e 64 vezes para ácido nalidíxico, ciprofloxacina e norfloxacina, respectivamente. Um novo variante, o gene *qepA2*, foi detectado, diferindo do gene original, por duas substituições nucleotídicas. Esse novo variante exibiu fenótipo de resistência semelhante ao codificado pelo gene *qepA*, atualmente denominado *qepA1* (YAMANE et al., 2007; CATTOIR; POIREL; NORDMANN, 2008).

Dados sobre a epidemiologia do determinante *qepA* são escassos e poucos estudos publicados mostram sua detecção em isolados clínicos. Entre os anos de 2002 e 2006, foram coletados 751 isolados clínicos de *E. coli* no Japão, dos quais 2 (0,3%) amostras apresentaram o gene *qepA* (YAMANE et al., 2008). Determinantes *qepA* foram isolados em enterobactérias isoladas de espécimes clínicos no Canadá (BAUDRY et al., 2009), Vietnã (LE et al., 2009), Londres (AMIN; WAREHAM, 2009), França (CATTOIR; POIREL; NORDMANN, 2008), Canadá (BAUDRY et al., 2009), Coréia (KIM et al., 2009) e China (HUANG et al., 2009; MA et al., 2009; WU et al., 2009).

2.1.4 Resistência aos β -lactâmicos e quinolonas em enterobactérias

A classe dos β -lactâmicos reúne alguns dos agentes antimicrobianos mais importantes e utilizados na terapia clínica. Essa classe de fármacos inclui as penicilinas que, apesar da produção de numerosos outros agentes antimicrobianos, são um dos grupos mais frequentemente prescritos e, a partir do seu núcleo estrutural, ainda são produzidos novos derivados. Os β -lactâmicos incluem ainda as cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Essa última classe representa os β -lactâmicos com o maior espectro antimicrobiano (BUSH; JACOBY, 2010).

Os antimicrobianos β -lactâmicos apresentam mecanismo de ação relacionado à inibição da síntese de peptidoglicano, principal componente estrutural da parede celular bacteriana que proporciona estabilidade mecânica rígida devido a sua

estrutura reticulada composta por cadeias de glicano unidas por meio de ligações cruzadas por cadeias peptídicas (BUSH; JACOBY, 2010; PETRI, 2011).

Em enterobactérias, o mecanismo de resistência aos β -lactâmicos mais prevalente é a produção de enzimas β -lactamases. Estas enzimas agem catalisando a hidrólise do anel β -lactâmico inativando esses antimicrobianos. Os produtos desta reação de hidrólise são derivados ácidos, serina-éster acilenzima como, por exemplo, o ácido penicilóico desprovido de atividade antibacteriana (BUSH; JACOBY, 2010; CHEN et al., 2011).

Alterações nos genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2} e *bla*_{SHV-1}, codificadores de β -lactamases clássicas, originaram as β -lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês “*extended spectrum β -lactamase*”). Essas variantes, geralmente mediadas por plasmídeos, são capazes de hidrolisar β -lactâmicos de amplo espectro, como cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos. As enzimas SHV, TEM e CTX-M são consideradas as ESBL mais comuns nos isolados clínicos. Em adição, enzimas BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2 e membros das famílias PER e VEB são ESBLs relatadas com menor frequência nos isolados bacterianos (BUSH; JACOBY, 2010).

Os determinantes de resistência às quinolonas são geralmente encontrados em plasmídeos de multiresistência de tamanhos variados (2,7 a 320 kb) sendo que os genes *qnrA* e *qnrB* são frequentemente encontrados em plasmídeos que também abrigam genes codificadores de β -lactamases (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

O determinante *qnrA* já foi descrito em enterobactérias que produziram ESBL tais como CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15, SHV-5, SHV-7, SHV12 E VEB-1. (CHEUNG et al., 2005; CORKILL; ANSON; HART, 2005; CASTANHEIRA et al., 2007; MINARINI; GALES; DARINI, 2007; CASTANHEIRA et al., 2008; ZHÃO et al., 2010). Enquanto o determinante *qnrB* já foi relatado em isolados carregando as enzimas CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-15, SHV-12 e SHV-30 (JACOBY et al., 2006; GAY et al., 2006; CASTANHEIRA et al., 2008; KARAH et al., 2010; KANAMORI et al., 2011; PEIRANO et al., 2011).

O determinante *qnrS* tem sido encontrado em plasmídeos menores, quando comparado a *qnrA* e *qnrB*, e geralmente não carregam genes codificadores de ESBL. Porém, *qnrS* já foi relatado em plasmídeos que também abrigaram os genes

*bla*_{CTX-M14}, *bla*_{CTX-M15}, *bla*_{TEM-1} e *bla*_{SHV-12} (HATA et al., 2005; LAVILLA et al., 2008; AHMED et al., 2007; KARAH et al., 2010; CRÉMET et al., 2011).

Portanto, estudos epidemiológicos de detecção e caracterização dos mecanismos de resistência às quinolonas e β -lactâmicos são essenciais, pois o isolamento frequente de enterobactérias com perfis de multiresistência configura um grave e atual problema de saúde pública em que a escolha de antimicrobianos efetivos para o tratamento dos pacientes infectados fica muito limitada.

3 RESULTADOS

Conforme descrito nas normas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, artigo 22, a critério do orientador e do discente, a dissertação poderá ser apresentada sob a forma de 01 (um) volume contendo: uma revisão de literatura, 1 artigo científico (número mínimo), tendo o mestrando como primeiro autor, representativo dos resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa proposta no programa.

No presente trabalho, os resultados serão apresentados a seguir, na forma de artigo.

3.1 Artigo

O artigo “Occurrence of extended-spectrum- β -lactamase enterobacterial isolates carrying *qnrB1* and *aac(6')-Ib-cr* in Minas Gerais, Brazil” será submetido para publicação em periódico da área de Farmácia.

**Occurrence of extended-spectrum- β -lactamase enterobacterial isolates
carrying *qnrB1* and *aac(6')-Ib-cr* in Minas Gerais, Brazil**

Running title: Plasmid-mediated quinolone resistance in Brazil

**André L. M. Viana¹, Rodrigo Cayô², Cassia C. Avelino¹, Ana C. Gales², Marília C.
Franco³, and Luciene A. R. Minarini^{4*}**

*¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Brazil*

*²Laboratório ALERTA, Division of Infectious Diseases, Universidade Federal de São Paulo,
São Paulo, Brazil*

*³Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Alfenas, Minas
Gerais, Brazil*

*⁴Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São
Paulo, São Paulo, Brazil*

*Corresponding author :

Tel: 55-11-3319-3300 / Fax: 55-11-4043-6428

E-mail: luciene.minarini@unifesp.br

Abstract

Objectives: To characterize the co-production of plasmid-mediated quinolone resistant (PMQR) determinants and ESBL genes in Enterobacteriaceae isolated in Brazil.

Methods: A total of 106 Enterobacteriaceae isolates was evaluated during a 5-month period of study, in two hospitals located in the state of Minas Gerais, Brazil. PCR and sequencing were used to search for PMQR determinants and ESBL genes. Conjugation and hybridization were carried out to evaluate the genetic context of the qnr-positive isolates. Broth microdilution was performed for β -lactams and quinolones in the qnr-producing isolates and their transconjugants. Clonal relationships between the isolates were analyzed by PFGE.

Results: qnr genes were identified in 12.3% of the isolates. The qnrB1 was the most prevalent qnr gene found, followed by qnrS1, qnrB2 and qnrB19. Ten qnr-producing isolates also carried aac(6)-Ib-cr gene, especially in K. pneumoniae isolates. The co-production of CTX-M-1-like, CTX-M-9-like and CTX-M-2-like was observed between these isolates.

Conclusion: This work indicates the emergence of PMQR genes in clinical specimens in Brazil. The coexistence of ESBL and PMQR genes demonstrates the complexity of the plasmid-mediated resistance determinants among members of the family Enterobacteriaceae in Brazil.

Key words: Plasmid-mediated quinolone resistance; extended-spectrum β -lactamases, enterobacterial isolates; Brazil

Introduction

In a historical perspective, quinolone resistance has been chromosome-encoded and related to structural topoisomerase modifications; decreased outer-membrane permeability and overexpression of naturally-occurring efflux pump (Hooper et al., 1987; Hooper, 1998). The first detection of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) associated with *qnr* gene was reported in the late 1990s from a *Klebsiella pneumoniae* isolate (Martinez-Martinez; Pascual; Jacoby, 1998). In subsequent studies, it was established that Qnr protein, which belong to the pentapeptide repeat family (PRP), protects DNA gyrase and type IV topoisomerase from quinolone inhibition (Bateman; Murzin; Teichmann, 1998). Also it has been proposed that *qnr* determinants could be originated from chromosomal genes of environmental bacteria (Cattoir et al., 2008; Picão et al., 2008).

Five types of *qnr* genes have been reported: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, and *qnrD*. To date, seven variants of *qnrA* have been identified worldwide and only four variants of the *qnrS* gene are known so far. *qnrC* and *qnrD* present a variant each one. In addition, *qnrB* is the most common of the five *qnr* families and has the greatest number of allelic variants (Rodríguez-Martínez et al., 2011). All are listed in the database maintained at the website <http://www.lahey.org/qnrStudies>.

Additional plasmid-mediated determinants conferring resistance to quinolones have been reported. Among these mechanisms, a variant aminoglycoside acetyltransferase named Aac(6')-Ib-cr, that modifies ciprofloxacin and norfloxacin by N-acetylation the amino nitrogen on its piperazinyl group (Robicsek et al., 2006) and active drug efflux pumps QepA and OqxAB, belonging to the major facilitator superfamily (MFS) transporters have been described (Hansen et al., 2004; Yamane et al., 2007; Périchon; Courvalin; Galimand, 2007).

Currently, it is common detect the association of the plasmid-mediated quinolone resistance determinants with extended spectrum β -lactamase (ESBL) encoded genes in the

same enterobacterial cell (Kanamori et al., 2011; García-Fulgueiras et al., 2011). These associations that allow for co-selection of resistance, even in the absence of quinolones, have been found among Brazilian enterobacterial isolates. Researching enterobacterial isolates recovered from outpatients of Southeastern Brazil, Minarini et al. identified *qnrA1* gene on a plasmid encoding a SHV-5 from an *Enterobacter cloacae* strain and *qnrB2* gene in a CTX-M-2- producing *Klebsiella pneumoniae* strain (Minarini; Gales; Darini, 2007; Minarini et al., 2008). Castanheira et al. reported a FOX-type cephalosporinase in ciprofloxacin-resistant QnrA1- producing *Escherichia coli* nosocomial strain. In these descriptions, *qnrA1* and *qnrB2* variants were located in plasmids ranging in size from 40 to 180 kb and associated with a *sul1*-type integron downstream ISCR1 element. Also, *qnrA1* and *qnrB19* determinants were found recently among *Salmonella* strains related to outbreaks recovered from Parana state (Ferrari et al., 2011) and Peirano et al. verified the dissemination of *aac(6')-Ib-cr* determinants among CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates, the majority belonging to clonal complex 23 and sequence type 410 (ST410 CC23). Another study examining a ciprofloxacin-resistant *V. cholerae* O1 clone from a cholera epidemic in Brazil identified a *qnr*-like gene designated *qnrVC1* incorporated as a cassette into a chromosomal class 1 integron (Fonseca et al., 2008).

Here, it was described 13 enterobacterial isolates harboring plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnrB1*, *qnrB2*, *qnrB19* and *qnrS1*, emphasizing the coexistence of *qnrB1* and *aac(6')-Ib-cr* determinants among CTX-M-15- producing *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* isolates recovered from two hospital in Minas Gerais state, Brazil.

Materials and methods

Bacterial isolates and susceptibility testing

One hundred and six non-duplicate enterobacterial clinical isolates with reduced susceptibility to nalidixic acid were collected from June to October 2010 in two beneficent hospital located in the Southeast region of Brazil (Hospital Santa Casa de Alfnas and Hospital Samuel Libânio, Minas Gerais State). The isolates were recovered from urine culture (n=87, 82.1%), surgical wounds (n=6, 5.6%), blood samples (n=4, 3.8%), catheter tip (n=4, 3.8%), tracheal aspirate (n=2, 1.9%) or wound swab (n=3, 2.8%). All isolates were identified to the species level both by conventional techniques and by the Microscan WalkAway® [plus System](#) (Siemens Healthcare), an automatized assay. The identified species were as follows: *Escherichia coli* (n=61, 57.6%), *Enterobacter cloacae* (n=23, 21.7%), *Klebsiella pneumoniae* (n=16, 15.1%), *Proteus mirabilis* (n=3, 2.8%), *Serratia marcescens* (n=2, 1.9%) and *Proteus vulgaris* (n=1, 0.9%). A clinical specimen per patient per hospitalization episode was evaluated, except when different species or resistance profiles were observed in re-hospitalized cases.

According to the guidelines established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the susceptibility profiles were determined by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar plates with β -lactam and non- β -lactam antibiotic-containing disks; the minimal inhibitory concentrations (MICs) of β -lactams, quinolones and fluoroquinolones were determined by microdilution method. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and azide-resistant *E. coli* J53 were used as the controls for susceptibility testing and as hosts in conjugation, respectively.

Bacterial DNA preparation, PCR amplification and sequencing

Bacterial colonies were suspended in 200 μ L of sterile distilled water and boiled for 10 minutes. After centrifugation, the supernatant was used as DNA template. The presence of the *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes was detected by Multiplex PCR technique as described by Cattoir

et al. The *qnrC*, *qnrD* and *qepA* genes were analyzed by single PCR with specific primers for each gene previously reported (Wang et al., 2009; Cavaco et al., 2009; Yamane et al., 2007). The *aac(6')-Ib-cr* gene was amplified using the primers Aac(6')-IbF (5'-CTTGCGATGCTCTATGAGT-3') and Aac(6')-IbR (5'-CCTGGCGTGTTTGAACCAT-3') and differentiated from original *aac(6')-Ib* gene by PCR digestion with BstCI enzyme. PCR analysis of quinolone resistance- determining region (QRDR) of *gyrA* and *parC* genes were performed as described elsewhere (Mammeri et al., 2005). The whole genetic structures surrounding the *qnrB1*, *qnrB2/ qnrB19* and *qnrS1* genes were characterized by PCR using different primer sets, respectively as follow, and DNA sequencing: TnpAqnrB1F (5'-GGATACTCAGCCAGCTGTT-3') and QnrB1R (5'-CGGAAATCTGCGCCTTGTG-3'); SapqnrB2F (5'- GCGTACCTGTCGTTGTTTAC-3') and QnrB2R (5'-GCGACGTTTCAGTGGTTCAG-3'); IS2qnrS1F (5'-CGACACGCCAAGACTTCTG'-3') and QnrS1R (5'-CGAAGATCTGCGACATCAAA-3'). After PCR amplification, all DNA fragments were purified with the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Both strands were sequenced using chain termination method with a Big-Dye Terminator kit and analyzed by ABI 3100 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The nucleotide and deduced protein sequences were analysed with software available over the Internet at the National Center for Biotechnology Information website (www.ncbi.nlm.nih.gov). The nucleotide sequences of the QRDR in *gyrA* and *parC* genes obtained for *qnr*- positive isolates were compared with those determined from reference sequences deposited in GenBank databases.

Conjugation, plasmid analysis and hybridization

Conjugation experiments using an azide-resistant *E. coli* J53 as recipient strain were performed in liquid culture media in 13 *qnr*- positive isolates. Transconjugants were selected

on Trypticase soy (TS) agar plates containing sodium azide (100 mg/L) plus nalidixic acid (6 mg/L). Colonies were tested by PCR using specific primers for the *qnr* genes. Plasmid DNAs of donor isolates and *E. coli* transconjugants were extracted using the Kieser technique (Kieser et al., 1984). DNA-DNA hybridization experiments were performed with a Southern transfer of an agarose gel containing plasmid DNA from *E. coli* transconjugants and wild-type *qnr*-positive isolates. Labeling of the probe and signal detection was carried out using a nonradioactive labeling and detection kit according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science).

Pulsed-field Gel electrophoresis

The pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of the 13 *qnr*-positive isolates was performed using the restriction enzyme SpeI as previously published (Pfaller et al., 1992). Macrorestriction fragments were resolved on 1% (wt/vol) agarose gels in 0.5% Tris-borate-EDTA buffer in a CHEF-DR (contour-clamped homogeneous electric field–dynamically regulated) III Mapper electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) for 23 h at 14°C using a pulse ramping rate changing from 5 to 60 s at 6 V/cm. The results were analyzed according to the criteria by Tenover et al (1995).

Results and discussion

Some studies have shown a significant increase in the presence of mechanisms of quinolone and β -lactams resistance, including those plasmid-mediated resistance genes in clinical samples isolated in Brazil. PMQR genes have been previously reported in clinical specimens in Brazil, but in few descriptions it was defined its subtype. The first *qnr* gene was observed in 2007, which reported the presence of *qnrA1* gene in *E. cloacae* and *E. coli* strains, one

isolate each, recovered from community and hospitalized patients, respectively (Minarini; Gales; Darini, 2007; Castanheira et al., 2007). The following year, *qnrB2*-positive *E. coli* and *K. pneumoniae* and *qnrB8*-positive *C. freundii* strains were reported by Minarini and colleagues, all of these recovered from outpatients.

Here, PCR testing revealed *qnr* genes in 12,2% (13/ 106) of *Enterobacteriaceae* isolates, including *Enterobacter cloacae* (n=6), *Klebsiella pneumoniae* (n=5) and *Escherichia coli* (n=2) recovered from hospitalized patients of Minas Gerais State, Brazil (Figure 1 and Table 1). The clinical specimens showing *qnr*-positive isolates were urine (n=9), wound swab (n=2), blood (n=1) and peritoneal fluid (n=1). Among these 13 *qnr*-positive isolates, 76.9% (10/13) carried *qnrB*, being the *qnrB1* type the most prevalent (n=7, 53.8%) and detected among *E. cloacae* and *K. pneumoniae* isolates; followed by *qnrB2* (n=2, 15.4%) found in *E. cloacae* and *E. coli*, one isolate of each. The *qnrS1* gene was identified in 23.1% (3/13) of the isolates, being two *K. pneumoniae* and one *E. coli* isolates. *qnrB19* gene was found in *Klebsiella pneumoniae*, previously reported in a *Salmonella enterica* in Brazil (Ferrari et al., 2011). The prevalence of the *aac(6')-Ib-cr* gene was 9.4% in this collection (10/106). The distribution of this gene is given as follows: 37.5% (6/16) of the isolates corresponded to *Klebsiella pneumoniae*, 13.0% (3/23) to *Enterobacter cloacae* and 1.6% (1/61) to *Escherichia coli* (Table 1). The coexistence of *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* genes was observed in 4 isolates, all of them *qnrB1*. The *qnrC*, *qnrD* and *qepA* genes were not identified.

Synergy between oxymino-cephalosporins and clavulanate was detected in 12 of 13 *qnr*-positive isolates consistent with the production of an ESBL. The ESBL CTX-M-type was the most prevalent (76.9%, 10/13), and it was distributed as follows: 53.8% (7/13) corresponded to CTX-M-1-like β -lactamase, 15.4% (2/13) corresponded to CTX-M-9-like and 7.7% (1/13) to CTX-M-2-like. In five *qnr*-positive isolates were detected SHV-2 and

SHV-11, separately. TEM-1 was present in 11 isolates. Surprisingly, none ESBL was identified in *E. coli* 79 (*qnrSI*-positive) (Table 1).

In terms of cephalosporin antibiotics, such as cefotaxime and ceftazidime, 69.2% of the isolates were resistant to both antibiotics. Eleven (84.6%) isolates were resistant to aztreonam with MICs ranging from 32 to > 64 mg/L. While all strains were susceptible to meropenem, the percentage of susceptibility to ertapenem was significantly reduced (46.1%) compared to susceptibility to imipenem (92.3%). Regarding gentamicin, 69.2% of the isolates were resistant to this antibiotic (mainly > 64 mg/L).

Among the *qnr*-positive isolates, 84.6% (11/13) were resistant to nalidixic acid and showed MIC value > 128 mg/L. The same percentage was found to ciprofloxacin and levofloxacin with MICs ranging from 8 to > 128 mg/L according to CLSI criteria. Also, 76.9% of the *qnr* isolates had moxifloxacin and norfloxacin MIC \geq 32 mg/L. Also, MICs reported in Table 2 show that nalidixic acid resistance was transferred by conjugation. The MICs of nalidixic acid for the transconjugant increased from 2 mg/L to 8 mg/L (*E. cloacae* 412, *E. coli* 414 and *K. pneumoniae* 430), 16 mg/L (*E. cloacae* 3, *E. cloacae* 53, *E. cloacae* 57, *K. pneumoniae* 58, *E. coli* 79, *E. cloacae* 420 and *K. pneumoniae* 439) or 32 mg/L (*K. pneumoniae* 401, *K. pneumoniae* 404, *E. cloacae* 405) due to plasmid transfer. In addition, the MICs of ciprofloxacin and norfloxacin for transconjugants, respectively, varied from 0.06 to 1 mg/L and from 0.125 to 2 mg/L, a four- to sixty-four- fold increase as compared to those of the recipient strain *E. coli* J53.

The contribution of plasmid-mediated *qnr* genes to fluoroquinolone resistance was also evaluated by determining the sequence of the quinolone resistance determining region (QRDR) in the *gyrA* and *parC* genes. All *qnr*-positive isolates in the study showed a QRDR region with mutations in codons 83 and/or 87 of the *gyrA* gene. Also, additional substitutions at codon 80 in *parC* genes were found in 9 isolates. The replacements were Ser83-Tyr, Ser83-

Ile, Ser83-Leu, Ser83-Phe, Asp87-Ala, Gly91-Arg in *gyrA* genes and Ser80Ile in *parC* genes (Table 2). Those substitutions were previously described and explained the difference of MIC values found for quinolones and fluoroquinolones in *qnr*-positive isolates.

Sequencing of the fragment correspondent to the genetic context of the *qnr* genes was assessed. The sequences analyzed of *qnrB1* genes obtained in seven clinical isolates were systematically found downstream of *orf1005*, as described previously. The *qnrB2* and *qnrB19* genes were always associated with the ISCR1 element embedded in a *sulI*-type integron. IS2 was found directly upstream of all *qnrS1*.

Electrophoresis of plasmid DNA extracts from the wild- type *qnr*-positive isolates showed plasmids ranging from 1.2- to 148 -kb in size and 1 to 6 plasmids per isolate (Table 2). The transfer of PMQR by the conjugation between *E. coli* J53 AzR and *qnr*-positive isolates was successful for all the strains. In *K. pneumoniae* 58, *E. coli* 79, *K. pneumoniae* 401, *K. pneumoniae* 404, *E. cloacae* 405, *E. cloacae* 412, *E. coli* 414, *E. cloacae* 420 and *K. pneumoniae* 439, only one plasmid encoding *qnr* gene was transferred, showing 54- to 148 -kb in size. In such isolates, resistance phenotype observed indicated the association of *qnr* and ESBL genes on a same transferable plasmid in 6 isolates, except on *E. cloacae* 420, *K. pneumoniae* 439 and *E. coli* 79 that originally did not show ESBL production.

The clonal relationship among *qnr*- positive enterobacterial isolates was evaluated by pulsed- field gel electrophoresis (PFGE). A total of 4 major patterns (A-D) were observed among the 6 *E. cloacae qnrB*- positive, with type A predominating (A1 and A2 subtypes). Five *K. pneumoniae* isolates from different patients also presented 3 distinguishable PFGE pattern (E-G). Two major patterns (H and I) were obtained among *E. coli* isolates.

These findings indicate the emergence of PMQR genes in clinical specimens in Brazil. The remarkable finding of the coexistence of PMQR by *qnrB1* and *aac(6')-Ib-cr* among related CTX-M-like-1- producing *E. cloacae* and *K. pneumoniae* demonstrates the complexity

of the plasmid-mediated dissemination of β -lactamase and PMQR genes among member of the family *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Hospital Santa Casa and Hospital Samuel Libânio for supplying the isolates; to Gabriela Puccinelli, Wilson Segura Dias and Rachel Girardello for excellent technical assistance on plasmid extraction, microdilution and sequencing experiments.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Hooper DC, Wolfson JS, Ng EY, Swartz MN. Mechanisms of action of and **resistance** to ciprofloxacin. *Am J Med.* 1987; 82(4A):12-20.
- Hooper DC. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin Infect Dis.* 1998; 27(Suppl1): 54–63.
- Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351: 797-9.
- Bateman A, Murzin AG, Teichmann SA. Structure and distribution of pentapeptide repeats in bacteria. *Protein Sci.* 1998; 7:1477-1480.
- Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14:231-7.
- Picão RC, Poirel L, Demarta A, Silva CS, Corvaglia AR, Petrini O, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62: 948-50.
- Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother.* 2011; 17:149-82.
- Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* 2006; 12:83-88.
- Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, **QepA**, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:3354-60.

- Périchon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51:2464-9.
- Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, Sørensen SJ. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48:3332-7.
- Kanamori H, Yano H, Hirakata Y, Endo S, Arai K, Ogawa M, Shimojima M, Aoyagi T, Hatta M, Yamada M, Nishimaki K, Kitagawa M, Kunishima H, Kaku M. High prevalence of extended-spectrum β -lactamases and **qnr** determinants in *Citrobacter* species from Japan: dissemination of CTX-M-2. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66: 2255-62.
- García-Fulgueiras V, Bado I, Mota MI, Robino L, Cordeiro NF, Varela A, Algorta G, Gutkind G, Ayala JA, Vignoli R. Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother*. 201; 66: 1725-9.
- Minarini LA, Gales AC, Darini AL. First report of plasmid-mediated resistance to quinolones and cefotaxime in an *Enterobacter cloacae* strain isolated from an outpatient in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51:401-2.
- Minarini LA, Poirel L, Cattoir V, Darini AL, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62: 474-8.
- Castanheira M, Pereira AS, Nicoletti AG, Pignatari AC, Barth AL, Gales AC. First report of plasmid-mediated *qnrA1* in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51:1527-9.

- Ferrari R, Galiana A, Cremades R, Rodriguez JC, Magnani M, Tognim MC, Oliveira TC, Royo G. Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* strains isolated in Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 2011; 5:496-8.
- Peirano G, Asensi MD, Pitondo-Silva A, Pitout JD. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17: 1039-43.
- Fonseca EL, Dos Santos Freitas F, Vieira VV, Vicente AC. New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerg. Infect. Dis*. 2008; 14:1129-1131.
- CLSI (2011). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement* Document M100-S21. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 60: 394-7.
- Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53:603-8.
- Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, Hooper DC, Wang M. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53:1892-7.
- Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005; 49: 71-76.

Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces 12 lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 1984; 12: 19-36.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995, 33: 2233–2239.

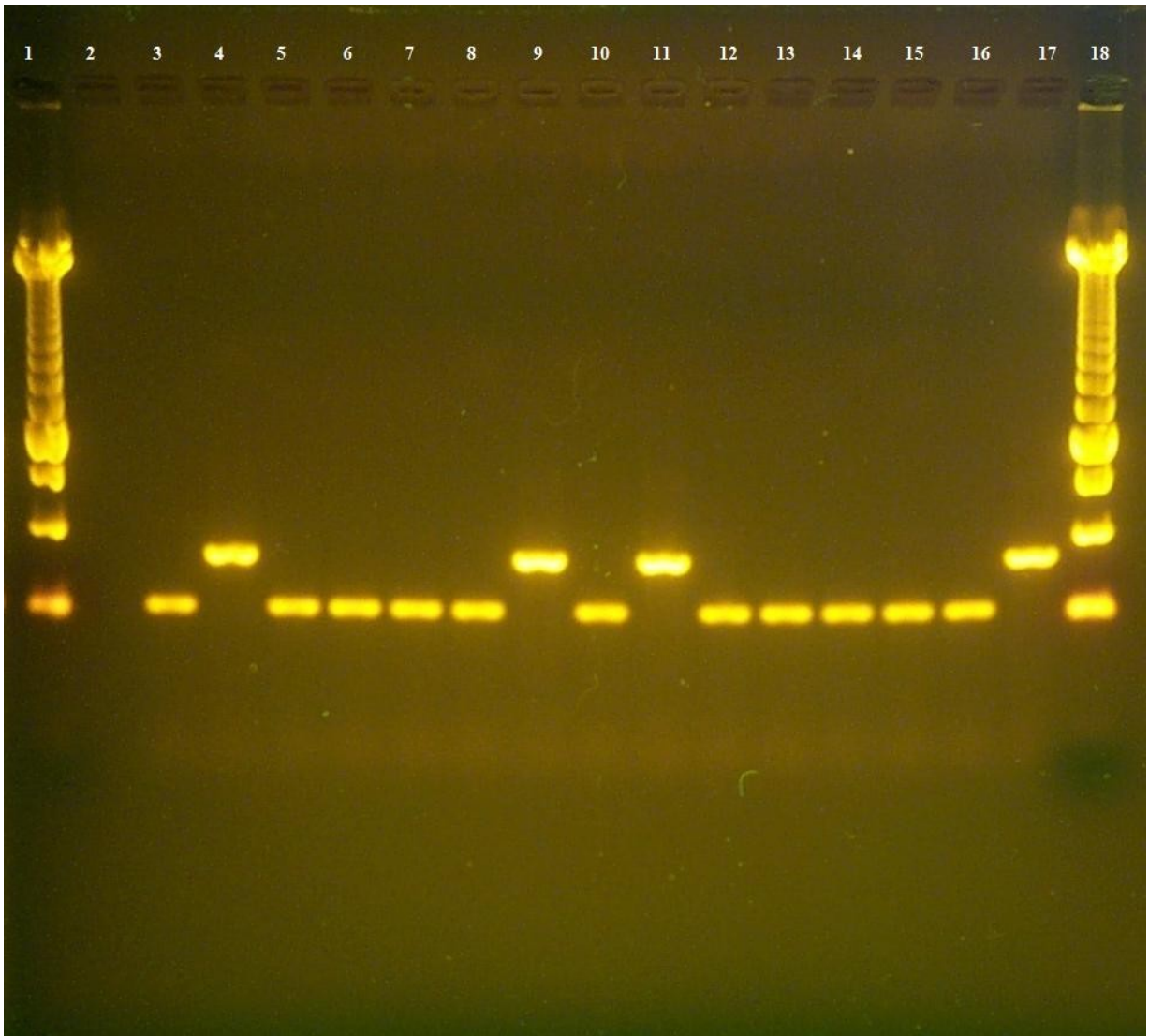


Figure 1. Agarose gel electrophoresis (2%) used for the separation of multiplex PCR products. Lanes: 1 and 18, molecular size marker (250 bp); 2, negative control; 3, positive control *qnrB*; 4, positive control *qnrS*; 5, *E. cloacae* 03; 6, *E. cloacae* 53; 7, *E. cloacae* 57; 8, *K. pneumoniae* 58; 9, *E. coli* 79; 10, *K. pneumoniae* 401; 11, *K. pneumoniae* 404; 12, *E. cloacae* 405; 13, *E. cloacae* 412; 14, *E. coli* 414; 15, *E. cloacae* 420; 16, *K. pneumoniae* 430 and 17, *K. pneumoniae* 439.

Table 1. Characteristics of *qnr*-positive enterobacterial isolates recovered from clinical specimens in Minas Gerais, Brazil

Isolates	Specimen	PFGE	PMQR genes	ESBL genes	Other resistance genes	MIC (mg/L) ^a							
						CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	MER	ERT	GEN
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=6)													
<i>Enterobacter cloacae</i> 03	Urine	A1	<i>qnrB1</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-1-like}		> 64	32	> 32	> 64	2	0.06	2	1
<i>Enterobacter cloacae</i> 53	Urine	A1	<i>qnrB1; aac(6')-Ib-cr</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-1-like}		> 64	64	> 32	> 64	0.05	0.015	0.5	> 64
<i>Enterobacter cloacae</i> 57	Blood	A2	<i>qnrB2</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-9-like}	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aac(6')-Ib</i>	> 64	8	> 32	64	0.05	0.015	1	2
<i>Enterobacter cloacae</i> 405	Surgical wounds	B	<i>qnrB1</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-1-like}	<i>bla</i> _{TEM-1}	> 64	> 64	> 32	> 64	0.12	0.03	1	>64
<i>Enterobacter cloacae</i> 412	Urine	C	<i>qnrB1</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-1-like}	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aac(6')-Ib</i>	> 64	64	4	64	0.25	1	2	>64
<i>Enterobacter cloacae</i> 420	Urine	D	<i>qnrB1; aac(6')-Ib-cr</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-1-like}	<i>bla</i> _{TEM-1}	> 64	64	> 32	> 64	0.25	0.015	0.01	>64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=5)													
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 58	Peritoneal fluid	ND	<i>qnrB19</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-9-like}	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aac(6')-Ib</i>	> 64	4	> 32	32	1	0.03	2	>64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 401	Wound swab	E	<i>qnrB1; aac(6')-Ib-cr</i>		<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11}	> 64	> 64	> 32	> 64	0.05	0.015	1	>64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 404	Urine	F	<i>qnrS1</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-2-like}	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11}	> 64	32	> 32	> 64	0.12	0.06	0.12	>64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 430	Urine	E	<i>qnrB1; aac(6')-Ib-cr</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-1-like}	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11}	> 64	> 64	> 32	> 64	0.12	0.03	0.12	>64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 439	Urine	G	<i>qnrS1</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-1-like}	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11}	> 64	> 64	> 32	> 64	0.25	0.03	0.06	>64
<i>Escherichia coli</i> (n=2)													
<i>Escherichia coli</i> 79	Urine	H	<i>qnrS1</i>		<i>bla</i> _{TEM-1}	0,12	0.25	32	0,125	1	0.015	0.01	2
<i>Escherichia coli</i> 414	Urine	I	<i>qnrB2</i>	<i>bla</i> _{SHV-2}		8	4	1	2	0.12	≤	0.01	4

^aCTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; IMP, imipenem; MER, meropenem; ERT, ertapenem; GEN; gentamicin.

Table 2. Results of plasmid and QRDR analysis and susceptibility testing by broth microdilution of clinical strains, their transconjugants (TC) and the *E. coli* J53 recipient strain

Isolates ^a	MIC (mg/L)					Plasmid size (Kb)	GyrA substitution	ParC substitution
	Nalidixic acid	Ciprofloxacin	Norfloxacin	Moxifloxacin	Levofloxacin			
<i>Enterobacter cloacae</i> 03	> 128	128	128	128	64	129, 54, 6.4, 2.9, 2	Ser-83→Tyr; Asp-87→Ala	Ser-80→Ile
TC03	16	0.125	0.5	0.5	0.25	129, 54, 6.4, 2.9, 2		
<i>Enterobacter cloacae</i> 53	> 128	>128	128	128	64	129, 54, 6.4, 4.7, 2.6, 2	Ser-83→Tyr, Asp-87→Ala	Ser-80→Ile
TC53	16	0.06	0.5	0.125	0.06	129, 2.6, 2		
<i>Enterobacter cloacae</i> 57	> 128	>128	128	128	64	148, 54, 6.4, 4.7	Ser-83→Tyr, Asp-87→Ala	Ser-80→Ile
TC 57	16	0.25	0.25	0.5	0.25	54, 4.7		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 58	> 128	64	64	64	32	148, 129, 54, 2.9, 1,2	Ser-83→Ile	Preserved
TC58	16	0.25	0.5	0.5	0.25	54		
<i>Escherichia coli</i> 79	> 128	8	1	4	8	148, 54, 25	Ser-83→Leu	Preserved
TC79	16	0.5	1	1	0.5	54		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 401	> 128	>128	128	64	64	129, 8.6, 1.2	Ser-83→Ile	Ser-80→Ile
TC401	32	1	2	0.5	0.25	129		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 404	> 128	>128	128	>128	>128	129, 17	Ser-83→Ile	Ser-80→Ile
TC404	32	0.06	0.125	<0.06	0.5	129		

Isolates ^a	MIC (mg/L)					Plasmid size (Kb)	GyrA position	ParC position
	Nalidixic acid	Ciprofloxacin	Norfloxacin	Moxifloxacin	Levofloxacin			
<i>Enterobacter cloacae</i> 405	> 128	>128	>256	64	64	148, 9.4	Ser-83→Tyr, Asp-87→Ala	Ser-80→Ile
TC405	32	1	2	1	0.25	148		
<i>Enterobacter cloacae</i> 412	> 128	>128	>128	>128	128	148, 23	Ser-83→Phe	Ser-80→Ile
TC412	8	0.06	0.25	0.125	0.06	148		
<i>Escherichia coli</i> 414	16	8	0.256	0.5	0.5	148, 76	Gly-91→Arg	Preserved
TC414	8	0.256	0.256	0.5	0.25	148		
<i>Enterobacter cloacae</i> 420	> 128	64	32	32	16	148	Ser-83→Ile	Ser-80→Ile
TC420	16	0.5	2	1	0.25	148		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 430	> 128	>128	32	128	64	148, 2.6, 1.6	Ser-83→Ile	Ser-80→Ile
TC430	8	0.06	0.125	< 0.06	0.06	148, 2.6, 1.6		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 439	16	1	0.5	1	1	148 e 54	Ser-83→Ile	Preserved
TC439	16	0.25	0.25	0.5	0.125	148		
<i>Escherichia coli</i> J53 AziR	2	0.015	0.03	< 0,06	0.015			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	4	0.008	0.06	0.06	0.015			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	> 128	0.25	1	2	1			

^aTC, transconjugant.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A. M. et al. Zoo animals as reservoirs of Gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6686–6690, 2007.
- AMIN, A. K.; WAREHAM, D. W. Plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolates associated with community and nosocomial urinary tract infection in East London, UK. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 490–491, 2009.
- AOGÁIN, M. M. Emergence of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes among Irish multidrug-resistant isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, p. 106–109, 2010.
- APELLBAUM, P. C.; HUNTER, P. A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 5–15, 2000.
- AVGUŠTIN, J. A. et al. Emergence of the Quinolone Resistance-Mediating Gene *aac(6')-Ib-cr* in Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Klebsiella* Isolates Collected in Slovenia between 2000 and 2005. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 4171-4173, 2007.
- BALL, P. Quinolones generations: natural history or natural selection? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 17-24, 2000.
- BAMBEKE, F. V. et al. Quinolones in 2005: an update. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 11, p. 256-280, 2005.
- BAUDRY, P. J. et al. Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from Canadian intensive care units: the 1st report of *QepA* in North America. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 63, p. 319–26, 2009.
- BARNARD, F. M.; MAXWELL, A. Interaction between DNA gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser83 and Asp87. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, p. 1994–2000, 2001.

BERGMAN, M. et al. Association between Antimicrobial Consumption and Resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 912-917, 2009.

BLONDEAU, J. M. Fluoroquinolones: Mechanism of Action, Classification, and Development of Resistance. **Survey of Ophthalmology**, v. 49, p.73-78, 2004.

BOLON, M. K. The Newer Fluoroquinolones. **Medical Clinics of North America**, v. 95, p. 793-817, 2011

BUSH, K; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.3, p. 969–976, 2010.

CABRAL, J. H. M. et al. Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. **Nature**, v. 388, p. 903–906, 1997.

CASTANHEIRA, M. et al. First Report of Plasmid-Mediated *qnrA1* in a Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli* Strain in Latin America. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1527–1529, 2007.

CASTANHEIRA, M. et al. Rapid emergence of *bla*_{CTX-M} among *Enterobacteriaceae* in US Medical Centers: molecular evaluation from the MYSTIC Program (2007). **Microbial Drug Resistance**, n. 14, p. 211–26, 2008.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump *QepA2* in an *Escherichia coli* isolate from France. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, p. 3801–3804, 2008.

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 Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 603–608, 2009.

CHEN, L. F.; CHOPRA, T.; KAYE, K. S. Pathogens Resistant to Antibacterial Agents. **Medical Clinics of North America**, v. 95, p. 647-676, 2011.

CHENIA, H. Y.; PILLAY, B.; PILLAY, D. Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 1274–1278, 2006.

CHEUNG, T. K. et al., Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of the *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 56, p. 586–589, 2005.

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

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Ed. Wayne: **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, 2011.

CRÉMET, L. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL *Enterobacteriaceae* clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. **Pathologie Biologie**, v. 59, p. 151-156, 2011.

DECOUSSER, J. M. et al. Trends in antibiotic susceptibility of bloodstream pathogens in hospitalized patients in France, 1996 to 2007. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, n. 3, p. 292-300, 2010.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n.3, p. 377–392, 1997.

EMMERSON, A. M.; JONES, A. M. The quinolones: decades of development and use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 13-20, 2003.

FARMER, J.J.; et al. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**, 9 ed. American Society for Microbiology: Washington, v.1, cap.42, p. 649-669, 2007.

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. 6, p. 496-498, 2011.

FRANZCO, A. M. T. Ocular toxicity of fluoroquinolones. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.35, p. 566–577, 2007.

HATA, M. et al. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 49, p. 801-803, 2005.

HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, Suppl. 1, p. i3–i10, 2009.

HOBAN, D. J. et al. Trends in the frequency of multiple drug-resistant *Enterobacteriaceae* and their susceptibility to ertapenem, imipenem, and other antimicrobial agents: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends 2002 to 2007. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, p. 78–86, 2010.

HOOPER, D. C. Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases**; v. 31(Suppl 2):S24–S28, 2000a.

HOOPER, D. C. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p. 530-538, 2002.

HOOPER, D. C. Mechanisms of quinolone resistance. *In*: **Hooper DC, Rubinstein E, eds. Quinolone antimicrobial agents**. 3. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, p. 41–67, 2003.

HUANG, S. Y. et al. Increased prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in chicken *Escherichia coli* isolates from 2001 to 2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, p. 1203–1209, 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.

JONES, R. N.; BIEDENBACH, D. J. Comparative activity of garenoxacin (BMS 284756), a novel desfluoroquinolone, tested against 8,331 isolates from community acquired respiratory tract infections: North American results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1999 –2001). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, p. 273–278, 2003.

KANAMORI, H. et al. High prevalence of extended-spectrum β -lactamases and *qnr* determinants in *Citrobacter* species from Japan: dissemination of CTX-M-2. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 66, p. 2255–2262, 2011.

KARAH, N. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from Norway and Sweden. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, p. 425–431, 2010.

KIM, E.S. et al. Prevalence of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme among *Enterobacteriaceae* blood isolates in Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.2643–2645, 2009.

LAVILLA, S. et al. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 291–295, 2008.

LE, T. M. et al. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in commensal members of the *Enterobacteriaceae* in Ho Chi Minh City, Vietnam. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1585–1592, 2009.

LEE, Y. J. et al. Fluoroquinolone resistance and *gyrA* and *parC* mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken. **Journal of Microbiology**, v. 43 n. 5, p. 391-397, 2005.

LESCHER, G. Y. et al. 1,8- Naphthyridine derivatives: a new class of class of chemotherapy agents. **Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, v. 5, p. 1063-1068, 1962.

LIEBERTRAU, A. et al. *In Vitro* Activities of a New Des-Fluoro(6) Quinolone, Garenoxacin, against Clinical Anaerobic Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3667-3671, 2003.

MA, J. et al. High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among Ceftiofur-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates from Companion and Food-Producing Animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 519-524, 2009.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., PASCUAL, A., JACOBY, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Lancet**, v. 351, p. 797–799, 1998.

MINARINI, L. A. R.; GALES, A. C.; DARINI, A. L. C. First Report of Plasmid-Mediated Resistance to Quinolones and Cefotaxime in an *Enterobacter cloacae* Strain Isolated from an Outpatient in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 401-402, 2007.

MINARINI, L. A. R. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 474–478, 2008.

MOON, D. C. et al. Emergence of a new mutation and its accumulation in the topoisomerase IV gene confers high levels of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 76-79, 2010.

NEUHAUSER, M. M. et al. Antibiotic Resistance Among Gram-Negative Bacilli in US Intensive Care Units. **The Journal of the American Medical Association**, v. 289, n. 7, p. 885-888, 2003.

NICOLETTI, A. G., PICÃO, R. C. First report of *GES-5*- and *QnrS1*-producing *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* clinical isolate from Brazil. In: INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 49. 2009, San Francisco, USA: **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2009.

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

OGBOLU, D. O. et al. High levels of multidrug resistance in clinical isolates of Gram-negative pathogens from Nigeria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 62-66, 2011

OWENS, R. C.; AMBROSE, P. G. Clinical use of the fluorquinolones. Antibiotic Therapy, part I. **Medical Clinics of North America**, v. 84, n. 6, p. 1447-1469, 2000.

PEIRANO, G. et al. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1039-1043, 2011

PEREIRA, A. S. et al. Evaluation of the Susceptibility Profiles, Genetic Similarity and Presence of *qnr* Gene in *Escherichia coli* Resistant to Ciprofloxacin Isolated in Brazilian Hospitals. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 40-43, 2007.

PETRI, Jr., W. A. Sulfonamides, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, Quinolones, and Agents for Urinary. In: Goodman & Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12 ed., McGraw-Hill companies, 2011. cap. 52, p. 1463- 1476.

POIREL, L. et al. Origin of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant *QnrA*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3523–3525, 2005.

PUTMAN, M.; VAN VEEN, H. W.; KONINGS, W. N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 672–693, 2000.

REECE, R. J.; MAXWELL, A. DNA gyrase: Structure and function. **Critical Review of Biochemical Molecular Biology**, v. 26, p. 335-375, 1991.

ROBICEK, A.; JACOBY, A. G.; HOOPER, D. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **The Lancet**, v. 6, p. 629-640, 2006.

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.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 17, p. 149-182, 2011.

RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1109–1117, 2003.

RUSTOMJEE, R. et al., A Phase II study of the sterilising activities of ofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 12, p. 128-138, 2008.

SADER, H. S. et al. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, p.25-79, 2004.

STRAHILEVITZ, J. et al. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 664-689, 2009.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; DOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol**, v.33, p. 2233-2239,1995.

TRAN, J. H.; JACOBY, G. A. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 8, p. 5638-5642, 2002.

VILLEGAS, M. V. et al. Increasing prevalence of extended-spectrum-betalactamase among Gram-negative bacilli in Latin America - 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 34-39, 2011.

WANG, M. et al. New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, *qnrC*, Found in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.53 n. 5, p. 1892-1897, 2009.

WEIGEL, L. M.; STEWARD, D. C; TENOVER, F. C. *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.42 n. 10, p. 2661-2667, 1998.

WU, C. M. et al. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolated from chickens in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 408–411, 2009

YAMANE, K. et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *QepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 51, p. 3354–3360, 2007.

YAMANE, K. et al. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, p. 1564–1566, 2008

YOSHIDA, H. et al. Quinolone Resistance-Determining Region in the DNA Gyrase *gyrB* Gene of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 8, p. 1647-1650, 1991.

YU, F. et al. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *aac(6')-Ib-cr* amongst *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from

hospitalised paediatric patients with diarrhoea in China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 152–155, 2011.

ZHAO, X. et al. Decreased quinolone susceptibility in high percentage of *Enterobacter cloacae* clinical isolates caused only by *Qnr* determinants. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, p. 110–113, 2010.