

Ana Raquel Pinto Monteiro

Resistência adquirida a quinolonas em *Enterobacteriaceae* isoladas de  
suiniculturas Portuguesas

**PORTO, 2011**

**Universidade Fernando Pessoa | Faculdade de Ciências da Saúde**



Ana Raquel Pinto Monteiro

Resistência adquirida a quinolonas em *Enterobacteriaceae* isoladas de  
suiniculturas Portuguesas

**PORTO, 2011**

**Universidade Fernando Pessoa | Faculdade de Ciências da Saúde**

Ana Raquel Pinto Monteiro

Resistência adquirida a quinolonas em *Enterobacteriaceae* isoladas de suiniculturas  
Portuguesas

Declaração de originalidade

Confirmo que este trabalho foi por mim realizado na íntegra e que todo o material proveniente de outras fontes foi devidamente referenciado.

Assinatura:

---

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Doutora Elisabete Machado

**PORTO, 2011**

**Universidade Fernando Pessoa | Faculdade de Ciências da Saúde**

O presente trabalho resultou de uma colaboração da Universidade Fernando Pessoa com o REQUIMTE (Laboratório Associado) / Grupo de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

## SUMÁRIO

As *Enterobacteriaceae* são indubitavelmente uma importante família bacteriana, ampla e versátil, que constitui a causa de sérias infecções, quer em animais, quer no Homem. O tratamento de infecções causadas por *Enterobacteriaceae* é efectuado recorrendo a antibióticos, encontrando-se os  $\beta$ -lactâmicos e as quinolonas entre as opções terapêuticas de primeira linha. Todavia, o seu uso exacerbado, quer em medicina humana, quer em medicina veterinária, tem levado à emergência e disseminação de mecanismos de resistência.

A resistência a quinolonas em *Enterobacteriaceae* era habitualmente interpretada como cromossómica. A descoberta recente de mecanismos de resistência a quinolonas mediados por plasmídeos (RQMP) veio acrescentar uma nova dimensão ao problema da resistência a esta classe de antibióticos. Estes mecanismos conduzem habitualmente a uma diminuição da susceptibilidade a quinolonas, mas parecem facilitar a selecção de mutantes com alto nível de resistência. A identificação de genes que conferem resistência a quinolonas localizados em plasmídeos tem aumentado por todo o mundo, tanto em *Enterobacteriaceae* de origem humana, como de origem animal.

O trabalho que aqui se apresenta tem como objectivo investigar a ocorrência e a diversidade de genes que codificam para a resistência adquirida a quinolonas em *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas Portuguesas. Para tal, foram analisados 173 isolados de *Enterobacteriaceae* representativos de diferentes morfotipos/perfis de susceptibilidade, os quais foram obtidos de quarenta e três amostras provenientes de cinco suiniculturas Portuguesas de diferentes regiões geográficas (2006-2007). A pesquisa de genes que codificam para RQMP foi efectuada através da amplificação de ácidos nucleicos pela técnica de PCR, usando *primers* e condições de amplificação para a detecção de genes que codificam para proteínas Qnr (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*), para a enzima AAC(6')-Ib-cr [*aac(6')-Ib-cr*] e para bombas de efluxo de quinolonas (*qepA*). Os genes amplificados foram sequenciados e as

sequências nucleotídicas obtidas comparadas com as depositadas em bancos de dados genéticos mundiais.

Foi observada uma baixa prevalência de resistência ao ácido nalidíxico (17%) e à ciprofloxacina (2%). A ocorrência de genes de resistência a quinolonas mediada por plasmídeos foi de 3% (5/173) entre os isolados analisados (4 suiniculturas; Norte, Centro e Sul). O gene *qnrB* foi o mais frequente, tendo sido detectado em 4 isolados de *Citrobacter freundii* provenientes de amostras de pó (n=2), ração dos suínos (n=2) e água limpa do exterior da pocilga (n=1) de 3 suiniculturas (Norte, Centro e Sul). O gene *qnrS* foi encontrado apenas em um isolado de *E. coli* produtor da beta-lactamase de espectro alargado CTX-M-32. Os genes *qnrA*, *qepA* e *aac(6')-Ib-cr* não foram detectados em nenhum isolado.

Este estudo constitui a primeira descrição de genes *qnr* em *Enterobacteriaceae* provenientes de suínos ou do ambiente de produção animal (suiniculturas) em Portugal. Os resultados obtidos indicam que as suiniculturas poderão constituir um reservatório importante de genes que codificam para resistência a quinolonas mediada por plasmídeos. O papel de *C. freundii* como um reservatório relevante de genes *qnr* é também confirmado.

## ABSTRACT

*Enterobacteriaceae* are undoubtedly an important bacterial family, large and versatile, causing serious infectious diseases both in animals and humans. Treatment of infections caused by *Enterobacteriaceae* is done using antibiotics, being  $\beta$ -lactams and quinolones among the first-line treatment options. However, overuse of these molecules in human and veterinary medicine has led to the emergence and spread of antibiotic resistance mechanisms.

Resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae* was usually interpreted as chromosomal. The recent discovery of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR)

mechanisms added a new dimension to the problem of resistance to this class of antibiotics. These mechanisms typically lead to a decreased susceptibility to quinolones, but seem to facilitate the selection of high-level resistance mutants. The identification of plasmid-mediated quinolone resistance genes has increased worldwide in *Enterobacteriaceae* of human and animal origin.

The work presented here aims to investigate the occurrence and diversity of genes coding for acquired resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae* from Portuguese piggeries. To accomplish these goals, a total of 173 *Enterobacteriaceae* representing different morphotypes/susceptibility patterns were analysed. Isolates were obtained from forty-three samples collected at five piggeries located at different geographic regions of Portugal (2006- 2007). Genes coding for PMQR were searched by PCR, using primers and conditions for detection of *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes. PCR products were sequenced and the sequences obtained were compared with those deposited in worldwide genetic databases.

A low rate of resistance to naladixic acid (17%) and ciprofloxacin (2%) was observed. The occurrence of PMQR genes was 3% (5/173) among the isolates analyzed (4 piggeries; North, Centre and South). *qnrB* was the most frequent gene, being detected in four isolates of *Citrobacter freundii* from samples of powder (n=2), feed (n=2) and clean water outside the pigsty (n=1) from 3 piggeries (North, Centre and South). *qnrS* was only found in one *E. coli* isolate producing the extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-32. *qnrA*, *qepA* and *aac(6')-Ib-cr* were not found.

This study constitutes the first report of *qnr* genes in *Enterobacteriaceae* from pigs or from the animal production environment (piggeries) in Portugal. The results indicate that piggeries may constitute an important reservoir of genes that code for PMQR. The role of *C. freundii* as a relevant reservoir of *qnr* genes is also confirmed.

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Elisabete Machado, pelo incentivo, disponibilidade, partilha de saberes, encorajamento, sugestões e materiais facultados – só com a sua orientação excepcional foi possível desenvolver este trabalho, apostando, passo a passo, num diálogo continuado que permitiu abrir-me múltiplas portas conceptuais e concretizar esta Monografia.

Ao Ricardo, Técnico de Laboratório de Microbiologia, pela disponibilidade, apoio, incentivo e profissionalismo.

Aos meus pais, pela possibilidade de me facultarem a concretização de um sonho – pelo seu amor incondicional e inesgotável, confiança e apoio sempre, sempre... não há palavras que possam traduzir tudo o que me propiciaram e tudo o que lhes dedico.

À minha tia Maria José, companheira de tantos dias e tantas noites – pelo seu apoio permanente, por estar ali sempre e por conseguir fazer-me sorrir nos momentos menos bons.

À minha tia Fátima Pinto, pelo apoio incedível, pela sua confiança plena em mim, pelo incentivo, pela disponibilidade total que sempre me dedicou.

Aos meus irmãos, pelo valiosíssimo amor que me devotam e pelos modelos de profissionalismo e dedicação que me transmitiram.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
Lista de Abreviaturas .....	xiv
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. <i>Enterobacteriaceae</i>: características e importância clínica .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Antibióticos com actividade em <i>Enterobacteriaceae</i>: Quinolonas .....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Características gerais e classificação .....	3
1.2.2. Mecanismo de acção .....	7
1.2.3. Mecanismos de resistência às quinolonas em <i>Enterobacteriaceae</i> .....	10
1.2.3.1. Resistência a quinolonas mediada por mutações cromossómicas .....	10
A. Mutações nas enzimas alvo .....	11
A.1. Mutações no gene <i>gyrA</i> .....	11
A.2. Mutações no gene <i>parC</i> .....	13
A.3. Mutações nos genes <i>gyrB</i> e <i>parE</i> .....	13
B. Mutações que conferem diminuição do acesso às enzimas alvo ...	13
B.1. Alterações nas porinas .....	13
B.2. Bombas de expulsão activa .....	14
1.2.3.2. Resistência adquirida: resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (RQMP) .....	15
A. Protecção das enzimas alvo por proteínas Qnr .....	16
B. Inactivação enzimática por AAC(6')-Ib-cr .....	19
C. Bombas de efluxo codificadas por genes de localização plasmídica	20
C.1. QepA ( <i>Quinolone efflux pump</i> ) .....	20
C.2. OqxAB .....	21
1.2.4. Ambiente genético dos genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas (RQMP) .....	21
<b>1.3. Epidemiologia da resistência adquirida a quinolonas em <i>Enterobacteriaceae</i> .....</b>	<b>23</b>
1.3.1. Epidemiologia no Mundo .....	23
1.3.2. Epidemiologia na Europa .....	27

1.3.3. Epidemiologia em Portugal .....	28
<b>1.4. Riscos associados à emergência e dessiminação da resistência adquirida a quinolonas em <i>Enterobacteriaceae</i> de origem animal .....</b>	<b>29</b>
<b>II. OBJECTIVOS .....</b>	<b>32</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Isolados bacterianos .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2. Detecção e caracterização molecular de genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas .....</b>	<b>34</b>
3.2.1. Extração do DNA bacteriano .....	34
3.2.2. Amplificação de ácidos nucleicos por PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) ..	35
3.2.3. Electroforese .....	35
3.2.4. Purificação dos produtos amplificados .....	37
3.2.5. Sequenciação .....	37
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1. Ocorrência e diversidade de genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2. Distribuição geográfica de <i>Enterobacteriaceae</i> contendo genes <i>qnr</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>4.3. Análise do perfil de susceptibilidade aos antibióticos em <i>Enterobacteriaceae</i> contendo genes <i>qnr</i> .....</b>	<b>45</b>
4.3.1. Resistência a quinolonas .....	45
4.3.2. Resistência a outras classes de antibióticos .....	47
<b>V. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>49</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>50</b>
<b>VII. ANEXOS .....</b>	<b>61</b>
<i>Anexo I - POSTER</i> apresentado no 3 <sup>rd</sup> Congress of European Microbiologists.	
<i>Anexo II - ABSTRACT</i> submetido e aceite para apresentação ( <i>POSTER</i> ) no 4 <sup>th</sup> Congress of European Microbiologists	

## ÍNDICE DE FIGURAS

I.	<b>Figura 1</b> – Quinolonas: classificação edécadas da descoberta e uso .....	4
	<b>Figura 2</b> – Estrutura base das Quinolonas .....	5
	<b>Figura 3</b> – Mecanismo de acção das Quinolonas .....	9
	<b>Figura 4</b> – Ambiente genético de genes <i>qnr</i> .....	22
	<b>Figura 5</b> – Distribuição geográfica dos genes <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i> à data de 2006 .....	24
	<b>Figura 6</b> – Percentagem de resistência a fluoroquinolonas em <i>E. coli</i> (a) e em <i>K. pneumoniae</i> (b) isoladas em países da União Europeia no ano 2009 .....	27
IV.	<b>Figura 7</b> – Consumo de antibióticos em animais em Portugal (2004-2006) .	47

## ÍNDICE DE TABELAS

I.	<b>Tabela 1</b> – Mutações em GyrA associadas a resistência a quinolonas ....	12
III.	<b>Tabela 2</b> – Origem dos isolados de <i>Enterobacteriaceae</i> incluídos no estudo .	34
	<b>Tabela 3</b> – <i>Primers</i> e condições de PCR usados no estudo .....	36
IV.	<b>Tabela 4</b> – Características dos isolados bacterianos contendo genes <i>qnr</i> identificados no estudo .....	39

## Lista de abreviaturas

AAC(6')-Ib-cr – aminoglicosídeo acetiltransferase (variante *ciprofloxacin resistance*, resistência à ciprofloxacina) (enzima)

*aac(6')-Ib-cr* – aminoglicosídeo acetiltransferase (variante *ciprofloxacin resistance*, resistência à ciprofloxacina) (gene)

Ala – Alanina

Asn – Asparagina

ATP – Adenosina trifosfato

Arg – Arginina

Asp – Ácido aspártico

CMI – Concentração mínima inibitória

Cis – Cisteína

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control

EFSA – European Food Safety Authority

FQ – Fluoroquinolonas

GAO – United States General Accounting Office

Gln – Glutamina

Glu – Ácido glutâmico

Gli – Glicina

His – Histidina

Leu – Leucina

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

RQMP – Resistência a Quinolonas Mediada por Plasmídeos

Pro – Prolina

*qnr* – *Quinolone resistance* (gene)

Qnr – *Quinolone resistance* (proteína)

QRDRs – Quinolone Resistance-Determining Regions

Ser – Serina

Trp – Triptofano

Tir – Tirosina

Val – Valina

## I. INTRODUÇÃO

Em 1928, Alexander Fleming revolucionou a terapêutica das doenças infecciosas de origem bacteriana através da descoberta acidental da Penicilina. Historicamente, a Penicilina viria a ser considerada o primeiro fármaco dotado de propriedades antibacterianas (Sousa, 2006). A elevada mortalidade provocada pelas doenças infecciosas, sobretudo epidémicas, mobilizou os cientistas na pesquisa de outros compostos, naturais ou de síntese, dotados de propriedades antimicrobianas (Sousa, 2006). Ao longo dos tempos outras moléculas foram surgindo, originando as alternativas terapêuticas hoje existentes (Sousa, 2006).

Porém, o crescente uso dos antibióticos ao longo dos anos levou à emergência de resistências bacterianas que, hoje em dia, levantam sérias preocupações, dado o comprometimento do tratamento de várias doenças infecciosas. A emergência e disseminação de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos constituem por isso importantes problemas de Saúde Pública, tanto mais que, nas duas últimas décadas, o número de novas classes de antibióticos desenvolvidos tem sido limitado.

### 1.1. *Enterobacteriaceae*: características e importância clínica

As *Enterobacteriaceae* constituem uma família bacteriana numerosa, onde se incluem diversas espécies de bacilos de Gram negativo com um diâmetro entre 0.3 e 1.5 µm. Estes bacilos são geralmente aeróbios ou anaeróbios facultativos, asporogénicos, fermentadores da glucose (a fermentação de outros carboidratos é variável), produtores de catalase e citocromo-oxidase negativos (Ferreira *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2007). Podem ser imóveis ou móveis. Quando são móveis possuem habitualmente flagelos peritricos (Ferreira *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2007).

As *Enterobacteriaceae* têm uma distribuição ubiqüitária, ou seja, algumas espécies compõem a flora comensal do intestino do Homem e de animais, podendo

encontrar-se também em solos, plantas e águas (Ferreira *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2007). O facto de algumas espécies de *Enterobacteriaceae* estarem presentes na flora comensal de mamíferos, faz com que sejam incluídas nos microrganismos a pesquisar em meios aquáticos, para detecção de contaminação fecal (por exemplo, em águas para consumo humano) (Ferreira *et al.*, 2000).

Contudo, as *Enterobacteriaceae* estão também na origem de importantes infecções do tracto urinário, respiratórias, gastrointestinais, intra-abdominais e septicemias, entre outras. Por exemplo, a *Escherichia coli*, apesar de fazer parte da flora comensal do intestino de mamíferos, provoca frequentemente infecções urinárias e outras infecções (Ferreira *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2007). As infecções provocadas por *Enterobacteriaceae* podem ser adquiridas na comunidade ou no hospital, embora as infecções nosocomiais apresentem habitualmente maior gravidade e sejam mais difíceis de tratar (Paterson *et al.*, 2006).

Dentro desta família bacteriana, podem ainda encontrar-se os géneros *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Proteus* sp. e *Serratia* sp.. São considerados patogénicos oportunistas, pois encontram-se frequentemente na origem de infecções oportunistas no Homem, tais como infecções do tracto urinário e respiratório (sobretudo *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp.), septicémias, feridas cirúrgicas, peritonites e outras infecções intra-abdominais. São mais frequentes em ambiente hospitalar (Ferreira *et al.*, 2000; Paterson *et al.*, 2006).

*Salmonella* sp., *Shigella* sp. e *Yersinia* sp. são três géneros bacterianos também incluídos na família *Enterobacteriaceae*, mas são considerados agentes patogénicos obrigatórios para o Homem, embora os animais possam constituir um reservatório importante de alguns deles (Ferreira *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2007). De referir que a *Salmonella* sp. tem vindo a adquirir especial importância clínica, já que está associada a infecções de transmissão fecal-oral, ou através da ingestão de alimentos e água contaminados. O seu principal reservatório é os animais e estes são também os principais responsáveis pela transmissão ao Homem, causando graves infecções, tais como gastroenterites e infecções invasivas, como a febre tifóide (Ferreira *et al.*, 2000; Paterson *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2007).

Apesar de se encontrarem disponíveis diversas alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *Enterobacteriaceae*, estas continuam a constituir um problema de Saúde Pública. A elevada resistência, natural ou adquirida, que muitas espécies de *Enterobacteriaceae* apresentam aos principais grupos de antibióticos (Livermore, 2003), associada a diversos factores de virulência (produção de toxinas, cápsula, factores de aderência, entre outros), e ainda à possibilidade de aquisição contínua de genes de resistência oriundos de outras bactérias, preocupam a comunidade clínica (Murray *et al.*, 1998). Dado o crescente aumento de resistência a diversas classes de antibióticos e o comportamento heterogéneo das diferentes espécies face a estas moléculas, o tratamento das infecções por *Enterobacteriaceae* deverá ser escolhido em função dos resultados dos ensaios de susceptibilidade realizados *in vitro* (Ferreira *et al.*, 2000; Paterson *et al.*, 2006).

## **1.2. Antibióticos com actividade em *Enterobacteriaceae*: Quinolonas**

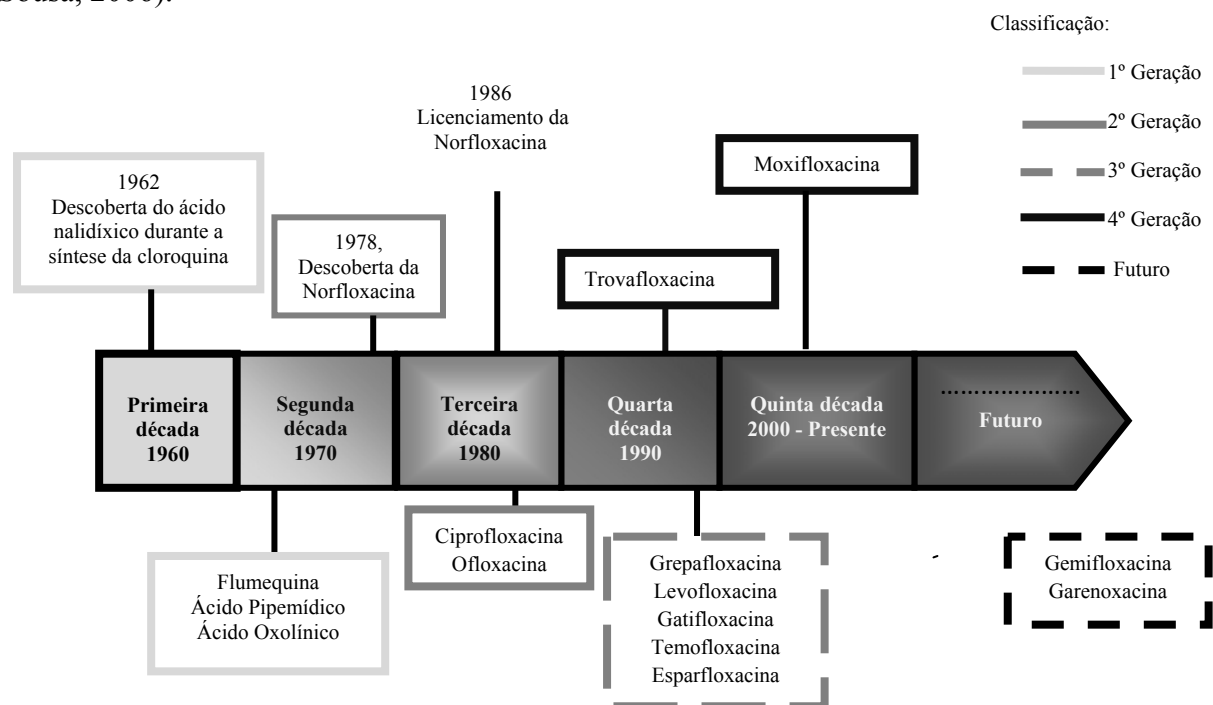
Os principais grupos de antibióticos usados na terapêutica de infecções causadas por *Enterobacteriaceae* são os  $\beta$ -lactâmicos (antibióticos antiparietais), as quinolonas (inibidores da síntese de ácidos nucleicos), aminoglicosídeos-aminociclitolis e tetraciclinas (inibidores da síntese proteica) e o trimetoprim-sulfametoxazol, entre outros (Ferreira *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2006). Actualmente os antibióticos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos e das quinolonas constituem opções terapêuticas de primeira linha no tratamento de infecções por *Enterobacteriaceae* (Denton, 2007).

### **1.2.1. Características gerais e classificação**

As quinolonas constituem uma das maiores classes de agentes antimicrobianos, sendo muito usadas quer em medicina humana, quer em medicina veterinária (Bamkeke *et al.*, 2005; Cattoir *et al.*, 2009; Má *et al.*, 2009; Mérens *et al.*, 2010; Herrera-León *et al.*, 2011). Isto deve-se especialmente à sua notável qualidade como agentes antimicrobianos (Lastours *et al.*, 2010). O uso clínico deste grupo de antibióticos de síntese química foi aprovado em 1967 (Emmerson *et al.*, 2003). A primeira quinolona a ser utilizada foi o ácido nalidíxico, tendo sido obtido a partir de um produto secundário

da síntese da cloroquina, a 7-cloroquinolina, na qual se verificaram propriedades bactericidas (Sousa, 2006). O ácido nalidíxico foi usado inicialmente em medicina humana para o tratamento de infecções urinárias não complicadas (por exemplo, cistites), causadas por bactérias de Gram negativo (excepto *Pseudomonas aeruginosa*) (Sousa, 2006; Cattoir *et al.*, 2009). No entanto, a sua utilização clínica veio a tornar-se muito limitada, quer pelas suas características farmacocinéticas (apenas atinge concentrações terapêuticas na urina, sendo apenas útil no tratamento de infecções do tracto urinário), quer pela alta incidência de efeitos secundários e de resistências bacterianas (Stahlmann, 1990; Emmerson *et al.*, 2003; Bambeke *et al.*, 2005; Mérens *et al.*, 2010). Ao longo de vários anos foram efectuadas diversas modificações estruturais, conseguindo-se melhorar progressivamente as características das quinolonas e, consequentemente, o seu espectro de acção e actividade microbiológica (Guimarães *et al.*, 2006; Luzzaro, 2008).

Embora os critérios utilizados pelos diferentes autores para a classificação das quinolonas sejam controversos, estas são geralmente agrupadas em quatro gerações (Figura 1), de acordo com as suas características e espectro de acção (Bambeke, 2005; Sousa, 2006).

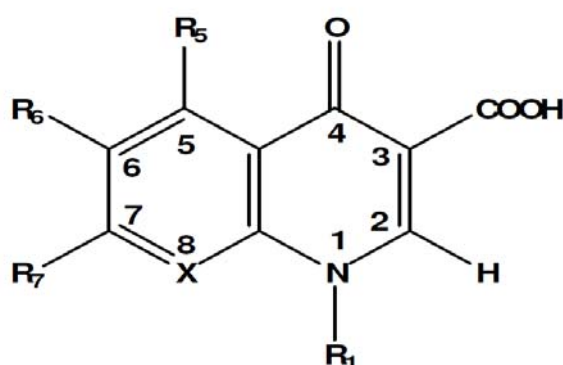


**Figura 1 – Quinolonas: classificação e décadas da sua descoberta e uso** (adaptado de Emmerson *et al.*, 2003).

As quinolonas de primeira geração têm acção antimicrobiana sobre bactérias de Gram negativo (excepto *Pseudomonas aeruginosa*), e são praticamente desprovidas de actividade contra bactérias de Gram positivo, bactérias atípicas e anaeróbias (Sousa, 2006; Luzzaro, 2008). Neste grupo incluem-se moléculas que apresentam distribuição sistémica diminuta, como por exemplo o Ácido Nalidíxico, o Ácido Pipemídico, o Ácido Oxolínico e a Cinoxacina (Sousa, 2006; Cattoir *et al.*, 2009).

As quinolonas de segunda geração surgem em 1980 e inauguram as chamadas quinolonas fluoradas ou fluoroquinolonas (FQ). Esta classe inclui as quinolonas monofluoradas como a Ciprofloxacina, a Norfloxacina, a Enrofloxacina, a Tosufloxacina e a Ofloxacina. Após a sua descoberta, rapidamente se tornaram num tratamento revolucionário para certas infecções, sobretudo devido à sua elevada potência antimicrobiana contra bactérias de Gram negativo e contra patogénicos atípicos intracelulares. Porém, apresentam uma acção limitada em bactérias de Gram positivo e praticamente não apresentam actividade contra anaeróbios (Sousa, 2006; Luzaro, 2008; Cattoir *et al.*, 2009).

A estrutura base das fluoroquinolonas (FQ) conserva no anel de naftiridina o ácido carboxílico na posição 3 e a ligação dupla entre o carbono e o oxigénio na posição 4, o que permite manter as propriedades de antibiose (Figura 2).



**Figura 2 – Estrutura base das Quinolonas** (adaptado de Sousa, 2007)

A introdução de um átomo de flúor ligado ao carbono 6 e de um ciclo aminado na posição 7 fazem aumentar o espectro de actividade destas moléculas (Sousa, 2006; Sousa, 2007). A presença de um grupo ciclopropilo na posição 1 contribui para a boa actividade sobre bactérias de Gram negativo (Sousa, 2006). De forma similar, a introdução de radicais cíclicos azotados na posição 7 faz aumentar a sua eficácia contra bactérias de Gram negativo (Emmerson *et al.*, 2003; Sousa, 2006)

A constante evolução que as fluorquinolonas foram sofrendo, levou ao aparecimento das quinolonas de *terceira* e de *quarta geração* (Sousa, 2006).

A *terceira geração* reúne as FQ bi- e tri-fluoradas, como por exemplo a Grepafloxacina e a Gatifloxacina, entre outras. Esta geração possui boa actividade contra bactérias de Gram negativo, contra patogénicos atípicos intracelulares e contra bactérias de Gram positivo. Contudo, apresentam ainda acção limitada contra anaeróbios. Este amplo espectro de acção deve-se à introdução de um grupo NH<sub>2</sub> na posição 5, o que lhes confere maior actividade sobre as bactérias de Gram positivo. O mesmo é observado com a introdução de um segundo radical cíclicos azotados na posição 7 (Sousa, 2006).

A *quarta geração de quinolonas*, de que é exemplo a Trovafloxacina, apresenta boa actividade em bactérias de Gram negativo e anaeróbias estritas, e muito boa actividade sobre bactérias de Gram positivo, sobre bactérias atípicas intracelulares e anaeróbios. Isto deve-se principalmente à introdução de um radical metoxi na posição 8 (Sousa, 2006).

As alterações estruturais descritas dotaram as quinolonas de um largo espectro de acção antibacteriana, de uma excelente biodisponibilidade (que permite tratamentos por via oral), de uma excelente difusão tecidular, de boa penetração intracelular, de actividade bactericida e de eficácia clínica bacteriológica (embora dependente da concentração que se alcançará no foco infeccioso) (Bamkeke *et al.*, 2005; Cattoir *et al.*, 2009; Mérens *et al.*, 2010). Estas características, associadas à boa tolerância destas moléculas e a uma segurança relativa, permitiu que as quinolonas deixassem de ser apenas consideradas anti-sépticos urinários, transformando-se em poderosos agentes

antibacterianos, usadas actualmente como terapêutica de primeira linha no tratamento de diversas infecções (incluindo infecções sistémicas graves) e/ou como alternativas terapêuticas aos mais eficazes agentes anti-infecciosos disponíveis (Guimarães *et al.*, 2006).

Uma vez que as quinolonas constituem antibióticos de origem inteiramente sintética, acreditava-se que não existiriam disponíveis mecanismos de resistência que pudessem ser mobilizados do cromossoma de certas bactérias para elementos genéticos móveis, e que portanto as bactérias não viriam a desenvolver facilmente resistência a estes antibióticos (Robicsek *et al.*, 2006b). Contudo, o incremento exponencial do seu consumo a que se tem vindo a assistir desde 1980 (Lastour *et al.*, 2010), tem contribuído para o aumento da prevalência de mecanismos de resistência às quinolonas, quer em bactérias de origem humana, quer em bactérias de origem animal, incluindo as pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (Nordmann *et al.*, 2005; Ferech *et al.*, 2006; Madurga *et al.*, 2008).

### **1.2.2. Mecanismo de acção**

As quinolonas exercem a sua actividade intracelularmente, interferindo com enzimas essenciais no crescimento bacteriano (Sousa, 2006; Cattoir *et al.*, 2009). Nas bactérias de Gram positivo, as quinolonas atingem o citoplasma após ultrapassarem a parede celular e a membrana citoplasmática (Mérens *et al.*, 2010). Já nas bactérias de Gram negativo, precisam de recorrer às proteínas transmembranares OmpF e OmpC para permearem a membrana externa da parede celular deste tipo de bactérias (Céspedes, 2008). Estas proteínas transmembranares formam canais aquosos, designados de porinas, e permitem a passagem destes antibióticos pela parede celular de bactérias de Gram negativo, a qual constitui a principal barreira à sua acção (Chapman *et al.*, 1988). No caso de quinolonas mais hidrofóbicas, como o ácido nalidíxico ou o ácido oxolínico, existe ainda a possibilidade de permearem a parede celular por difusão passiva (Chapman *et al.*, 1988; Piddock *et al.*, 1999).

No interior da célula bacteriana, as quinolonas actuam por inibição da actividade das enzimas *DNA girase* e *Topoisomerase IV*, ambas topoisomerasas. Esta inibição é

conseguida através da interferência com o controlo topológico que estas enzimas exercem sobre o DNA cromossomal, essencial para os processos de replicação, transcrição e recombinação, entre outros (Cattoir *et al.*, 2009).

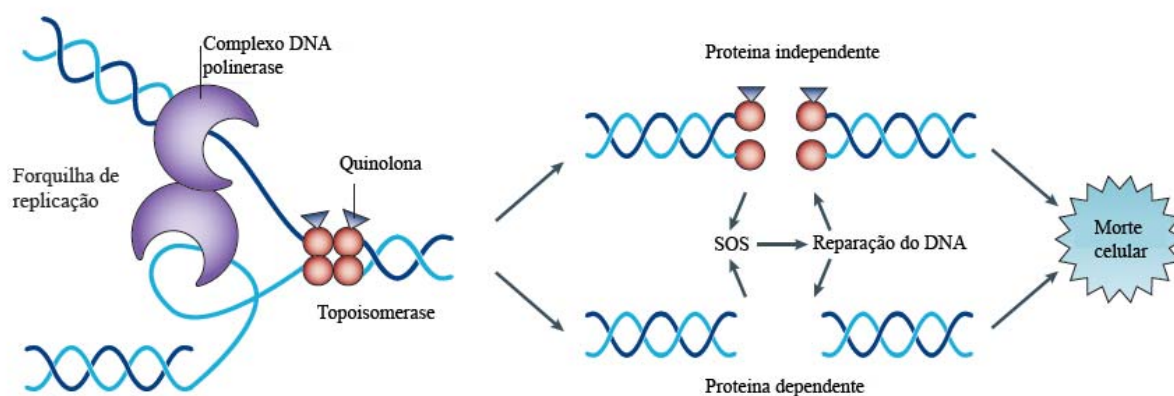
A *DNA girase* é uma enzima tetramérica constituída por duas subunidades A e duas subunidades B ( $A_2B_2$ ), codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente (Dougherty *et al.*, 2001; Cattoir *et al.*, 2009; Mérens *et al.*, 2010). Estas duas subunidades são responsáveis por induzir o superenrolamento negativo no DNA, ou seja, o enrolamento do DNA bacteriano numa direcção oposta ao da dupla hélice de DNA (Céspedes, 2008; Cattoir *et al.*, 2009). A actividade da DNA girase requer a presença de ambas as subunidades e de ATP (Céspedes, 2008; Mérens *et al.*, 2010). A subunidade A efectua cortes em certas regiões da molécula de DNA, permitindo assim à DNA girase, através dos resíduos de Tirosina-122 (N-terminal) da subunidade A, unir-se às extremidades 5'-fosfato que ficam livres (Céspedes, 2008). A subunidade B, por sua vez, induz o superenrolamento negativo. No final o DNA volta a unir-se e a DNA girase fica livre (Céspedes, 2008). O superenrolamento negativo do DNA é imprescindível para a replicação, transcrição, recombinação do DNA bacteriano e, eventualmente, para a sua reparação (Sousa, 2006; Cattoir *et al.*, 2009). Este estado de superenrolamento negativo torna também possível a compactação da longa cadeia de DNA dentro da célula bacteriana (Sousa, 2006).

A *Topoisomerase IV* constitui também uma enzima tetramérica, sendo formada por duas subunidades C e duas subunidades E ( $C_2E_2$ ), codificadas pelos genes *parC* e *parE*, respectivamente (Dougherty *et al.*, 2001). Tal como a DNA girase, necessita da presença de ambas as subunidades e de energia sob a forma de ATP para exercer a sua actividade (Céspedes, 2008; Mérens *et al.*, 2010). Esta enzima está envolvida no relaxamento e na separação do DNA, e permite a cisão dos cromossomas no final da replicação, levando a que cada uma das bactérias fique com o seu próprio genoma (Dougherty *et al.*, 2001; Céspedes, 2008). A acção coerente com a DNA girase assegura o desdobraimento do DNA durante a replicação e a segregação do DNA.

A *DNA girase* será o alvo primordial das quinolonas que actuam em bactérias de Gram negativo, e a *Topoisomerase IV* o principal alvo das quinolonas com acção nas

bactérias de Gram positivo (Sousa, 2006). Será a estrutura química das quinolonas que determinará o seu modo de acção (Bambeke *et al.*, 2005). Contudo, a sequência de aminoácidos codificada pelos genes *parC* e *parE* é homóloga à codificada pelo genes *gyrA* e *gyrB*, sendo a região correspondente designada de Região Determinante da Resistência a Quinolonas (QRDR, *Quinolone Resistance-Determining Region*). Esta similaridade nas sequências de aminoácidos entre a DNA girase e a Topoisomerase IV, particularmente na região QRDR do gene *gyrA* da DNA girase e *parC* da Topoisomerase IV, implica que as quinolonas sejam capazes de inibir tanto a DNA girase, como a Topoisomerase IV (embora em diferentes graus, dependendo da sua estrutura química), e portanto, possam ter actividade em bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, desde que tenham características que permitam a permeação da parede celular nestes dois tipos de células bacterianas (Céspedes, 2008).

As quinolonas habitualmente utilizadas para o tratamento de infecções por *Enterobacteriaceae* (e outros bacilos de Gram negativo) actuam sobretudo por ligação à subunidade A da DNA girase, impedindo o fecho dos cortes produzidos por esta enzima no DNA. Desta forma, impedem a replicação do DNA, exercendo um efeito bacteriostático (Céspedes, 2008; Cattoir *et al.*, 2009). A capacidade bactericida que lhes é atribuída deve-se à manutenção das rupturas introduzidas, as quais vão funcionar como sinais para as exonucleases (Céspedes, 2008; Cattoir *et al.*, 2009). As exonucleases vão clivar nucleótidos (Videira, 2001), dando origem a rupturas permanentes ao longo de todo o DNA e conduzindo à morte celular (Céspedes, 2008; Cattoir *et al.*, 2009) (Figura 3).



**Figura 3 – Mecanismo de acção das Quinolonas** (adaptado de Kohanski *et al.*, 2010).

### **1.2.3. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Enterobacteriaceae***

As bactérias têm vindo a desenvolver diversos mecanismos para resistir aos efeitos tóxicos dos agentes antibacterianos. O uso exacerbado de quinolonas, quer em medicina humana, quer em medicina veterinária, tal como se tem vindo a assistir nos últimos anos, aparece intimamente ligado ao incremento constante das resistências a estes fármacos em *Enterobacteriaceae* (White, 2005; Holzbauer *et al.*, 2006, Paterson *et al.*, 2006; Denton, 2007).

A resistência às quinolonas em *Enterobacteriaceae* ocorre usualmente por mutações cromossomais transmissíveis verticalmente (Lascols *et al.*, 2007; Cattoir *et al.*, 2008; Corvec *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2010; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010; Mérens *et al.*, 2010). Contudo, foram recentemente descritos mecanismos de resistência a quinolonas mediados por plasmídeos (PMQR, *Plasmid Mediated Quinolone Resistance*; RQMP em português), transmitidos horizontalmente (Lascols *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2009; Corvec *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Cattoir *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2010; Lunn *et al.*, 2010; Herrera-León *et al.*, 2011). Estes mecanismos de resistência podem surgir isoladamente ou em combinação, sendo certo que o aumento do grau de resistência às quinolonas se deve à actuação de vários mecanismos em simultâneo (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

#### **1.2.3.1. Resistência a quinolonas mediada por mutações cromossómicas**

As mutações cromossómicas podem ser divididas em dois grupos: mutações nas enzimas alvo e mutações que conferem diminuição do acesso às enzimas alvo (White, 2005; Poirel *et al.*, 2006; Paterson *et al.*, 2006; Cattoir *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010; Lastours *et al.*, 2010).

## A. Mutações nas enzimas alvo

As mutações que conduzem a alterações no local alvo da ação dos antibióticos constituem importantes mecanismos de resistência bacteriana a diversas classes de antibióticos (Mérens *et al.*, 2010). Nas quinolonas, estas mutações ocorrem nos genes que codificam as topoisomerases (*DNA girase* e *Topoisomerase IV*) (Cattoir *et al.*, 2009; Mérens *et al.*, 2010). Têm sido descritas substituições aminoacídicas nas proteínas GyrA/GyrB (*DNA girase*) e ParC/ParE (*Topoisomerase IV*), associadas ao surgimento de resistência às quinolonas por redução da afinidade destes antibióticos ao seu local de ligação (Bambeke *et al.*, 2005). Em *Enterobacteriaceae*, a resistência a quinolonas resulta de um acumular de mutações, que habitualmente ocorrem primeiro no gene que codifica a subunidade GyrA da *DNA girase* e só depois no gene que codifica a subunidade ParC da *Topoisomerase IV* (Vila *et al.*, 2006; Cattoir *et al.*, 2009; Corvec *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Porém, estas mutações espontâneas são um evento genético demasiado raro, sendo necessárias múltiplas mutações até que apareça um resultado clinicamente importante, isto é, até que surjam microrganismos resistentes às quinolonas (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

### A.1. Mutações no gene *gyrA*

As alterações descritas na proteína GyrA de uma vasta variedade de *Enterobacteriaceae* encontram-se fundamentalmente situadas na região determinante da resistência a quinolonas (QRDR), que se localiza entre os aminoácidos Alanina-67 e Glutamina-106 da proteína GyrA (Vila *et al.*, 1994; Madurga *et al.*, 2008; Cattoir *et al.*, 2009). Esta região encontra-se perto dos resíduos de Tirosina na posição 122, onde se considera que a *DNA girase* se une ao DNA (Vila *et al.*, 1994; Cattoir *et al.*, 2009). Segundo Vila (1994) e Hooper (2003), têm sido descritas numerosas mutações no gene *gyrA* que se traduzem em alterações aminoacídicas associadas à resistência a quinolonas, as quais se encontram indicadas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Mutações em GyrA associadas a resistência a quinolonas (adaptado de Céspedes, 2008).

<b>Codão</b>	<b>Aminoácido presente nas estirpes selvagens</b>	<b>Aminoácido(s) presente(s) nos mutantes</b>
51	Ala	Val
67	Ala	Ser
81	Gli	Cis, Asp
82	Asp	Gli
83	Ser	Leu, Trp, Ala, Val
84	Ala	Pro, Val
87	Asp	Asn, Gli, Val, Tir, His
106	Gln	Arg, His

Ala, Alanina; Asn, Asparagina; Arg, Arginina; Asp, Ácido aspártico; Cis, Cisteína; Gln, Glutamina; Gli, Glicina; His, Histidina; Leu, Leucina; Pro, Prolina; Ser, Serina; Trp, Triptofano; Tir, Tirosina; Val, Valina.

Mutações isoladas em GyrA são suficientes para causar um alto nível de resistência às quinolonas de primeira geração, o mesmo não se verificando para as fluoroquinolonas (Cattoir *et al.*, 2009; Corvec *et al.*, 2009). Frequentemente as mutações localizam-se nas posições Serina-83 e Ácido aspártico-87 (Sánchez-Céspedes *et al.*, 2007; Cattoir *et al.*, 2009; Corvec *et al.*, 2009). Associa-se à alteração em Serina-83 uma resistência moderada às fluoroquinolonas e uma resistência de alto nível ao ácido nalidíxico (Sánchez-Céspedes *et al.*, 2007). Isto deve-se ao facto da cadeia lateral de resíduos deste aminoácido ser responsável pela ligação da fluoroquinolona à *DNA girase* (Céspedes, 2008). No caso das alterações ocorridas em Ácido aspártico-87, estas conferem um nível mais elevado de resistência às fluoroquinolonas, uma vez que é nesta zona da proteína GyrA que se dá a interacção com o grupo nitrogenado da fluoroquinolona (Céspedes, 2008, Madurga *et al.*, 2008). Contudo, e como já foi referido anteriormente, para que surjam altos níveis de resistência bacteriana às fluoroquinolonas, é necessário a ocorrência de ambas as mutações ou a existência simultânea de mutações na subunidade ParC (Sánchez-Céspedes *et al.*, 2007; Cattoir *et al.*, 2009).

### A.2. Mutações no gene *parC*

As mutações em *parC* dão-se na região homóloga à região determinante da resistência a quinolonas do gene *gyrA*. Em *Enterobacteriaceae*, têm sido descritas mutações aminoácidas nos codões 80 e 84. Contudo, também foi descrita em *E. coli* uma mutação na posição 78, tanto em estirpes clínicas, como de laboratório (Heiseg, 1996; Céspedes, 2008). Vários autores têm referido que a existência de uma ou de mais mutações neste gene, associadas à existência de uma ou mais mutações em *gyrA*, conferem os altos níveis de resistência às fluoroquinolonas verificados em algumas *Enterobacteriaceae* (Vila *et al.*, 1994; Cattoir *et al.*, 2009).

### A.3. Mutações nos genes *gyrB* e *parE*

As mutações que ocorrem nos genes *gyrB* e *parE*, que codificam a subunidade GyrB e ParE, respectivamente, parecem ser raras e, no caso de *parE*, não se traduzem num resultado clinicamente relevante no contexto da resistência às quinolonas (Cattoir *et al.*, 2009). O papel do gene *parE* no desenvolvimento de resistência a quinolonas parece ser mesmo irrelevante, só se conhecendo uma mutação obtida *in vitro* (Céspedes, 2008).

## **B. Mutações que conferem diminuição do acesso às enzimas alvo**

A redução do acesso das quinolonas às suas enzimas alvo ocorre habitualmente por diminuição da sua concentração dentro da célula bacteriana. Isto pode dever-se a uma diminuição da permeabilidade causada por mutações em genes que regulam a síntese de porinas, ou a uma hiperexpressão de bombas de efluxo activo (Vila *et al.*, 2004; Mérens *et al.*, 2010). Nas bactérias de Gram negativo é frequente que os dois mecanismos de resistência coexistam (Vila *et al.*, 2004).

### B.1 Alterações nas porinas

Como já foi referido anteriormente, os canais de porina exercem um papel fundamental na difusão das quinolonas através da membrana externa das bactérias de

Gram negativo, sendo a velocidade de passagem condicionada pelo seu tamanho, grau de hidrofília e carga eléctrica (Chapman *et al.*, 1988). Desta forma, modificações nos padrões de porinas (por mutações nos genes correspondentes) podem conduzir a alterações nos padrões de susceptibilidade bacteriana às quinolonas (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

Algumas *Enterobacteriaceae* apresentam três porinas maioritárias: OmpA, OmpC e OmpF. Tem sido descrito que a diminuição da expressão de OmpF se relaciona com o aumento da resistência a algumas quinolonas, com excepção da Tosufloxacina e da Esparfloxacina (Céspedes, 2008). A diminuição da permeabilidade não é, obviamente, suficiente para contrariar a acumulação do agente antibacteriano no interior da bactéria; somente proporciona um atraso na sua entrada (Vila *et al.*, 2004). Vários estudos referem este evento como um mecanismo que confere resistência a quinolonas (Cattoir *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Contudo, são poucos os que confirmam a sua presença, o que leva a crer que são eventos demasiado raros (Robicsek *et al.*, 2006b; Cagnacci *et al.*, 2008; Strahilevitz *et al.*, 2009; Cattoir *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

## B.2. Bombas de expulsão activa

Em *Enterobacteriaceae* tem sido descrito o sistema de transporte AcrAB. Trata-se de uma bomba pertencente à família RND (*Resistance-Nodulation-Division*), que provoca o efluxo de uma enorme variedade de substratos, incluindo as quinolonas, e que utiliza o fluxo de protões como fonte de energia (Hooper *et al.*, 2003; Vila *et al.*, 2004, Sánchez-Céspedes *et al.*, 2007; Coyne *et al.*, 2011). Foi descrita pela primeira vez em *E. coli* e é constituída por três elementos: uma proteína integral da membrana citoplasmática (AcrB); uma lipoproteína periplasmática (AcrA) que faz a ligação com as proteínas da membrana externa; e o canal TolC, existente na membrana externa e que faz o efluxo do fármaco (Hooper *et al.*, 2003, Sánchez-Céspedes *et al.*, 2007). Mutações no gene *acrR*, que é um repressor dos genes que codificam este sistema de transporte (*acrA*, *acrB* e *tolC*), levam a uma hiperexpressão dos mesmos (Hooper *et al.*, 2003, Sánchez-Céspedes *et al.*, 2007). É de salientar que os genes que codificam o sistema de transporte AcrAB são co-activados pelos operões MarAB e SoxSR (Hooper *et al.*,

2003). Da mesma forma, estas operações regulam a expressão do gene *micF*, que reprime o RNA *antisense* durante a transcrição de *ompF*. Assim, uma mutação no repressor MarR, induz a expressão dos genes *acrA* e *acrB*, e reduz a expressão de *ompF*. Este evento leva a uma hiperexpressão da bomba AcrAB e a uma diminuição de porinas OmpF, e conseqüentemente conduz a uma diminuição da concentração do fármaco dentro da célula bacteriana (Hooper *et al.*, 2003, Sánchez-Céspedes *et al.*, 2007; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

É importante referir que a hiperexpressão de bombas de efluxo não é suficiente para conferir resistência de alto nível às fluoroquinolonas, uma vez que a acumulação de elevadas concentrações do antibiótico no interior da bactéria é prevenida, mas não completamente impedida (Hawkey, 2003; Sánchez-Céspedes *et al.*, 2007; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Torna-se necessária a associação com mutações nos genes *gyrA* ou *parC* para que a resistência seja clinicamente significativa (Hawkey, 2003; Sánchez-Céspedes *et al.*, 2007).

#### **1.2.3.2. Resistência adquirida: resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (RQMP)**

A descoberta recente da resistência adquirida a quinolonas, a qual tem sido associada à transferência horizontal de genes mediada por plasmídeos (RQMP), veio acrescentar uma nova dimensão ao problema da resistência a esta família de antibióticos (Strahilevitz *et al.*, 2009; Karah *et al.*, 2010; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Entre os mecanismos de resistência a quinolonas mediados por plasmídeos incluem-se: i) a protecção das enzimas alvo por proteínas Qnr (QnrA, QnrB, QnrS, QnrC, QnrD), as quais pertencem a uma família de pentapeptídeos repetidos que protegem a DNA girase e a Topoisomerase IV da inibição das quinolonas (Robicsek *et al.*, 2006; Cattoir *et al.*, 2009; Karah *et al.*, 2010; Strahilevitz *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2010; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010); ii) a variante de uma aminoglicosídeo acetiltransferase, AAC(6')-Ib-cr, capaz de acetilar e conseqüentemente reduzir a actividade da norfloxacin e da ciprofloxacina (Robicsek *et al.*, 2006; Cattoir *et al.*, 2009; Jacoby *et al.*, 2009; Karah *et al.*, 2010; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010); e, mais recentemente, iii) bombas de efluxo proteicas (QepA e OqxAB) que expulsam

fluoroquinolonas para fora da célula bacteriana (Cattoir *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009; Cattoir *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2010; Karah *et al.*, 2010; Herrera-Léon *et al.*, 2011).

Os mecanismos de RQMP conferem um baixo nível de resistência a quinolonas, embora facilitem a aquisição de outros mecanismos de resistência a quinolonas na presença de concentrações terapêuticas ou sub-terapêuticas destes antibióticos (Strahilevitz *et al.*, 2009; Karah *et al.*, 2010; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

### **A. Protecção das enzimas alvo por proteínas Qnr**

As proteínas Qnr (*quinolone resistance*) pertencem à família dos pentapeptídeos repetidos. Esta família, com mais de 500 membros, apresenta na sua estrutura base uma sequência de cinco aminoácidos repetidos, com presença de um resíduo de cisteína na zona central da repetição: [Serina, Treonina, Alanina ou Valina]<sup>1</sup>-[Ácido Aspártico ou Asparagina]<sup>2</sup>-[Leucina, Fenilalanina]<sup>3</sup>-[Serina, Treonina ou Arginina]<sup>4</sup>-[Glicina]<sup>5</sup> (Strahilevitz *et al.*, 2009; Cattoir *et al.*, 2009).

As proteínas Qnr protegem a DNA girase e a Topoisomerase IV da acção inibidora das quinolonas, por interferência com o complexo topoisomerase/DNA/quinolonas, cuja formação é essencial para que estes antibióticos exerçam a sua actividade antibacteriana (Minarini *et al.*, 2008; Teo *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Este mecanismo de protecção das enzimas alvo não se encontra completamente elucidado e até ao momento apenas foi estudado para a proteína QnrA (Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). No entanto, admite-se que toda a família tenha a mesma forma de actuar. Sabe-se que a proteína QnrA protege a DNA girase e a Topoisomerase IV, uma vez que se liga às subunidades de ambas as enzimas e forma o *complexo QnrA-topoisomerase*. A formação deste complexo reduz a formação do complexo binário topoisomerase-DNA e inibe a ligação das quinolonas às enzimas, evitando desta forma a formação do complexo topoisomerase-DNA-quinolona (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). A ligação de QnrA às topoisomerasas ocorre antes da formação do complexo ternário topoisomerase-DNA-quinolona e da ligação ao ATP, não dependendo por isso destas

alterações conformacionais (Cattoir *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Há que salientar que, segundo alguns autores, a formação do complexo Qnr–topoisomerase pode contribuir para mutações, nomeadamente no local de ligação à subunidade (Cattoir *et al.*, 2009).

As proteínas Qnr conferem resistência ao ácido naladixico e diminuição da susceptibilidade à ciprofloxacina (Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). No entanto, há ainda a possibilidade dos genes que codificam para estas proteínas (os genes *qnr*) permanecerem na célula bacteriana sem se expressarem, o que faz com que não haja alteração do perfil de susceptibilidade (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Tal pode ser revertido pela presença de quinolonas em níveis terapêuticos, os quais podem induzir a expressão destes genes (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

Até ao momento foram identificados os seguintes tipos de genes *qnr*:

- ***qnrA***. Codifica para a proteína QnrA, constituída por 218 aminoácidos e que protege a DNA girase e a Topoisomerase IV da acção das quinolonas (Cattoir *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). O gene *qnrA* foi o primeiro gene *qnr* encontrado, constituindo também a primeira descrição de um mecanismo de resistência a quinolonas mediado por plasmídeos. Foi identificado num plasmídeo conjugativo de 56 kb (pMG252) codificando também a  $\beta$ -lactamase FOX-5, obtido de uma *Klebsiella pneumoniae* isolada da urina de um paciente (1994, Birmingham) (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010; Cattoir *et al.*, 2009). A presença do gene *qnrA* na célula bacteriana pode levar ao aumento da CMI para as quinolonas (geralmente conduz a um aumento da CMI das fluoroquinolonas até cerca de 20 vezes) e pode facilitar a aquisição de mecanismos de resistência de alto nível a estes antibióticos (Cattoir *et al.*, 2007; Lascols *et al.*, 2007; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Até ao momento foram identificadas 7 variantes deste gene (*qnrA1* a *qnrA7*) (<http://www.lahey.org/qnrStudies/>);
- ***qnrB***. A primeira descrição do gene *qnrB* ocorreu em 2004, em isolados de *K. pneumoniae* recolhidos na Índia durante o ano de 1994 (Jacoby *et al.*, 2006). Este gene codifica uma proteína de 214 aminoácidos com 43% e 44% de semelhança com

as proteínas QnrA e QnrS, respectivamente (Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Até ao momento foram encontradas 31 variantes do gene *qnrB* (*qnrB1* a *qnrB31*) (<http://www.lahey.org/qnrStudies/>);

- ***qnrS***. O primeiro gene *qnrS* (*qnrS1*) foi descoberto em 2003 num plasmídeo conjugativo presente num clone de *Shigella flexneri*, no Japão (Hata *et al.*, 2005). Este gene codifica uma proteína com 218 aminoácidos e com 59% de semelhança com QnrA (Cattoir *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Até ao momento foram identificadas 4 variantes deste gene (*qnrS1*, *qnrS2*, *qnrS3*, *qnrS4*) (<http://www.lahey.org/qnrStudies/>);
- ***qnrC***. O gene *qnrC* foi recentemente descoberto na China (2009) num isolado clínico de *Proteus mirabilis* (Wang *et al.*, 2009). Este gene, com um tamanho de 666 bp, é transportado num plasmídeo conjugativo (pHS9) e codifica uma proteína de 221 aminoácidos (Cattoir *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). A proteína que codifica, QnrC, apresenta uma homologia de 64%, 41%, 59% e 43% com QnrA, QnrB, QnrS e QnrD, respectivamente (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010);
- ***qnrD***. O gene *qnrD* foi também descrito recentemente pela primeira vez num isolado de *Salmonella enterica* de origem humana (China, 2009) (Cattoir *et al.*, 2009; Cavaco *et al.*, 2009). Encontra-se localizado num plasmídeo conjugativo de 4.3 kb e codifica uma proteína de 214 aminoácidos que apresenta baixa homologia com as restantes proteínas Qnr (48%, 61% e 32% com QnrA, QnrB e QnrS, respectivamente) (Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Em *Escherichia coli* aumenta 32 vezes a CMI à ciprofloxacina (Cattoir *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

Pensa-se que os genes *qnr* tiveram uma origem cromossómica, tanto em bactérias de Gram negativo como de Gram positivo, provenientes de vários habitats (Jacoby *et al.*, 2008; Cantón *et al.*, 2009; Cattoir *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Por exemplo, o gene *qnrA* difere em poucos nucleótidos do gene *qnrA-like* encontrado no genoma de *Shewanella algae* (Cattoir *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Da mesma forma, o gene *qnrS-like* presente no

genoma de *Vibrio splendidus* apresenta 80% e 84% de homologia com o gene *qnrS1* e *qnrS2*, respectivamente (Cantón *et al.*, 2009; Cattoir *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Já o gene *Smaqnr* presente no cromossoma de *Serratia marcescens* codifica para uma proteína Qnr que apresenta 80% de homologia com QnrB1 (Velasco *et al.*, 2010). Proteínas Qnr-like codificadas por genes *qnr-like* foram ainda identificadas em várias bactérias de Gram positivo, como *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, *Bacillus cereus* e *B. subtilis* (Cattoir *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Estas proteínas Qnr-like encontradas no cromossoma destas bactérias de Gram positivo apresentam uma homologia entre 16% e 22% com as proteínas QnrA, QnrB e QnrS (Cattoir *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). De igual forma, estas proteínas Qnr-like codificadas por genes do cromossoma bacteriano de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo conferem diminuição da susceptibilidade às quinolonas (Cattoir *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Este facto leva-nos a crer que as bactérias de Gram positivo poderão também ser potenciais reservatórios de genes *qnr* ainda desconhecidos (Cattoir *et al.*, 2009).

## **B. Inativação enzimática por AAC(6')-Ib-cr**

As quinolonas podem ser parcialmente degradadas por enzimas, o que provoca uma redução da sua actividade nos locais alvo (Mérens *et al.*, 2010). Este processo de inativação enzimática das quinolonas ocorre no interior da célula bacteriana, antes da sua acção sobre as topoisomerasas. Um bom exemplo deste processo é a inativação pela enzima AAC(6')-Ib-cr, uma variante cr (*c*iprofloxacina *r*esistência) da subclasse de enzimas AAC(6')-I, que inclui enzimas que modificam aminoglicosídeos por acetilação dos seus grupos -NH<sub>2</sub>, e por isso designadas de aminoglicosídeo-N-acetiltransferases (AACs) (Jacoby *et al.*, 2009; Robicsek *et al.*, 2006; Bonomo *et al.*, 2007). As enzimas AAC(6')-I podem ser codificadas por genes localizados no cromossoma de bactérias de Gram positivo ou de Gram negativo, ou em plasmídeos, transposões ou integrões, conferindo habitualmente resistência a aminoglicosídeos como a tobramicina, a netilmicina, e a canamicina, entre outros (Robicsek *et al.*, 2006; Bonomo *et al.*, 2007; Jacoby *et al.*, 2009).

A variante AAC(6′)-Ib-cr apresenta-se assim como uma enzima codificada por um gene de localização plasmídica que modifica duas classes de antibióticos: aminoglicosídeos e quinolonas (Bonomo *et al.*, 2007; Pitout *et al.*, 2008; Mérens *et al.*, 2010). Reduz a actividade ou inactiva as fluoroquinolonas ciprofloxacina e norfloxacina, através da acetilação do amino nitrogeno do anel piperazil, o que resulta na quadruplicação da CMI (Park *et al.*, 2006; Robicsek, *et al.*, 2006b; Pitout *et al.*, 2008; Jacoby *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009c). Esta capacidade advém de mutações nos codões 102 (Triptofano→Arginina) e 179 (Ácido aspártico→Tirosina), embora tenha como consequência uma diminuição da sua actividade em aminoglicosídeos (Park *et al.*, 2006; Robicsek *et al.*, 2006; Robicsek *et al.*, 2006b; Kim *et al.*, 2009d).

### **C. Bombas de efluxo codificadas por genes de localização plasmídica**

#### **C.1. QepA (Quinolone efflux pump)**

QepA constitui uma bomba de efluxo de natureza proteica, codificada pelo gene de localização plasmídica *qepA*. O gene *qepA* foi identificado pela primeira vez em 2002, no Japão, num plasmídeo (pHPA) contendo também genes codificando para resistência a  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos (Cantón *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

A bomba de efluxo QepA pertence à família de transportadores de 14 segmentos transmembranares, integrada na superfamília MFS (*Major Facilitator Superfamily Transporters*), e promove a expulsão de fluoroquinolonas hidrofílicas (por exemplo, ciprofloxacina, norfloxacina, enrofloxacina) para fora da célula bacteriana (Cattoir *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). A sua acção conduz a um aumento de 32 a 64 vezes no valor da CMI das estirpes selvagens (Cattoir *et al.*, 2008; Minarini *et al.*, 2008). Actualmente existem descritas duas variantes, QepA1 e QepA2, codificadas pelos genes *qepA1* e *qepA2*, respectivamente, as quais diferem apenas em dois aminoácidos (Alanina<sup>99</sup>→Glicina; Valina<sup>134</sup>→ Isoleucina) (Kim *et al.*, 2009b; Strahilevitz *et al.*, 2009).

## C.2. OqxAB

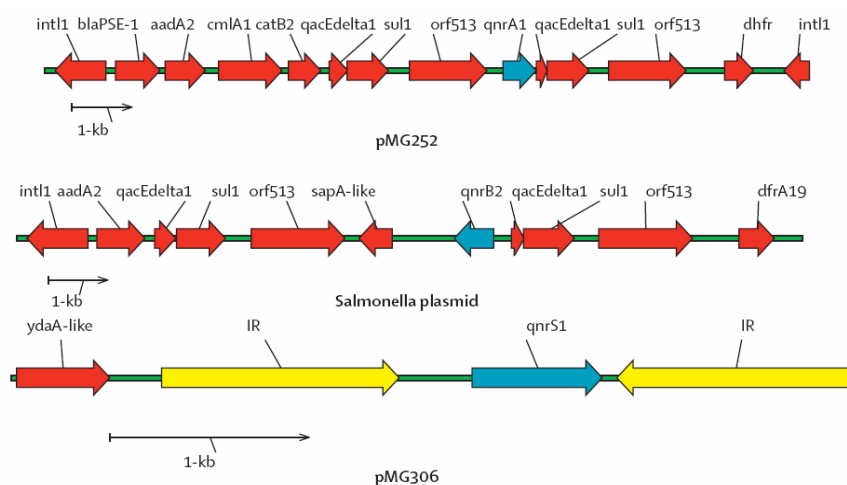
A bomba de efluxo OqxAB foi descrita pela primeira vez em 1995 num isolado de *E. coli* proveniente de uma suinicultura (Strahilevitz *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010). O gene codificante, *oqxAB*, foi encontrado num plasmídeo conjugativo que conferia resistência ao antibiótico Olaquinox, um derivado da quinolaxina usado em agricultura e veterinária como promotor do crescimento (Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Anos mais tarde, descobriu-se que esta bomba de efluxo pertence à família de transportadores activos RND (*Resistance-Nodulation-Division*), capaz de conferir resistência a múltiplos antibióticos, incluindo fluoroquinolonas. É codificada por dois genes de localização plasmídica, *oqxA* e *oqxB*, que se encontram no mesmo operão e que são activados na presença de Olaquinox (Coyen *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2010). À semelhança dos restantes membros desta família de transportadores activos, necessita da presença do canal transmembranar TolC (codificado pelo gene *tolC*) para o efluxo activo do fármaco (Zhao *et al.*, 2010). Pensa-se que os genes que codificam para esta bomba de efluxo activo tenham origem no cromossoma de *K. pneumoniae*, dada a similaridade da sequência de nucleótidos dos genes *oqxA* e *oqxB* encontrados no plasmídeo do isolado de *E. coli* acima referido, e os genes *oqxA* e *oqxB* presentes no cromossoma de *K. pneumoniae* (99,5% e 99,0%, respectivamente) (Kim *et al.*, 2009).

### **1.2.4 Ambiente genético dos genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas (RQMP)**

Os genes que codificam para a resistência adquirida a quinolonas em *Enterobacteriaceae* encontram-se localizados em diferentes tipos de elementos genéticos móveis, como plasmídeos conjugativos, transposões compostas, sequências de inserção, cassetes genéticas ou integrões alojados em plasmídeos conjugativos/transposões, o que torna este mecanismo de resistência facilmente e rapidamente disseminável entre diferentes espécies (McGrath *et al.*, 2006). Por outro lado, os processos de recombinação e a consequente evolução destes elementos genéticos móveis, torna comum a coexistência de genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas e de genes que conferem resistência a  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, sulfonamidas, trimetoprim, e cloranfenicol, entre outros,

nessas estruturas genéticas, conferindo à bactéria um fenótipo de multiresistência (Machado *et al.*, 2005; Cattoir *et al.*, 2009; Karah *et al.*, 2010; Cantón *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

Os genes *qnrA* têm sido associados a integrões de classe 1 e/ou a sequências de inserção (ISs, transposões simples), como por exemplo *ISCR1* (no passado designada de Orf513) (Ferreira *et al.*, 2010), os quais por sua vez se encontram numa vasta variedade de plasmídeos, muitas vezes adjacentes a outros genes de resistência a antibióticos, como os que codificam para  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs) do tipo SHV, CTX-M e VEB-1, ou  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC (FOX-5 e DHA-1) (Lavilla *et al.*, 2008; Pitout *et al.*, 2008; Corvec *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010). O mesmo se verifica com os genes *qnrB* e *qnrS*, embora o ambiente genético em que estejam inseridos seja por vezes diferente. *qnrB* tem sido descrito no mesmo tipo de integrões que *qnrA*, muitas vezes associado aos mesmos transposões simples (*ISCR1*) ou associados a Orf1005 (Robicsek *et al.*, 2006b; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Alguns alelos específicos, como *qnrB19*, aparecem mais associados à sequência de inserção *ISEcp1* (Cattoir *et al.*, 2009). Já no caso do gene *qnrS1*, tem-se verificado a sua localização a montante de transposões do tipo *Tn3-like* ou de *ISEcl2* (Cattoir *et al.*, 2009; Karah *et al.*, 2010). Foi ainda descrita a associação do gene *qnrS2* a cassetes genéticas e a transposões inseridos em plasmídeos do tipo IncU2, ubiqüitários numa vasta variedade de ambientes (Cantón *et al.*, 2009; Karah *et al.*, 2010; Antunes *et al.*, 2011). Na Figura 3 encontra-se representado o ambiente genético de alguns genes *qnr*.



**Figura 4 – Ambiente genético de genes *qnr*** (adaptado de Robicsek *et al.*, 2006)

A presença do gene *aac(6′)-Ib-cr* tem sido descrita maioritariamente em integrões de classe 1 e/ou em transposões Tn1331, assim como associado às sequências de inserção *ISEcp1* ou *ISCR1* (Kim *et al.*, 2009b; Cattoir *et al.*, 2009) Este tipo de localização é responsável pela alta mobilidade e disseminação do gene *aac(6′)-Ib-cr*. Aparece frequentemente associado a outros mecanismos de resistência adquirida a quinolonas (por exemplo, genes *qnr*) e a  $\beta$ -lactamases (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-9, CXT-M-14, CTX-M-24, DHA-1, TEM-1, SHV-12, KPC-2, OXA-1) (Park *et al.*, 2006; Cattoir *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009b; Kim *et al.*, 2009c; Strahilevitz *et al.*, 2009).

Estudos recentes demonstram que *qepA* se encontra frequentemente em plasmídeos do tipo IncF1, muitas vezes albergando transposões, como Tn10, Tn21, Tn30 e sequências de inserção (Cattoir *et al.*, 2008; Périchon *et al.*, 2008; Cattoir *et al.*, 2009). Têm sido descritas duas cópias de IS26 a flanquear o gene *qepA1* e junto a *qepA2* foi identificada uma nova sequência de inserção (ISCR3C) (Liu *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Cattoir *et al.*, 2008; Strahilevitz *et al.*, 2009). O gene que codifica para a bomba de efluxo OqxAB aparece também frequentemente flanqueado por IS26, sugerindo também uma mobilização como parte integrante de transposões compostos (Kim *et al.*, 2009). Vários estudos descrevem a presença de *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CXT-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-24</sub>, *bla*<sub>DHA-1</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *sull*, *tet(A)* e *rmtB*, que codifica para uma 16S rRNA metiltransferase, no ambiente genético de *qepA*, conferindo desta forma um fenótipo de multiresistência aos isolados (Cattoir *et al.*, 2008; Cantón *et al.*, 2009; Corvec *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009).

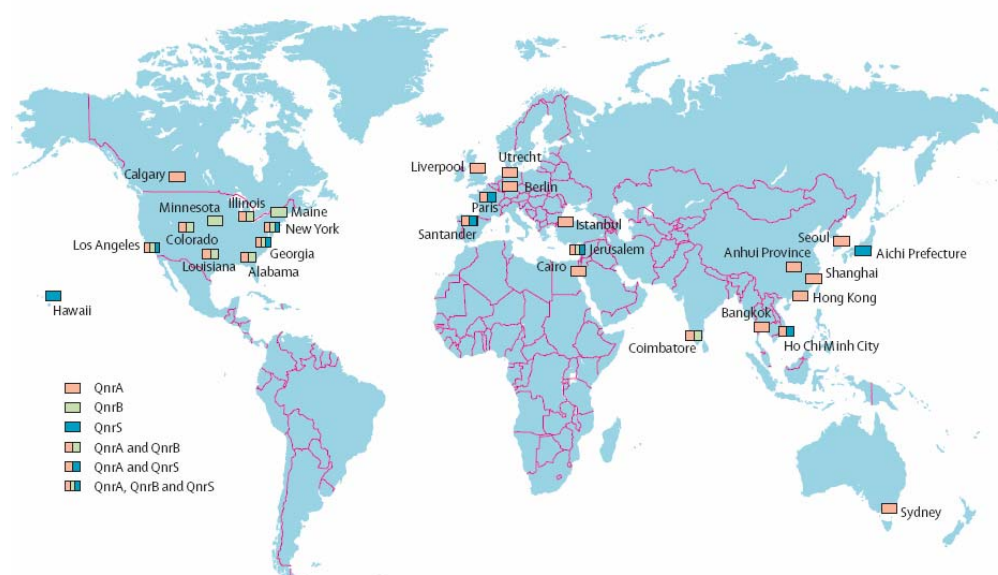
### 1.3. Epidemiologia da resistência adquirida a quinolonas em *Enterobacteriaceae*

#### 1.3.1. Epidemiologia no Mundo

Decorridos mais de vinte anos desde a introdução das fluoroquinolonas na prática clínica, a resistência de *Enterobacteriaceae* a estes agentes começa a ser comum e dispersa territorialmente, e em geral não relacionada com a dispersão clonal de

estirpes bacterianas (Robicsek *et al.*, 2006b; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). A frequência da resistência de *Enterobacteriaceae* às quinolonas parece ter aumentado com a descoberta dos mecanismos de resistência a quinolonas mediados por plasmídeos (Denton, 2007), constituindo actualmente um problema de saúde pública que requer atenção imediata, atendendo à facilidade com que os genes que codificam para esta resistência se disseminam à escala global e ao conseqüente comprometimento do tratamento das doenças infecciosas (Robicsek *et al.*, 2006, Paterson *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Pitout *et al.*, 2008; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

Após a descoberta do primeiro mecanismo de RQMP (QnrA) num isolado de *K. pneumoniae* em Birmingham, vários estudos foram desenvolvidos para encontrar este gene em outras regiões geográficas (Lascols *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2009; Jacoby *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Estes estudos não só forneceram dados epidemiológicos acerca do gene *qnrA*, como conduziram à descoberta de outros genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas (*qnrS*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *aac(6)-Ib-cr*, *qepA*, *oqxAB*) (Hansen *et al.*, 2004; Yamane *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Cavaco *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009). A Figura 5 apresenta a distribuição geográfica dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* à data de 2006.



**Figura 5 – Distribuição geográfica dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* à data de 2006** (adaptado de Robicsek *et al.*, 2006b).

Até ao final de 2008, mais de setenta publicações em revistas científicas e resumos de congressos demonstravam a presença de genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas em cerca de vinte e um mil isolados bacterianos de *Enterobacteriaceae* (Strahilevitz *et al.*, 2009). A média da prevalência de genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* nesta base de dados compilada era de 1.5%, 4.6% e 2.4%, respectivamente, tendo sido encontrados em todos os Continentes e numa vasta variedade de plasmídeos e de espécies de *Enterobacteriaceae*, nomeadamente *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *E. amnigenus*, *E. sakazakii*, *Citrobacter freundii* e *Providencia stuartii*, entre outros (Strahilevitz *et al.*, 2009; Pitout *et al.*, 2008; Cattoir *et al.*, 2009; Karah *et al.*, 2010). A maioria dos estudos refere uma maior prevalência de genes *qnr* entre os géneros *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp., seguidos de *E. coli*, sendo também evidente a maior ocorrência do gene *qnrB* (Robicsek *et al.*, 2006b; Strahilevitz *et al.*, 2009; Lavilla *et al.*, 2008).

Para os genes *qnr* recentemente descobertos (*qnrC* e *qnrD*), existem poucos estudos epidemiológicos disponíveis. Após a descoberta inicial de *qnrC* na China não se relatou mais a sua presença em outros isolados bacterianos, levando a supor que o reservatório de *qnrC* estará associado a *Proteus mirabilis* (Wang *et al.*, 2009). Quanto a *qnrD*, após a primeira descrição em *Salmonella enterica*, foi identificado em *E. coli* e *Proteus* spp. na China, e em isolados de *Salmonella* spp. obtidos de 13 países Europeus (Cavaco *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010; Ogbolu *et al.*, 2011; Veldman *et al.*, 2011).

A mesma compilação de dados refere ainda uma prevalência média do gene *aac(6')-Ib-cr* de 10.8%, transformando este gene no mais prevalente por todo mundo (Strahilevitz *et al.*, 2009). Ainda que seja encontrado numa vasta variedade de *Enterobacteriaceae*, tem sido mais frequente em *E. coli*, seguindo-se *K. pneumoniae*, *E. cloacae* e *E. agglomerans* (Park *et al.*, 2006; Jacoby *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009c; Strahilevitz *et al.*, 2009).

Apesar dos genes *qnr* e o *aac(6')-Ib-cr* terem vindo a ser relatados um pouco por todo o Mundo, pensa-se que o seu principal reservatório sejam países dos Continentes Asiático e Americano, nos quais alguns estudos descrevem prevalências entre os 50% e os 90% (Park *et al.*, 2006; Cattoir *et al.*, 2007; Corvec *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009c). A

análise dos estudos realizados até ao momento permite ainda concluir que existe uma relação entre a presença destes mecanismos de resistência adquirida a quinolonas e a produção de ESBLs (Robicsek *et al.*, 2006b; Cattoir *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2009; Cattoir *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2006, Corvec *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009c; Ma *et al.*, 2009; Lastours *et al.*, 2010; Herrera-León *et al.*, 2011).

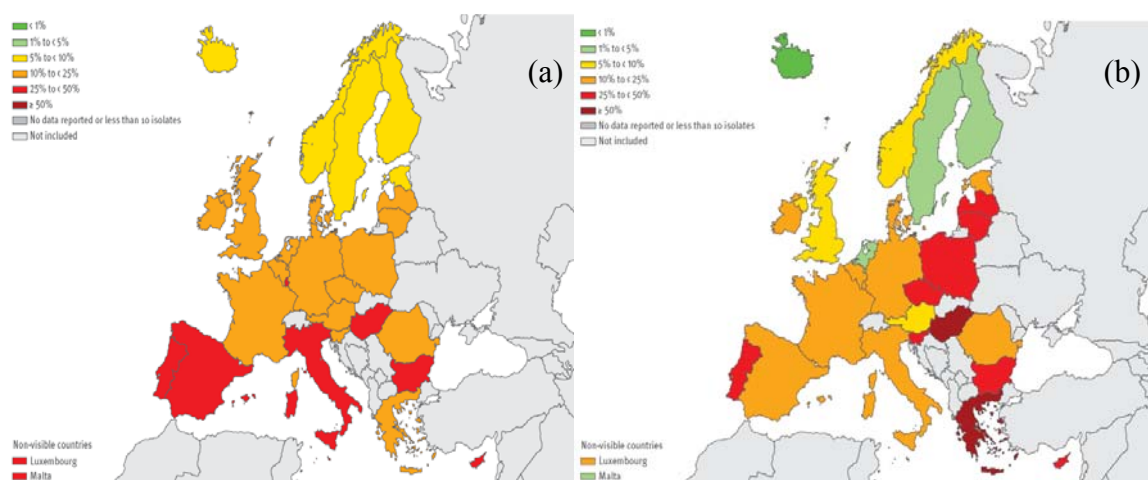
No que se refere à epidemiologia de *qepA*, poucos estudos foram realizados até ao momento, pelo que não existem conclusões muito claras quanto à sua prevalência e disseminação mundiais. No entanto, as poucas investigações que foram realizadas parecem apontar para uma baixa prevalência na Europa e uma prevalência elevada na Ásia e nos Estados Unidos, chegando a atingir-se valores de 90% de prevalência em bactérias produtoras de 16S rRNA metiltransferases (codificadas pelo gene *rmtB*) (Ma *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Tem sido mais frequente em *E. coli* (Cattoir *et al.*, 2008; Strahilevitz *et al.*, 2009).

Finalmente, a disseminação do gene *oqxAB* parece ter abrandado nos últimos anos. Com a abolição do uso do Olanquidox na Europa, parece não ter sido mais encontrado (Hansen *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2005). Contudo, em países asiáticos a sua prevalência continua elevada, sendo o seu principal reservatório a espécie *E. coli* (Kim *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010).

Conclui-se assim que após os relatos de 2008, os genes que codificam para mecanismos de RQMP continuam em expansão. Entre Janeiro 2009 e Março de 2010, foram publicados mais 121 estudos originais sobre resistência adquirida a quinolonas, o que corresponde a 38% das publicações sobre RQMP (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Todavia, a prevalência exacta da RQMP é ainda difícil de determinar, podendo variar entre 0.2% e 94%, conforme os critérios usados para o estudo (produção de ESBLs e/ou resistência ao ácido naladixico e/ou a escolha de um género bacteriano específico) (Strahilevitz *et al.*, 2009; Corvec *et al.*, 2009; Cattoir *et al.*, 2009). Estes factos levam a crer que a prevalência destes mecanismos de resistência adquirida a quinolonas seja ainda mais elevada do que a publicada até ao momento.

### 1.3.2. Epidemiologia na Europa

Dados recentemente publicados reflectem um aumento significativo da resistência a quinolonas nos últimos anos por toda a Europa (ECDC, 2009; Cagnacci, 2008). Duas das principais espécies bacterianas da família *Enterobacteriaceae*, *E. coli* e *K. pneumoniae*, apresentam taxas de resistência elevadas a fluoroquinolonas (20%-50%), podendo mesmo no caso de *K. pneumoniae* encontrar-se taxas de resistência superiores a 50% em alguns países, não se verificando tendência para baixar (Figura 6) (ECDC, 2009).



**Figura 6 - Percentagem de resistência a fluoroquinolonas em *E. coli* (a) e em *K. pneumoniae* (b) isoladas em países da União Europeia no ano 2009 (adaptado de ECDC, 2009)**

Apesar deste fenótipo de resistência não diferenciar entre mutações cromossómicas ou mecanismos de RQMP, é inegável o contributo destes últimos para o aumento generalizado da resistência a quinolonas um pouco por toda a Europa. Não só porque as mutações cromossómicas são eventos demasiado raros para servir de justificação dos valores aqui apresentados, mas também porque o facto dos genes que codificam para a resistência adquirida a quinolonas se localizarem em plataformas genéticas móveis permite a sua ampla e rápida disseminação, contribuindo ainda para a selecção e aquisição posteriores de mutações cromossómicas conducentes a altos níveis de resistência a quinolonas (Strahilevitz *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010).

Estima-se que os genes que codificam para a resistência adquirida a quinolonas estejam disseminados por toda a Europa (Cattoir *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009;

Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Em alguns países onde a taxa de resistência a quinolonas é elevada verifica-se também uma alta incidência de mecanismos de RQMP. É o que acontece por exemplo em Espanha, França, Itália, Suécia e Reino Unido (Lavilla *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2009; Kara *et al.*, 2010, Herrera-Léon *et al.*, 2011; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Contudo, relatos relativos aos mecanismos de RQMP mais recentes (*qepA* e *oqxAB*) são nulos ou quase nulos na Europa. Até ao momento, o gene *qepA* foi apenas identificado na França, Bélgica e Reino Unido, em isolados bacterianos contendo também o gene *rmtB* (Cattoir *et al.*, 2008; Cantón *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). *oqxAB* só foi descrito até ao momento na Dinamarca e na Suécia em *E. coli* obtidos antes da proibição do uso de Olanquidox enquanto promotor de crescimento (Hansen *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2007).

### 1.3.3. Epidemiologia em Portugal

Apesar de Portugal se encontrar entre os países que apresentam as maiores taxas de *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas (ECDC, 2009), poucos estudos foram realizados até ao momento para avaliar o contributo de diferentes mecanismos de resistência adquirida a quinolonas para este cenário epidemiológico.

A primeira descrição de mecanismos de resistência adquirida a quinolonas em Portugal ocorreu em 2006, correspondendo à identificação do gene *aac(6')-Ib-cr* em *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-15 obtidas maioritariamente de hospitais Portugueses no período 2003-2004 (Machado *et al.*, 2008). Mais tarde, outros estudos vieram aumentar a diversidade de genes de RQMP em Portugal. Um desses estudos avaliou a ocorrência de genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr* em isolados bacterianos produtores de ESBLs recolhidos em 1999 e no período 2004–2006 (Félix *et al.* cit in Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Nos isolados recolhidos durante 1999 foi detectada a presença de *aac(6')-Ib-cr* (14%) (Félix *et al.* cit in Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010); no período 2004-2006 foi detectada a presença de *qnrB* (10%), *qnrS* (8%) e *aac(6')-Ib-cr* (65%). Outro estudo, efectuado em isolados de *Salmonella* spp. recolhidos também no período 2004-2006, descreve a presença de *qnrS1* em *Salmonella* Enteritidis (Antunes *et al.*, 2011). A presença de genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* em *E. coli* uropatógenicas obtidas do Hospital de Coimbra (2007) e numa colecção de *E. coli* produtoras de ESBLs (2004)

foi também pesquisada (Santos, 2008): 9.5% dos isolados de *E. coli* uropatogénicas e 12% dos isolados de *E. coli* produtores de ESBLs continham o gene *qnrS*. Outros estudos descrevem também a presença de *qnrA*, *qnrB* ou *qnrA/qnrB* com *aac(6')-Ib-cr* em *K. pneumoniae* provenientes de doentes de unidades de cuidados intensivos (Ferreira *et al.*, 2010b), assim como a presença de *qnrA* e *qnrB* em um mesmo plasmídeo em isolados de *C. freundii* (Ferreira *et al.*, 2010).

Até ao momento ainda não foi descrita a presença de genes *qepA* ou *oqxAB* em Portugal. Contudo torna-se necessário um maior controlo da sua emergência, tanto em meio hospitalar como extra-hospitalar, dado a elevada capacidade de disseminação que estes mecanismos de resistência possuem.

#### **1.4. Riscos associados à emergência e disseminação da resistência adquirida a quinolonas em *Enterobacteriaceae* de origem animal**

Em medicina veterinária, as quinolonas podem ser usadas para fins terapêuticos, metafiláticos, profiláticos ou de promoção de crescimento (Aarestrup, 2005). Estas possibilidades, associadas à sua notável eficácia no tratamento das doenças infecciosas causadas por *Enterobacteriaceae* (entre outras), têm fomentado o aumento do seu uso em ambiente de produção animal ao longo dos anos. Como consequência, tem aumentado a selecção de bactérias resistentes a quinolonas e/ou dos genes que codificam para a resistência a quinolonas, quer nos animais, quer no ambiente, o que conduz ao comprometimento do tratamento de várias doenças infecciosas (White, 2005; Aarestrup, 2006; Gibbs *et al.*, 2006; Má *et al.*, 2009; Mérens *et al.*, 2010; Herrera-León *et al.*, 2011).

Os estudos até agora realizados demonstram a emergência e disseminação da RQMP em *Enterobacteriaceae* recolhidas em animais de locais de produção intensiva (suínos, galinhas, gado), em animais selvagens (patos, perdizes, gansos) e em animais de companhia (cães e gatos) (Liu *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Pomba *et al.*, 2009; Asai *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 2010b; Fortini *et al.*, 2011). Estes dados levam a crer que estes animais poderão constituir um

importante reservatório de genes de resistência adquirida a quinolonas e um possível vector de transmissão para o ambiente circundante (Robicsek *et al.*, 2006b).

A emergência e disseminação de mecanismos de resistência a quinolonas em ambientes de produção intensiva de animais tornam-se assim preocupantes. Não só porque estes genes de resistência se encontram em plataformas genéticas moveis de fácil e rápida disseminação entre animais que co-habitam espaços confinados, mas também devido à possibilidade da sua disseminação dos animais para o Homem, quer por contacto directo (no caso dos trabalhadores que lidam directamente com os animais e que diariamente são expostos a estas bactérias resistentes a antibióticos), quer através da cadeia alimentar (consumo de alimentos provenientes de animais contaminados), ou mesmo pelo próprio meio ambiente (Gibbs *et al.*, 2006; Hawkey *et al.*, 2009). A contaminação ambiental pode ser causada por resíduos provenientes destes locais de produção animal ou pela utilização de fezes e material orgânico proveniente dos animais como fertilizantes, contaminando águas, solos e produtos hortícolas (Hawkey *et al.*, 2009). Estas bactérias podem assim chegar ao Homem por consumo/uso de água e/ou de alimentos provenientes de solos contaminados (GAO, 2004; EFSA, 2008; Hawkey *et al.*, 2009).

Estes dados, associados a algumas evidências científicas que confirmam a transmissão dos animais para o Homem de determinadas bactérias resistentes a antibióticos através da cadeia alimentar (consumo da carne desses animais), levou a Comissão Europeia a abolir o uso de antibióticos como promotores de crescimento e a desenvolver políticas para o controlo da disseminação de bactérias resistentes, assim como para a avaliação de risco não só para o consumidor, como também para os trabalhadores que têm contacto directo com esses animais (GAO, 2004; INFARMED, 2007; EFSA, 2008). Contudo, algumas classes de antibióticos que têm grande importância em medicina humana ainda continuam a ser usadas como promotores de crescimento em países não pertencentes à União Europeia, nomeadamente nos Estados Unidos, Canadá, Austrália, Japão e Coreia do Sul (GAO, 2004). Como consequência, verifica-se nesses países uma maior prevalência de genes que codificam para a resistência adquirida a quinolonas (Park *et al.*, 2006; Cattoir *et al.*, 2007; Corvec *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009b). Dada a facilidade de disseminação dos genes que codificam

para RQMP, associada à elevada mobilidade de pessoas e bens que hoje existe, este cenário pode conduzir, num futuro próximo, a uma disseminação alarmante da resistência a quinolonas, comprometendo seriamente o tratamento das doenças infecciosas e a Saúde Pública em geral.

## II. OBJECTIVOS

A utilização das quinolonas em medicina humana e em medicina veterinária tem contribuído para a emergência e disseminação de bactérias resistentes e/ou genes de resistência a quinolonas, o que compromete a eficácia terapêutica destes antibióticos. Admitindo-se que os animais podem constituir um importante reservatório de *Enterobacteriaceae* contendo genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas, e tendo em conta que a cadeia alimentar ou o contacto directo com os animais podem ser responsáveis pela transferência de microrganismos (patogénicos ou comensais) entre os animais e o Homem, será importante identificar esses reservatórios, de forma a controlar/minimizar a sua disseminação. Por este motivo, a avaliação da resistência aos antibióticos em bactérias da flora comensal de animais de produção intensiva para consumo humano, e em bactérias presentes no ambiente onde são produzidos esses animais, continua a ser uma das grandes preocupações e prioridades da Organização Mundial de Saúde e da Comissão Europeia, com vista a um melhor controlo da disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos.

Neste contexto, o trabalho que aqui se apresenta sobre a resistência adquirida a quinolonas em isolados de *Enterobacteriaceae* obtidos de suiniculturas Portuguesas reveste-se de elevada relevância do ponto de vista da Saúde Pública em geral.

Foram objectivos principais do presente trabalho:

- ✓ Investigar a ocorrência e a diversidade de genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas em *Enterobacteriaceae* isoladas de suiniculturas Portuguesas (2006-2007);
- ✓ Avaliar a co-resistência a antibióticos de outras famílias nos isolados contendo genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Isolados bacterianos

Foram estudados 173 isolados previamente identificados como *Enterobacteriaceae* e obtidos do ambiente de cinco suiniculturas da região Norte, Centro e Sul de Portugal, entre Abril de 2006 e Maio de 2007. Estes isolados foram obtidos no âmbito de um projecto de maior dimensão a decorrer no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. A designação utilizada para as suiniculturas analisadas, a sua localização geográfica e o número de amostras recolhidas foram as seguintes:

- Suinicultura E (10 amostras) e Suinicultura F (17 amostras), da Região Norte;
- Suinicultura A (1 amostra) e Suinicultura B (11 amostras), da Região Sul;
- Suinicultura C (18 amostras), da Região Centro.

As amostras a partir das quais se obtiveram os isolados analisados foram previamente processadas de acordo com as metodologias descritas (Machado *et al.*, 2008), tendo sido inoculadas em placas contendo o meio de MacConkey Agar com ou sem os seguintes antibióticos: ceftazidima (1 mg/L), cefotaxima (1 mg/L), tetraciclina (6 mg/L) e sulfonamidas (256 mg/L). Apenas foram seleccionados de cada meio de cultura representantes dos diferentes morfotipos bacterianos encontrados.

Os isolados incluídos no estudo foram provenientes de 43 amostras de distintos pontos das explorações (incluindo salas de cobrição, salas de gestação, maternidade, salas de engorda, entre outros) e foram distribuídos por cinco grupos de acordo com a sua proveniência (Tabela 2).

**Tabela 2 – Origem dos isolados de *Enterobacteriaceae* incluídos no estudo.**

<b>Origem dos isolados (nr. de amostras)</b>	<b>Tipo de amostra (número de isolados)</b>	<b>Nr. total de isolados</b>
Suínos (11)	Fezes (36), narinas (4), superfície (6)	46
Alimentos (10)	Rações em comedouros (30), ração de porca (4), ração de leitões (2), água em bebedouros (20)	56
Águas limpas (2)	Águas limpas fora das pocilgas (14)	14
Resíduos (9)	Fossa interna (6), águas sujas fora das pocilgas (13), lagunagens (5), chorume (4), efluentes (5), esterco seco (2)	35
Instalações (11)	Ar (10), pó (5), sistema de ventilação (1), pavimento (1), doseador de ração (5)	22

Entre os isolados incluídos no presente estudo, a percentagem de resistência ao ácido nalidíxico foi de 17% (29/173) e à ciprofloxacina de 2% (4/173). Os isolados apresentavam também resistência a outras famílias de antibióticos: cefotaxima (14%), ceftazidima (3%), cefepime (1%), aztreonamo (11%), cefoxitina (14%), amoxicilina/ácido clavulânico (16%), gentamicina (4%), tobramicina (5%), amicacina (1%), estreptomina (75%), espectinomicina (57%), neomicina (11%), netilmicina (2%), canamicina (8%), apramicina (7%), sulfonamidas (73%), trimetoprim (71%), cloranfenicol (26%), tetraciclina (83%) e tigeciclina (26%). Todos os isolados se apresentaram sensíveis ao imipenemo. *Estes dados de susceptibilidade aos antibióticos foram anteriormente obtidos (outros trabalhos de investigação a decorrer paralelamente) através do método de difusão por discos (CLSI, 2007). Para a tigeciclina foram utilizados os critérios de interpretação do EUCAST (Hope et al., 2010).*

### **3.2. Detecção e caracterização molecular de genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas**

#### **3.2.1 Extracção do DNA bacteriano**

Com o objectivo de fazer a extracção do DNA bacteriano para posterior detecção e caracterização molecular de genes de resistência, as bactérias em estudo

foram descongeladas e semeadas em meio de CLED agar (OXOID, Madrid, Espanha). Após incubação a 37°C durante 18 horas, foram recolhidas 3-4 colónias da cultura pura, as quais foram colocadas em 300 µL de água ultra-pura estéril. Após homogeneização, procedeu-se à lise bacteriana através de um processo de fervura em banho de água (GFL<sup>®</sup>, Burgwadel, Alemanha) durante 15 minutos. Posteriormente foi efectuada uma centrifugação (Sigma, Osterode am Harz, Alemanha) a 14000 r.p.m. durante 5 minutos. O sobrenadante obtido (contendo o DNA extraído) foi congelado a -20°C para os estudos posteriores.

### 3.2.2. Amplificação de ácidos nucleicos por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A pesquisa de genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas foi realizada pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizando *primers* e condições de amplificação específicos para a detecção e posterior caracterização molecular por sequenciação dos genes mais frequentes: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA* e *aac(6')-Ib-cr* (Cattoir *et al.*, 2007; Hopkins *et al.*, 2007; Cattoir *et al.*, 2008; Minarini *et al.*, 2008). As condições reaccionais e de amplificação, assim como a sequência nucleotídica dos *primers* usados, encontram-se na Tabela 3. As reacções de PCR foram efectuadas nos termocicladores MyCycler<sup>™</sup> e ICycler<sup>™</sup> (Bio-Rad, Hércules, EUA).

### 3.2.3. Electroforese

Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TAE 1X e contendo 0,1 µL/mL de SYBR Safe<sup>™</sup> DNA Gel Stain (Invitrogen, Paisly, United Kingdom). As condições de electroforese foram as seguintes: 100V, 40 minutos, tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. Os produtos amplificados foram visualizados sob luz UV em transiluminador acoplado ao sistema de aquisição de imagem Molecular Imager ChemiDoc<sup>XRS</sup> (Milão, Itália), que conjuntamente com o programa *Quantity One version 4.6.1 Build 055* (Bio-Rad, Hércules, EUA), permitiu guardar um registo dos resultados obtidos. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com o Marcador de Peso Molecular HyperLadder<sup>™</sup> IV (Bioline, Uppsala, UK).

Tabela 3 - *Primers e condições de PCR usados no estudo.*

Gene	Primer	Sequência (5'-3') <sup>b</sup>	Tamanho (bp)	Concentração final dos reagentes <sup>c</sup>	Condições de amplificação	Referências
<i>qnrA</i>	qnrA-F	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG	580	0,8 µM de cada Primer; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,2 mM de dNTP's; Tampão da enzima 1X (Green Go Taq Flexi Buffer, Promega, USA); 1 Unidade de DNA polimerase (GoTaq®Flexi DNA Polymerase, Promega, USA)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
	qnrA-R	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC				
<i>qnrB</i>	qnrB-F	GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG	264	0,8 µM de cada Primer; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,2 mM de dNTP's; Tampão da enzima 1X (Green Go Taq Flexi Buffer, Promega, USA); 1 Unidade de DNA polimerase (GoTaq®Flexi DNA Polymerase, Promega, USA)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 57°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
	qnrB-R	TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA				
<i>qnrS</i>	qnrS-F	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT	427	0,8 µM de cada Primer; 1,4 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,2 mM de dNTP's; Tampão da enzima 1X (Green Go Taq Flexi Buffer, Promega, USA); 1 Unidade de DNA polimerase (GoTaq®Flexi DNA Polymerase, Promega, USA)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
	qnrS-R	TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG				
<i>qnrS<sup>a</sup></i>	qnrS-Fc	TGG AAA CCT ACA ATC ATA CAT ATC G	656	0,8 µM de cada Primer; 2,8 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,2 mM de dNTP's; Tampão da enzima 1X (Green Go Taq Flexi Buffer, Promega, USA); 1 Unidade de DNA polimerase (GoTaq®Flexi DNA Polymerase, Promega, USA)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 62°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Hopkins <i>et al.</i> , 2007
	qnrS-Rc'	TTA GTC AGG ATA AAC AAC AAT ACC C				
<i>qepA</i>	qepA-F	CGT GTT GCT GGA GTT CTT C	403	0,8 µM de cada Primer; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,2 mM de dNTP's; Tampão da enzima 1X (Green Go Taq Flexi Buffer, Promega, USA); 1 Unidade de DNA polimerase (GoTaq®Flexi DNA Polymerase, Promega, USA)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Cattoir <i>et al.</i> , 2008
	qepA-R	CTG CAG GTA CTG CGT CAT G				
<i>aac(6')-Ib</i>	aac(6')-A	TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA	482	0,8 µM de cada Primer; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,2 mM de dNTP's; Tampão da enzima 1X (Green Go Taq Flexi Buffer, Promega, USA); 1 Unidade de DNA polimerase (GoTaq®Flexi DNA Polymerase, Promega, USA)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 61°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Minarini <i>et al.</i> , 2008
	aac(6')-B	CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT				

<sup>a</sup>Primers usados para amplificação do gene completo e posterior sequenciação; <sup>b</sup>M=A ou C; H=A ou C ou T; Y=C ou T; <sup>c</sup>As reacções foram efectuadas num volume final de 25 µL, sendo adicionados 2 µL de DNA a cada reacção e tendo sido usada a água ultra-pura estéril para diluir os reagentes usados até à concentração final pretendida.

### 3.2.4. Purificação dos produtos amplificados

A purificação de produtos de PCR efectuou-se pelo sistema de purificação Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-UP System (PROMEGA Corporation, Madison, EUA), de acordo com as indicações do fabricante.

### 3.2.5. Sequenciação

As reacções de sequenciação dos produtos de PCR purificados foram efectuadas pela empresa STAB VIDA (Oeiras, Portugal) em sequenciador automático 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA).

As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas com as depositadas em bancos de dados genéticos mundiais, nomeadamente no GenBank e EMBL, através da ferramenta “BLASTN alignment” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) que procura sequências iguais ou semelhantes. A fim de determinar a variante do gene *qnrS*, procedeu-se à comparação com as sequências nucleotídicas das variantes depositadas no GenBank e publicadas no site <http://www.lahey.org/qnrStudies/> usando a ferramenta “ClustalW2 Multiple Sequence Alignment” (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ocorrência e Diversidade de genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas

A ocorrência de genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas foi detectada em 3% (5/173) de isolados analisados, os quais foram identificados como *Citrobacter freundii* (n=4) e *Escherichia coli* (n=1).

Os genes detectados incluíram apenas representantes de genes *qnr*, correspondendo a dois tipos distintos: *qnrB* (n=4) e *qnrS1* (n=1). Não foi detectado nenhum isolado contendo os genes *aac(6′)-Ib-cr* ou *qepA*. Os genes *qnr* foram identificados em isolados bacterianos obtidos de amostras de pó, ração e água limpa do exterior da pocilga. A distribuição dos diferentes genes *qnr* identificados pelas espécies de *Enterobacteriaceae*, suiniculturas e tipo de amostras analisadas encontra-se na Tabela 4.

De acordo com os resultados observados para as suiniculturas analisadas, a ocorrência e diversidade de genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas foram baixas durante o período de tempo estudado. Contudo, os resultados obtidos constituem a primeira descrição de genes *qnrB* e *qnrS1* em *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas Portuguesas. Os estudos realizados em Portugal que descrevem *Enterobacteriaceae* contendo genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas, referem-se apenas a bactérias de origem hospitalar ou provenientes de animais de companhia (Pomba *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2010b, Antunes *et al.*, 2010). Um desses estudos descreve uma elevada prevalência (71%) de genes *qnrA* e *qnrB* entre *K. pneumoniae* resistentes ao ácido nalidíxico e à ciprofloxacina, isoladas de pacientes internados em Unidades de Cuidados Intensivos de um hospital Português (Ferreira *et al.*, 2010b). O mesmo estudo refere a co-presença de genes *bla*<sub>ESBL</sub> (*bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>) e/ou *bla*<sub>AmpC</sub> (*bla*<sub>DHA</sub>) em 87% e em 47% dos isolados, respectivamente. A presença do gene *qnrB* e *qnrA* no mesmo plasmídeo foi também identificada (Ferreira *et al.*, 2010b). Um outro estudo efectuado no mesmo período e hospital descreve também um isolado de *Citrobacter freundii* contendo os genes *qnrA1*,

**Tabela 4** – Características dos isolados bacterianos contendo genes *qnr* identificados no estudo.

Gene	Espécie (nº. do isolado)	Suinicultura	Região Geográfica	Data de Isolamento (mês/ano)	Amostra (Área)	Resistência a Quinolonas	Outras resistências associadas
<b><i>qnrB</i></b> (n=4)	<i>C. freundii</i> (S279)	B	Sul	04/2006 e 03/2007	Água limpa (exterior da pocilga, parideiras)	Na	Fox, Sm, Km, Su, Tp, Te, Tg
	<i>C. freundii</i> (S295)	B	Sul	04/2006 e 03/2007	Pó de pocilga (parideiras com leitões)	_____	Amc, Fox, Sm, Km, Su, Tp, Te
	<i>C. freundii</i> (S363)	C	Centro	10/2006	Pó (maternidade)	_____	Amc, Atm, Fox, Sm, Su, Tp, Te
	<i>C. freundii</i> (S406)	F	Norte	12/2006	Ração do comedouro (sala de gestação)	_____	Amc, Fox, Sm, Su, Tp, Cl, Te, Tg
<b><i>qnrS1</i></b> (n=1)	<i>E. coli</i> (S479)	E	Norte	12/2007	Ração do comedouro (sala de cobrição)	_____	Amc, Atm, Ctx, Sm, Su, Tp, Cl, Te

Na, Ácido Nalidíxico; Amc, Amoxicilina-Ácido Clavulânico; ATM, Aztreonamo; Fox, Cefoxitina; Ctx, Cefotaxima; Sm, Estreptomicina; Km, Canamicina; Su, Sulfonamidas; Tp, Trimetoprim; Cl, Cloranfenicol; Te, Tetraciclina; Tg, Tigeciclina.

*qnrB1* e *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (Ferreira *et al.*, 2010). Recentemente foi ainda descrita a presença de *qnrS1* localizado num plasmídeo IncN em *Salmonella* Enteritidis de origem humana (Antunes *et al.*, 2011). No caso do estudo realizado em animais de companhia, foi identificado pela primeira vez num cão uma *Escherichia coli* uropatogénica portadora de *qnrB*, *aac(6')-Ib-cr* e *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (Pomba *et al.*, 2009).

**O gene mais frequentemente detectado foi *qnrB* (2%, 4/173), tendo sido encontrado exclusivamente em *Citrobacter freundii*. A variante deste gene não foi identificada, uma vez que não foram incluídos *primers* específicos para a sequenciação de toda a região genética de *qnrB*. Várias variantes do gene *qnrB* têm sido descritas em *Enterobacteriaceae* de origem animal, nomeadamente em suínos (*qnrB2*, *qnrB6*, *qnrB23*), em aves (perus, galinhas, frangos) (*qnrB2*, *qnrB12*, *qnrB19*, *qnrB23*), animais de companhia (*qnrB2*, *qnrB6*), répteis (*qnrB6*, *qnrB19*) e tartarugas (*qnrB6*, *qnrB19*), principalmente em *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. e *E. coli* (Liu *et al.*, 2008; Pomba *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2010; Veldman *et al.*, 2011). Em *C. freundii* já foi descrito o gene *qnrB23* em isolados obtidos de galinhas (Coreia do Sul) e *qnrB6* em isolados de suínos (China) (Liu *et al.*, 2008; Bae *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2010). Já no caso de isolados clínicos de *C. freundii* provenientes do ambiente hospitalar e da comunidade têm sido descritos os genes *qnrB1*, *qnrB2*, *qnrB4*, *qnrB6*, *qnrB8*, *qnrB9* e *qnrB22* (Liassine *et al.*, 2008; Minarini *et al.*, 2008; Sazabo *et al.*, 2008; Strahilevitz *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010; Forcella *et al.*, 2010).**

Os isolados bacterianos portadores deste gene de resistência foram recolhidos de áreas da suinicultura onde se encontravam porcas parideiras e leitões, nomeadamente salas de maternidade e salas de gestação, onde o uso de antibióticos para fins profiláticos constitui uma prática comum (Aarestrup, 2005). Sendo *C. freundii* e *E. coli* espécies de bactérias que podem ser encontradas como parte da flora comensal destes animais, estarão expostas a diferentes pressões causadas pelo uso de antibióticos em doses terapêuticas ou sub-terapêuticas, ocorrendo a selecção de genes de resistência. A passagem destas bactérias resistentes às quinolonas para o pó, águas e rações pode dar-se por contacto directo dos animais ou dos detritos orgânicos por eles produzidos.

É também de referir que a sala de maternidade de onde foi recolhida um dos isolados de *Citrobacter freundii* é desinfectada a cada 27 dias, e os suínos quando lá entram são lavados e desinfectados. A presença de *C. freundii* contendo *qnrB* nesta área da suinicultura, torna também provável a existência de outros mecanismos de resistência que lhe permitam sobreviver na presença de desinfectantes, por exemplo, bombas de efluxo activas inespecíficas de substrato, que não só promovam o efluxo de múltiplos antibióticos para fora da célula bacteriana, mas também de outras moléculas, incluindo solventes orgânicos (por exemplo, desinfectantes) (Vila *et al.*, 2004). A associação destes mecanismos de resistência já foi anteriormente descrita em *E. coli* multiresistentes isoladas de animais de companhia (Gibson *et al.*, 2010b).

**O isolado de *E. coli* no qual foi detectado o gene *qnrS1* demonstrou ser também resistente a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos por produção de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs).** A presença do gene *qnrS1* em *E. coli* está de acordo com resultados previamente publicados que indicam uma maior frequência deste gene entre certas espécies, nomeadamente *E. coli*, *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp. (Strahilevitz *et al.*, 2009). Em estudos a decorrer em paralelo foi feita a caracterização molecular da ESBL presente, tendo sido detectado o gene *bla*<sub>CTX-M-32</sub> (Vanessa, 2011). Embora a associação de genes *bla*<sub>CTX-M</sub> a mecanismos de resistência emergentes, como a produção de proteínas Qnr (*qnrA* e CTX-M-1, -9, -15, -24; *qnrB* e CTX-M-2, -15; *qnrS* e CTX-M-9, -14, -15) e de acetiltransferases de fluoroquinolonas e aminoglicosídeos [*aac(6')*-*Ib-cr* e CTX-M-1, -9, -14, -15, -24] tenha sido descrita nos últimos anos (Machado *et al.*, 2006; Touati *et al.*, 2008; Minarini *et al.*, 2008; Crémet *et al.*, 2009; Paniagua *et al.*, 2010), este estudo constitui a primeira descrição da co-presença de *bla*<sub>CTX-M-32</sub> e *qnrS1* num mesmo isolado de *Enterobacteriaceae*. A localização de ambos os genes num mesmo elemento genético móvel é provável, mas carece de estudos moleculares mais aprofundados (Cerquetti *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010b; Zhao *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos neste estudo corroboram os de estudos internacionais realizados em suínos e/ou ambientes de produção intensiva destes animais (Liu *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2010). Por exemplo, num estudo realizado na China foram pesquisados os mesmos genes em isolados de *E. coli* de origem clínica provenientes de suínos e de aves de capoeira, tendo sido detectados os genes *aac(6')*-*Ib-cr*, *qnrB* e *qnrS*, sendo este

último o mais frequente (Yue *et al.*, 2008). Um estudo em *E. coli* comensais de suínos demonstrou também a presença destes genes e ainda do gene que codifica a bomba de efluxo QepA, o qual foi o mais predominante (Liu *et al.*, 2008). Estudos mais recentes realizados na China em amostras fecais de suínos (2005-2006 e 2007) referem também uma predominância das variantes *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr* e ausência de *qnrA* (Xia *et al.*, 2010).

Os estudos realizados em outros animais demonstram outras associações de genes de resistência adquirida a quinolonas/espécie de *Enterobacteriaceae*/espécie animal. Por exemplo, na Alemanha foi descrito o gene *qnrB12* em isolados de *Citrobacter werkmanii* obtidos de aves de capoeira (Kehrenberg *et al.*, 2008). Já na China foram identificados os genes *qnrB*, *qnrS1*, *qepA* e *aac(6')-Ib-cr* em isolados de *E. coli* obtidos de galinhas, tendo sido observada a presença de *qnrB* e *aac(6')-Ib-cr* num mesmo plasmídeo (Huang *et al.*, 2009). Em Itália e Holanda foi identificado o gene *qnrB2* em *Salmobella* Bredeney e *qnrS1* em *E. coli* obtidas em aves de capoeira (Fortini *et al.*, 2009; Cerquetti *et al.*, 2009). Estudos realizados no Egipto demonstram também a presença de *qnrS* ou *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr* em *Salmonella* Enteritidis, e de *qnrB* em *Salmonella* Typhimurium de fezes diarreicas de vitelos recém-nascidos (Ahmed *et al.*, 2009). No Japão foi encontrado o gene *qnrS1* em *Salmonella*. Typhimurium e *Salmonella* Thompson provenientes de animais para consumo humano (suínos, bovinos, galinhas) e seus derivados (carnes e produtos lácteos) (Ahmed *et al.*, 2009b). Recentemente, foi ainda descrita a presença de genes *qnrA1* e *qnrB1* quase sempre associados a *aac(6')-Ib-cr* em *Enterobacter* spp. provenientes de infecções intestinais de animais de companhia (Austrália) (Gibson *et al.*, 2010). Fialmente, na Nigéria, foram detectados *qnrS1*, *qnrB19* e *qnrB10* (associado a *qepA*) em *E. coli* comensais em suínos e aves de capoeira, sendo *qnrS1* o mais prevalente (Fortini *et al.*, 2011). Assim, ao contrário do que se encontrou no presente estudo e do que se tem verificado em isolados recolhidos na comunidade ou no meio hospitalar, parece haver uma maior diversidade de genes que codificam para RQMP nos isolados obtidos de animais, sendo contudo predominante o gene *qnrS*.

A presença do gene que codifica para a bomba de efluxo *oqxAB* não foi pesquisada na presente investigação. Até ao momento não foi descrita em Portugal a

presença deste gene. De qualquer forma, a existir, a sua prevalência não deverá ser elevada. Isto porque o uso do Olaquinox, um antibiótico que parece contribuir para a selecção deste gene de resistência, foi abolido em Portugal em 1999 (<http://www.who.int/gfn/en/Expertsreportgrowthpromoterdenmark.pdf>). Este antibiótico era usado como promotor de crescimento, mas devido ao seu potencial mutagénico e consequente risco para o manipulador deixou de ser permitido na União Europeia. Contudo, em países como a China, o uso do Olanquinox como promotor de crescimento ainda é permitido e a prevalência do gene *oqxAB* é elevada e (Zhao *et al.*, 2010).

Analisando os estudos efectuados em animais e publicados até à data, parece existir uma maior prevalência de genes de resistência adquirida a quinolonas em países em que o controlo do uso de antibióticos é baixo e/ou onde o uso de promotores de crescimento em ambiente de produção animal ainda não foi abolido, nomeadamente em países Asiáticos, Estados Unidos da América e Canadá, entre outros (GAO, 2004; Liu *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2009b; Huang *et al.*, 2009; Gibson *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2011; Fortini *et al.*, 2011).

**Neste estudo, *Citrobacter freundii* foi a espécie mais frequentemente identificada como portadora de genes de resistência adquirida a quinolonas (80%),** o que é preocupante, dado tratar-se de uma espécie que também produz naturalmente beta-lactamases do tipo AmpC indutíveis e/ou adquiridas, as quais conferem resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Bauernfeind *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999). Esta associação de mecanismos de resistência a diferentes famílias de antibióticos dificulta o tratamento e o controlo destas bactérias multirresistentes (Nordmann *et al.*, 2005, EFSA, 2008).

Os genes *qnr* têm vindo a ser encontrados em vários animais para consumo humano e numa vasta variedade de espécies de *Enterobacteriaceae*, algumas pertencentes à flora comensal de suínos e outros animais, o que leva a admitir que os animais constituem importantes reservatórios para estes genes. Isto é preocupante, na medida em que estas bactérias podem já ser parte integrante da flora normal dos suínos, podendo estar a ser comercializadas linhagens genéticas destes animais contaminadas muitas vezes desde a nascença com bactérias resistentes a antibióticos (Novais *et al.*,

2005; Machado *et al.*, 2008). A ser verdade, este facto poderá estar a contribuir para a disseminação destes genes de resistência em suínos à escala global, dado que as políticas de controlo implementadas pela Organização mundial de Saúde Animal em animais importados/exportados, apenas obrigam à avaliação da presença de resistência a antibióticos em bactérias patogénicas obrigatórias (ex: *Salmonella* spp.) ou patogénicas oportunistas que causem doença no animal (<http://www.oie.int/>).

#### **4.2. Distribuição geográfica de *Enterobacteriaceae* contendo genes *qnr***

Foram identificados genes *qnr* em *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas localizadas em diferentes regiões de Portugal (Tabela 4). A presença de isolados contendo estes genes e proveniente do ambiente de produção animal das regiões Norte, Centro e Sul do País estará provavelmente relacionada com uma disseminação plasmídica. Contudo, uma disseminação associada a clones epidémicos não pode ser excluída. De qualquer forma, a existir ela, deverá estar associada à disseminação de elementos genéticos móveis, já que a transmissão vertical de genes de resistência, isoladamente, deixaria por explicar a alta mobilidade destes genes emergentes que conferem resistência a quinolonas e a capacidade de se disseminarem em diferentes nichos, géneros e famílias bacterianas. Assim, a disseminação plasmídica neste estudo e à semelhança de outros estudos realizados até ao momento, estará na base da explicação da disseminação destes genes pelas diferentes regiões geográficas (Cerquetti *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2010b, Gibson *et al.*, 2010; Antunes *et al.*, 2011). Os estudos realizados em diferentes espécies de bactérias, de diferentes origens e de distintos países têm demonstrado a presença dos genes *qnr* em plasmídeos conjugativos (Cantón *et al.*, 2009; Carattolli *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009).

### 4.3. Análise do perfil de susceptibilidade aos antibióticos em *Enterobacteriaceae* contendo genes *qnr*

#### 4.3.1. Resistência a quinolonas

Entre os isolados contendo genes *qnr*, a resistência às quinolonas testadas foi rara, tendo sido apenas detectado um isolado resistente ao ácido nalidíxico (20%, 1/5) (Tabela 4). Nenhum isolado demonstrou ser resistente à ciprofloxacina. Este resultado está de acordo com estudos anteriormente publicados e que indicam que este tipo de genes apenas confere baixos níveis de resistência a quinolonas, podendo não ocorrer alteração da CMI para valores acima do limite definido pelo CLSI para classificação da bactéria como “resistente ao antibiótico” (Sazabo *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2009). Alguns estudos também demonstram a presença do gene na célula bacteriana sem que ocorra a sua expressão (Liu *et al.*, 2008; Lavilla *et al.*, 2008; Sazabo *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010).

A resistência ao ácido nalidíxico num dos isolados portador do gene *qnrB* poderá dever-se à expressão de *qnrB* e a mutações no gene que codifica a proteína GyrA (*gyrA*), ou a estas últimas isoladamente (Nordmann *et al.*, 2005; Sánchez-Céspedes *et al.*, 2007; Céspedes, 2008). De qualquer forma, existem descrições de alterações dos valores de CMI acima do intervalo considerado como susceptível para quinolonas de primeira geração, como o ácido nalidíxico em bactérias contendo apenas genes *qnr* (Nordmann *et al.*, 2005; Sánchez-Céspedes *et al.*, 2007; Cattoir *et al.*, 2009; Corvec *et al.*, 2009).

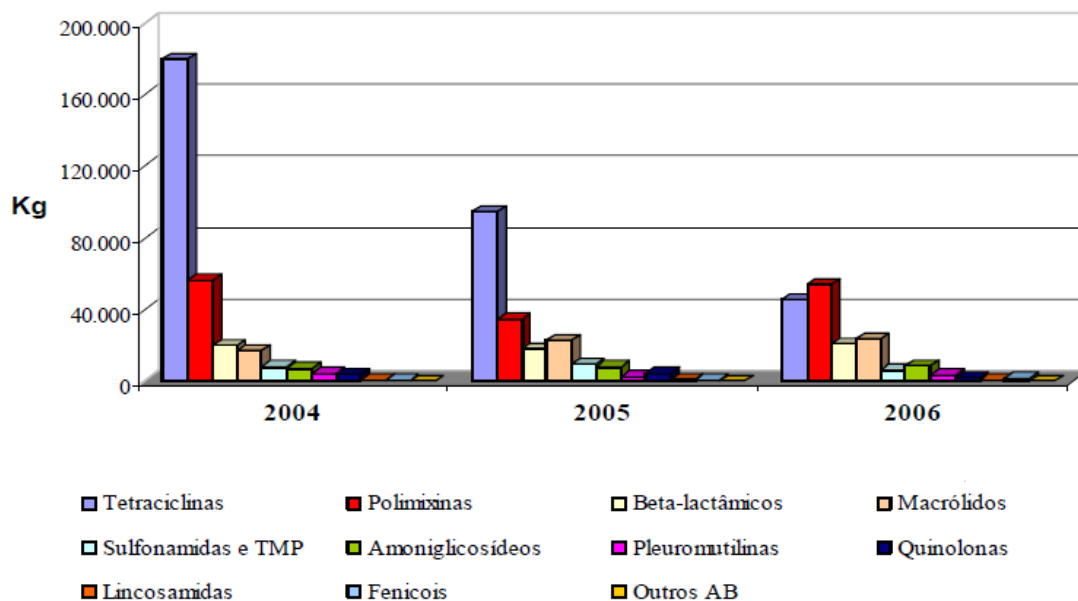
No caso dos isolados resistentes ao ácido nalidíxico que tinham sido incluídos no estudo e nos quais não se verificou a presença dos genes de resistência adquirida a quinolonas pesquisados (n=28), outros mecanismos de resistência poderão estar presentes, nomeadamente os mediados por genes de localização cromossómica (Sánchez-Céspedes *et al.*, 2007; Minarini *et al.*, 2008; Cattoir *et al.*, 2009). Por exemplo, mutações em *gyrA* e/ou mutações em *parC*, ou mutações em genes de localização cromossómica que codificam para bombas de efluxo (Poirel *et al.*, 2007; Cattoir *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010; Lastours *et al.*, 2010). Há sempre

a possibilidade de estarem também presentes mutações nos genes que codificam para os canais de porina ou a presença da bomba de efluxo OqxAB. No entanto, e uma vez que o ácido nalidíxico é uma quinolona hidrofóbica, estes mecanismos não deverão ser justificação para este caso (Vila *et al.*, 2004). Alguns dos isolados resistentes ao ácido nalidíxico apresentaram também resistência à ciprofloxacina (n=4), o que poderá reflectir a existência de várias mutações nos genes cromossómicos anteriormente referidos conducentes a resistência a ambos os antibióticos (Hawkey, 2003; Vila *et al.*, 2004; Lascols *et al.*, 2007; Cavaco *et al.*, 2008).

Em estudo futuros será expectável a detecção de um maior número de isolados contendo genes *qnr* e mutações em *gyrA* ou *parC* resistentes ao ácido nalidíxico e/ou fluoroquinolonas. Isto porque a presença de genes que codificam para RQMP em isolados bacterianos de *Enterobacteriaceae* parece ser um pré-requisito para as gerações seguintes adquirirem mutações nas enzimas alvo e, conseqüentemente, atingirem um alto nível de resistência às fluoroquinolonas (Zhao *et al.*, 2010). Apesar de raramente ser confirmado e não ser sistematicamente estudado, o gene *qnr* tem sido apontado como responsável pela selecção de mutações nas topoisomerasas (Lascols *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010). A interacção das proteínas Qnr com as subunidades da enzima *DNA girase* na zona QRDR parece conduzir a alterações aminoacídicas no local de ligação, impedindo depois a ligação da quinolona por redução da afinidade com esta subunidade (Lascols *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010). Porém, a presença de QepA e OqxAB parecem ter uma maior influência no surgimento de mutações nestas enzimas, uma vez que ao promoverem o efluxo do antibiótico para fora da célula bacteriana, apenas reduzem a acumulação intracelular do antibiótico, permitindo à bactéria sobreviver na presença de baixas concentrações de quinolonas (Zhao *et al.*, 2010). Esta exposição promove a selecção de mutações nas topoisomerasas conducentes também a altos níveis de resistência a quinolonas (Zhao *et al.*, 2010). Estas mutações aminoacídicas provocadas pela presença dos genes que codificam para RQMP podem ser posteriormente transmitidas à descendência durante a de replicação do DNA, passando a fazer parte integrante do seu cromossoma e sendo naturalmente seleccionadas durante a exposição a estes antibióticos (Zhao *et al.*, 2010).

### 4.3.2. Resistência a outras classes de antibióticos

As *Enterobacteriaceae* contendo genes *qnrB* ou *qnrS1* apresentaram resistência a alguns antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não- $\beta$ -lactâmicos (excluindo as quinolonas cujo comportamento foi apresentado e discutido na secção anterior), sobretudo às tetraciclina (tetraciclina, tigeciclina), sulfonamidas, trimetoprim, aminoglicosídeos (estreptomicina, canamicina) e aos  $\beta$ -lactâmicos amoxicilina-ácido clavulânico, aztreonamo e cefoxitina (Tabela 4). Alguns destes antibióticos encontram-se entre as moléculas mais usadas em medicina veterinária em Portugal (Figura 7) (INFARMED, 2007).



**Figura 7 – Consumo de antibióticos em animais em Portugal (2004–2006)** (adaptado de INFARMED, 2007).

Os isolados bacterianos contendo genes *qnrB* e *qnrS1* apresentavam assim um fenótipo de multiresistência. Num dos isolados a resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos estava relacionada com a presença do genes *bla<sub>CTX-M-32</sub>*, tal como referido anteriormente (secção 4.1), sendo também provável a existência de genes *bla<sub>AmpC</sub>* nos isolados co-resistentes à amoxicilina-ácido clavulânico e cefoxitina (Sousa, 2006; Ma *et*

*al.*, 2009). A resistência aos aminoglicosídeos pode dever-se à associação com genes que codificam para metiltransferases do 16S ribossomal ou à presença de integrons de classe 1 contendo genes *aadA* (Zhao *et al.*, 2010). Nos isolados que apresentam resistência ao cloranfenicol, tetraciclinas, sulfonamidas e trimetoprim poderão estar envolvidos genes *cmlA*, *tet*, *sul* e *dfrA*, respectivamente, inseridos ou não em integons de classe 1 (Ahmed *et al.*, 2011). Contudo, deverão ser efectuados estudos moleculares mais aprofundados para se identificarem os genes envolvidos.

A associação de genes *qnrB* e *qnrS1* a genes que codificam para resistência a outros antibióticos tem sido identificada em vários isolados multirresistentes obtidos do meio hospitalar e extra-hospitalar, parecendo contribuir para o cenário epidemiológico da resistência aos antibióticos a que se assiste actualmente (Cattoir *et al.*, 2009; Karah *et al.*, 2010; Cantón *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Contudo, é preocupante uma vez que estes genes podem estar presentes no mesmo elemento genético móvel e, conseqüentemente, o uso de antibióticos de outras famílias co-seleccionará também os genes de RQMP presentes nesses plasmídeos multirresistentes. Num país em que os antibióticos assumem especial notoriedade em relação aos outros medicamentos para uso animal, excedendo as 167 toneladas por ano, a selecção e disseminação destes genes emergentes de resistência a antibióticos serão muito difíceis de controlar (INFARMED, 2007).

## V. CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo constituiu a primeira descrição de genes *qnr* em *Enterobacteriaceae* provenientes de suínos e do respectivo ambiente de produção animal (suiniculturas) em Portugal. Através dos resultados obtidos é possível concluir que a ocorrência e a diversidade de genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas em *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas Portuguesas são baixas.

*qnrB* foi o gene mais prevalente, aparecendo associado a *C. freundii*, e *qnrS1* foi apenas detectado num isolado de *E. coli*, o que contrasta com dados de outros estudos que indicam uma maior prevalência de *qnrS*, sobretudo em *E. coli*, *Enterobacter* spp., e *Klebsiella* spp. Este trabalho vem assim confirmar a existência de diferentes cenários epidemiológicos em áreas geográficas distintas. Este estudo epidemiológico confirma ainda a constante evolução da associação de diferentes genes de resistência a antibióticos, constituindo a primeira descrição de *qnrS1* num isolado bacteriano contendo o gene *bla*<sub>CTX-M-32</sub> que codifica para uma beta-lactamase de espectro alargado.

As suiniculturas serão um potencial reservatório de genes de resistência a quinolonas mediada por plasmídeos e *Citrobacter freundii* constituirá um importante reservatório de genes *qnr*.

Apesar dos esforços da União Europeia em reduzir o consumo de antibióticos em ambiente de produção animal, tal parece não estar a ser suficiente. Os resultados obtidos predispõem para a necessidade de realizar estudos moleculares mais aprofundados de forma a caracterizar os genes que codificam para a resistência adquirida a quinolonas em outros nichos ecológicos, detectar a emergência de novos genes de resistência e perceber a sua disseminação entre diferentes bactérias e nichos ecológicos. Só assim será possível delinear e implementar medidas eficazes de controlo da disseminação de bactérias multirresistentes (incluindo do animal para o Homem) e minimizar o risco para a saúde humana.

## VI. BIBLIOGRAFIA

Aarestrup, F. (2005). Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 96(4), pp. 271–81.

Ahmed, M. *et al.* (2009). Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in Japan. *Journal of Applied Microbiology* 106(2), pp. 402–9.

Ahmed, M. *et al.* (2009). Genetic basis of multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from diarrheic calves in Egypt. *Acta Tropica* 111(2), pp. 144–9.

Ahmed, M. *et al.* (2011). Molecular characterization of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt. *Microbiology and Immunology*, in press.

Antunes, P. *et al.* (2011). First description of *qnrS1*-IncN plasmid in a ST11 *Salmonella* Enteritidis clinical isolate from Portugal. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 69(4), pp. 463–5.

Asai, T. *et al.* (2010). Epidemiology of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from food-producing animals in Japan. *Gut Pathogens* 2(1): pp. 17.

Bauernfeind, A. *et al.* (1998). Plasmid-encoded AmpC beta-lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery? *Yonsei Medical Journal* (6), pp. 20–5.

Bae, I.K. *et al.* (2010). Novel variants of the *qnrB* gene, *qnrB22* and *qnrB23*, in *Citrobacter werkmanii* and *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(7), pp. 3068–9.

Bambeke, F. *et al.* (2005). Quinolones in 2005: an update. *Clinical Microbiology and Infection* 11(4), pp. 256–80.

Bonomo, R. *et al.* (2007). *Enzyme-mediated resistance to antibiotics – mechanisms, dissemination and prospects for inhibition*. Washington, Ed. American Society for Microbiology.

Cagnacci, S. *et al.* (2008). European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *Journal of Clinical Microbiology* 46(8), pp. 2605–12.

- Cantón R. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clinical Microbiology and Infection* 15(Suppl 1), pp. 20–5.
- Carattoli, A. *et al.* (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(6), pp. 2227–38.
- Cattoir, V. *et al.* (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60(2), pp. 394–7.
- Cattoir, V. *et al.* (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(10), pp. 3801–4.
- Cattoir, V. *et al.* (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance in Gram-negative bacterial species: an update. *Current Medicinal Chemistry* 16(8), pp. 1028–46.
- Cavaco, M. *et al.* (2008). *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(2), pp. 603–8.
- Cerquetti, M. *et al.* (2009). First report of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* in an *Escherichia coli* strain of animal origin in Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(7), pp. 3112–4.
- Céspedes, J. (2008). *Implicación de diversos mecanismos de resistencia a quinolonas en bacilos Gram-negativos: diseño de una nueva fluoroquinolona*. Barcelona, Universidad de Barcelona – Facultad de Medicina (Tesis Doctoral).
- Chapman, J. *et al.* (1988). Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32(4), pp. 438–42.
- Corvec, S. *et al.* (2009). Vitek2<sup>®</sup> system: a reliable tool to detect *qnr* determinants in *Enterobacteriaceae* without quinolone resistance-determining region modifications. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 64(4), pp. 455–7.
- Coyne, S. *et al.* (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(3), pp. 947–93.

Crémet, L. *et al.* (2009). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL *Enterobacteriaceae* clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. *Pathologie-biologie, in press.*

Denton, M. (2007). *Enterobacteriaceae. International Journal of Antimicrobial Agents* 29(Suppl 3), pp. S9–S22.

Dougherty, T. *et al.* (2001). New quinolones and the impact on resistance. *Therapeutic focus* 6(10), pp. 529–36.

ECDC. (2010). Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network - *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009*. Stockholm, ECDC.

EFSA. (2008). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *The EFSA Journal* 765, pp. 1-87.

Emmerson, A. *et al.* (2003). The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51(Suppl 1), pp. 13–20.

Fang, H. *et al.* (2009). Prevalence of *qnr* determinants among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-positive *Enterobacteriaceae* clinical isolates in southern Stockholm, Sweden. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34(3), pp. 268–70.

Ferech, M. *et al.* (2006). European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(2), pp. 401–7.

Ferreira, W. e Sousa, J. (2000). *Microbiologia*. Porto, Edição Lidel, Volume 2.

Ferreira, S. *et al.* (2010). Carriage of *qnrA1* and *qnrB2*, *bla<sub>CTX-M15</sub>*, and complex class 1 integron in a clinical multiresistant *Citrobacter freundii* isolate. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 67(2), pp. 188–90.

Ferreira, S. *et al.* (2010). First description of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates carrying both *qnrA* and *qnrB* genes in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 35(6), pp. 584–6.

Forcella, C. *et al.* (2010). Characterization of quinolone resistance in *Escherichia coli* strains of animal origin from Italy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 22(3), pp. 165–8.

Fortini, D. *et al.* (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance and beta-lactamases in *Escherichia coli* from healthy animals from Nigeria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, in press.

GAO (2004). Report to congressional requesters – antibiotic resistance. Federal agencies need to better focus efforts to address risk to humans from antibiotic use in animals. Washington, GAO 04-490, pp. 1–95.

Gibbs, C. *et al.* (2006). Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a swine confined or concentrated animal feeding operation. *Environmental Health Perspectives* 114(7), pp. 1032–7.

Gibson, J. *et al.* (2010). Identification of Qnr and AAC(6)-Ib-cr plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in multidrug-resistant *Enterobacter* spp. isolated from extraintestinal infections in companion animals. *Veterinary Microbiology* 143(2-4); pp. 329–36.

Gibson, J. *et al.* (2010). Fluoroquinolone resistance mechanisms in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections in dogs. *Veterinary Microbiology* 146 (1-2); pp. 161–6.

Guimarães, S. *et al.* (2006). *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas*. Porto, Porto Editora, Quinta Edição.

Hata, M. *et al.* (2005). Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49(2), pp. 801–3.

Hansen, L. *et al.* (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(9), pp. 3332–7.

Hansen, L. *et al.* (2005). The prevalence of the OqxAB multidrug efflux pump amongst olaquinox-resistant *Escherichia coli* in pigs. *Microbial Drug Resistance* 11(4), pp. 378–82.

Hansen, L. *et al.* (2007). Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60(1), pp. 145–7.

Hawkey, P. (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51(Suppl 1), pp. 29–35.

Hawkey, P. *et al.* (2009). The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64(Suppl 1), pp. 3–10.

Heisig, P. (1996). Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40(4), pp. 879–85.

Herrera-León, S. *et al.* (2011). Characterization of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* carrying plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66(2), pp. 287–90.

Holzbauer, S. and Chiller, T. (2006). Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Emerging Infectious Diseases* 12(7), pp. 1180-1.

Hope, R. *et al.* (2010). Zone breakpoints, by the CLSI disc method, for 15 µl tigecycline discs corresponding to EUCAST MIC breakpoints. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65(10), pp. 2262–4.

Hopkins, K. *et al.* (2007). Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59(6), pp. 1071–5.

Hooper, D. and Rubinstein, E. (2003). *Quinolone antimicrobial agents*. Washington, Ed. American Society for Microbiology, 3<sup>rd</sup> Edition.

Huang, S. *et al.* (2009). Increased prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in chicken *Escherichia coli* isolates from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease* 6(10), pp. 1203–9.

INFARMED. (2007). Relatório do Departamento de Medicamentos Veterinários - O Medicamento Veterinário Farmacológico. Abordagem Analítica. Lisboa, INFARMED.

WHO. Impacts of antimicrobial growth promoter termination in Denmark. The WHO international review panel's evaluation of the termination of the use of antimicrobial growth promoters in Denmark [Em linha]. Disponível em: <http://www.who.int/gfn/en/Expertsreportgrowthpromoterdenmark.pdf> [Consultado em: 02/01/2011].

- Jacoby, A. *et al.* (2006). *qnrB*, another plasmid-mediated for quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(4), pp. 1178-82.
- Jacoby, G. *et al.* (2009). Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(4), pp. 1665–6.
- Karah, N. *et al.* (2010). 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 Diseases* 66(4), pp. 425–31.
- Kehremberg, C. *et al.* (2008). Novel variant of the *qnrB* gene, *qnrB12*, in *Citrobacter werkmanii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(3), pp. 1206–7.
- Kim, H. *et al.* (2009). OqxAB encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(8), pp. 2582–4.
- Kim, E. *et al.* (2009). Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene, *qepA*, in *Escherichia coli* clinical isolates in Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 65(3), pp. 335–8.
- Kim, E. *et al.* (2009). Prevalence of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme among *Enterobacteriaceae* blood isolates in Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), pp. 2643-5.
- Kim, E. *et al.* (2009). Prevalence and characteristics of *aac(6')-Ib-cr* in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*: a multicenter study from Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 63(3), pp. 314–8.
- Kohanski, M. *et al.* (2010). How antibiotics kill bacteria from targets to networks. *Nature Reviews. Microbiology* 8(6), pp. 423–35.
- Lascols, C. *et al.* (2007). Type II topoisomerase mutations in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and other enterobacterial species harbouring the *qnrA* gene. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29(4), pp. 402–9.
- Lastours, V. *et al.* (2010). Résistance aux Flouroquinolones en 2010: quel impact pour la prescription en reanimation? *Réanimation* 19(4), pp. 347–53.

- Lavilla, S. *et al.* (2008). Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61(12), pp. 291–5.
- Liassine, N. *et al.* (2008). First detection of plasmid-mediated quinolone resistance in the community setting and in hospitalized patients in Switzerland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62(5), pp. 1151–2.
- Livermore, D. M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Diseases* 36(Suppl 1), pp. S11-23.
- Liu, J. *et al.* (2008). Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr and AAC(6′)-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(8), pp. 2992–3.
- Lunn, A. *et al.* (2010). Prevalence of mechanisms decreasing quinolone-susceptibility among *Salmonella* spp. clinical isolates. *International Microbiology* 13(1), pp. 15–20.
- Luzzaro, F. (2008). Fluorochinoloni e Gram-negativi: differenze di attività e nuove evidenze sui meccanismi di resistenza. *Le Infezioni in Medicina* 16(2), pp. 5–11.
- Ma, J. *et al.* (2009). 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* 53(2), pp. 519–24.
- Machado, E. *et al.* (2005). Integron content of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(5), pp. 1823–9.
- Machado, E. *et al.* (2006). Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6′)-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(9), pp. 3220–1.
- Machado, E. *et al.* (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62(2), pp. 296–302.

- Madurga, S. *et al.* (2008). Mechanism of binding of fluoroquinolones to the quinolone resistance–determining region of DNA gyrase: towards an understanding of the molecular basis of quinolone resistance. *ChemBioChem* 9, pp. 2081–6.
- McGrath, B. *et al.* (2006). Molecular tools to detect the IncJ elements: a family of integrating, antibiotic resistant mobile genetic elements. *Journal of Microbiological Methods* 66(1), pp. 32–42.
- Mérens, A. *et al.* (2010). Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. *Revue Francophone des Laboratoires* 422, pp. 33–41.
- Minarini, L. *et al.* (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62(3), pp. 474–8.
- Murray, P. R. *et al.* (2007). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, Ed. American Society for Microbiology Press, Ninth Edition.
- Murray, P. R. *et al.* (1998). *Medical Microbiology*. St Louis Missouri, Ed. Mosby, third Edition.
- Nordmann, P. *et al.* (2005). Emergence of plasmid–mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56(3), pp. 463–9.
- Novais, C. *et al.* (2005). High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56(6), pp. 1139–43.
- Ogbolu, D. *et al.* (2011). High levels of multidrug resistance in clinical isolates of Gram-negative pathogens from Nigeria. *International Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 37(1), pp. 62–6.
- Paniagua, R. *et al.* (2010). Assessment of prevalence and changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* fecal carriers using a chromogenic medium. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 67(4), pp. 376–9.
- Park, C. *et al.* (2006). Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin–modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(11), pp. 3953–5.
- Paterson, D. *et al.* (2006). Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *The American Journal of Medicine* 119(6 Suppl 1), pp. S20–8.

Périchon, B. *et al.* (2008). Sequence of conjugative plasmid pIP1206 mediating resistance to aminoglycosides by 16S rRNA methylation and to hydrophilic fluoroquinolones by efflux. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(7), pp. 2581–92.

Piddock, L. *et al.* (1999). Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43(1), pp. 61–70.

Pitout, J. *et al.* (2008). Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of *aac(6′)-Ib-cr*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61(5), pp. 999-1002.

Poirel, L. *et al.* (2006). Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from a French University Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(12), pp. 3992–7.

Pomba, C. *et al.* (2009). Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the *qnrB2* and *aac(6′)-Ib-cr* genes in a dog. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(1), pp. 327–8.

*qnr* numbering and sequence [Em linha] Disponível em: <http://www.lahey.org/qnrStudies/>. [Consultado em: 12/12/10].

Rodríguez-Martínez, J. *et al.* (2010). Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *Journal of Infection and Chemotherapy, in press*.

Robicsek, A. *et al.* (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine Microbiology* 12(1), pp. 83–8.

Robicsek, A. *et al.* (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infectious Diseases* 6(10), pp. 629–40.

Sánchez-Céspedes, J. *et al.*, (2007). Partial characterisation of the *acrAB* locus in two *Citrobacter freundii* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 30(3), pp. 259–63.

Santos, M. (2008). *Determinação da prevalência de genes qnr em isolados clínicos de Escherichia coli*. Aveiro, Universidade de Aveiro (Tese de Douturamento).

Silva, V. (2011). *Detecção e caracterização molecular de beta-lactamases de espectro alargado em Enterobacteriaceae provenientes de suiniculturas Portuguesas*. Porto, Universidade Fernando Pessoa (Monografia).

Sousa, J. (2006). *Manual de antibióticos antibacterianos*. Porto, Ed. Universidade Fernando Pessoa, Segunda Edição.

Sousa, I. (2007). *Interacção da Enrofloxacina com modelos biomembranares: influência das suas propriedades físico-químicas*. Porto, Universidade do Porto - Faculdade de Ciências (Dissertação de Mestrado).

Stahlmann, R. (1990). Safety profile of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 26(Suppl D), pp. 31–44.

Strahilevitz, J. *et al.* (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews* 22(4), pp. 664–89.

Szabo, D. *et al.* (2008). First detection of plasmid-mediated, quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in Budapest, Hungary. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62(3), pp. 630–2.

Teo, J. *et al.* (2009). Detection and genetic characterization of *qnrB* in hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Singapore. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33(2), pp. 177-80.

OIE. Terrestrial Code. [Em linha]. Disponível em: <http://www.oie.int/>. [Consultado em: 12/02/10].atenção, localizar na secção da letra O

Touati, A. *et al.* (2008). First report of *qnrB*-producing *Enterobacter cloacae* and *qnrA*-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 60(3), pp. 287–90.

Velasco, C. *et al.* (2010). Smaqnr, a new chromosome-encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65(2), pp. 239–42.

Veldman, K. *et al.* (2011). International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, in press.

Videira, A. (2001). *Engenharia Genética*. Porto, Ed. Lidel.

Vila, J. *et al.* (1994). Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38(10), pp. 2477–9.

Vila, J. *et al.* (2004). Sistemes d'expulsió activa i llur relació amb la resistència als agents antibacterians. *Antimicrobians* 55, pp. 49–60.

Xia, L. *et al.* (2010). A survey of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes from *Escherichia coli* isolates and their dissemination in Shandong, China. *Foodborne Pathogens and Disease* 7(2), pp. 207–15.

Xiong, Z. *et al.* (2008). Investigation of *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in *Enterobacter cloacae* isolates from Anhui Province, China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 62(4), pp. 457–9.

Yamane, K. *et al.* (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(9), pp. 3354–60.

Yue, L. *et al.* (2008). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* 132(3-4), pp. 414–20.

Wang, M. *et al.* (2009). New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(5), pp. 1892–7.

White, D. *et al.* (2005). *Frontiers in antimicrobial resistance*. Washington, Ed. American Society for Microbiology.

Wu, S. *et al.* (1999). Characterization and nucleotide sequence of a *Klebsiella oxytoca* cryptic plasmid encoding a CMY-type beta-lactamase: confirmation that the plasmid-mediated cephamycinase originated from the *Citrobacter freundii* AmpC beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(6), pp. 1350–7.

Zhao, J. *et al.* (2010). Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(10), pp. 4219–24.

## VII. ANEXOS

**Anexo 1**

*POSTER* apresentado no 3<sup>rd</sup> *Congress of European Microbiologists* (FEMS 2009),  
Gotemburgo, Suécia, 28 Junho-2 Julho 2009.

Organização: *Federation of European Microbiological Societies*

---



**Anexo 2**

*ABSTRACT* submetido e aceite para apresentação (*POSTER*) no 4<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists (FEMS 2011), Genebra, Suíça, 26-30 Junho 2011.

Organização: *Federation of European Microbiological Societies*

---

