

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**Determinação da frequência de genes de resistência a quinolonas  
(*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*) em isolados de *E. coli* obtidos em fazendas de  
suínos**

**Camila Zanfelize Müller**

Porto Alegre - RS

2022

Camila Zanfelize Müller

**Determinação da frequência de genes de resistência a quinolonas (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*) em isolados de *E. coli* obtidos em fazendas de suínos**

Trabalho de Conclusão do Curso de graduação apresentado à Comissão de Graduação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andreza Francisco Martins

Porto Alegre, 2022

## **APRESENTAÇÃO**

Optou-se por apresentar este trabalho em forma de monografia, conforme possibilitado pela Decisão 01/2018 da Comissão de Graduação em Ciências Biológicas (<http://www.ufrgs.br/comgradbio/>). O presente trabalho obedece aos padrões de apresentação exigidos pelas normas ABNT.

## CIP - Catalogação na Publicação

Zanfelize Müller, Camila  
Determinação da frequência de genes de resistência  
a quinolonas (qnrA, qnrB e qnrS) em isolados de E.  
coli obtidos em fazendas de suínos / Camila Zanfelize  
Müller. -- 2022.  
55 f.  
Orientadora: Andreza Francisco Martins.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,  
Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Quinolonas. 2. Resistência. 3. Escherichia coli.  
4. Suínos. 5. PMQR. I. Francisco Martins, Andreza,  
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Camila Zanfelice Müller

**Determinação da frequência de genes de resistência a quinolonas  
(*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*) em isolados de *E. coli* obtidos em fazendas de  
suínos**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do  
título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Andreza Francisco Martins

---

Fabiana Caroline Zempulski Volpato

---

Dariane Castro Pereira

## RESUMO

Quinolonas são antimicrobianos criticamente importantes para a Saúde Humana e Animal e são muito utilizados na pecuária. A ampla utilização destes antimicrobianos aumenta a pressão seletiva promovendo a emergência da resistência bacteriana tanto na microbiota dos animais, como no ambiente. Dentro desse contexto, as taxas de resistência a quinolonas, mediada por genes plasmidiais (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*) aumentaram significativamente nos últimos anos e preocupam pela facilidade de disseminação horizontal destes genes podendo levar ao esgotamento deste arsenal terapêutico. O objetivo deste estudo foi determinar o perfil de susceptibilidade às quinolonas e a frequência de genes de resistência mediados por plasmídeo, em isolados de *E. coli* obtidos de suínos e do ambiente de suinocultura. Foram utilizados 174 isolados ambientais e 260 isolados provenientes de amostras de swab retal de suínos, advindos de 39 granjas do Rio Grande do Sul e coletados de março a setembro de 2018. O perfil de susceptibilidade ao enrofloxacino foi avaliado para 297 isolados (37 ambientais e 260 de suínos), sendo 84,8% (252/297) resistentes, 14,8% (44/297) intermediários e 0,3% (1/297) sensíveis, o que sugere uma alta prevalência de isolados resistentes às quinolonas tanto nos suínos quanto no ambiente da granja. Na pesquisa da frequência dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* constatamos que 8,6% (15/174) dos isolados ambientais foram positivos para o gene *qnrB* e 20,1% (35/174) foram positivos para o gene *qnrS*. Dos isolados de swab retal, 6,5% (17/260) foram positivos para o gene *qnrB*, 19,6% (51/260) foram positivos para o gene *qnrS* e em um isolado (0,4%) foi detectada a presença de ambos os genes *qnrB* e *qnrS*. Os resultados indicam uma possível disseminação dos plasmídeos contendo os genes *qnr* no ambiente das fazendas. Entretanto, diversos isolados que apresentaram fenótipo resistente não possuíam nenhum dos genes avaliados, o que indica a possível ocorrência de outros mecanismos de resistência a quinolonas, como expressão de bombas de efluxo ou mutações cromossômicas. Isso aponta para a necessidade de maior fiscalização e aplicação de medidas para uso prudente dos antimicrobianos, visando sua preservação como uma importante opção terapêutica para o tratamento de doenças infecciosas.

**Palavras-chave:** Resistência, antimicrobianos, PMQR, quinolonas, suínos, *E. coli*.

## ABSTRACT

Quinolones are critically important antimicrobials widely utilized in human and animal medicine. Its extensive application enhances the selective pressure that promotes the emergency of bacterial resistance in animal microbiomes and the environment. Over the last few years the quinolone resistance rates, mediated by plasmidial genes (*qnrA*, *qnrB* and *qnrS*), have significantly increased. Its facilitated propagation through horizontal dissemination is highly concerning, risking the depletion of the existent therapeutic arsenal. This essay aimed to determine the quinolone susceptibility profile and the frequency of plasmid mediated resistance genes in *E. coli* isolates obtained from swines and swine farm environment. We utilized 173 swine farm environment isolates and 260 swine rectal swab isolates acquired from 39 farms in Rio Grande do Sul, collected from march to september in 2018. The enrofloxacin susceptibility profile was analyzed in 297 isolates, 84,8% (252/297) were found to be resistant, 4,8% (44/297) were intermediate and 0,3% (1/297) were susceptible, which suggests a high prevalence of resistant isolates in the environment and the swines. In the *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* gene frequency essay, we observed that 8,6% (15/174) of the environmental isolates were *qnrB* positive and 20,1% (35/174) were *qnrS* positive. For the rectal swab isolates, 6,5% (17/260) were *qnrB* positive, 19,6% (51/260) were *qnrS* positive and one isolate (0,4%) had both *qnrB* and *qnrS* genes. These results show a relationship between these environments and a possible plasmid dissemination in the same proportions. Aside from that, several isolates that showed a resistant phenotype did not present any of the *qnr* genes, which indicates the possible occurrence of other quinolones resistance mechanisms such as the expression of efflux bombs. This points to the need for greater supervision and prudent use of antimicrobials, aiming at their preservation as an important therapeutic option for the treatment of infectious diseases.

**Keywords:** Resistance, antimicrobials, PMQR, quinolones, swine, *E. coli*.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1.Introdução compreensiva.....	9
1.2.Justificativa.....	10
1.3.Objetivos.....	10
1.3.1.Objetivos específicos.....	10
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	11
2.1.Resistência a antimicrobianos.....	11
2.2.Quinolonas.....	13
2.3.Resistência às quinolonas em <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.4.Produção de suínos no Brasil.....	17
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	19
3.1.Amostras.....	19
3.2.Identificação de <i>E. coli</i> .....	20
3.3.Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	20
3.4.Identificação molecular dos genes de resistência às quinolonas pela técnica de PCR Multiplex.....	21
3.4.1.Extração de DNA dos isolados.....	21
3.4.2 Padronização da reação em cadeia da polimerase (PCR) Multiplex.....	21
3.4.3. Eletroforese em gel de agarose.....	23
3.5. Análise de dados.....	23
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
4.1. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	24
4.2 Padronização da PCR Multiplex para os genes <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i> .....	25
4.3. Identificação molecular dos genes de resistência às quinolonas.....	26
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	29
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	31
<b>7. APÊNDICE</b> .....	35



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Introdução Compreensiva

A resistência antimicrobiana é a capacidade dos microrganismos resistirem aos efeitos dos antimicrobianos (ATM), dificultando o tratamento de infecções e restringindo as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento. Considera-se que três princípios podem influenciar na propagação de genes de resistência aos antimicrobianos entre animais e humanos: uso de antimicrobianos em dosagens subterapêuticas, a utilização não terapêutica dos ATM e utilização dos mesmos ATM em humanos e em animais. Além disso, a exposição dos seres humanos a bactérias resistentes e seus genes, no ambiente, pode aumentar a prevalência de genes de resistência no microbioma intestinal inclusive pelo consumo de alimentos de origem animal. (RODRIGUES et. al., 2020).

O ambiente da fazenda e os animais de produção são nichos ecológicos favoráveis para a emergência de bactérias resistentes aos antimicrobianos, tendo em vista sua ampla utilização visando o controle de infecções bacterianas e a melhoria das condições sanitárias (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2012). Dessa forma, acaba-se exercendo uma pressão seletiva sobre a microbiota, favorecendo o predomínio de microrganismos resistentes e podendo levar à disseminação de genes de resistência para outras espécies, incluindo os seres humanos (LEVY; MARSHALL, 2004).

Atualmente, diversos estudos apontam o aumento nos níveis de resistência a quinolonas em enterobactérias isoladas de humanos e de animais (TEUBER, 2001; NORDMANN et al., 2005; PATERSON, 2006; CATTOIR et al., 2007) e uma correlação entre o uso indiscriminado de antibióticos na agricultura e a prevalência de bactérias resistentes a antibióticos nas fazendas (KHACHATOURIANS, 1998; TEUBER et al., 2001; GHOSH et al. 2007, WU et al., 2019). As quinolonas são categorizadas como agentes antimicrobianos criticamente importantes pela World Health Organization (WHO) e pela World Organization for Animal Health (OIE), enfatizando sua importância para humanos e também para animais (OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance; WHO List of Critically Important

Antimicrobials, 2019) e ressaltando a relevância de estudos como o presente para a observação da propagação de resistência a esses ATM, visando a manutenção de opções terapêuticas no tratamento de doenças.

## **1.2 Justificativa**

As quinolonas são antimicrobianos amplamente usados na medicina humana e na pecuária como uma importante opção no arsenal terapêutico para o tratamento de doenças infecciosas. Seu amplo uso na pecuária tem levado ao aumento da ocorrência de genes plasmidiais de resistência a esses ATM em *E. coli*, como o *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*.

No Brasil existem poucos estudos comparativos avaliando a ocorrência desses genes em suínos e no ambiente da granja e a ocorrência de fenótipo resistente nas *E. coli* portadora desses genes. Deste modo, estudos que monitorem a presença destes genes de resistência nos animais e no ambiente podem nos auxiliar a compreender se esse fato reflete na diminuição da sensibilidade de *E. coli* às quinolonas.

## **1.3 Objetivos**

O presente estudo teve como objetivo determinar o perfil de susceptibilidade às quinolonas e a frequência de genes de resistência mediados por plasmídeo, em isolados de *E. coli* obtidos de suínos e do ambiente de suinocultura.

### **1.3.1. Objetivos Específicos**

1. Estabelecer o perfil de susceptibilidade dos isolados de *E. coli* aos antimicrobianos;
2. Padronizar a reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) Multiplex para os genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*;
3. Determinar a presença dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* nos isolados ambientais e de suínos;
4. Correlacionar os resultados do teste de susceptibilidade às fluoroquinolonas (enrofloxacino) com a detecção dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Resistência a antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias - naturais ou sintéticas - capazes de inibir o crescimento ou causar o decréscimo dos microrganismos. Esses agentes são extensivamente utilizados na prevenção e tratamento de infecções bacterianas na medicina humana e veterinária (KÜMMERER, 2004; PHILLIPS et al., 2004; CARRILHO et al., 2007), sendo também adicionados às rações animais para promover o crescimento e aumentar a eficácia alimentar (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000). No século XX, o descobrimento e a comercialização destes compostos desencadearam uma série de avanços na medicina, na produção animal e na economia mundial, resultando em uma grande revolução (HILTUNEN et al., 2016). Os antimicrobianos e seus diversos mecanismos de ação visam comprometer a fisiologia bacteriana, através de processos como: inibição da síntese proteica, inibição da síntese da parede celular, inibição de síntese de ácidos nucleicos, inibição de síntese de metabólitos essenciais e danificação da membrana plasmática (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Com a ampla utilização de antimicrobianos, acaba-se exercendo uma pressão seletiva sobre a microbiota, favorecendo o predomínio de microrganismos resistentes e podendo levar à disseminação de genes de resistência para outras espécies, podendo essas serem patógenos humanos ou animais (LEVY, 1998; LEVY; MARSHALL, 2004). Um exemplo da emergência de resistência por pressão seletiva é pela utilização de promotores de crescimento em rações animais. Glicopeptídeos, como a avoparcina, foram usados extensivamente na Europa, levando vários autores a sugerirem que tais antimicrobianos eram os responsáveis pelo desenvolvimento de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) em animais e, posteriormente, em seres humanos (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000; MATEU; MARTIN, 2001, NORMANNO et al., 2007; REGULA et al., 2009), acarretando proibição do uso destes e de alguns outros antimicrobianos usados como promotores de crescimento.

A resistência bacteriana ocorre quando um organismo anteriormente suscetível a um antimicrobiano torna-se resistente a ele, em decorrência de um processo adaptativo da célula. Isso se dá por meio de mutações, que são eventos espontâneos e aleatórios dentro de uma população bacteriana, ou por aquisição de genes de resistência através de transferência horizontal entre os microrganismos (TORTORA, 2010). Além disso, os mecanismos de resistência podem ser categorizados de acordo com a rota bioquímica envolvida no processo: i) modificações da molécula antimicrobiana, ii) prevenção para atingir o alvo antibiótico (diminuindo a penetração ou expulsando ativamente o composto antimicrobiano), iii) alterações e/ou desvios de sítios-alvo, e iv) resistência devido a processos adaptativos das células (MUNITA e ARIAS, 2016). A resistência a antimicrobianos (AMR) usualmente emerge da variação genética naturalmente expressa por microrganismos somada à pressão seletiva que o uso excessivo dos ATM exerce sobre esses organismos (SKÖLD, 2011), favorecendo a transferência horizontal e disseminação pelos mais diversos ambientes. Pesquisas recentes apontam ambientes aquáticos e de solo como recipientes, reservatórios e fontes desses genes de resistência a ATM, incluindo os de interesse clínico (MARTINEZ, 2009; WRIGHT, 2010).

Atualmente, o aumento de microrganismos resistentes e a consequente ineficácia dos antimicrobianos representam uma grande ameaça global. As patologias relacionadas a AMR podem causar cerca de 10 milhões de mortes a cada ano até 2050, danificando a economia de forma similar à crise financeira global de 2008 (UN Ad hoc Interagency Coordinating Group on Antimicrobial Resistance, 2019). Estima-se que até 2030, a resistência a antimicrobianos levará aproximadamente 24 milhões de pessoas à pobreza extrema (WHO, 2019). Salvo à tomada de ações mundiais para a resolução desse problema, há risco de um retorno à era pré-antibiótica, tendo em vista que mesmo com o desenvolvimento de novos antibióticos, a resistência a eles também acaba se desenvolvendo. Além disso, a fabricação destes agentes envolve um processo longo e dispendioso e, devido a limitações naturais e econômicas, o número de novos compostos antimicrobianos aprovados diminuiu na última década (CANSIZOGLU e TOPRAK, 2017).

O uso racional de antimicrobianos é uma das metas definidas pela World Health Organization (WHO/OMS) para o século XXI. Dessa forma, visando combater o desafio da resistência aos antimicrobianos, a WHO desenvolveu um plano de ação global (WHO - World Health Assembly 72) no contexto de One Health, pretendendo assegurar por maior tempo possível a continuidade e prevenção dos tratamentos. O plano possui cinco objetivos: (i) melhorar a conscientização e a compreensão da resistência antimicrobiana em formuladores de políticas e profissionais; (ii) fortalecer a vigilância e a pesquisa; (iii) reduzir a infecção; (iv) encorajar o uso racional de medicamentos em saúde humana e animal; (v) e aumentar o investimento no desenvolvimento de novos medicamentos, diagnósticos e vacinas. Para que estas premissas sejam alcançadas, é utilizada a abordagem de “uma única saúde”, refletindo a relação entre a saúde humana, animal e o meio ambiente, e exigindo que setores diversos se unam para coordenadamente combater o problema (WHO, 2015).

## **2.2 Quinolonas**

As quinolonas são antimicrobianos sintéticos, sintetizados pela primeira vez em 1949 e introduzidos no uso clínico em 1962 com o ácido nalidíxico (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 1998). Todavia, sua utilização era limitada pelo baixo espectro de atividade, alta concentração inibitória necessária e diversos efeitos colaterais. Em meados de 1980 foi estabelecido no uso clínico o ciprofloxacino, um análogo melhorado do ácido nalidíxico com adição de um átomo de flúor que permitia uma melhoria considerável na atividade contra a DNA girase, melhorando sua ação em organismos Gram-positivos e na farmacocinética e farmacodinâmica, dando início à era das fluoroquinolonas (ALDRED, 2014). Dessa forma, houve a possibilidade de aumento de níveis de atividade e de efetividade desses antimicrobianos com a manutenção do átomo de flúor em quase todas as quinolonas introduzidas posteriormente em uso clínico.

O mecanismo bactericida e seletivo das quinolonas e fluoroquinolonas se dá pela interferência na replicação do DNA bacteriano, por meio de alterações na girase e na topoisomerase IV. A DNA girase é responsável pela supertorção negativa, enquanto

a topoisomerase IV a remove, promovendo o relaxamento da molécula do DNA. Ambas as enzimas são essenciais ao crescimento e replicação da célula bacteriana e, ao terem suas ações e todos os processos subsequentes irreversivelmente inibidos, resultam em morte celular, uma vez que o passo interrompido é reconhecido e degradado pelas enzimas corretoras de erros no DNA. (ALDRED, 2014).

Por mais de cinco décadas as quinolonas tiveram seu uso favorecido, considerando sua alta potência, amplo espectro, biodisponibilidade e formulações convenientes, sendo prescritas amplamente para diversos tipos de infecções humanas e animais. Apesar disso, as quinolonas são altamente tóxicas, com mais de 40% dos usuários sofrendo de efeitos colaterais, os mais comuns sendo efeitos gastrointestinais e artralgia. Danos neuronais e ruptura de tendões foram reportados e correlacionados com a utilização a longo-prazo de diversas fluoroquinolonas, sendo efeitos potencialmente permanentes (PHAM, 2019). Tendo em vista o potencial a reações adversas causadoras de danos permanentes, mais de metade dos fármacos encontrados dentro desta classe já foram removidos do uso clínico. (NICKEL, 2020)

Apesar da controvérsia quanto ao uso das quinolonas em práticas clínicas e sua toxicidade, elas são categorizadas como agentes antimicrobianos criticamente importantes, tanto pela World Organization for Animal Health (OIE), quanto pela World Health Organization, destacando sua extrema relevância tanto para humanos quanto para animais (OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance; WHO List of Critically Important Antimicrobials, 2019). A WHO categoriza todos antimicrobianos utilizados em três grupos, baseado na importância para a medicina humana: Importante, Altamente Importante e Criticamente Importante, visando gerenciar a AMR, assegurando que todos, principalmente os Criticamente Importantes, sejam utilizados de forma parcimoniosa. Os antimicrobianos categorizados como Criticamente Importantes se enquadram em dois critérios: (i) A classe deve ser usada para tratar infecções causadas por bactérias que possam ser transmitidas a humanos a partir de fontes não-humanas; e que possam adquirir genes de resistência de fontes não-humanas; (ii) Número extenso de pessoas na comunidade ou em certas populações de alto risco, como

pacientes com infecções graves em ambientes hospitalares, que são afetadas por doenças cujo tratamento é feito com alternativas limitadas de antimicrobianos.

As quinolonas, além de serem classificadas como Criticamente Importantes, se enquadram na ordem mais alta de prioridade existente, por serem algumas das únicas opções disponíveis de tratamento para doenças que atingem um número alto de indivíduos. Além disso, sua frequência de uso na medicina humana é alta, além da ocorrência de transmissão de *Campylobacter spp.* e Enterobacteriaceae resistentes à quinolonas, advindas de fontes não-humanas (WHO List of Critically Important Antimicrobials, 2019). Historicamente, as quinolonas vêm sendo amplamente usadas no tratamento de infecções urinárias causadas por bactérias Gram-negativas (RUIZ et al., 2019). Na comunidade, seu uso indiscriminado e variação sazonal nas taxas de consumo possivelmente indicam a não-aderência às prescrições médicas, uma consideração importante da perspectiva de saúde pública. O uso excessivo e inapropriado das quinolonas é altamente associado com a emergência da resistência a esses ATM, fazendo com que mais recursos sejam necessários para combater as patologias e aumentando o risco de efeitos colaterais (ADRIAENSSENS et al., 2021). Apesar dos benefícios trazidos pelo espectro mais amplo de ação, pode-se observar que a resistência, principalmente na família Enterobacteriaceae, tornou-se comum, difundida e geralmente não-clonal (STRAHILEVITZ, 2009).

### **2.3 Resistência às quinolonas em *Escherichia coli***

A *Escherichia coli* é uma enterobactéria bacilar Gram-negativa encontrada no ambiente, em alimentos e colonizando o trato gastrointestinal tanto de humanos quanto de animais (SCHROEDER, 2004; SCHIERACK, 2006), além de ser o maior agente etiológico de infecções agudas do trato urinário e diarreia em animais de corte (MAKRINA, 2012; MANGES, 2016). Assim, ela se caracteriza como um patógeno oportunístico extensivamente presente em hospitais, fazendas e seus ambientes circundantes, representando um importante fator na emergência e propagação da resistência a agentes antimicrobianos (WU, 2019).

Do mesmo modo que o eficiente mecanismo de ação das quinolonas age na célula bacteriana, emergem formas de resistir a esse efeito seletivo. Existem quatro mecanismos principais por alterações cromossômicas que conferem resistência a quinolonas em *Escherichia coli*: Mutações em genes codificadores da DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e da topoisomerase IV (*parC* e *parE*); hiperexpressão de bombas de efluxo cromossômicas ou aquisição de bombas por plasmídeos (ex.: QepA e OqxAB); diminuição de permeabilidade da membrana e a inativação enzimática das quinolonas por AAC-(6')-Ib-cr (MIRZAI, 2018; RECACHA, 2017).

No final dos anos 90 um plasmídeo (pMG252) contendo genes codificando baixos níveis de resistência a quinolonas foi isolado de uma cepa clínica de *Klebsiella pneumoniae* em Julho de 1994 da urina de um paciente do Centro Médico Birmingham, na Universidade do Alabama (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 1998). O plasmídeo de 56 kb foi encontrado em diferentes espécies incluindo outros membros das *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Dessa forma se deu a descoberta do *qnrA*, um gene plasmidial codificante de uma proteína de 218 aminoácidos, conferindo susceptibilidade reduzida a quinolonas e fluoroquinolonas (GUAN, 2013). Estudos apontam que esse gene pode ser originário de genes cromossômicos de bactérias marinhas da família *Shewanellaceae* (POIREL, 2015). Após o isolamento do *qnrA*, outros genes *qnr* (quinolone resistance) foram identificados, incluindo o *qnrS*, de *Shigella flexneri* e o *qnrB1*, também de *Klebsiella pneumoniae*. Esses genes codificam proteínas com aminoácidos 41% e 59% homólogas à proteína original.

Dessa forma, os genes plasmidiais *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* e *qnrVC* compartilham de um mesmo mecanismo de ação, codificando proteínas que se acoplam e protegem a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição causada pelas quinolonas (TRAN, 2009). Esses mecanismos de resistência a quinolonas são conhecidos como PMQR, ou “plasmid-mediated quinolone resistance” (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 1998), no qual o plasmídeo é o responsável direto pela resistência a quinolonas; nesse caso, por carrear esses genes. A resistência promovida por esses mecanismos é majoritariamente de baixo nível, o que favorece a seleção de bactérias portadoras de resistência de alto nível, aumentando o efeito das mutações cromossômicas que conferem resistência. Os genes *qnr* são prevalentes principalmente em enterobactérias e são



difundidos globalmente, o que indica que seu surgimento é relativamente antigo (POIREL et al., 2008). Os genes *qnr* normalmente são associados a plasmídeos juntamente com outros elementos móveis ou transponíveis, geralmente incorporados a integrons do tipo *sull* associados a outros determinantes de resistência. Estudos apontam que *E. coli* isoladas de diversos ambientes carregam tanto genes produtores de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) quanto PMQR, normalmente coexistindo no mesmo plasmídeo (WANG, 2012). Plasmídeos carreadores de múltiplos genes de resistência têm a capacidade de transferir essa resistência múltipla a diversas cepas bacterianas, o que representa uma grande ameaça ao tratamento de patologias humanas e animais (JIANG 2012). Essa localização plasmidial e o contexto de integron em que os genes *qnr* se inserem tornam-os grande alvo da transferência horizontal, fazendo com que a resistência à quinolonas se dissemine com relativa facilidade (SKÖLD, 2011).

#### **2.4. Produção de suínos no Brasil**

O Brasil desempenha um importante papel na produção suína, sendo o quarto maior produtor e exportador mundial (Relatório Anual ABPA, 2018), em um contexto no qual a carne suína é de grande destaque no consumo mundial de proteínas de origem animal. Com o aumento da demanda, a produção vem evoluindo com sistemas cada vez mais intensivos de criação, requerendo cada vez mais mão-de-obra especializada para suprir as necessidades do setor produtivo. Dessa forma, houve a necessidade de aumento da utilização de antimicrobianos, cujo uso já ocorria desde a década de 50, com o objetivo de combate às doenças bacterianas. A ocorrência dessas patologias em fazendas produtoras de suínos é a maior responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade e, subsequentemente, por grandes perdas econômicas. (FAIRBROTHER, 2005). Por conseguinte, visando o controle de infecções bacterianas e a melhoria das condições sanitárias, os antibióticos acabam sendo extensivamente utilizados nessa indústria, podendo ser caracterizados por finalidade. As principais classes empregadas são as penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, macrolídeos, lincosamidas e pleuromutilinas, sulfonamidas, sulfa-trimetoprim, quinolonas e rifamicinas (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2012), sendo para finalidades terapêuticas,

metafiláticas, profiláticas ou como aditivos, em doses baixas para melhorar o desenvolvimento animal (promotores de crescimento).

Apesar da comprovada capacidade de melhorar o desempenho de suínos, o uso de antimicrobianos como aditivos vêm sendo progressivamente restringido, principalmente pela possibilidade da resistência bacteriana cruzada em humanos e pela emergente exigência dos importadores por produtos livres de resíduos de antibióticos (SILVA, 2000).

O crescente problema da resistência bacteriana aos antimicrobianos tem sido relacionado, entre outros fatores, ao uso extensivo dos fármacos na suinocultura convencional. Não obstante, em grande parte do mundo os antimicrobianos não são estritamente regulamentados, sendo utilizados de forma indiscriminada, bem como raramente existem estatísticas de uso (MARSHALL, 2011). A grande maioria dos antimicrobianos é aplicada de forma oral, por meio da alimentação (CROMWELL, 2002) e, não obstante a praticidade dessa forma de aplicação, ela favorece a emergência de resistência na microbiota dos próprios animais e carrega consigo um risco de liberação dessas substâncias no ambiente da fazenda, exercendo pressão seletiva sobre os microrganismos comensais e facilitando a disseminação da resistência. Além disso, alguns antibióticos como as fluoroquinolonas e as tetraciclínas não são totalmente metabolizados em suínos, fazendo com que seus resíduos possam ser detectados na poeira, no esterco, no solo, no esgoto, em corpos d'água superficiais e em plantações próximas às fazendas (KINDLE, 2019). Consequentemente, esses locais acabam se tornando reservatórios de resíduos de antimicrobianos, sendo ideais para a emergência e propagação de bactérias resistentes, incluindo *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas (KRUSE, 1994).

### 3. METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia Aplicada (n°323) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

#### 3.1 Amostras

Os isolados ambientais e de swab retal utilizados são provenientes de uma tese de doutorado aprovada no comitê de ética CEUA/UFRGS (projeto n° 33494) e no GPPG/HCPA (projeto n° 180672). As amostras foram coletadas em granjas existentes no Rio Grande do Sul, em parceria com os Serviços de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal/DIPOA - Serviço de Inspeção Estadual-RS, na véspera do abate de cada lote amostrado.

Para este projeto, foram selecionados 260 isolados de *E.coli* provenientes de amostras de swab retal e 174 isolados ambientais advindos de amostras de arraste da pocilga e esterqueira da granja, totalizando 434 isolados estudados, coletados em 39 granjas distribuídas em 8 cidades no Rio Grande do Sul no período de março a setembro de 2018.

As amostras de swab retal dos suínos foram, embebidas em 20mL de Caldo Tripton Caseína de Soja (TSB-KASVI®) contendo ceftazidima e ampicilina em pó e incubadas por 18 a 24 horas a 37 °C. Após este crescimento, foram semeadas em ágar MacConkey (KASVI®) para isolamento e identificação de colônias típicas de *Escherichia coli*. As amostras ambientais foram processadas, utilizando água peptonada tamponada 0,1% para sua diluição, e incubadas em Caldo Tripton Caseína de Soja (TSB-KASVI®) com ceftazidima em pó por 18 a 24 horas a 37 °C. Assim como as amostras de swab retal, as amostras ambientais foram semeadas em ágar MacConkey (KASVI®) para isolamento e identificação de colônias típicas de *Escherichia coli*.

### **3.2 Identificação de *E. coli***

As amostras foram semeadas utilizando uma alça estéril de 10 microlitros em ágar MacConkey (MC - KASVI®) e incubadas por 18 a 24h a 37°C para isolamento e identificação de colônias características de *E. coli*. Em caso de colônias ambíguas, estas foram encaminhadas para identificação através de espectrometria de massas pelo equipamento MALDI-TOF/MS (Brucker Daltonics, Germany). Após o crescimento em ágar, foram selecionadas de 3 a 4 colônias secas, lactose positivas e com características típicas de *E. coli* e estocadas em duplicata em caldo Brain Heart Infusion (BHI - OXOID®) com glicerol 16% em freezer -80.

### **3.3. Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos**

O perfil de susceptibilidade foi determinado através do método de Kirby-Bauer por disco difusão em ágar Mueller Hinton (KASVI®), conforme preconiza o Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2021). Dez antimicrobianos foram utilizados, baseado em sua significância clínica ou epidemiológica para a saúde humana e animal (Oxoid, Austrália): amoxicilina/ácido clavulânico (AMC, 20 µg/10 µg), cefepima (FEP, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), ceftazidima (CAZ, 30 mg), ceftiofur (EFT, 30 µg), enrofloxacino (ENR 5 µg), gentamicin (GM, 10 µg), imipenem (IPM, 10 µg), tetracycline, (TET 30 µg) and sulfametoxazol/trimetoprima (STX 23.75 µg /1.25 µg). Foi utilizada uma cepa padrão de *E. coli* (ATCC 25922) para controle de qualidade e os resultados foram interpretados classificando os isolados como “sensíveis” (S), “intermediários” (I), ou “resistentes” ® de acordo com o CLSI-M100 Ed28 (CLSI 2021) e CLSI-VET08 Ed4 (CLSI, 2018c, 2019). Todos os isolados provenientes de amostras de swab retal (260) foram caracterizados. Neste estudo, 37 isolados ambientais foram utilizados para a determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Para análise dos resultados deste estudo, foi dado enfoque nos resultados do perfil de susceptibilidade ao enrofloxacino, uma fluoroquinolona de amplo espectro.

### **3.4. Identificação molecular dos genes de resistência às quinolonas pela técnica de PCR Multiplex**

#### **3.4.1 Extração de DNA dos isolados**

O DNA genômico total dos isolados foi extraído segundo o protocolo de lise térmica adaptado de DASHTI et al., 2009. Os isolados foram cultivados em ágar Mueller-Hinton (KASVI®) a 37°C por um período de 18 a 24h. Após, foi realizada uma suspensão das colônias em microtubos contendo 1000 µL de tampão TE (Tris-EDTA, pH 7,8) até a obtenção de densidade equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala McFarland. Os tubos foram incubados por 20 min a 80°C em banho seco e por 20 min a -80°C no freezer. Após a lise térmica, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 4 minutos, e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo tubo. A medição da concentração e da pureza foi realizada em um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®) utilizando 2 µL de DNA dos isolados, avaliando a razão 260/280, que deve ser maior que 1,8 e a concentração de DNA, que deve ser maior que 20 ng/µl.

#### **3.4.2 Padronização da reação em cadeia da polimerase (PCR) Multiplex**

Os genes PMQR escolhidos para este estudo foram o *qnrA*, *qnrB* e o *qnrS* (Tabela 1). Foi realizada uma padronização da reação com abordagem multiplex, por ser uma técnica que possibilita a detecção de várias sequências de DNA alvo, visando técnica eficiente, rápida, econômica e reprodutível. Desta forma, o DNA extraído dos isolados de *E.coli*, tanto ambientais quanto de swab retal, foi utilizado na detecção simultânea dos três genes escolhidos. Para os controles positivos da reação foram utilizados os isolados: *Salmonella sp.* 473 (*qnrS*+), *Klebsiella pneumoniae* 507 (*qnrB*+), e *Enterobacter cloacae* 506 (*qnrA*+); cedidos ao Laboratório de Microbiologia Aplicada da UFRGS. Como controle negativo foi utilizada água livre de DNase e RNase (QuatroG®).

Para a padronização da reação em cadeia da polimerase (PCR) Multiplex, foi utilizado o protocolo previamente estabelecido por Yue et al., 2008 como ponto de partida, de acordo com os primers apresentados na Tabela 1 e condições de reação

apresentadas na Tabela 2. Dessa forma, a reação foi realizada em um termociclador (Thermal Cycler Applied Biosystems ProFlex™ PCR System®), seguindo as condições iniciais de desnaturação inicial a 94°C por 45 seg, 32 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento a 57°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 min para a realização de uma curva de temperatura de anelamento para os primers escolhidos (Tabela 2). As concentrações iniciais utilizadas foram de 0,1 µM para cada um dos primers (*qnrA*-F, *qnrA*-R, *qnrB*-F, *qnrB*-R, *qnrS*-F e *qnrS*-R ) (Exxtend®) e DNA template a 20 ng/µl, juntamente com 12,5 de Master Mix (QuatroG®) para cada reação de 25µL.

**Tabela 1: Primers utilizados para os genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*, descritos por Yue et al., 2008.**

Amplicon	Primers	Tamanho do amplicon
<i>qnrA</i>	F: TCAGCAAGAGGATTTCTCA R: GGCAGCACTATTACTCCCA	627 pb
<i>qnrB</i>	F: GATCGTGAAAGCCAGAAAGG R: ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	469 pb
<i>qnrS</i>	F: ACGACATTCGTCAACTGCAA R: TAAATTGGCACCCTGTAGGC	417 pb

**Tabela 2: Condições iniciais de reação utilizadas para a padronização da PCR Multiplex para os genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*.**

Desnaturação inicial	Ciclos	Extensão final
	<b>32 x</b>	
94°C por 45 seg	94°C por 1 min 57°C por 1 min 72°C por 1 min	72°C por 10 min

Min: minutos; Seg: segundos.

### **3.4.3. Eletroforese em gel de agarose**

Após finalizada a reação de PCR Multiplex, os produtos foram corados com 1µL de Loading Buffer GelRed + Bromofenol (QuatroG®) e corridos em um gel de agarose (Kasvi®) 2% em uma cuba de eletroforese (Kasvi® K33) com tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) por 30 min a 127 volts. O gel foi visualizado em um fotodocumentador (SmartView Pro Imager, CMOS, UVCI-1200, Major Science) sob luz UV e fotografado com a câmera do equipamento. Após a análise do gel de agarose foi possível determinar a presença dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* em cada isolado, permitindo a determinação da frequência dos mesmos dentre os isolados utilizados neste experimento.

### **3.5. Análise de dados**

Os dados obtidos foram organizados em um banco de dados em forma de tabela no software Excel 2016 (Microsoft®), possibilitando a visualização e a análise dos resultados em frequências.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Ao todo, obtivemos no antibiograma resultado para 297 isolados (260 swab de suínos e 37 de ambiente). Verificou-se que dos 260 isolados provenientes de amostras de swab retal, 14,6% (38/260) foram intermediários e 85,4% (222/260) foram resistentes ao enrofloxacino, não tendo sido detectado nenhum isolado suscetível ao antimicrobiano. Dos 37 isolados ambientais utilizados, 16,2% (6/37) foram intermediários, 81,0% (30/37) foram resistentes e 2,7% (1/37) foram sensíveis ao enrofloxacino. O perfil de susceptibilidade ao enrofloxacino de todos os isolados analisados foi, então, de 84,8% (252/297) resistentes, 14,8% (44/297) apresentaram resultado intermediário e 0,3% (1/297) foram sensíveis ao ATM. Estes resultados sugerem uma alta prevalência de isolados resistentes às quinolonas tanto nos suínos quanto no ambiente da granja.

A alta ocorrência na expressão de um fenótipo resistente a fluoroquinolonas neste estudo pode ser um reflexo da ampla utilização de antimicrobianos deste grupo na fazenda, cujos resíduos alastram-se e perpetuam-se facilmente no ambiente da granja, podendo favorecer a emergência de resistência dos microrganismos ali presentes. Apesar de ter sido observado um perfil de susceptibilidade majoritariamente resistente, tanto em amostras ambientais quanto de suínos (84,8%), não é possível distinguir a ação de PMQR da de outros mecanismos de resistência, como bombas de efluxo sem antes analisar o perfil genético e principalmente plasmidial destes isolados (STRAHILEVITZ, 2009).

Os fenótipos de susceptibilidade reduzida e resistência a quinolonas são comumente observados em cepas positivas para os genes *qnr*, tornando necessários estudos para compreender quais destes se fazem presentes. Isso se torna possível por meio de uma PCR Multiplex para os genes alvos que, no caso deste estudo, foram o *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*. No geral, somente a aquisição de um plasmídeo com algum dos genes *qnr* não é o suficiente para tornar um organismo *wild-type* não-susceptível às quinolonas (STRAHILEVITZ, 2009). Deste modo, para compreender a extensão e influência desses genes na expressão da resistência às quinolonas se fazem necessários



estudos mais aprofundados, comparando as diferenças de Concentração Inibitória Mínima (MIC) entre cepas com e sem a presença desses genes.

#### 4.2 Padronização da PCR Multiplex para os genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*

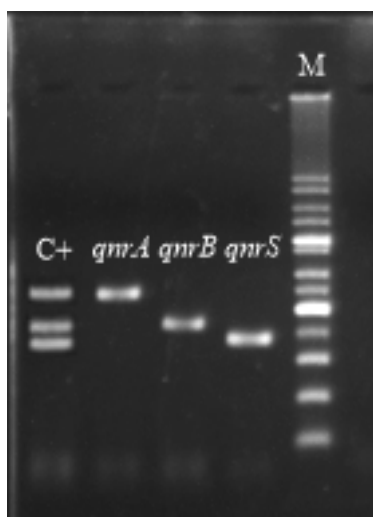
Ao iniciar a padronização com base na reação descrita por Yue et al., 2008, foram mantidas as mesmas concentrações do teste inicial realizado. A reação foi padronizada em 25 µL, sendo usadas as quantidades iniciais de 12,5µL de Master Mix (QuatroG®), 0,5µL de cada primer com concentração de 10 µM (*qnrA*-F, *qnrA*-R, *qnrB*-F, *qnrB*-R, *qnrS*-F e *qnrS*-R) (Exxtend®), 3,5µL de água ultrapura livre de DNase e RNase (QuatroG®) e 6µL de amostra de DNA.

Partindo das condições iniciais de reação, foi realizada uma tentativa e leitura de gel de agarose, na qual foram verificadas bandas fracas nos três controles positivos. Tendo em vista o resultado observado, foram realizadas alterações no tempo de desnaturação inicial e no número de ciclos, dando origem à seguinte reação padronizada, na qual foi possível observar bandas fortes nos controles: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento a 57°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 min (Tabela 3; Figura 1). O tamanho dos fragmentos amplificados foi, respectivamente, 627 pb (*qnrA*), 469 pb (*qnrB*) e 417 pb (*qnrS*).

**Tabela 3: Condições padronizadas da PCR Multiplex para a detecção dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*.**

Gene	Desnaturação inicial		Ciclos	Extensão final
<i>qnrA</i>			1 min a 94°C	
<i>qnrB</i>	3 min a 94°C	35x	1 min a 57°C	10 min a 72°C
<i>qnrS</i>			1 min a 72°C	

Min: minutos.



**Figura 1:** Gel de agarose mostrando o resultado da técnica de PCR multiplex para os genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*. C+: Controle positivo (mistura dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*); *qnrA*: 627 bp, *qnrB*: 469 bp, *qnrS*: 417 bp; M: Marcador de peso molecular de 1000 bp.

#### 4.3. Identificação molecular dos genes de resistência às quinolonas

Na pesquisa da frequência dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* nos isolados ambientais foram utilizados os 174 isolados coletados. Após a PCR Multiplex e a leitura e análise dos géis de agarose, foi possível constatar que 8,6% (15/174) dos isolados ambientais foram positivos para o gene *qnrB* e 20,1% (35/174) foram positivos para o gene *qnrS*. O gene *qnrA* não foi detectado em nenhum dos isolados, assim como nenhum isolado foi considerado positivo para mais de um gene. Na pesquisa da frequência dos genes nos isolados provenientes de amostras de swab retal dos suínos, foi observado que 6,5% (17/260) dos isolados foram positivos para o gene *qnrB*, 19,6% (51/260) foram positivos para o gene *qnrS* e em um isolado (0,4%) foi detectada a presença de ambos os genes *qnrB* e *qnrS*. Assim como nos isolados ambientais, o gene *qnrA* não foi identificado em nenhum isolado. Os resultados obtidos para os isolados ambientais e de swab retal foram muito similares, o que indica uma relação entre esses ambientes e uma possível disseminação do plasmídeo nas mesmas proporções. Além disso, os resultados apontam para uma possibilidade das cepas bacterianas presentes nos suínos serem as mesmas que circulam no ambiente da granja.

O gene *qnrB* é o segundo dos PMQR mais frequentemente encontrado em isolados de Enterobacterales provenientes da América Latina, sendo o primeiro o *aac (6')-Ib-cr* (VIEIRA, 2019). Demais estudos também reportaram que, globalmente, o *qnrB* é o gene PMQR de maior prevalência, juntamente ao *qnrS* (STRAHILEVITZ, 2009; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2011; POIREL, 2012; CATTOIR, 2009). Corroborando com esses dados, o presente estudo apontou taxas significativas de detecção do *qnrB* nos isolados estudados, totalizando 7,4% destes (32/434). O gene *qnrS* foi o mais prevalente, tanto nos isolados suínos como ambientais, tendo sido encontrado em 19,8% dos isolados (86/434).

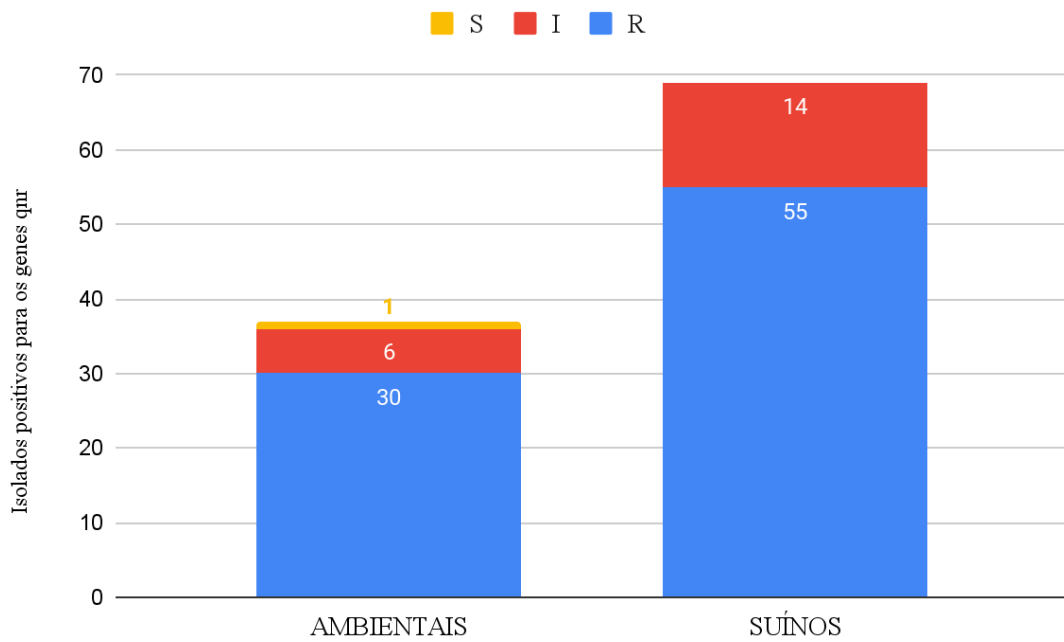
A presença desses genes tanto em *E. coli* provenientes de amostras ambientais quanto de suínos reforça os dados de susceptibilidade analisados, podendo-se inferir que a pressão seletiva pode realmente estar ocorrendo, mesmo sem exposição dos isolados a concentrações inibitórias de fluoroquinolonas (KINDLE, 2019). Granjas de suínos com histórico de aplicação desses antimicrobianos são ambientes que podem conter concentrações residuais destes, tendo em vista que a poluição ambiental com resíduos de fluoroquinolonas é altamente facilitada por sua baixa degradabilidade e alto potencial de ligação à sedimentos (MARENGO, 1997). Diversos dos lotes originários das amostras deste estudo tiveram a utilização de quinolonas como o ciprofloxacino e o norfloxacino na criação dos suínos, sendo essa aplicação na água, na ração tornando assim possível a passagem de resíduos destes antimicrobianos para o ambiente, o que pode favorecer a pressão seletiva nos microrganismos e, conseqüentemente, a propagação dos genes PMQR com relativa facilidade. Estudos apontam que isso ocorre principalmente nas fazendas de criação, nas quais os genes de resistência foram exclusivamente detectados naquelas com histórico de aplicação de fluoroquinolonas (KINDLE, 2019). Além da disseminação do plasmídeo, também pode estar ocorrendo uma expansão clonal de *E. coli* resistentes a quinolonas por todo o ambiente da granja, tendo em vista que a presença de resíduos de ATM pode favorecer a disseminação destes clones.

Em suma, os genes PMQR são facilmente transferidos horizontalmente a outras bactérias no ambiente majoritariamente por se encontrarem em um contexto plasmidial. A exposição de bactérias portadoras dos genes de resistência a quinolonas *qnr* pode

umentar sua capacidade de aquisição de mutações de ponto em genes codificantes da DNA girase e da topoisomerase IV, fazendo com que possa ocorrer a expressão de um fenótipo resistente, conforme observado em 84,8% (252/297) dos isolados do nosso estudo. Apesar de 27,4% (119/434) dos isolados terem sido identificados como positivos para algum dos genes plasmidiais analisados que conferem resistência às quinolonas (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*), diversos isolados que apresentaram fenótipo resistente não possuíam nenhum dos genes presentes.

Isso pode indicar a ocorrência de outros mecanismos de resistência a quinolonas, diferentes dos estudados, como os genes *qnrC*, *qnrD*, *qnrVC* e *aac (6')-Ib-cr*, e ainda outros mecanismos não plasmidiais, como mutações no *gyrB* e expressão de bombas de efluxo, facilitando a extrusão de antimicrobianos através da membrana celular para fora da célula (TRAN; JACOBY, 2002). Dessa forma, além de mecanismos plasmidiais de resistência a quinolonas, mutações que alteram o alvo e reduzem o acúmulo de antimicrobianos podem estar presentes nestes isolados, assim protegendo a célula do efeito das quinolonas e justificando a expressão de resistência observada no antibiograma por disco-difusão. Além disso, o único isolado sensível a enrofloxacino no antibiograma apresentou o gene PMQR *qnrS*. Esse fato indica que a presença dos genes isoladamente pode conferir baixos níveis de resistência às quinolonas, não detectáveis no antibiograma por disco-difusão.

**Gráfico 1 : Perfil de susceptibilidade ao enrofloxacino de isolados ambientais e de suínos positivos para os genes *qnr*.**



Legenda: S: Susceptível; I: Intermediário, R: Resistente.

## 5. CONCLUSÃO

*Escherichia coli* resistentes a quinolonas parecem estar amplamente disseminadas em fazendas de criação de suínos, tanto no ambiente quanto nos próprios animais. Isolados bacterianos que apresentam esse fenótipo resistente são comumente portadores de genes transmissíveis PMQR, o que protege a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição causada pelas quinolonas, podendo resultar em resistência de alto nível. Dessa forma, plasmídeos carreadores de genes *qnr* podem contribuir para a transferência horizontal de resistência a antimicrobianos, afetando o ambiente, os animais e até os seres humanos. Nas últimas décadas, os mecanismos PMQR vêm apresentando grande prevalência em organismos de importância clínica, assim contribuindo para a disseminação global da resistência bacteriana como um todo.

O presente estudo foi realizado visando avaliar a disseminação dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* nas granjas de suínos e como esses genes se correlacionam com a resistência a quinolonas em isolados de *E. coli*, com o objetivo de ressaltar os danos causados pelo uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e na veterinária. Os resultados observados apontam para um alto índice de resistência nos isolados ambientais e de swab retal, conforme observado no antibiograma, apontando para os possíveis efeitos da ampla utilização de fluoroquinolonas na medicina veterinária. Na identificação molecular dos genes de resistência às quinolonas pôde ser observada uma alta frequência dos genes *qnrB* e *qnrS* nos isolados analisados, embora o único isolado sensível a enrofloxacino no antibiograma tenha um dos genes PMQR, indicando que somente a presença dos genes não necessariamente confere altos níveis de resistência a ATM (Gráfico 1).

Os resultados observados no presente estudo apontam para a importância e necessidade do atual plano de ação global One Health, que busca assegurar por maior tempo possível a disponibilidade de antimicrobianos para tratamentos de infecções graves. Para a preservação da utilização de quinolonas e fluoroquinolonas e para a proteção da saúde humana e animal, se faz imprescindível uma maior fiscalização da utilização de antimicrobianos e da disseminação de resistência nas granjas, aplicando

medidas para uso prudente destes antimicrobianos, visando sua preservação como uma importante opção terapêutica para o tratamento de doenças infecciosas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CATTOIR, V., POIREL, L., ROTIMI, V., SOUSSY, C. J., & NORDMANN, P. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(2), 394–397.
2. CHEE-SANFORD JC., MACHKIE RI., KOIKE S., KRAPAC IG., LIN Y., YANNARELL AC., MAXWELL S., AMINOV RI. 2008. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J Environ Qual*, 38(3):1086–108.
3. CLSI. Performance of standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standards 2017. 27 ed. *CLSI guideline M100*.
4. CROMWELL, G. L. 2006. Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal Biotechnology*, 13:1, 7-27.
5. DASHTI, A. A., JADAON, M. M., & DASHTI, H. 2009. Heat Treatment of Bacteria : A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Med J*, 41(2), 117-122.
6. FAIRBROTHER JM., NADEAU E, GYLE CL. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev*. 2005;6(1):17–39.
7. FERRARI, R., MAGNANI, M., ROYO, G., CREMADES, R., OLIVEIRA, T. C. R. M., GALIANA, A., TOGNIM, M. C. B., & RODRÍGUEZ, J. C. 2013. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and mutations in the topoisomerase genes of *Salmonella enterica* strains from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 657–662.
8. GHOSH, S., & LAPARA, T. M. 2007. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *ISME Journal*, 1(3), 191–203.
9. GORDON, D., & GEORGE, J. 2015. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 176(1), 139–148.
10. GOULD, K. 2016. Antibiotics: from prehistory to the present day, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 71, Issue 3, March 2016, Pages 572–575,
11. HOOPER, D. C. 2003. Mechanisms of quinolone resistance, p. 41–67. In D. C. Hooper and E. Rubinstein (ed.), *Quinolone antimicrobial agents*, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC



12. HOOPER, D. C., & JACOBY, G. A. 2016. Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(9),.
13. JACOBY, G. A. 2005. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical infectious diseases*, 41(Supplement 2), S120-S126.
14. JACOBY, G. A. 2017. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Antimicrobial Drug Resistance* (pp. 265–268).
15. JACOBY, G. A., CHOW, N., & WAITES, K. B. 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(2), 559–562.
16. KHACHATOURIANS G. G. 1998. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *CMAJ : Canadian Medical Association journal*, 159(9), 1129–1136.
17. KINDLE, P., ZURFLUH, K., NÜESCH-INDERBINEN, M., VON AH, S., SIDLER, X., STEPHAN, R., & KÜMMERLEN, D. 2019. Phenotypic and genotypic characteristics of Escherichia coli with non-susceptibility to quinolones isolated from environmental samples on pig farms. *Porcine Health Management*, 5(1), 1–12.
18. KRUSE H, SORUM H. 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl Environ Microbiol.*, 4015–21.
19. LEVY, S. B. 1998. Multidrug resistance: a sign of the times. *N. Engl. J. Med.* 338, 1376–1378.
20. LEVY, S. B. & MARSHALL, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10, S122–S129.
21. MARENGO JR., KOK RA., O'BRIEN K., VELAGALETI RR., STAMM JM. 1997. Aerobic biodegradation of (14C)-sarafloxacin hydrochloride in soil. *Environ Tox Chem.*, 16(3):462–7
22. MARSHALL BM., LEVY SB. 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev*, 24:718-33
23. MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., PASCUAL, A., & JACOBY, G. A. 2005. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet*, 351(9105), 797-799.
24. MUNITA, J. M., ARIAS, C. A. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 119–127.

25. NICKEL, J. C., & DOIRON, R. C. 2020. Dangerous fluoroquinolones: The urologist's dilemma. *Canadian Urological Association journal*, 14(4), 85–86.
26. NORDMANN, P., & POIREL, L. 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(3), 463–469.
27. NORMANNO, G.; CORRENTE, M.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N. C.; PARISI, A.; GRECO, G.; BELLACICCO, A. L.; VIRGILIO, S.; CELANO, G. V. 2007. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology, Amsterdam*, v. 117, n. 2, p. 219-222.
28. PATERSON, D. L. 2003. Resistance in gram-negative bacteria : Enterobacteriaceae. *Am J Med.* 20–28.
29. ROBICSEK, A., JACOBY, G. A., & HOOPER, D. C. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infectious Diseases*, 6(10), 629–640.
30. RODRIGUES I A., FERRARI R G, PANZENHAGEN P H N, MANO S B, CONTE-JUNIOR C A. 2020. Antimicrobial resistance genes in bacteria from animal-based foods. *Adv Appl Microbiol*, 112:143-183
31. RUIZ, J. 2019. Transferable mechanisms of quinolone resistance from 1998 onward. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4), 1–59.
32. SKOLD, O. 2011. Antibiotics and Antibiotic Resistance. *John Wiley & Sons*.
33. STRAHILEVITZ J, JACOBY GA, HOOPER DC, ROBICSEK A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev*, 22(4):664–89.
34. TEUBER, M. 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5), 493–499.
35. TORTORA, G J., FUNKE, B R., CASE, C L. 2017. Microbiologia. *Artmed*, 12<sup>a</sup> ed., Porto Alegre.
36. TRAN, J. H., & JACOBY, G. A. 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5638–5642.
37. TRAN, J. H., JACOBY, G. A., & HOOPER, D. C. 2005. Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein QnrA with. *Microbiology*, 49(7), 3050–3052.

38. VAN DEN BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Link between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 327- 335.
39. VIEIRA, D. C., LIMA, W. G., & DE PAIVA, M. C. 2020. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) among Enterobacteriales in Latin America: a systematic review. *Molecular Biology Reports*, 47(2), 1471–1483.
40. WHO, World Health Organization. 2005. Containing antimicrobial resistance. *WHO Policy Perspectives on Medicines*.
41. WHO, World Health Organization. 2015. Global action plan on antimicrobial resistance.
42. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*.
43. WHO, World Health Organization. 2005. Containing antimicrobial resistance. *WHO Policy Perspectives on Medicines*.
44. WHO, World Health Organization. 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*.
45. WHO, World Health Organization. 2018. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: Early implementation 2017-2018.
46. WHO HEALTH TOPICS: ANTIMICROBIAL RESISTANCE. World Health Organization, 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso: 15 de dezembro de 2021
47. WU, B., QI, Q., ZHANG, X., CAI, Y., YU, G., LV, J., GAO, L., WEI, L., & CHAI, T. 2019. Dissemination of Escherichia coli carrying plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes from swine farms to surroundings. *Science of the Total Environment*, 665, 33–40.
48. YUE, L., JIANG, H. X., LIAO, X. P., LIU, J. H., LI, S. J., CHEN, X. Y., CHEN, C. X., LÜ, D. H., & LIU, Y. H. 2008. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in poultry and swine clinical isolates of Escherichia coli. *Veterinary Microbiology*, 132(3–4), 414–420.

## 7. APÊNDICE

**Tabela 4.** Caracterização dos isolados de *E.coli* obtidos a partir de swab retal de suínos

Isolado Swab Retal	Antibiograma	Genes de resistência a quinolonas		
	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
553	R	0	0	0
554	I	0	0	0
558	R	0	0	0
559	R	0	0	0
560	R	0	0	0
564	R	0	0	1
565	R	0	0	0
566	R	0	0	1
567	R	0	0	1
568	R	0	0	0
569	R	0	0	0
570	I	0	0	0
571	I	0	0	0
572	R	0	0	1
573	R	0	0	0
574	R	0	0	0
575	R	0	0	0

Isolado Swab Retal	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
587	R	0	0	0
588	I	0	1	0
589	R	0	1	1
590	I	0	0	0
591	R	0	0	0
592	R	0	0	0
593	I	0	0	1
594	I	0	0	0
595	R	0	0	0
596	R	0	0	0
597	R	0	0	0
598	R	0	0	0
599	R	0	0	0
600	R	0	0	0
601	R	0	0	0
602	I	0	0	0
603	I	0	0	1
605	I	0	1	0
606	R	0	0	0
607	R	0	0	0
608	I	0	0	0
609	R	0	0	0

Isolado Swab Retal	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
610	I	0	0	0
631	I	0	0	0
633	R	0	0	0
634	R	0	0	1
637	R	0	0	0
646	R	0	0	0
647	R	0	0	0
648	R	0	0	0
649	R	0	0	0
650	R	0	0	0
651	I	0	0	0
652	R	0	0	0
653	I	0	0	0
654	R	0	0	0
655	R	0	0	0
656	R	0	0	0
657	R	0	0	0
658	R	0	0	0
659	R	0	0	0
660	R	0	0	1
661	R	0	0	1
662	I	0	0	0

Isolado Swab Retal	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
663	I	0	0	0
664	R	0	0	0
665	R	0	0	1
666	R	0	0	1
667	I	0	1	0
668	I	0	0	1
669	I	0	0	0
679	R	0	0	0
680	R	0	0	1
718	R	0	0	1
725	I	0	0	0
726	R	0	0	0
743	R	0	0	0
771	R	0	0	0
772	R	0	0	0
773	R	0	0	0
774	R	0	0	0
775	R	0	0	0
776	R	0	0	0
777	R	0	1	0
778	R	0	1	0
779	R	0	0	0

Isolado Swab Retal	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
780	R	0	0	0
781	R	0	1	0
782	R	0	0	0
783	R	0	0	0
784	R	0	0	0
785	R	0	1	0
786	R	0	0	0
787	R	0	1	0
788	R	0	1	0
789	I	0	0	0
790	I	0	1	0
791	R	0	0	0
792	R	0	0	1
793	I	0	0	0
794	I	0	1	0
795	R	0	0	1
796	R	0	0	0
797	R	0	0	0
798	R	0	0	0
799	R	0	0	0
800	R	0	0	0
801	R	0	0	0



Isolado Swab Retal	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
824	R	0	0	0
831	R	0	0	0
832	R	0	0	0
833	R	0	1	0
834	R	0	0	0
835	R	0	0	0
836	R	0	0	0
837	R	0	0	0
838	R	0	0	0
839	R	0	0	0
840	R	0	0	1
841	I	0	0	1
842	R	0	1	0
844	R	0	0	0
845	R	0	0	1
846	R	0	0	0
847	R	0	0	0
848	R	0	0	0
849	R	0	0	0
850	R	0	0	0
851	R	0	0	0
852	R	0	0	0

Isolado Swab Retal	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
853	R	0	0	0
854	R	0	0	0
855	I	0	0	0
856	R	0	0	0
857	R	0	0	0
858	R	0	0	0
859	R	0	0	0
860	R	0	0	1
861	R	0	0	1
862	I	0	1	0
863	R	0	0	0
864	R	0	0	1
865	R	0	0	0
896	R	0	0	0
914	R	0	0	1
915	R	0	0	0
920	R	0	0	0
921	R	0	0	0
922	R	0	0	0
923	I	0	0	0
924	R	0	0	0
925	R	0	0	0

Isolado Swab Retal	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
926	R	0	0	0
927	R	0	0	0
928	R	0	0	1
929	R	0	0	0
930	R	0	0	1
931	R	0	0	0
932	R	0	0	1
933	R	0	0	0
934	I	0	0	1
935	R	0	0	1
936	I	0	0	1
937	I	0	0	1
938	R	0	0	0
939	R	0	0	0
940	R	0	0	0
941	I	0	0	0
942	R	0	0	0
943	R	0	0	0
944	R	0	0	0
946	I	0	1	0
947	R	0	0	1
948	I	0	0	0

Isolado Swab Retal	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
949	R	0	0	0
950	R	0	0	0
951	R	0	0	0
953	R	0	0	0
954	I	0	1	0
955	R	0	0	0
981	R	0	0	1
987	I	0	0	0
988	R	0	0	0
993	R	0	0	0
994	R	0	0	0
995	I	0	0	0
1012	R	0	0	1
1018	R	0	1	0
1019	R	0	0	1
1020	R	0	0	1
1021	R	0	0	0
1022	R	0	0	0
1023	R	0	0	0
1024	R	0	0	0
1025	R	0	0	0
1026	R	0	0	0

Isolado Swab Retal	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
1027	R	0	0	0
1028	R	0	0	0
1029	R	0	0	1
1030	R	0	0	1
1031	R	0	0	0
1032	R	0	0	0
1033	R	0	0	0
1034	R	0	0	0
1035	R	0	0	0
1036	R	0	0	0
1037	R	0	0	0
1038	R	0	0	1
1039	R	0	0	1
1040	R	0	0	1
1041	R	0	0	0
1042	R	0	0	1
1043	R	0	0	0
1044	R	0	0	1
1045	R	0	0	0
1046	R	0	0	0
1047	R	0	0	0
1048	R	0	0	0

Isolado Swab Retal	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
1049	R	0	0	1
1050	R	0	0	0
1059	R	0	0	0
1060	R	0	0	0
1061	R	0	0	0
1083	R	0	0	0
1084	R	0	0	1
1085	R	0	0	0
1086	R	0	0	0
1107	R	0	0	0
1112	R	0	0	0
1114	R	0	0	0
1117	R	0	0	0
1134	R	0	0	0
1135	R	0	0	0
1136	R	0	0	0
1137	R	0	0	0
1138	R	0	0	0
1140	R	0	0	0
1141	R	0	0	0
1142	I	0	0	0
1143	R	0	0	1

Isolado Swab Retal	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
1144	R	0	0	0
1145	R	0	0	1
1146	R	0	0	1
1147	R	0	0	0
1148	R	0	0	0
1149	R	0	0	0
1150	R	0	0	0
1151	R	0	0	1
1153	R	0	0	0
1154	R	0	0	0
1155	R	0	0	0
1156	R	0	0	1
1158	R	0	0	0
1159	R	0	0	0
1160	R	0	0	1
1161	R	0	0	1
1162	R	0	0	0
1163	R	0	0	0
1164	R	0	0	0
1165	R	0	0	0
1166	R	0	0	0
1203	R	0	0	0

Isolado Swab Retal	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
1204	R	0	0	0
<b>TOTAL</b>		0	18	52

ENR: Enrofloxacino; 0: ausência de gene, 1: presença de gene.

**Tabela 5.** Caracterização dos isolados de *E. coli* obtidos no ambiente da fazenda.

Isolado Ambiental	Antibiograma	Genes de resistência a quinolonas		
	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
556	-	0	0	0
557	R	0	0	1
562	R	0	0	1
577	-	0	0	0
579	R	0	0	1
580	R	0	0	1
612		0	0	0
613	-	0	0	0
614	-	0	0	0
626	-	0	0	0
627	R	0	0	1
628		0	0	0
629	I	0	0	1
632	-	0	0	0
636	-	0	0	0



Isolado Ambiental	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
639	I	0	1	0
642	-	0	0	0
673	R	0	0	1
677	-	0	0	0
678	-	0	0	0
699	R	0	0	1
701	-	0	0	0
702	-	0	0	0
703	-	0	0	0
704	-	0	0	0
705	-	0	0	0
708	-	0	0	0
710	-	0	0	0
711	-	0	0	0
713	S	0	0	1
720	-	0	0	0
721	-	0	0	0
723	-	0	0	0
730	-	0	0	0
732	-	0	0	0
733	-	0	0	0
734	-	0	0	0

Isolado Ambiental	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
736	-	0	0	0
737	-	0	0	0
738	-	0	0	0
739	-	0	0	0
741	-	0	0	0
746	R	0	0	1
753	R	0	1	0
754	R	0	1	0
755	-	0	0	0
756	-	0	0	0
758	-	0	0	0
759	-	0	0	0
761	R	0	1	0
802	-	0	0	0
803	-	0	0	0
804	-	0	0	0
805	-	0	0	0
806	-	0	0	0
807	-	0	0	0
808	-	0	0	0
809	-	0	0	0
810	R	0	0	1

Isolado Ambiental	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
811	-	0	0	0
812	-	0	0	0
814	-	0	0	0
815	-	0	0	0
816	-	0	0	0
817	-	0	0	1
818	R	0	1	0
820	-	0	0	0
821	-	0	0	0
866	-	0	0	0
867	-	0	0	0
868	-	0	0	0
869	I	0	0	1
873	-	0	0	0
876	-	0	0	0
877	R	0	0	1
878	-	0	0	0
879	-	0	0	0
882	-	0	0	0
897	-	0	0	0
898	R	0	0	1
899	R	0	0	1

Isolado Ambiental	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
900	-	0	0	0
901	-	0	0	0
903	-	0	0	1
904	-	0	0	0
905	R	0	1	0
906	-	0	0	0
907	-	0	0	0
909	R	0	0	1
910	-	0	0	0
911	R	0	0	1
912	R	0	1	0
916	-	0	0	0
917	-	0	0	0
918	-	0	0	0
957	-	0	0	0
959	-	0	0	0
962	R	0	0	1
963	-	0	0	0
965	-	0	0	1
972	R	0	1	0
997	R	0	0	1
998	R	0	0	1

Isolado Ambiental	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
1000	-	0	0	0
1001	-	0	0	0
1003	R	0	1	0
1004	-	0	0	0
1005	-	0	0	0
1008	-	0	0	0
1009	-	0	0	1
1010	-	0	0	0
1013	-	0	0	0
1014	-	0	0	0
1015	R	0	1	0
1016	-	0	0	0
1017	-	0	0	0
1053	-	0	0	0
1054	-	0	0	0
1056	-	0	0	0
1072	-	0	0	0
1075	-	0	0	0
1087		0	1	0
1088	I	0	1	0
1089	-	0	1	0
1090	-	0	0	0

Isolado Ambiental	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
1091	-	0	0	1
1093	-	0	0	0
1094	-	0	0	0
1095	I	0	0	1
1096	-	0	0	0
1097	R	0	0	1
1098	-	0	0	0
1099	-	0	0	0
1100	-	0	0	1
1101	-	0	0	0
1102	R	0	0	1
1103	-	0	0	0
1104	-	0	0	1
1105	-	0	0	0
1106	-	0	0	0
1108	I	0	0	1
1109	-	0	0	0
1110	-	0	0	0
1115	-	0	0	0
1116	-	0	0	0
1118	-	0	0	1
1125	-	0	0	1

Isolado Ambiental	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
1128	-	0	0	0
1130	-	0	0	0
1167	-	0	0	0
1173	-	0	0	0
1175	-	0	0	0
1176	-	0	0	0
1177	-	0	0	0
1178	-	0	0	0
1180	-	0	0	0
1181	-	0	0	0
1182	-	0	0	0
1183	-	0	0	0
1184	-	0	0	0
1185	R	0	1	0
1186	-	0	0	1
1187	-	0	0	0
1189	-	0	0	0
1190	-	0	0	0
1191	-	0	0	0
1199	-	0	0	0
1200	-	0	0	1
1201	-	0	0	0

Isolado Ambiental	ENR	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
1202	-	0	0	0
1205	R	0	1	0
1206	-	0	0	0
1207	-	0	0	0
1208	-	0	0	0
<b>TOTAL</b>		0	15	35

ENR: Enrofloxacino; 0: ausência de gene, 1: presença de gene.