



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INFLUÊNCIA DO USO DE ENROFLOXACINA NO APARECIMENTO DE  
RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS MEDIADA POR PLASMÍDEOS EM *Escherichia coli*  
DE VITELOS

Lara Sofia Fernandes Guerreiro

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz

Mestre Telmo Renato Landeiro Raposo Pina Nunes

ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias

Ferreira Pomba

CO-ORIENTADOR

Mestre Telmo Renato Landeiro

Raposo Pina Nunes

2012

LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INFLUÊNCIA DO USO DE ENROFLOXACINA NO APARECIMENTO DE  
RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS MEDIADA POR PLASMÍDEOS EM *Escherichia coli*  
DE VITELOS

Lara Sofia Fernandes Guerreiro

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz

Mestre Telmo Renato Landeiro Raposo Pina Nunes

ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias

Ferreira Pomba

CO-ORIENTADOR

Mestre Telmo Renato Landeiro

Raposo Pina Nunes

2012

LISBOA

---

**À minha família.**

## **Agradecimentos**

A realização da presente dissertação contou com imprescindíveis contributos, de natureza diversa, que não podem deixar de ser realçados. Venho, assim, expressar o meu sincero agradecimento e profunda honra pela colaboração, especialmente:

-À Professora Doutora Maria Constança Ferreira Pomba, pelo apoio e disponibilidade incomensuráveis, pelo interesse e ânimo com que ouviu sempre todas as minhas questões, pela partilha de valiosos conhecimentos, pelo constante incentivo e estímulo ao trabalho e pelas críticas e sugestões relevantes que pautaram a sua orientação de inigualável rigor científico e pedagógico;

-Ao Mestre Telmo Nunes, pelos importantes ensinamentos, pela prontidão com que sempre me recebeu e esclareceu, pelo espírito de interesse e de crítica que me trouxe a perspicácia de questionar e ver mais além;

-À Dr<sup>a</sup> Madalena Centeno, pelo excelente trabalho que desenvolveu em 2010 e que foi o ponto de partida da minha investigação, dando-me a oportunidade e o privilégio de seguir as suas pegadas de dedicação e elevada exigência;

-À Doutora Lina Cavaco, pelo auxílio prestado e partilha de conhecimento no contexto das técnicas de análise utilizadas;

-Ao Coordenador do Mestrado em Segurança Alimentar Professor Doutor António Salvador Barreto, pela disponibilidade permanente e pelas palavras de motivação;

-Ao Professor Doutor Virgílio Almeida pela atenção de sempre, pelo incentivo e pela ‘porta’ que me abriu, direccionando-me para a realização deste trabalho;

-À D. Maria Paula Silva, pela amabilidade, atenção e profissionalismo com que sempre acolheu e resolveu todas as minhas questões;

-Às companheiras de laboratório Natacha Couto, pela paciente e competente instrução, pela atenção constante, pela amabilidade com que sempre partilhou a sua experiência, incutindo-me as capacidades e o rigor necessários ao sucesso deste trabalho, e Adriana Belas, pela presença, apoio, partilha e amizade;

-Grata, por fim, àqueles que são a minha vida: ao Zé, minha inspiração; ao meu pai, que é luz nos meus caminhos; à minha mãe, essa inspiradora força de viver; ao Vasquinho, o melhor irmão do mundo; à avó Maria, que semeou em mim a sede do saber; e aos meus amigos(as), pelo apoio e confiança incondicionais, que por crerem em mim tão além do que sou, fazem-me ser mais do que sou.

## Resumo

O conhecimento sobre a presença e frequência de genes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (RQMP) em estirpes comensais de *Escherichia coli* de origem bovina é escasso a nível mundial. Foram estudadas um total de 237 amostras de *E. coli* de vitelos saudáveis previamente isoladas após pressão selectiva *in vivo* de enrofloxacin (ENR) e caracterizadas quanto à resistência aos antibióticos: 101, 79 e 57 isolados relativos a T0, T1 (6 semanas após administração de ENR) e T2 (10 semanas após administração de ENR), respectivamente. Os isolados foram caracterizados fenotipicamente por determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os antimicrobianos ácido nalidíxico (AN), ciprofloxacina (CIP) e levofloxacina (LEV) e os resultados interpretados segundo os critérios epidemiológicos (ECOFF) estabelecidos pelo EUCAST. A frequência de genes de RQMP (*qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA*) foi determinada através de amplificação por PCR e sequenciação nucleotídica. A proporção de isolados de *E. coli* resistentes ao AN em T0, T1 e T2 foi de, respectivamente: 52,5% (n=53; CIM 64->256 µg/ml), 100% (n=79; CIM 128->256 µg/ml) e 82,5% (n=47; CIM 128->256 µg/ml). A resistência à CIP em T0, T1 e T2 foi de, respectivamente: 52,5% (n=53; CIM 0,125->256 µg/ml), 100% (n=79; CIM 0,25-128 µg/ml) e 89,5% (n=51; CIM 0,25-64 µg/ml). A resistência à LEV em T0, T1 e T2 foi de, respectivamente: 46,5% (n=47; CIM 0,5-64 µg/ml), 100% (n=79; CIM 0,5-64 µg/ml) e 87,7% (n=50; CIM 0,5-32 µg/ml). No que respeita aos determinantes de RQMP nos 237 isolados estudados, foram identificados: 11,8% (n=28) positivos para genes *qnr* (*qnrB2*, n=4; *qnrD*, n=11; *qnrS1*, n=13); e 0,8% (n=2) isolados positivos para o gene *aac(6')-Ib-cr*. Da análise da frequência dos genes de RQMP nos isolados de *E. coli* observou-se: em T0, 3% de genes *qnr* (todos *qnrS1*) e 2% do gene *aac(6')-Ib-cr*; em T1, 15,2% de genes *qnr* (10,1% *qnrD* e 5,1% *qnrS1*); em T2, 22,8% de genes *qnr* (7% *qnrB2*, 5,3% *qnrD* e 10,5% *qnrS1*). Os dados obtidos evidenciam um aumento significativo da prevalência de isolados resistentes ao longo do tempo de colheita, sugerindo que a pressão selectiva imposta pela exposição à ENR tem influência no aparecimento de resistência às quinolonas. Observou-se um aumento significativo da frequência de genes de RQMP ao longo do estudo longitudinal e mais de 80% dos isolados positivos para RQMP foram resistentes às quinolonas. Este é, para o nosso conhecimento, o primeiro estudo que descreve a identificação de resistência às quinolonas por *qnrD* em isolados de *E. coli* de bovinos.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*; vitelos; fluoroquinolonas; resistência mediada por plasmídeos; pressão selectiva.

## Abstract

The current knowledge about the presence and frequency of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in commensal *Escherichia coli* strains from cattle is scarce. Two hundred and thirty seven *E. coli* samples isolated from healthy calves were studied after *in vivo* enrofloxacin (ENR) selective pressure and previously characterized regarding antimicrobial susceptibility, including: 101, 79 and 57 isolates from T0, T1 (six weeks after ENR administration) and T2 (10 weeks after ENR administration), respectively. The phenotypic characterization was performed using Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination for nalidixic acid (NAL), ciprofloxacin (CIP) and levofloxacin (LEV) by the microdilution method and the results were interpreted according to EUCAST definitions of epidemiological cut-off values (ECOFF). PMQR genes (*qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA*) frequency was performed by PCR amplification and nucleotide sequencing. NAL resistant *E. coli* isolates in T0, T1 and T2 were, respectively: 52,5% (n=53; MICs 64 to >256 µg/ml), 100% (n=79; MICs 128 to >256 µg/ml) and 82,5% (n=47; MICs 128 to >256 µg/ml). CIP resistant isolates in T0, T1 and T2 were, respectively: 52,5% (n=53; MICs 0,125->256 µg/ml), 100% (n=79; MICs 0,25-128 µg/ml) and 89,5% (n=51; MICs 0,25-64 µg/ml). LEV resistant isolates in T0, T1 and T2 were, respectively: 46,5% (n=47; MICs 0,5-64 µg/ml), 100% (n=79; MICs 0,5-64 µg/ml) and 87,7% (n= 50; MICs 0,5-32 µg/ml). From the 237 *E. coli* isolates tested: 11,8% (n=28) harboured *qnr* genes (*qnrB2*, n=4; *qnrD*, n=11; and *qnrS1*, n=13) and 0,8% (n=2) were found positive for the *aac(6')-Ib-cr* gene. The analysis of PMQR genes in *E. coli* at the different sampling times showed that: at T0, *qnr* genes were detected in 3% of the isolates (all found to be *qnrS1*) and 2% carried the *aac(6')-Ib-cr* gene; at T1, 15,2% of the isolates carried *qnr* genes (10,1% *qnrD* and 5,1% *qnrS1*); and at T2, 22,8% of the isolates were found positive for *qnr* genes (7% *qnrB2*, 5,3% *qnrD* and 10,5% *qnrS1*). The results reveal an increased prevalence of resistant isolates along the time, suggesting that ENR selective pressure influences the emergence of quinolone resistance. A significant increased frequency of PMQR genes along the longitudinal study was observed and more than 80% of PMQR positive isolates were quinolone resistant. This is to our knowledge the first report on PMQR *qnrD* gene in *E. coli* isolates from cattle.

**Keywords:** *Escherichia coli*; calves; fluoroquinolones; plasmid-mediated-resistance; selective pressure.

## Índice geral

Dedicatória .....	i
Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Índice geral .....	v
Índice de figuras .....	vii
Índice de tabelas .....	viii
Lista de abreviaturas .....	x
I – INTRODUÇÃO .....	1
1. <i>Escherichia coli</i> .....	4
1.1. Resistência aos antimicrobianos em isolados de <i>Escherichia coli</i> e sua relação com a segurança alimentar .....	5
1.2. Pressão selectiva .....	14
1.3. Uso de antimicrobianos nos sistemas de produção intensiva de bovinos .....	16
2. Quinolonas .....	18
2.1. Classificação, estrutura química e actividade .....	20
2.2. Mecanismo de acção .....	24
2.3. Farmacocinética .....	25
2.4. Importância do uso das fluoroquinolonas no tratamento de infecções em espécies animais produtoras de alimentos destinados ao consumo humano .....	26
2.5. Resistência às fluoroquinolonas em <i>Escherichia coli</i> .....	28
3. Resistência aos antimicrobianos: critérios interpretativos clínicos e epidemiológicos .....	36
4. Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas .....	40
4.1. Resistência às quinolonas mediada por mutações no cromossoma bacteriano....	42
4.2. Resistência às quinolonas mediada por plasmídeos .....	45
4.2.1. Genes <i>qnr</i> .....	59
4.2.2. Bomba de efluxo QepA e OqxAB .....	67
4.2.3. Variante <i>cr</i> da acetiltransferase de aminoglicosídeos ( <i>aac(6')-Ib-cr</i> ) .....	69
II – OBJECTIVOS .....	71
III – MATERIAIS E MÉTODOS .....	73
1. Isolados de <i>Escherichia coli</i> .....	73
2. Caracterização da exploração .....	73
3. Colheita das amostras .....	74
4. Caracterização fenotípica dos isolados de <i>Escherichia coli</i> .....	75
4.1. Determinação das concentrações inibitórias mínimas para os antimicrobianos ácido nalidíxico, ciprofloxacina e levofloxacina .....	75
5. Caracterização genotípica dos isolados de <i>Escherichia coli</i> .....	76
5.1. Amplificação por “Polymerase Chain Reaction” .....	76
5.2. Purificação e sequenciação de produtos de “Polymerase Chain Reaction” .....	79
6. Análise estatística dos resultados.....	80
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	81
1. Valores da concentração inibitória mínima para as quinolonas e fenótipo de resistência .....	81
2. Prevalência dos genes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos ....	88
3. Pressão selectiva <i>in vivo</i> de enrofloxacin: efeitos no desenvolvimento de resistência e no aparecimento de genes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos .....	92
4. Critérios epidemiológicos (ECOFF) vs. critérios clínicos .....	98
VI – CONCLUSÃO .....	102



## Índice geral (continuação)

VII – BIBLIOGRAFIA .....	104
ANEXOS .....	123
Anexo I. Resumo da comunicação livre apresentada no V Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias (SPCV), Vale de Santarém, 2011 .....	123
Anexo II. Declaração de autorização para a reprodução parcial de dissertação (documento digitalizado) .....	125
Anexo III. Resultados da pesquisa de genes de RQMP e dos testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para as 237 estirpes de <i>E. coli</i> em estudo (colhidas em T0, T1 e T2) e interpretação dos valores de CIM segundo os critérios epidemiológicos (ECOFF) estabelecidos pelo EUCAST e segundo os critérios clínicos definidos pelo CLSI e pelo EUCAST .....	126

## Índice de figuras

Figura 1. Fluxo de genes de resistência aos antimicrobianos em <i>E. coli</i> na biosfera. Setas largas representam pressões selectivas intensas nos genes de resistência aos antimicrobianos; setas finas representam direcções significativas do fluxo de genes (Adaptado de: Hawkey & Jones, 2009) .....	12
Figura 2. Estrutura de algumas quinolonas (Adaptado de: Silva, 2002) .....	22
Figura 3. Cronograma da colheita de amostras (Adaptado, com consentimento, de: Centeno, 2010) .....	74

## Índice de tabelas

Tabela 1. Número e proporção de isolados clínicos invasivos de <i>E. coli</i> resistentes a aminopenicilinas, cefalosporinas de terceira geração, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e multirresistência, incluindo um intervalo de confiança de 95%, reportado por país em 2010 (Adaptado de: ECDC, 2011) .....	9
Tabela 2. Classificação das quinolonas (Adaptado de: Silva, 2002) .....	21
Tabela 3. Venda de FQs (toneladas de substância activa) e produção de carne em alguns Estados-Membros da UE (Adaptado de: EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007) .....	27
Tabela 4. Número de isolados (n) e proporção de resistência [R(%)] à CIP e AN em isolados de <i>E. coli</i> de bovinos em países europeus, em 2009 (Adaptado de: EFSA & ECDC, 2011) .....	31
Tabela 5. Proporção de resistência (%) às FQs e AN entre isolados de <i>E. coli</i> provenientes de porcos, frangos e bovinos .....	32
Tabela 6. Proporção de resistência (%) às FQs entre bactérias patogénicas de animais destinados ao consumo humano, 2004 (Adaptado de: Hendriksen <i>et al.</i> , 2008) .....	34
Tabela 7. Definições de critérios interpretativos clínicos e critérios epidemiológicos segundo o EUCAST (Adaptado de: <a href="http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=init">http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=init</a> , último acesso a 7 de Outubro de 2011).....	38
Tabela 8. Prevalência dos genes de RQMP ( <i>qnr</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> e <i>qepA</i> ) .....	46
Tabela 9. Efeitos de diferentes mecanismos de RQMP ( <i>qnrB4</i> , <i>qnrS1</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , e <i>qepA</i> ) nos valores de CIM e de MPC de CIP em <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> Thyphimurium na ausência e na presença de mutações cromossómicas que afectam a resistência às quinolonas ( <i>gyrA</i> e <i>parC</i> ) (Adaptado de: Cantón & Morosini, 2011). .....	57
Tabela 10. Nomenclatura das variantes (alelos) de <i>qnr</i> (Adaptado de: <a href="http://www.lahey.org/qnrStudies">http://www.lahey.org/qnrStudies</a> , último acesso a 24 de Janeiro de 2012) .....	61
Tabela 11. Actividade <i>in vitro</i> de quinolonas em <i>E. coli</i> susceptíveis (“wild type”) contendo genes de RQMP (Adaptado de: Strahilevitz <i>et al.</i> , 2009) .....	66
Tabela 12. Impacto das proteínas Qnr sobre a susceptibilidade às quinolonas (Adaptado de: Luzzaro, 2008) .....	67
Tabela 13. Impacto do gene codificante de bomba de efluxo QepA sobre a susceptibilidade às FQs hidrofílicas em <i>E. coli</i> (Adaptado de: Périchon <i>et al.</i> , 2007). .....	68
Tabela 14. Impacto do gene <i>aac(6')-Ib-cr</i> sobre a susceptibilidade às quinolonas em <i>E. coli</i> (Adaptado de: Robicsek <i>et al.</i> , 2006a) .....	70
Tabela 15. “Primers” utilizados .....	77
Tabela 16. Condições de PCR .....	78
Tabela 17. “Primers” usados na amplificação por PCR para sequenciação de <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i> .....	79
Tabela 18. Percentagem de resistência (%R), variação de CIMs e valores de CIM <sub>50</sub> e CIM <sub>90</sub> observadas para os antimicrobianos AN, CIP e LEV .....	81
Tabela 19. Frequência dos genes de RQMP .....	89
Tabela 20. Aplicação do modelo de regressão logística para a associação entre a exposição à ENR e a resistência aos antimicrobianos AN, CIP e LEV .....	93
Tabela 21. Associação entre a exposição à ENR e o aparecimento de genes de RQMP .....	94
Tabela 22. Associação entre isolados de <i>E. coli</i> positivos para genes de RQMP e a percentagem de resistência aos antimicrobianos AN, CIP e LEV .....	96

## Índice de tabelas (continuação)

Tabela 23. Percentagem de resistência (%R) observada para os antimicrobianos AN, CIP e LEV segundo a aplicação dos ECOFF estabelecidos pelo EUCAST e critérios interpretativos clínicos estabelecidos pelo EUCAST e pelo CLSI .....	99
Tabela 24. Comparação dos resultados obtidos pelo método de determinação das CIMs, de acordo com os ECOFF e os critérios interpretativos clínicos definidos pelo EUCAST, os critérios interpretativos clínicos estabelecidos pelo CLSI .....	100

## Lista de abreviaturas

*aac(6)-Ib-cr* gene que codifica a síntese da variante *cr* da enzima acetiltransferase de aminoglicosídeos  
ABC ATP “binding cassette”  
ADN ácido desoxirribonucleico  
ARN ácido ribonucleico  
AEEC “*Escherichia coli* “attaching and effacing”  
AMG aminoglicosídeos  
AMP aminopenicilinas  
AN ácido nalidíxico  
ARBAO-II “Antibiotic Resistance in Bacteria of Animal Origin II”  
ATCC “American Type Culture Collection”  
BSAC “British Society for Antimicrobial Chemotherapy”  
CA-SFM “Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie”  
CEF 3G cefalosporinas de terceira geração  
CIM concentração inibitória mínima  
CIP ciprofloxacina  
CLSI “Clinical and Laboratory Standards Institute”  
DIN “Deutsches Institut für Normung e.V.”  
DK Dinamarca  
EAEC *Escherichia coli* enteroagregativa  
EARS-Net “European Antimicrobial Resistance Surveillance Network”  
EARSS “European Antimicrobial Resistance Surveillance System”  
ECDC “European Center for Disease Prevention and Control”  
ECOFF critérios (valores de “cut-off”) epidemiológicos estabelecido pelo EUCAST  
EFSA “European Food Safety Authority”  
EHEC *Escherichia coli* enterohemorrágica  
EIEC *Escherichia coli* enteroinvasiva  
EMA “European Medicines Agency”  
ENR enrofloxacin  
EPEC *Escherichia coli* enteropatogénica  
ES Espanha  
ESBL  $\beta$ -lactamases de espectro alargado  
ETEC *Escherichia coli* enterotoxinogénica  
EUA Estados Unidos da América  
EUCAST “European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing”  
EURL-AR “European Union Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance”  
FAO Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação  
FDA “Food and Drug Administration”  
FMV Faculdade de Medicina Veterinária  
FI Finlândia  
FQs fluoroquinolonas  
FR França  
*gyrA* gene que codifica a síntese da subunidade A da girase  
*gyrB* gene que codifica a síntese da subunidade B da girase  
IC intervalo de confiança  
INFARMED Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.  
IT Itália  
LEV levofloxacina  
LRAB Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas  
MATE “multidrug and toxic compound extrusion”

MFS “major facilitator superfamily”  
MR multirresistência  
MRSA “methicillin-resistant” *Staphylococcus aureus*  
NCBI “National Center for Biotechnology Information”  
NL Países-Baixos  
NO Noruega  
NWT “non-wild type”  
OIE Organização Mundial da Saúde Animal  
OMS Organização Mundial de Saúde  
*oqxAB* gene que codifica a bomba de efluxo OqxAB  
*parC* gene que codifica a síntese da subunidade C da topoisomerase IV  
*parE* gene que codifica a síntese da subunidade E da topoisomerase IV  
pb pares de bases  
PCR “Polimerase Chain Reaction”  
PMQR “plasmid-mediated quinolone resistance”  
QC “quality control”  
*qepA* gene que codifica a bomba de efluxo QepA  
*qnr* gene que codifica a síntese da proteína Qnr  
QRDR “quinolone resistance-determining regions”  
Red VAV “Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencias a Antibióticos”  
RND “resistance-nodulation division”  
RQMP resistência às quinolomas mediada por plasmídeos  
SE Suécia  
SLT toxina “Shiga-like”  
STEC *Escherichia coli* produtora de shiga-toxina  
TBE Tris-borato-EDTA  
UE União Europeia  
UFC unidades formadoras de colónias  
UTL Universidade Técnica de Lisboa  
VTEC *Escherichia coli* verotoxinogénica  
WHA “World Health Assembly”  
WT “wild type”



## I – INTRODUÇÃO

A introdução de antimicrobianos na prática clínica na década de 40 revolucionou a capacidade do Homem de tratar as doenças infecciosas, tendo sido amplamente aclamada como um dos mais importantes avanços da medicina (World Health Organization [WHO] & Alliance for the Prudent Use of Antibiotics [APUA], 2001; Laxminarayan, 2003). Não obstante terem contribuído dramaticamente para o declínio da morbidade e da mortalidade, o uso generalizado e, por vezes, indiscriminado destes agentes reflectiu-se igualmente na emergência, selecção e disseminação global de bactérias resistentes, de tal modo que a resistência aos antimicrobianos se assume, presentemente, como uma das maiores ameaças para a Saúde Pública (Direcção Geral de Saúde [DGS], 2010; WHO, 2011).

O flagelo da resistência aos antimicrobianos, particularmente a multirresistência em estirpes bacterianas largamente disseminadas, é um problema relevante tanto em medicina humana como em medicina animal (Quinn & Markey, 2003; Hawkey & Jones, 2009; European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC], European Food Safety Authority [EFSA], European Medicines Agency [EMA] & Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks [SCENIHR], 2009). Dados recentes referentes à resistência aos antimicrobianos reportada ao “European Antimicrobial Resistance Surveillance Network” (EARS-Net) por 28 países, evidenciam um alarmante declínio da susceptibilidade antimicrobiana em importantes microrganismos patogénicos isolados de humanos, tais como *Escherichia coli*, e uma preocupante emergência de resistência aos carbapenemos em *Klebsiella pneumoniae* na Europa (ECDC, 2011). Também em matéria de resistência aos antimicrobianos em isolados provenientes de animais e alimentos destinados ao consumo humano, a “European Food Safety Authority” (EFSA) e o “European Center for Disease Prevention and Control” (ECDC) reúnem no seu último relatório dados reportados pelos diferentes Estados-Membros da União Europeia (UE), em 2009, demonstrando que a resistência aos antimicrobianos é frequentemente encontrada em estirpes de *Salmonella*, *Campylobacter* e bactérias indicadoras, tais como *E. coli* e *Enterococcus* (EFSA & ECDC, 2011).

A transferibilidade de bactérias resistentes ou de determinantes móveis de resistência entre animais e humanos por via da alimentação, ambiente ou contacto directo tem sido sugerida em vários estudos (Fey *et al.*, 2000; Manian, 2003; Ishida *et al.*, 2010). Em consequência, autoridades internacionais como a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), reconhecendo que a resistência verificada em bactérias zoonóticas pode ser consequência do uso de antimicrobianos em animais de produção de alimentos, alertam para a



possibilidade de estas poderem ser transmitidas ao Homem (ECDC *et al.*, 2009). Daí, poderão resultar infecções humanas multirresistentes e, em última análise, insucesso na terapêutica, doenças mais severas e duradouras, aumento das taxas de hospitalização, maior número de mortes e mais custos para a sociedade (WHO, 2011). Por esta razão, e dada a natureza multifactorial deste fenómeno, recomenda-se que também os aspectos de segurança alimentar sejam tratados como parte integrante da resposta ao desafio do combate à resistência (WHO, 1998b).

Apesar da natureza complexa da resistência aos antimicrobianos, a exposição a estes fármacos é considerada o factor mais importante na origem e disseminação da resistência. Por contraste, quando a utilização de antimicrobianos é reduzida ou abolida, pode ocorrer um decréscimo na prevalência de isolados resistentes (Cantón & Morosini, 2011). A pressão selectiva imposta pela exposição de uma população bacteriana a um dado antimicrobiano está, assim, associada à resistência observada para esse fármaco (Alessiani *et al.*, 2009). Desde modo, bactérias comensais como *E. coli*, comumente isoladas de fezes de animais, constituem reservatórios de genes de resistência que podem ser disseminados horizontalmente entre si e/ou para bactérias patogénicas através da cadeia alimentar, pelo que a monitorização da resistência nestes organismos indicadores comensais permite, além de determinar a taxa de resistência naquela população, avaliar o efeito dos padrões de uso de antimicrobianos num determinado país e numa determinada espécie animal (EFSA, 2008; EFSA & ECDC, 2011).

Segundo dados reportados ao ECDC, Portugal figura entre os países da Europa com elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos em diferentes bactérias potencialmente causadoras de infecções graves ao Homem, como em *E. coli* patogénica (<http://www.ecdc.eu.int>, último acesso em 20 de Dezembro de 2011). Esta crescente diminuição da susceptibilidade aos antimicrobianos que se tem reportado nos últimos anos, não apenas em Portugal mas, em geral, por toda a Europa, é particularmente alarmante em relação às fluoroquinolonas (FQs) (ECDC, 2011), uma das classes de antimicrobianos mais prescritas em todo o mundo (Morgan-Linnell, Boyd, Steffen & Zechiedrich, 2009; Xiong, Bromley, Oelschlaeger, Woolfson & Spencer, 2011) e classificada pela OMS como criticamente importante para a medicina humana (WHO, 2009). Desde a descoberta da primeira quinolona, o ácido nalidíxico (AN), nos anos 60, que esta classe de antimicrobianos tem evoluído tremendamente, representando hoje em dia agentes antimicrobianos de extrema importância no tratamento de infecções bacterianas severas e invasivas, tanto em medicina humana como em medicina veterinária, dado o seu amplo espectro de actividade (Ball, 2000). Todavia, imediatamente após a sua introdução na prática clínica para o tratamento de infecções do trato urinário causadas por *E. coli*, observou-se o aparecimento de bactérias resistentes às

quinolonas (Engberg, Aarestrup, Smidt, Nachamkin & Taylor, 2001; Ito, Gales, Tognim, Munerato & Costa, 2008).

Até há pouco tempo, assumia-se que a resistência às quinolonas era consequência de mutações cromossômicas em regiões específicas das ácido desoxirribonucleico (ADN) topoisomerasas e/ou por aquisição ou alteração da regulação de sistemas de efluxo. Contudo, a situação mudou radicalmente com a descoberta de uma variedade de determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (RQMP) (Xiong *et al.*, 2011). O primeiro gene de RQMP, descrito por Martínez-Martínez e colaboradores (1998), foi designado de *qnr* (*qnr* para resistência às quinolonas, do inglês *quinolone resistance*). Até à data, cinco famílias de genes *qnr* são conhecidas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* e *qnrD*) e dois outros determinantes de RQMP foram descritos, usando dois mecanismos distintos dos característicos das proteínas Qnr (Rodríguez-Martínez, Cano, Velasco, Martínez-Martínez & Pascual, 2011b). O primeiro é o gene *aac(6)'-Ib-cr*, que codifica uma variante da acetiltransferase de aminoglicosídeos (Robicsek *et al.*, 2006a), ao qual se seguiu a descoberta de *qepA*, um gene codificante de uma bomba de efluxo pertencente à *Major Facilitator Superfamily*, MFS (Yamane *et al.*, 2007). Os genes de RQMP, particularmente reconhecidos em *Enterobacteriaceae* (Gay *et al.*, 2006; Sjölund-Karlsson *et al.*, 2009), conferem um baixo nível de resistência às quinolonas; no entanto, e apesar de aparentemente pouco frequentes, a sua relevância clínica deriva da sua capacidade de poderem, por um lado, suplementar mecanismos de resistência pré-existentes devido a mutações cromossômicas nas regiões-alvo das quinolonas, por exemplo, e, por outro lado, permitir a selecção de mutantes de elevada resistência a concentrações de quinolonas (doses terapêuticas) que seriam letais na sua ausência (Wang, Sahm, Jacoby, Zhang & Hooper, 2004b; Jacoby, 2005; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011b).

Níveis elevados de resistência às FQs têm sido observados na Europa em bactérias zoonóticas e em indicadores comensais, nomeadamente em *E. coli*, o que representa um facto preocupante, tanto no que concerne a saúde humana como a saúde animal, uma vez que a *E. coli* proveniente de animais de exploração e da alimentação tem potencial para distribuir genes de resistência aos antimicrobianos a bactérias patogénicas e comensais, humanas e animais, através de mecanismos de transferência variáveis (EFSA & ECDC, 2011). Acresce que o principal factor que contribui para a ocorrência de resistência a antimicrobianos em bactérias indicadoras é pressão selectiva exercida pelo uso de antimicrobianos em diferentes populações de animais produtores de alimentos. No entanto, e em contraste com a imensa quantidade de informação disponível acerca de mecanismos e genes responsáveis pela resistência, descrições *in vivo* a respeito da emergência de bactérias resistentes sob condições de pressão selectiva de antimicrobianos são ainda escassas (Cantón & Morosini, 2011).

## 1. *Escherichia coli*

*E. coli* é uma bactéria pertencente à família das *Enterobacteriaceae* e é um habitante natural do intestino dos mamíferos (Quinn, Carter, Markey & Carter, 1994). Desde 1885, quando foi isolada pela primeira vez a partir de fezes de crianças e descrita pelo bacteriologista alemão Theodor Escherich, que a atenção da ciência se tem concentrado neste microrganismo. Mais tarde, no início da década de 40, estirpes de *E. coli* foram identificadas pela primeira vez como causa de gastroenterite por investigadores ingleses que procuravam determinar a causa de diarreia em crianças (Adams & Moss, 2000).

As *Enterobacteriaceae* têm uma distribuição ubiqüitária e são Gram-negativas, anaeróbias facultativas, fermentadoras de glicose e outros açúcares. São oxidase-negativas, catalase-positivas, não formadoras de esporos, crescem bem em agar MacConkey e são, na sua maioria, móveis. Reduzem nitratos em nitritos e algumas bactérias, como *E. coli*, fermentam a lactose. Esta família contém mais de 28 géneros e de 80 espécies (Quinn, Markey, Carter, Donnelly & Leonard, 2002; Quinn & Markey, 2003; Manning, 2005).

*E. coli* pode viver no organismo humano sem causar doença, numa relação denominada de comensalismo, em que a bactéria obtém alimento e benefício do hospedeiro sem causar dano (Manning, 2005). É excretada nas fezes e pode sobreviver nas partículas fecais, pó e água durante semanas ou meses (Quinn *et al.*, 1994). Esta bactéria apresenta características de crescimento e sobrevivência muito similares aos restantes organismos entéricos. É um típico mesófilo, crescendo de 7-10°C até 50°C, mas com um crescimento óptimo a 37°C. Sobrevive a temperaturas de congelação na ordem dos -20°C e sobrevive à refrigeração, conseguindo crescer a uma temperatura mínima de 6,5°C; existem, contudo, relatos de algumas estirpes de *E. coli* enterotoxinogénica (ETEC) a crescer a temperaturas de 4°C. Não demonstra particular resistência à temperatura, com um valor D a 60°C na ordem de 0,1 minutos. É geralmente móvel, possuindo flagelos peritricos e, frequentemente, fímbrias. Este fermentador de lactose produz colónias cor-de-rosa em agar MacConkey. As estirpes de *E. coli* patogénicas bem como as não-patogénicas apresentam iguais níveis de resistência a meios extremamente ácidos. A este propósito, a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em alimentos com baixo pH, tais como a maionese, sumo de maçã, sumo de laranja, salsichas fermentadas e lácteos tem sido documentada (Adams & Moss, 2000; Quinn *et al.*, 2002; Garcia & Heredia, 2009).

Até à data, um extenso número de serótipos de *E. coli* foi descrito: 160 antigénios tipo O, 56 tipo H, 80 tipos K/Vi (Hubálek & Rudolf, 2011). As estirpes patogénicas ao homem são rotuladas como: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxinogénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) ou *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* “attaching and effacing” (AEEC). Usualmente, formam toxinas, incluindo a

verotoxina (VTEC, *E. coli* verotoxinogénica, como na O157) ou toxinas “Shiga-like” SLT-1 e SLT-2 (STEC, *E. coli* produtora de shiga-toxina). Os antígenos mais frequentes são o O157:H7, seguido de O111 e O26 (Quinn *et al.*, 1994; Hubálek & Rudolf, 2011). Importa, no entanto, referir o recente surto de STEC O104:H4 ocorrido em Maio de 2011, que se iniciou na Alemanha e se estendeu a outros países da UE e outros. Até à data, assume-se como o maior surto de síndrome hemolítico-urémico causado por STEC alguma vez reportado, sendo responsável por 48 mortes na Alemanha e uma na Suécia; no total, o número de casos notificados na UE, Noruega e Suíça foi de 4 178 (EFSA, 2011). Trata-se de um serótipo raro em humanos; para o período de 2004-2009, na UE, apenas dois casos de STEC O104 reportados se confirmaram ser do serótipo O104:H4 (Finlândia, em 2010, e França, em 2004) (ECDC & EFSA, 2011). Um lote específico de sementes de feno-grego importado do Egipto e utilizado para produzir rebentos foi identificado como a provável fonte do surto de *E. coli* O104:H4 (EFSA, 2011).

### **1.1. Resistência aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* e sua relação com a segurança alimentar**

Em 1940, a introdução de antibióticos no tratamento de doenças infecciosas revolucionou a medicina (WHO, 2011). A resistência aos antimicrobianos é, no entanto, tão antiga quanto os mesmos, desde logo protegendo os organismos produtores de antibióticos dos seus próprios produtos (Phillips *et al.*, 2004). A par das inequívocas vantagens no tratamento de indivíduos com doenças bacterianas e do impacto significativo na redução da morbilidade e da mortalidade, a utilização ampla e, muitas vezes, inapropriada dos antimicrobianos originou a emergência, selecção e disseminação de bactérias resistentes e multirresistentes, resultando na perda da eficácia da terapêutica anti-infecciosa e na escassez de opções nesta importante classe de fármacos (DGS, 2010; WHO, 2011). Actualmente, mais de 70 anos depois, a resistência aos antimicrobianos tornou-se comum, constituindo uma das maiores ameaças para a Saúde Pública global que requer atenção e actuação urgentes (WHO & APUA, 2001; Acar & Rostel, 2003; Ramalinho, Cabrita, Ribeirinho & Vieira, 2010; WHO, 2011).

Qualquer utilização dos antimicrobianos, quer seja em humanos, animais, plantas ou num processo alimentar, pode promover o desenvolvimento de resistência em bactérias (World Organisation for Animal Health [OIE], 2003; WHO, 2011). A origem da resistência antimicrobiana em humanos é multifactorial, contudo, vários estudos têm evidenciado que o uso inadequado de antimicrobianos, a automedicação ou prescrição médica excessiva constituem um importante factor causal (Ramalinho *et al.*, 2010). Neste âmbito, um estudo de 2002 do INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.)

evidenciou a utilização inapropriada de antimicrobianos nos Cuidados Primários de Saúde em Portugal, revelando uma elevada frequência de utilização de antibióticos em situações clínicas em que o seu recurso seria discutível (Caldeira *et al.*, 2002). Exemplos concretos do uso inadequado de antimicrobianos em humanos incluem a emergência de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA, “methicillin-resistant” *Staphylococcus aureus*), *Pneumococcus* resistentes à penicilina, *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente, microrganismos patogénicos nosocomiais multirresistentes, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi* multirresistente e resistente às FQs. Todavia, também parece evidente que algumas bactérias resistentes, bem como os mecanismos de resistência, tiveram origem no uso de antimicrobianos em medicina veterinária (European Medicines Agency [EMA]/Committee for Medicinal Products for Veterinary Use[CVMP]/342/99, 1999; Nicholls *et al.*, 2003). Desta forma, não obstante a escassez de conhecimento acerca das verdadeiras causas da resistência aos antimicrobianos, em humanos e em animais, a utilização destes fármacos em animais de exploração é tida como um contributo significativo para este fenómeno. A insuficiência de dados científicos relevantes neste âmbito subentende, pois, a utilização do princípio da precaução, apesar de as causas subjacentes aos riscos para a Saúde Pública não terem sido ainda devidamente identificadas (OIE, 2003).

Sérias preocupações acerca da resistência antimicrobiana em bactérias provenientes de ambiente hospitalar, comunidade e organismos patogénicos de origem alimentar têm vindo a aumentar ao longo dos anos. Neste âmbito, autoridades como a OMS, FAO e OIE consideram a resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas uma ameaça para a Saúde Pública e reconhecem que a resistência observada actualmente pode ser consequência do uso de antimicrobianos em animais de produção, considerando a possibilidade da sua transmissão a humanos (ECDC *et al.*, 2009). Relembre-se que já há muito que estas autoridades internacionais adverteram para a importância desta ameaça, incluindo a sua relação com a segurança alimentar, resultando em compromissos e orientações internacionais para lidar com o problema, salientando-se, a este propósito, a “World Health Assembly” 51.17 da OMS (WHO, 1998b).

A OMS considera que a utilização abusiva de antimicrobianos em animais tem efeitos importantes na Saúde Pública, designadamente na promoção da emergência de bactérias resistentes e genes de resistência que podem ser transmitidos ao Homem através do consumo de alimentos, contacto directo e outros mecanismos ambientais (WHO, 2011). A este respeito, vários autores sugerem que uma das principais vias de transferência de resistência de animais e/ou plantas para humanos é a alimentação (Fey *et al.*, 2000; Manian, 2003; Ishida *et al.*, 2010). Os produtos alimentares de origem animal são frequentemente contaminados por

bactérias tornando-se, por conseguinte, numa das principais vias de transmissão de bactérias resistentes e genes de resistência provenientes de animais destinados à produção de alimentos para o consumo humano. O contacto directo com animais ou o ambiente em que estes estão inseridos pode, contudo, ser significativo, dependendo do tipo de bactéria (WHO, 2011). Em suma, a resistência aos antimicrobianos é, inequivocamente, um desafio da segurança alimentar.

A resistência aos antimicrobianos pode ser definida como a capacidade de sobrevivência das bactérias à exposição a uma determinada concentração de uma substância antimicrobiana, apresentando múltiplas definições, de acordo com a disciplina científica e os objectivos em causa: (i) segundo a definição clínica, a bactéria sobrevive a um tratamento apropriado com um antimicrobiano; (ii) segundo a definição farmacológica, a bactéria sobrevive a um intervalo de concentrações que expressam a quantidade de um antimicrobiano presente nos diferentes compartimentos do corpo quando o fármaco é administrado à dose recomendada; (iii) segundo a definição microbiológica e molecular, a bactéria dispõe de um mecanismo que lhe permite tolerar uma concentração inibitória mínima (CIM) superior à tolerada pela bactéria do tipo selvagem (do inglês “wild type”); (iv) por último, a definição epidemiológica, que considera qualquer grupo de estirpes bacterianas que se distinga da distribuição normal (ou Gaussiana) da CIM de um antimicrobiano (Acar & Rostel, 2003). De acrescentar que o valor da CIM corresponde à maior diluição de um antimicrobiano (concentração mínima) requerida para inibir o crescimento de uma bactéria (Quinn *et al.*, 1994).

Em matéria de resistência, a situação nas *Enterobacteriaceae* é particularmente preocupante, em especial devido à observação da acumulação de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBL) em *E. coli* e *Klebsiella* spp. e ao aumento generalizado de microrganismos resistentes às FQs (Livermore, 2009). Os dados mais recentes publicados pelo ECDC (2011) evidenciam um preocupante declínio da susceptibilidade aos antimicrobianos em organismos patogénicos relevantes, como em *E. coli*, bem como a alarmante emergência de resistência aos carbapenemos em *K. pneumoniae*. Desta forma, as *Enterobacteriaceae*, em particular *E. coli*, estão entre as bactérias mais profundamente estudadas, numa tentativa de esclarecer o fenómeno por detrás da resistência aos antimicrobianos, especialmente em medicina humana. *E. coli* tem sido sobretudo utilizada como um microrganismo indicador, dada a sua ubiquidade e elevada propensão para a acumulação e transferência horizontal de genes de resistência (Alessiani *et al.*, 2009).

A resistência aos antimicrobianos reportada ao EARS-Net por 28 países, em 2010, e a análise da tendência dos últimos quatro anos (2007 a 2010) evidencia um crescente aumento da resistência aos antimicrobianos em isolados clínicos invasivos de *E. coli* por toda a Europa.

Em 2010, a resistência mais elevada nestes isolados registou-se para as aminopenicilinas, com uma prevalência superior a 83%. Apesar do elevado nível de resistência já existente, o aumento verifica-se mesmo em países que reportam taxas de resistência inferiores a 50%. No que concerne a percentagem de *E. coli* resistente às cefalosporinas de terceira geração, verificou-se um aumento significativo nos últimos quatro anos em metade os países reportados. Esta resistência está directamente associada às elevadas proporções (85 a 100%) de isolados de *E. coli* positivos para ESBL reportada entre os isolados resistentes às cefalosporinas (ECDC, 2011). Já anteriormente, um relatório do ECDC (2010b), referente aos dados de 26 países reportados ao “European Antimicrobial Resistance Surveillance System” (EARSS), havia evidenciado tendência semelhante na ocorrência de resistência a aminopenicilinas, FQs, cefalosporinas de terceira geração e aminoglicosídeos neste tipo de isolados de *E. coli*.

Portugal é um dos países europeus que regista elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos em diferentes bactérias potencialmente causadoras de infecções graves no homem (<http://www.ecdc.eu.int>, último acesso em 20 de Dezembro de 2011). No que se refere à *E. coli*, tal como detalhado na Tabela 1, dos 53 463 isolados reportados pelos 28 países europeus, em 2010, 28 961 (54,2%) apresentaram resistência às aminopenicilinas, com Portugal a reportar 54,3%. A resistência às cefalosporinas de terceira geração foi observada em 8,5% (4 705 de 55 446) do total dos isolados reportados; em Portugal, observou-se uma resistência de 6,6 %, sendo o único país, a par da Áustria, onde se observou uma tendência de decréscimo na resistência a estes agentes nos últimos quatro anos. 8,7% (4 911 de 56 237) dos isolados de *E. coli* reportados apresentaram resistência aos aminoglicosídeos. Portugal registou também um decréscimo na resistência aos aminoglicosídeos nos últimos quatro anos, juntamente com Áustria e Roménia, reportando uma resistência de 9,5% em 2010. Em matéria de resistência às FQs 20,7% (11 295 de 54 483) dos isolados reportados foram resistentes; Portugal reportou uma taxa de resistência de 23,8%. A maioria dos países (16 de 28) reportou proporções de resistência superiores a 20%; 9 países entre 10% e 20%, enquanto três países reportaram menos de 10% (Estónia, Noruega e Finlândia). Relativamente à tendência observada para o período 2007-2010, calculada para os 28 países, verificou-se um aumento significativo em oito países (ECDC, 2011).

Quanto a resistência combinada, em 2010, verificou-se que 4% dos isolados de *E. coli* reportados pelos 28 países foram resistentes às quatro classes de antimicrobianos investigadas (aminopenicilinas, aminoglicosídeos, FQs e cefalosporinas de terceira geração). A multirresistência, definida como a resistência simultânea a cefalosporinas de terceira geração,

FQs e aminoglicosídeos, foi de 3,2%. Nos quatro anos analisados (2007-2010), apenas a Áustria revelou uma tendência de redução da taxa de multirresistência (ECDC, 2011).

Tabela 1. Número e proporção de isolados clínicos invasivos de *E. coli* resistentes a aminopenicilinas, cefalosporinas de terceira geração, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e multirresistência, incluindo um intervalo de confiança de 95%, reportado por país em 2010 (Adaptado de: ECDC, 2011).

País	AMP <sup>a</sup>		FQs <sup>b</sup>		CEF 3G <sup>c</sup>		AMG <sup>d</sup>		MR <sup>e</sup>	
	N	R (%)	N	R (%)	N	R (%)	N	R (%)	N	R (%)
<b>Áustria</b>	2928	50,6	2925	20,9	2922	7,3	2915	6,5	2889	2,0
<b>Bélgica</b>	1957	56,9	1782	21,5	1952	5,2	1584	5,6	1562	1,0
<b>Bulgária</b>	142	71,8	151	33,1	153	24,8	152	15,8	150	8,0
<b>Chipre</b>	137	62,0	138	42,8	139	20,1	138	15,9	138	8,7
<b>República Checa</b>	2481	59,3	2481	22,7	2482	10,4	2449	8,5	2447	3,4
<b>Dinamarca</b>	3412	45,8	3166	13,7	2408	7,6	3412	5,8	2403	2,4
<b>Estónia</b>	259	37,5	263	8,4	309	5,5	269	5,6	255	2,0
<b>Finlândia</b>	2165	33,8	2550	9,2	2509	3,7	2356	3,8	2315	1,9
<b>França</b>	9017	54,6	9007	17,5	9022	7,2	9025	7,2	9000	2,9
<b>Alemanha</b>	3022	54,4	3017	24,8	3015	8,4	3021	8,7	3009	3,6
<b>Grécia</b>	1474	52,3	1536	24,4	1507	14,2	1530	16,5	1490	9,5
<b>Hungria</b>	1328	65,3	1367	36,6	1383	19,5	1384	21,2	1366	15,4
<b>Islândia</b>	100	46,0	95	10,5	104	3,8	104	2,9	95	1,1
<b>Irlanda</b>	2121	66,8	2117	22,9	2119	7,7	2118	9,9	2112	3,0
<b>Itália</b>	2288	64,2	2436	39,2	2419	21,0	2609	15,5	2395	10,5
<b>Letónia</b>	98	50,0	97	14,4	98	12,2	98	11,2	97	6,2
<b>Lituânia</b>	329	55,9	333	13,5	333	8,7	331	14,5	331	5,4



Tabela 1. (continuação).

<b>Luxemburgo</b>	47	57,4	49	26,5	48	4,2	52	19,2	47	2,1
<b>Malta</b>	192	44,3	192	34,4	192	15,6	192	22,4	192	13,5
<b>Países Baixos</b>	3404	47,6	3409	13,6	3387	5,1	3408	7,2	3371	1,8
<b>Noruega</b>	2268	38,2	2267	8,7	2275	3,7	2246	4,3	2236	1,4
<b>Polónia</b>	616	60,2	691	25,8	744	7,5	704	9,1	661	3,2
<b>Portugal</b>	862	54,3	808	23,8	814	6,6	865	9,5	785	3,9
<b>Roménia</b>	23	82,6	33	24,2	34	20,6	33	12,1	32	6,3
<b>Eslovénia</b>	941	48,0	952	19,3	952	6,6	952	8,8	952	3,8
<b>Espanha</b>	5696	64,5	5696	32,8	5696	12,1	5696	14,2	5696	5,5
<b>Suécia</b>	1727	34,7	2130	10,8	3883	2,6	3665	2,7	1925	0,9
<b>Reino Unido</b>	4429	62,3	4815	17,3	4547	9,0	4329	8,3	4192	4,0

<sup>a</sup>Aminopenicilinas, AMP.

<sup>b</sup>Fluoroquinolonas, FQs.

<sup>c</sup>Cefalosporinas de terceira geração, CEF 3G.

<sup>d</sup>Aminoglicosídeos, AMG.

<sup>e</sup>Multirresistência, MR, definida como a resistência a cefalosporinas de terceira geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos.

A informação reportada ao EARS-Net evidencia ainda que a resistência aos antimicrobianos na Europa descreve uma ampla variação dependendo do tipo de bactéria patogénica, agente antimicrobiano e região geográfica. Em geral, baixas proporções são registadas no Norte e elevadas proporções são registadas no Sul da Europa, reflectindo, provavelmente, as diferenças nas práticas de controlo de infecções e na legislação referente à prescrição de antimicrobianos (ECDC, 2011).

Um estudo de Gagliotti e colaboradores (2011), baseado nos dados recolhidos pelo EARS-Net e o antigo EARSS, descreve as tendências nos padrões de susceptibilidade antimicrobiana e ocorrência de infecções invasivas causadas por *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (principais causas de bacteriémia em humanos) entre 2002 e 2009. Em consonância com o descrito recentemente pelo ECDC, no relatório de 2011, este trabalho refere que a resistência aos antimicrobianos em *E. coli* causadora de bacteriémia está a aumentar de forma alarmante na Europa. A resistência combinada em *E. coli* (definida como a resistência a dois, três ou quatro classe de antimicrobianos reportados ao EARS-Net) registou um aumento significativo,

enquanto a resistência única diminuiu de 37,1%, em 2002, para 35,8%, em 2009. A proporção de isolados de *E. coli* susceptíveis às quatro classes de antimicrobianos reportados reduziu de 51,4%, em 2002, para 41,7%, em 2009. Esta tendência sugere que entre a população de isolados resistentes, houve um crescimento relativo contínuo de resistência combinada, possivelmente causada pela adição de traços de resistência a estirpes que eram já resistentes a pelo menos uma das classes de antimicrobianos consideradas neste estudo. Tal tendência pode ser explicada pela disseminação de plasmídeos multirresistentes que também contêm genes para a produção de  $\beta$ -lactamases de largo espectro (Gagliotti *et al.*, 2011).

Considerando o crescente aumento das taxas de resistência bacteriana à escala global, bem como a natureza complexa e, ainda, incompreendida da resistência aos antimicrobianos, os aspectos da segurança alimentar devem ser tratados como parte integrante da resposta a este desafio (WHO, 2011). Neste contexto, as estirpes resistentes aos antimicrobianos relevantes incluem a *Salmonella* multirresistente, *Campylobacter* resistente às FQs ou aos macrólidos, *Enterococcus* resistente aos glicopéptidos ou às estreptograminas e *E. coli* multirresistente. Em todos os casos, a hipótese colocada é a de que a cadeia alimentar constitui o principal meio de transmissão; esta hipótese, apesar de intuitivamente atractiva, e não havendo dúvidas da existência de um perigo, não significa que esteja correcta ou que exista significância universal. Aliás, deste ponto de vista, o próprio Homem, tal como outros animais, pode constituir uma fonte de bactérias resistentes subsequentemente isoladas de animais de produção, uma vez que as bactérias comensais e patogénicas (incluindo estirpes resistentes) podem atingir o ambiente através de outras vias, como por exemplo, os esgotos (Phillips *et al.*, 2004). Neste contexto, a Figura 1 procura ilustrar o fluxo de genes de resistência aos antimicrobianos que se pode observar na biosfera, em relação à bactéria *E. coli*.

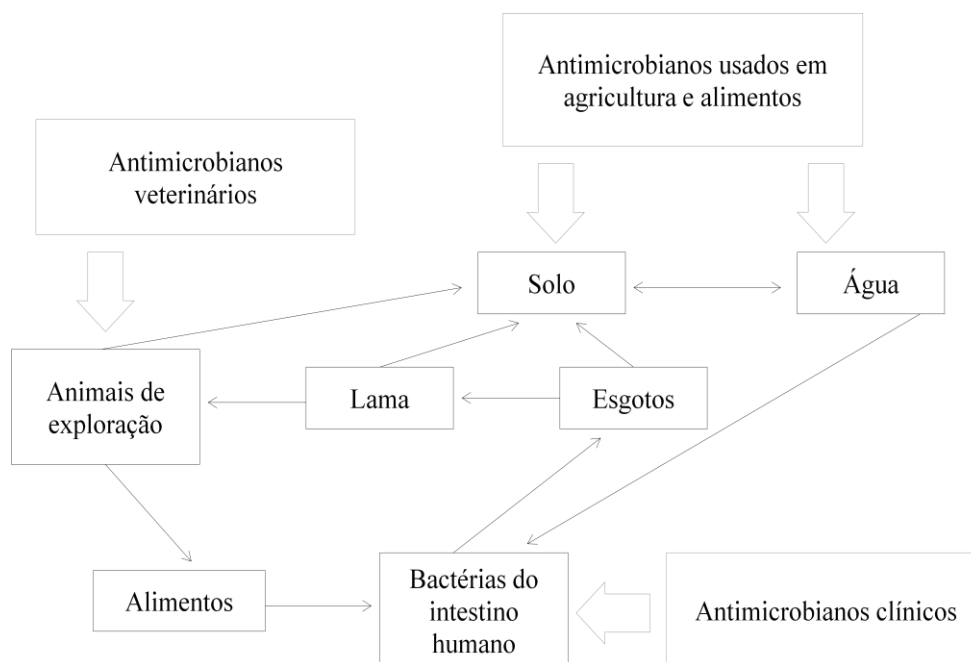


Figura 1. Fluxo de genes de resistência aos antimicrobianos em *E. coli* na biosfera. Setas largas representam pressões selectivas intensas nos genes de resistência aos antimicrobianos; setas finas representam direcções significativas do fluxo de genes (Adaptado de: Hawkey & Jones, 2009).

Em geral, os genes e os mecanismos de resistência podem ser transferidos ao Homem por (i) transferência de bactérias zoonóticas resistentes a antimicrobianos, (ii) transferência de bactérias comensais resistentes a antimicrobianos, e (iii) um mecanismo frequentemente referido de “hit and run”, em que uma bactéria patogénica ou comensal de origem animal resistente a antimicrobianos transfere os genes de resistência a bactérias humanas durante a sua passagem pelo intestino. As questões críticas e ainda sem resposta são, pois, em que medida a resistência presente em bactérias de origem animal é relevante para a resistência verificada em medicina humana, a quantificação do potencial de transferência de resistência e a implicação na eventual falha terapêutica em humanos (EMEA/CVMP/342/99, 1999). A inexistência de evidências sólidas neste âmbito aponta para a necessidade de realização de estudos epidemiológicos convencionais e moleculares adequados (Phillips *et al.*, 2004). Por exemplo, é sugerido que os animais de produção de alimentos destinados ao consumo humano constituem uma fonte de estirpes de *E. coli* uropatogénica, no entanto, nenhuma identidade exacta de genótipo de isolados bacterianos animais e humanos foi, até então, demonstrada (Ajiboye *et al.*, 2009). Importa referir, ainda, o alarme inerente às consequências da transferência horizontal de genes de resistência. Estirpes de *E. coli* com origem nos animais ou na água que contaminem alimentos podem armazenar genes de resistência que podem ser transferidos para bactérias humanas comensais e/ou patogénicas durante a passagem pelo

intestino (WHO, 2011), fenómeno já observado em alguns estudos que demonstraram a transferência de genes de resistência aos antimicrobianos no intestino humano (Smith, Harris, Johnson, Silbergeld & Morris, 2002; Trobos, Lester, Olsen, Frimodt-Møller & Hammerum, 2009). Se uma estirpe de *E. coli* resistente emerge num ser humano e causa doença ou transfere os seus genes de resistência a bactérias patogénicas, falha terapêutica relacionada com duração prolongada da doença e/ou maior severidade podem ocorrer (WHO, 2011). Acresce que este mecanismo pode promover em simultâneo a disseminação da resistência a várias classes de antimicrobianos não relacionadas, particularmente se os genes de resistência estiverem co-localizados no elemento genético transmissível horizontalmente (WHO, 2011).

A explosão quantitativa de resistência proveniente de eventos celulares individuais (mutação e/ou transferência de genes) para desafios de saúde globais tem se baseado fundamentalmente em dois aspectos: a) pressão selectiva exercida pelos antimicrobianos; b) disseminação demográfica e geográfica. Por exemplo, o uso de enrofloxacina (ENR) em animais destinados à produção de alimentos resultou no desenvolvimento de resistência em *Salmonella* e *Campylobacter* à CIP, uma FQ usada no tratamento de humanos. Do mesmo modo, *E. coli* resistente pode disseminar-se de animais para as pessoas através da cadeia alimentar. Um risco indirecto surge quando genes de resistência se movem de uma bactéria resistente, como as espécies de *E. coli* e *Enterococcus*, proveniente de animais para uma bactéria patogénica humana. Os genes de resistência podem imediatamente ser transferidos entre bactérias de animais terrestres, peixes e pessoas; acresce que, tais transferências podem ter lugar em diferentes ambientes, tais como cozinhas, explorações e fontes de água (WHO, 2011).

Várias estratégias têm sido recomendadas para reduzir os impactos na saúde humana derivados do uso não-humano de antimicrobianos, sendo o mais importante o aumento da vigilância da resistência e do uso de antimicrobianos. Pretende-se, assim, implementar uma boa regulamentação para controlar o seu uso em animais, à luz dos padrões de resistência, e tomar medidas que assegurem a sua utilização prudente, especialmente através da redução da exposição dos animais a baixas doses de antimicrobianos por longos períodos de tempo (uso de promotores de crescimento e profiláticos) uma vez que este uso pode seleccionar resistência aos fármacos usados em medicina humana (McEwen, 2001). Neste sentido, lembre-se que, de acordo com a Directiva 2003/99/CE sobre a monitorização de zoonoses e agentes zoonóticos, os Estados-Membros são obrigados a monitorizar e reportar resistência antimicrobiana em isolados de *Salmonella* e *Campylobacter* de animais e alimentos. Porém, a notificação da resistência antimicrobiana dos organismos indicadores *E. coli* e *Enterococcus* permanece voluntária (EFSA & ECDC, 2011).

## 1.2. Pressão selectiva

A pressão selectiva imposta pela exposição aos antimicrobianos constitui um dos aspectos mais relevantes na origem da crescente resistência a estes fármacos por parte das bactérias, uma vez que a resistência se desenvolve como uma resposta à pressão exercida (WHO, 2011). Para tal, duas condições são tidas como necessárias: a substância selectora tem que estar em contacto prolongado com a população bacteriana e o selector terá que estar a uma concentração que possibilite a sobrevivência da bactéria, o que é comumente referido como concentração sub-inibitória (Acar & Rostel, 2003).

A intensa pressão selectiva existente, não apenas em ambiente clínico, mas também em aquacultura e agricultura, pode favorecer a persistência de populações bacterianas resistentes bem como a transmissão dos seus elementos de resistência (Hernández, Sánchez & Martínez, 2011). O uso de antimicrobianos em animais de companhia e em animais de produção, quer para fins profiláticos, terapêuticos ou como promotores de crescimento, causam pressão selectiva nestas bactérias de origem animal (Fàbrega, Sánchez-Céspedes, Soto & Vila, 2008). Ao longo do tempo, a selecção Darwiniana favorece os organismos resistentes face aos organismos susceptíveis ao efeito do agente, tornando-o ineficaz (Laxminarayan, 2003). Acresce que o principal factor que contribui para a ocorrência de resistência a antimicrobianos em bactérias indicadoras, como *E. coli* comensal, é pressão selectiva exercida pelo uso de antimicrobianos em diferentes populações de animais produtores de alimentos. No entanto, e em contraste com a imensa quantidade de informação disponível acerca de mecanismos e genes responsáveis pela resistência, descrições *in vivo* a respeito da emergência de bactérias resistentes sob condições de pressão selectiva de antimicrobianos são escassas (Cantón & Morosini, 2011).

Quando os antimicrobianos são usados em animais, a resistência poderá ser seleccionada na microbiota intestinal (normal ou patogénica), bem como noutros locais do corpo colonizados ou infectados. Por outro lado, verifica-se que a resistência pode também diminuir em prevalência quando a administração de um antimicrobiano é reduzida ou descontinuada, pois embora as estirpes individuais possam reter os genes responsáveis pela resistência, estas serão eventualmente repostas por estirpes susceptíveis assim que a pressão selectiva for removida (Phillips *et al.*, 2004). Existem evidências da ocorrência de ambos estes fenómenos na Europa em *Enterococcus*, no âmbito do uso e descontinuação do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento. Por exemplo, aproximadamente 75% dos isolados de *E. faecium* provenientes de frangos, na Dinamarca, eram resistentes a avoparcina (logo, resistentes também à vancomicina) e cerca de 65% eram resistentes a virginamicina (logo, resistentes também à quinupristina/dalfopristina). Ainda, cerca de 75% dos isolados eram resistentes à

avilamicina, que não tem similar usado em medicina humana. Em 2000, após a proibição do uso de promotores de crescimento, registou-se uma significativa redução da resistência em relação à avoparcina e à avilamicina (<5%), permanecendo mais elevada no caso da virginiamicina (cerca de 30%). De notar que a persistência de resistência em relação a este fármaco após a sua proibição foi atribuída ao uso de penicilinas seleccionando para resistência à virginiamicina associada (Phillips *et al.*, 2004). Outro exemplo, também dinamarquês, remonta a 2003, quando as FQs foram banidas para o uso em animais na Dinamarca, excepto em situações em que os testes de susceptibilidade, efectuados num laboratório de diagnóstico aprovado, demonstrem que as bactérias em causa são resistentes a todos os outros agentes antimicrobianos registados para o tratamento nas espécies animais em causa. Esta acção traduziu-se na redução do consumo de FQs em animais destinados à produção de alimentos para consumo humano (porcos, bovinos e frangos) de 114 Kg, em 2001, para cerca de 24 Kg, em 2006. Verificou-se ainda um decréscimo da resistência à CIP em *E. coli* proveniente de carne de frango produzida na Dinamarca de 10%, em 2003, para 4,5%, em 2006 (Hammerum & Heuer, 2009).

No caso particular das quinolonas, considera-se que o impacto de bactérias resistentes às quinolonas na gestão das infecções humanas possa estar associado a três cenários distintos: (i) bactérias patogénicas zoonóticas resistentes às quinolonas são seleccionadas e o alimento é contaminado durante o abate e/ou preparação; (ii) bactérias não-patogénicas resistentes às quinolonas são seleccionadas no animal e quando o alimento contaminado é ingerido, a bactéria pode transferir determinantes de resistência a outras bactérias presentes no intestino humano (bactérias comensais ou potencialmente patogénicas); e (iii) resíduos de quinolonas presentes nos géneros alimentícios podem permitir a selecção de bactérias resistentes após o consumo do alimento (Fàbrega *et al.*, 2008).

Estima-se que cerca de 50% do total da produção de antimicrobianos (por peso) são usados em animais e plantas, com 50-80% usados em alguns países como promotores de crescimento ou profiláticos e o restante usado com fins terapêuticos. Os padrões de uso variam muito, mas nalguns países, a maioria dos animais de produção recebe antimicrobianos nalguma fase da sua vida e muitos deles por longos períodos de tempo em doses sub-terapêuticas. A pressão selectiva do uso de antimicrobianos pensa-se que seja maior durante a baixa-dosagem e exposição a longo-prazo, características de promotores de crescimento e profiláticos (McEwen, 2001). De referir que também a metafilaxia, uma abordagem terapêutica que se refere ao uso de antimicrobianos em grupos de animais mediante aparecimento ou expectativa do aparecimento de sintomas de doença, pode contribuir para a promoção da selecção de bactérias resistentes (Lorenz *et al.*, 2011). No entanto, também o uso terapêutico, que requer

elevadas doses em curtos períodos de tempo, pode contribuir para o aparecimento de resistência (McEwen, 2001). As bactérias entéricas de animais produtores de alimentos são particularmente expostas a pressão selectiva (McEwen, 2001), pelo que a ocorrência de resistência a antimicrobianos em microrganismos indicadores comensais, tais como *E. coli*, *E. faecium* e *E. faecalis*, constitui um bom indicador da pressão selectiva exercida pelo uso de antimicrobianos na população bacteriana intestinal de animais de produção (EFSA & ECDC, 2011). Adicionalmente, estes microrganismos funcionam como um reservatório de genes de resistência que podem ser transferidos para outras bactérias patogénicas e/ou comensais (EFSA, 2008). Neste contexto, a monitorização de resistência a antimicrobianos em bactérias comensais como a *E. coli*, isoladas de animais saudáveis, seleccionados aleatoriamente e escolhidos para serem representativos da população em geral, pode fornecer informação valiosa a respeito dos determinantes de resistência presentes em bactérias de origem animal (EFSA & ECDC, 2011). Devem ser alvo desta monitorização as classes de antimicrobianos criticamente importantes usados em medicina humana e em medicina veterinária (OIE, 2003).

### **1.3. Uso de antimicrobianos nos sistemas de produção intensiva de bovinos**

O uso de antimicrobianos em produção animal engloba diferentes tipos de administração: terapêutica, profilática, metafilática, como promotor de crescimento e ainda o uso “off-label” ou “extra-label”. O uso terapêutico refere-se ao uso de um antimicrobiano com o propósito específico de tratar um animal ou animais com uma doença infecciosa clinicamente diagnosticada (Codex Alimentarius Commission [CAC]/Recommended Code of Practice [RCP] 61, 2005). O uso profilático refere-se ao uso de um ou mais antimicrobianos em animais saudáveis considerados em risco de desenvolverem uma infecção ou antes do início clínico de uma doença infecciosa; este tratamento inclui o controlo da disseminação de uma doença infecciosa clinicamente diagnosticada identificada num grupo de animais e a prevenção de uma doença infecciosa que ainda não foi clinicamente diagnosticada (CAC/RCP 61, 2005). De referir que, frequentemente, quando se faz referência ao controlo de doença, mais do que à prevenção da mesma, o conceito de metafilaxia pode ser usado em substituição do conceito de profilaxia, sendo definido como a medicação em massa de um grupo de animais com vista a eliminar ou minimizar um surto da doença esperado (Coe & Grooms, 2002). O uso como promotor de crescimento, pressupõe a administração de antimicrobianos com vista ao aumento da taxa de ganho de peso e/ou da eficiência da utilização da alimentação em animais; este termo não se aplica ao uso de antimicrobianos para o propósito específico de tratar, controlar ou prevenir doenças infecciosas, mesmo quando uma resposta de crescimento possa ser incidentalmente obtida (CAC/RCP 61, 2005). No que se refere à

promoção do crescimento, lembre-se que, tendo em vista a redução do risco humano e sem prejuízo na saúde animal ou economia da produção, o uso de antimicrobianos para este fim foi proibido na UE desde 2006 (UE, 2003). Por último, a utilização “off-label” envolve a administração do agente de outra forma que não aquela descrita nas indicações de uso; isto inclui o uso em espécies diferentes, para uma indicação diferente ou numa dose diferente da recomendada (Moon *et al.*, 2011; WHO, 2011).

Vários antimicrobianos são administrados aos bovinos por uma variedade de razões, incluindo o controlo de abscessos hepáticos, aceleração do ganho de peso e prevenção ou tratamento de surtos de doença respiratória (McEwen & Fedorka-Cray, 2002). Depois do desmame, por volta dos sete meses, os vitelos de carne são tipicamente enviados para outras explorações e posteriormente para “feedlots”, onde são mantidos em grandes grupos e alimentados com rações de elevada densidade energética. Pneumonia e diarreia constituem as maiores causas de mortalidade nos vitelos, pelo que, com frequência, estes animais são tratados com medicação individual ou em grupo (McEwen & Fedorka-Cray, 2002). Neste contexto, uma diminuição da mortalidade e morbidade de 2% e 26%, respectivamente, para vitelos que receberam tratamento antimicrobiano à chegada ao “feedlot” foi reportada numa meta-análise de estudos norte-americanos. O ganho de peso médio diário foi 0,11 kg superior nos animais que receberam o tratamento metafilático (Wileman, Thomson, Reinhardt & Renter, 2009). A diarreia dos vitelos é uma enfermidade multifactorial, responsável por graves perdas económicas, que ocorre nos primeiros meses de vida do animal. A doença caracteriza-se, clinicamente, por diarreia aquosa aguda e profusa, desidratação progressiva, acidose e morte. Os agentes etiológicos mais encontrados são *E. coli*, rotavírus, coronavírus e *Clostridium perfringens* em vitelos até um mês de vida, enquanto em animais entre um a seis meses, *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Salmonella* spp., juntamente com os parasitas gastrointestinais, são os principais agentes patogénicos. Muitas vezes, esses agentes aparecem associados, actuando de forma sinérgica para o agravamento do quadro clínico (Schuch, 2001). Considerando que certas estirpes de *E. coli* podem causar infecções do trato intestinal, incluindo doenças diarreicas em bovinos, as FQs são frequentemente a opção terapêutica, dada a sua efectividade contra a maioria das bactérias Gram-negativas (Lim *et al.*, 2010). De referir, também, que a denominada febre do transporte (pneumonia) representa um problema de saúde relevante para os vitelos nos “feedlots” e um importante determinante do uso de antimicrobianos (McEwen & Fedorka-Cray, 2002).

Já nas produções leiteiras, a maior parte dos vitelos são removidos das mães logo no primeiro dia de vida e são acomodados separadamente para controlo de infecção, alimentados com leite ou leite de transição (que pode conter tetraciclina) por 6 a 8 semanas, desmamados e depois



acomodados em grupos. Os antimicrobianos podem ser administrados oralmente ou por injeção, fundamentalmente com o fim de tratar e prevenir diarreia e pneumonia, ambas doenças de relevância nos vitelos de leite (McEwen & Fedorka-Cray, 2002).

## 2. Quinolonas

A quimioterapia antimicrobiana, que se iniciou nos anos 30 com as sulfonamidas, foi indubitavelmente fortalecida com o aparecimento das quinolonas, que desde logo associavam à sua baixa toxicidade um amplo espectro de actividade (Jackson, Reyes & Cordiés, 1998). A primeira quinolona antibacteriana foi identificada por Lesker e colaboradores, em 1962, entre os produtos obtidos da síntese da cloroquina. Trata-se de um composto de estrutura 1,8-naftiridina que recebeu o nome de ácido nalidíxico, AN (Silva, 2002). Desde a descoberta do AN, cuja utilização era limitada ao tratamento de infecções do trato urinário por bactérias Gram-negativas, as quinolonas evoluíram para se tornar agentes importantes e efectivos no tratamento de diversas infecções bacterianas (Ball, 2000). A descoberta de que alterações na estrutura química destes compostos modificava de modo importante a sua actividade antimicrobiana, permitiu sintetizar outros compostos desta família até chegar às novas quinolonas, denominadas fluoroquinolonas (FQs); estes novos agentes contêm um átomo de flúor que lhes confere actividade contra espécies Gram-positivas e um anel piperacínico que amplia o seu espectro de actividade contra espécies Gram-negativas aeróbias e *Pseudomonas aeruginosa* (Jackson *et al.*, 1998).

A estrutura molecular das quinolonas foi sendo adaptada ao longo do tempo em associação com a necessidade clínica e o núcleo naftiridona do AN tornou-se a base de uma série de compostos activos. A substituição da piperazina na posição 7 levou ao desenvolvimento de compostos com actividade significativa contra *Pseudomonas aeruginosa*, como por exemplo, o ácido pipemídico. A fluorinação na posição 6 (que originou as FQs) e modificação de outras cadeias laterais levou a uma aumentada actividade contra Gram-positivas, incluindo melhoria da potência contra *Pneumococcus* e melhoria do perfil farmacocinético. Estes compostos estão disponíveis para uma administração diária e são clinicamente eficientes no tratamento de infecções respiratórias por *Pneumococcus* e outras infecções causadas por Gram-positivas (Ball, 2000).

Entre os derivados das quinolonas, as FQs constituem um subgrupo amplamente utilizado, cuja estrutura apresenta um azoto em vez de um carbono na posição 8 no núcleo de naftiridina e uma substituição fluorada na posição 6 (Hernández *et al.*, 2011). Estes compostos actuam por bloqueio da actuação das topoisomerasas bacterianas ADN girase e topoisomerase IV, responsáveis pela introdução de superenrolamento negativo na molécula de ADN. Desta

forma, provocam o bloqueio dos processos que envolvem separação das cadeias de ADN, tais como a replicação e transcrição, induzindo alterações nos processos biológicos incompatíveis com a vida da célula (De Sousa *et al.*, 1998).

A introdução das FQs na década de 80, entre as quais a ciprofloxacina (CIP), entre outros antimicrobianos, constituiu um incontestável avanço na terapia anti-infecciosa, designadamente no tratamento de infecções do trato urinário (De Menezes, Góis, Oliveira, Pinheiro & Brito, 2009). Na época, as FQs firmaram-se como os medicamentos mais utilizados na terapia empírica. O amplo espectro de actividade antimicrobiana, a excelente biodisponibilidade, a boa penetração tecidual, o tempo de semi-vida plasmático (possibilitando posologia de uma toma diária) e, em geral, poucos efeitos colaterais, fizeram desta classe de antimicrobianos um grupo especial de fármacos (Silva, 2002; De Menezes *et al.*, 2009). As infecções do trato urinário causadas por *E. coli* constituem a infecção bacteriana mais comum e são usualmente tratadas com FQs, uma vez que os microrganismos isolados são frequentemente resistentes a aminopenicilinas e trimetoprim-sulfametoxazol; além disso, as FQs têm ainda a vantagem de serem administradas por via oral (Allou, Cambau, Massias, Chau & Fantin, 2011).

De acordo com a lista de antimicrobianos criticamente importantes para medicina humana definida pela OMS, as quinolonas (incluindo as FQs) integram as classes de antimicrobianos consideradas de elevada importância, figurando entre as primeiras três classes juntamente com as cefalosporinas (terceira e quarta geração apenas) e os macrólidos. A designação de classes de antimicrobianos pela OMS como criticamente importantes responde aos seguintes critérios: (1) única terapia ou uma das poucas alternativas para tratar doenças humanas graves e (2) agentes antimicrobianos utilizados para tratar doenças causadas por organismos que podem ser transmitidos através de fontes não-humanas ou doenças causadas por organismos que podem adquirir genes de resistência a partir de fontes não humanas (WHO, 2009). Também a OIE estabeleceu, em 2007, uma lista de antimicrobianos criticamente importantes para a saúde animal, entre os quais figuram também as quinolonas (FAO/WHO/OIE, 2008).

As FQ representam uma classe de antimicrobianos de extrema importância no tratamento de infecções severas e invasivas em humanos e em animais, pelo que são de particular interesse para a saúde pública e saúde animal (EMEA/CVMP/Scientific Advisory Group on Antimicrobials Work Programme [SAGAM]/184651/2005, 2007). No entanto, imediatamente após a sua introdução na prática clínica para o tratamento de infecções do trato urinário causadas por *E. coli* observou-se o aparecimento de bactérias resistentes às quinolonas (Engberg *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2008). Acresce que tanto as mais antigas como a mais recentes gerações de quinolonas têm impacto no desenvolvimento de resistência

(EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007). Em ambas as listas de antimicrobianos criticamente importantes, da OMS e da OIE, as quinolonas e FQs são agrupadas na mesma classe, considerando que quando a resistência às quinolonas se desenvolve, (por exemplo, resistência ao AN), constitui, para a maioria das bactérias, um primeiro passo para o desenvolvimento de resistência de alto nível às FQs (FAO/WHO/OIE, 2008).

### **2.1. Classificação, estrutura química e actividade**

Com o intuito de classificar as quinolonas usadas em humanos do ponto de vista clínico, Walker propôs, em 1999, um critério baseado no espectro de actividade antibacteriana, criando quatro gerações de quinolonas, tal como exemplificado na Tabela 2 (Silva, 2002). A actividade antimicrobiana das quinolonas aumenta dramaticamente com o desenvolvimento de novas gerações, sendo que as quinolonas da terceira e da quarta geração são frequentemente apelidadas de quinolonas de espectro aumentado *versus* quinolonas convencionais da segunda geração (Ball, 2000).

Tabela 2. Classificação das quinolonas (Adaptado de: Silva, 2002).

<b>Primeira geração</b>
Ácido nalídíxico
Ácido oxolínico
Cinoxacina
<b>Segunda geração</b>
Norfloxacina
Ciprofloxacina <sup>a</sup> / Enrofloxacina <sup>b</sup>
Enoxacina
Lomefloxacina
Ofloxacina
<b>Terceira geração<sup>c</sup></b>
Levofloxacina <sup>d</sup>
Esparfloxacina
Gatifloxacina <sup>e</sup>
Grepafloracina <sup>f</sup>
<b>Quarta geração</b>
Trovafloxacina <sup>g</sup>
Moxifloxacina <sup>g</sup>

<sup>a</sup>A mais potente contra *Pseudomonas*.

<sup>b</sup>Quinolona exclusiva de uso veterinário, estruturalmente semelhante à ciprofloxacina.

<sup>c</sup>Mais potentes contra *Pneumococcus* e/ou anaeróbios do que as quinolonas anteriores.

<sup>d</sup>Embora classificada, por alguns autores, como pertencente à segunda geração, a levofloxacina figura na terceira geração por causa do seu espectro aumentado contra *S. pneumoniae*, incluindo estirpes penicilina-resistentes.

<sup>e</sup>A mais activa *in vitro* contra *S. pneumoniae*.

<sup>f</sup>Retirada do mercado em 1997.

<sup>g</sup>Mais potente contra aneróbios.

As quinolonas usadas na clínica possuem a estrutura de dois anéis hexagonais com um azoto na posição 1, um grupo carbonil na posição 4 e um grupo carboxil ligado ao carbono na posição 3 do primeiro anel (Silva, 2002), tal como ilustrado na Figura 2. As quinolonas apresentam um carbono na posição 8 do segundo anel e as naftiridinas um azoto da posição 8. O AN é estruturalmente uma 1,8-naftiridina com substituintes 1-etil e 7-metil. O ácido oxolínico (anel de quinolona) e a cinoxacina (anel de cinolina) também possuem substituintes 1-etil e um anel dióxido ligando as posições 6 e 7 (Silva, 2002).

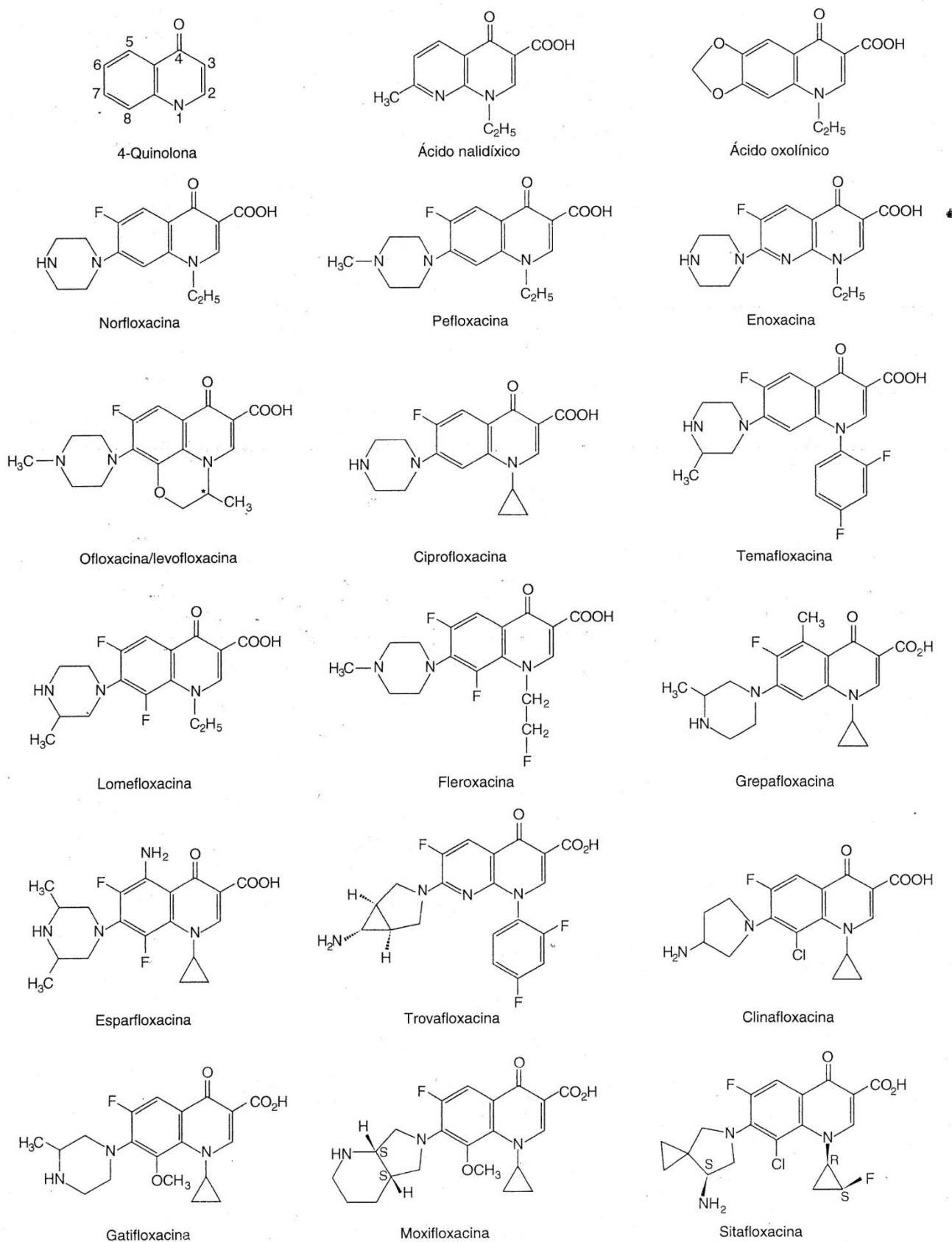


Figura 2. Estrutura de algumas quinolonas (Adaptado de: Silva, 2002).

Modificações químicas nas posições 1, 7 e 8 expandiram a actividade dos compostos de terceira geração, como a moxifloxacina, a anaeróbios e aumentaram a sua actividade intrínseca contra bactérias Gram-positivas. Alguns derivados nafteridona, como a gemifloxacina, são também activos contra organismos anaeróbios e Gram-positivos. A optimização dos vários substitutos permitiu a obtenção de novas quinolonas, designadas de quarta geração (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011b).

A potência destes fármacos é pronunciadamente aumentada com a adição de um átomo de flúor na posição 6 e a acção contra bactérias Gram-negativas é aumentada com a adição de um grupo piperazinil (norfloxacina, CIP, enoxacina), de um grupo metil-piperazinil (perfloxacina, ofloxacina, lomefloxacina, fleroxacina, temafloxacina, grepafloxacina, gatifloxacina) ou ainda de um grupo dimetil-piperazinil (esparfloxacina) na posição 7. De salientar que a adição do grupo metil no anel da piperazina pode melhorar a biodisponibilidade oral (Silva, 2002).

O espectro de actividade *in vitro* das quinolonas evoluiu consideravelmente desde o aparecimento do AN; este agente apresenta uma gama de actividade limitada a algumas espécies Gram-negativas. Em geral, as quinolonas são muito eficazes *in vitro* contra muitas enterobactérias e bacilos Gram-negativos, tais como *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis* e *Moraxella*; também são activas contra algumas espécies de *Pseudomonas*. Compostos como a norfloxacina e a enofloxacina são muito activos contra *Staphylococcus aureus* e outras estirpes de *Staphylococcus*, bem como nalgumas espécies de *Streptococcus* e *Enterococcus*. As FQs como a CIP e a ofloxacina são muito activas *in vitro* contra distintos tipos de *Mycobacterium* (*tuberculosis*, *avium complex*, *fontuitum leprae*) e também frente a microrganismos patogénicos do trato gastrointestinal, incluindo *E. coli*, algumas espécies de *Salmonella* e *Shigella*, *Yersinia enterocolítica* e *Campylobacter jejuni* (Jackson *et al.*, 1998).

A resistência bacteriana às quinolonas da primeira geração (AN, ácido oxolínico e cinoxacina) rapidamente se desenvolveu e esses derivados caíram em desuso. As quinolonas mais activas da segunda geração (norfloxacina, CIP, ofloxacina, enoxacina e lomefloxacina) foram lançadas entre 1986 e 1992. Estes fármacos têm sido muito úteis, porém, não possuem actividade contra cocos Gram-positivos (como o *Streptococcus pneumoniae* penicilina-resistente) nem contra anaeróbios. As FQs mais recentes da terceira e quarta gerações (LEV, esparfloxacina, trovafloxacina, gatifloxacina e moxifloxacina), de espectro antibacteriano aumentado, foram lançadas após 1997, apresentando características que lhes conferem actividade aumentada contra bactérias Gram-positivas, anaeróbias, Gram-negativas, bem como contra e microrganismos patogénicos atípicos (Silva, 2002). Como exemplos do seu espectro antibacteriano excepcionalmente amplo destacam-se a maior actividade contra os

bacilos Gram-negativos aeróbios, especialmente os membros da família *Enterobacteriaceae* e *Haemophilus* spp., e contra cocos Gram-negativos, como *Neisseria* spp. e *Moraxella catarrhalis*. São também eficazes contra bacilos Gram-negativos como *P. aeruginosa* e contra *Staphylococcus* (Silva, 2002). A CIP é, ainda, o antimicrobiano de largo espectro mais potente contra as bactérias Gram-negativas, porém, menos efectivo em bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus faecalis* (Ali, Zehra, Naqvi, Shah & Bushra, 2010).

## 2.2. Mecanismo de acção

As vias pelas quais as FQs atravessam as membranas celulares das bactérias ainda não foram totalmente compreendidas. No entanto, os compostos hidrofílicos parecem difundir-se através das membranas externas das bactérias Gram-negativas pelos canais das porinas (Silva, 2002). As FQs actuam por inibição da actividade catalítica de dois enzimas essenciais à replicação e transcrição do ADN bacteriano: a ADN girase e a topoisomerase IV. , duas topoisomerasas Tipo II (De Sousa *et al.*, 1998; Silva, 2002). As topoisomerasas são enzimas ubíquias que desempenham um papel central na arquitectura cromossómica. Como parte normal do seu mecanismo de acção, estas enzimas ligam-se ao ADN cromossómico e formam complexos capazes de ser captados por outras proteínas, por determinados fármacos anti-tumorais e por quinolonas. No caso destas últimas, o complexo ternário quinolona-enzima-ADN bloqueia a replicação do ADN, o movimento da ácido ribonucleico (ARN) polimerase e, consequentemente, o crescimento celular (Malik, Zhao & Drlica, 2006).

Na sua forma relaxada, o ADN existe na forma de uma dupla hélice que pode ser enrolada e torcida no sentido contrário, levando a um superenrolamento negativo da dupla hélice. Para que haja replicação do ADN é necessário que as duas cadeias se separem, ou seja, que a dupla hélice se desenrole. O grau de enrolamento do ADN depende da acção combinada superenrolamento/relaxamento das duas enzimas. A ADN girase é responsável pelo superenrolamento negativo, enquanto a topoisomerase IV o remove, promovendo o relaxamento da molécula de ADN (Da Silva & Hollenbach, 2010).

Com a acção das topoisomerasas II, dá-se a clivagem do ADN nos complexos de enzima-ADN. Tendo em conta que o superenrolamento do ADN afecta o início da replicação do ADN e a transcrição genética, a actividade da ADN girase, composta por duas subunidades A e B (produtos dos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente), resulta em: (i) ruptura coordenada de ambos os filamentos do ADN, pela enzima; (ii) passagem de outro fragmento de ADN pelo local de ruptura; e (iii) recolagem da ruptura, mecanismo este característico das topoisomerasas do tipo II. Já a actividade da topoisomerase IV, composta por duas

subunidades codificadas pelos genes *parC* e *parE*, consiste na separação das moléculas-filhas de ADN interligadas (em cadeia) que constituem os produtos de finalização de uma etapa de replicação do ADN que permite posteriormente a sua segregação em células-filhas (Silva, 2002).

As quinolonas exercem a sua acção aprisionando ou estabilizando os complexos de ADN e enzima após a ruptura dos filamentos e antes da recolagem do ADN. Este complexo inactivo gera uma ruptura do ADN que a célula dificilmente consegue reparar. De salientar que as quinolonas ligam-se especificamente ao complexo ADN girase com ADN e não apenas à ADN girase (Silva, 2002).

### **2.3. Farmacocinética**

As FQs são absorvidas rapidamente por via oral (principal via de administração), com biodisponibilidade superior a 50% para todos os compostos, alguns dos quais muito próximos de 100% (Silva, 2002). No Homem, as concentrações séricas mais altas aparecem entre 1 a 2 horas depois, quando o fármaco é administrado em jejum, ou 2 horas depois, quando administrado com alimentos. O tempo de semi-vida é variável, sendo, por exemplo, de 3 horas para a norfloxacin, 4 horas para a CIP e até 5 horas para a perfloxacin (Jackson *et al.*, 1998). Estes antimicrobianos também são rapidamente absorvidos por animais monogástricos e pré-ruminantes, no entanto, o pico máximo de concentração sérica varia conforme a espécie animal. Assim, por exemplo, após a administração oral de ENR, a concentração sérica máxima é atingida 0,5, 0,9, 1,4, 2,4, e 5,4 horas depois em equinos, cães, perus, galinhas e bovinos, respectivamente (Da Silva & Hollenbach, 2010).

Quase todas as quinolonas se distribuem amplamente pelos tecidos e líquidos corporais, bem como dentro das células (Silva, 2002). Além da boa absorção e do grande volume de distribuição, outra grande vantagem do uso das FQs é a sua baixa ligação às proteínas plasmáticas, variando entre 15% a 30%, com excepção da trovafloxacin que pode alcançar 75% (Silva, 2002; Da Silva & Hollenbach, 2010).

Os tempos de semi-vida de eliminação varia entre 3 horas, para a norfloxacin e CIP, e 20 horas, para a esparfloxacin, o que permite o uso de frequências de administração de uma a duas vezes por dia (Silva, 2002). Quase todas as quinolonas são excretadas por via renal, basicamente por secreção tubular. Algumas, como a perfloxacin, são eliminadas por via hepática; a CIP pode ainda ser eliminada por via transintestinal (Jackson *et al.*, 1998).

De acordo com as constantes de acidez e diferentes estruturas, as quinolonas vão exibir diferentes acções antibacterianas. Sendo as porinas uma das principais vias de entrada das quinolonas nas células bacterianas Gram-negativas, a hidrofobicidade, o peso molecular, e a



forma iônica em pH fisiológico são propriedades que vão condicionar a interação destes fármacos. No caso das bactérias Gram-positivas, como estas não possuem uma membrana externa, onde se encontram os canais porínicos, a difusão através da membrana celular será o local de entrada dos antibióticos na célula bacteriana e, neste caso, a hidrofobicidade do composto é a propriedade mais importante (Da Silva & Hollenbach, 2010).

#### **2.4. Importância do uso das fluoroquinolonas no tratamento de infecções em espécies animais produtoras de alimentos destinados ao consumo humano**

As FQs são eficazes no tratamento de infecções graves como septicemia, gastroenterite e doenças respiratórias causadas por bactérias Gram-negativas susceptíveis. Também são usadas no tratamento de infecções do trato urinário, infecções cutâneas e infecções dos tecidos moles causadas por bactérias Gram-negativas e algumas bactérias Gram-positivas aeróbias. São eficazes no tratamento de infecções por *Mycoplasma* e por bactérias atípicas, tais como micobactérias, *Clamidia* spp., *Ehrlichia* spp. ou *Rickettsia* spp. (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

A primeira geração de quinolonas (ácido oxolínico e flumequina) foram licenciadas para uso em alimentação animal no início dos anos 80 e a primeira FQ, a ENR, já no final da década de 80. Desde então, FQs adicionais têm sido autorizadas. Embora sejam raros os casos em que as FQs constituem o único agente de tratamento de uma doença infecciosa específica, constituem uma importante alternativa na prática clínica veterinária (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007). De referir que a CIP e a ENR são FQs estruturalmente relacionadas, apresentando um espectro e actividade aumentados por comparação ao AN. A CIP é amplamente usada em medicina humana e a ENR em medicina veterinária. Em comparação à CIP, a ENR é ligeiramente menos potente, no entanto, existe uma clara resistência cruzada entre as duas substâncias (EFSA, 2008).

Existe dificuldade em obter informação acerca do consumo de agentes antimicrobianos em animais destinados ao consumo humano, embora a situação venha progredindo ligeiramente nos últimos tempos. Dados referentes ao consumo de quinolonas e FQs estão compilados na Tabela 3.

Tabela 3. Venda de FQs (toneladas de substância activa) e produção de carne em alguns Estados-Membros da UE (Adaptado de: EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

Estado-Membro	Venda (toneladas)		Produção de carne (toneladas abatidas)			
	FQs	Todas as quinolonas	Vaca e veado	Porco	Frango	Total
<b>República Checa</b>	0,8	1	103 775	40 9102	215 802	728 679
<b>Dinamarca</b>	0,1	0,1	147 600	1 762 000	199 994	2 109 594
<b>Finlândia</b>	< 0,1 <sup>a</sup>	< 0,1	95 830	193 222	83 730	372 782
<b>França</b>	3,6 <sup>a</sup>	20,7	163 1000	2 321 000	2 010 700	5 962 700
<b>Holanda</b>	0,3 <sup>b</sup>	5,0 <sup>a</sup>	364 000	125 0000	564 000	2 178 000
<b>Portugal</b>	3,0	3,8	118 524	315 141	229 335	663 000
<b>Suécia</b>	0,2 <sup>a</sup>	0,2	136 300	287 500	99 850	523 650
<b>Reino Unido</b>	1,4 <sup>a</sup>	1,4	687 000	690 000	1 569 987	2 946 987

<sup>a</sup>Inclui cães e gatos.

<sup>b</sup>Apenas frangos.

Da análise da Tabela 3, salienta-se, desde logo, a existência de claras diferenças no consumo de quinolonas e FQs nos diferentes Estados-Membros da UE, ainda que os consumos referidos não discriminem as espécies animais a que dizem respeito. A informação relativa a Portugal evidencia, ainda, um elevado consumo de quinolonas face às toneladas de carne produzidas. A acrescer a estes dados, destaca-se o facto de as FQs representarem, em Portugal, 78,9% da venda total de quinolonas. No que respeita ao consumo de FQs em humanos, importa referir que um estudo recente de Ramalinho e colaboradores (2010), acerca da evolução do consumo de antibióticos no País, Regiões de Saúde e Distritos do Continente português, de 2000 a 2007, evidenciou um decréscimo de 9,36% no consumo total de antibióticos, nomeadamente no que respeita ao uso das quinolonas (incluindo FQs), registando-se uma redução de 8,86% neste período. Contrariamente, na Europa, o consumo das quinolonas aumentou ligeiramente ao longo do período de estudo, tendo estabilizado entre 2005 e 2007. Em Portugal o consumo de quinolonas representa 13,15% do consumo total de antibióticos. Em 2007, as substâncias mais utilizadas em Portugal foram a CIP e a LEV, enquanto na Europa, foram a CIP e a norfloxacina. Apesar do decréscimo no consumo de quinolonas, que ocorreu em todos os distritos e Regiões de Saúde do Continente no período

em estudo, Portugal continua a ser um dos países europeus com maior consumo de quinolonas em humanos (Ramalhinho *et al.*, 2010).

## **2.5. Resistência às fluoroquinolonas em *Escherichia coli***

As infecções bacterianas que acometem ao trato urinário são incontestavelmente responsáveis por uma elevada prevalência de morbidade e de mortalidade na população mundial (De Menezes, *et al.*, 2009; Kawamura-Sato *et al.*, 2010). *E. coli* representa o principal agente etiológico causador de infecções agudas do trato urinário e as quinolonas (incluindo as FQs) constituem os antimicrobianos de primeira-linha no tratamento desta doença (Ito *et al.*, 2008). A exposição a antimicrobianos é tida como o factor mais importante na emergência e disseminação de resistência (Cantón & Morosini, 2011). Em linha com esta consideração, está o aparecimento de bactérias resistentes às quinolonas observado imediatamente após a sua introdução na prática clínica, na década de 60, com o uso do AN no tratamento de infecções causadas por *E. coli* (Jackson *et al.*, 1998; Engberg *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2008). Refira-se que, nos anos 90, o uso de FQs cresceu em cerca de 40%, verificando-se um consequente aumento para o dobro da taxa de resistência à CIP entre bacilos Gram-negativos isolados de unidades de cuidados intensivos de hospitais (Jaboby, 2005). Porém, enquanto a profundidade de conhecimento sobre organismos resistentes aos antimicrobianos isolados de pacientes com infecções ou que circulam em ambiente hospitalar é amplo, muito pouco é conhecido acerca deste fenómeno na comunidade (Alessiani *et al.*, 2009; Vien *et al.*, 2009). O consumo de antimicrobianos é tido como o principal factor de desenvolvimento e proliferação de resistência em hospitais (Michael, Zarb, Ferech & Goossens, 2008). Por outro lado, na comunidade, a transferibilidade de bactérias resistentes ou determinantes móveis de resistência entre animais e humanos por via da alimentação ou contacto directo tem sido sugerida em vários estudos (Fey *et al.*, 2000; Manian, 2003; Ishida *et al.*, 2010). Apesar da complexidade da origem da resistência aos antimicrobianos, o que se observa é que, globalmente, a resistência às FQs vem aumentando tanto entre os principais microrganismos patogénicos nosocomiais, tais como *P. aeruginosa* e MRSA, como também nos principais agentes causadores de infecções adquiridas na comunidade, tais como *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria gonorrhoeae*. Para estes exemplos, não foi até então demonstrada a sua ligação com o uso de FQs em animais. No entanto, no caso de resistência verificada em infecções entéricas por agentes zoonóticos (*Salmonella* e *Campylobacter*), a ligação ao uso veterinário de FQs é bem documentado (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007). Adicionalmente, a transmissão da resistência entre bactérias comensais e bactérias patogénicas em meio hospitalar tem sido amplamente reportada na literatura (Alessiani *et al.*,

2009). Em contraste, a informação acerca da prevalência de distintos mecanismos de resistência às quinolonas em *E. coli* de origem humana e animal são escassos na literatura científica (Cavaco *et al.*, 2008).

No que concerne a resistência a antimicrobianos em *E. coli*, tal como referido anteriormente no ponto 1.4., a resistência às FQs em isolados clínicos invasivos desta bactéria de origem humana observada na Europa regista, nos últimos anos, uma tendência crescente. Em 2008, *E. coli* foi a bactéria Gram-negativa mais comum na génese de bacteriémia e de infecções do trato urinário, apresentando um aumento em toda a Europa na resistência a todas as classes de antimicrobianos sob vigilância, incluindo as FQs (ECDC, 2010b). Segundo dados de 2011, num total de 28 países europeus, 20,7% reportaram isolados resistentes às FQs (8,4%, na Estónia, a 42,8%, no Chipre), sendo que Portugal reportou uma taxa de resistência de 23,8% (ECDC, 2011), logo, acima da média europeia.

Aquando do início da utilização clínica das quinolonas, foi sugerido que a rápida actividade bactericida deste composto seria vantajosa para minimizar a resistência. No entanto, à medida que o uso de quinolonas foi aumentando, a ocorrência de estirpes com reduzida susceptibilidade ou com resistência também aumentou (Yagci, Yoruk, Azap & Memikoglu, 2009). Alguns trabalhos realizados no âmbito do efeito das quinolonas na microbiota intestinal têm sugerido que estes agentes seleccionam estirpes de *E. coli* resistentes às quinolonas (Yagci *et al.*, 2009), especialmente quando usadas profilaticamente em pacientes neutropénicos ou no tratamento de infecções do trato urinário (Gupta, Hooton & Stamm, 2005).

A reduzida susceptibilidade às FQs tornou-se, pois, num problema relevante, não apenas na Europa, mas de âmbito global, com uma particular incidência na Ásia (Ali *et al.*, 2010). Por exemplo, na China, mais de 60% das estirpes de *E. coli* isoladas de infecções hospitalares são resistentes às FQs, enquanto em estirpes de *E. coli* isoladas de infecções adquiridas na comunidade a resistência reportada é de 50,6% (Guo *et al.*, 2010). Já no Japão, um estudo de Kawamura-Sato e colaboradores (2010) detectou 36,2% de resistência às quinolonas e 15,7% às FQs em estirpes clínicas de *E. coli* uropatógena. Estudos realizados na África Ocidental em *E. coli* de origem humana (comensal e diarreicogénica) anteriores a 2004 reportam a não existência ou uma muito baixa incidência de resistência ao AN e às FQs. Todavia, relatos e estudos de vigilância mais recentes apontam para a emergência de resistência a estes antimicrobianos entre bactérias patogénicas entéricas e bactérias comensais entéricas (Namboodiri, Opintan, Lijek, Newman & Okeke, 2011). Um estudo prospectivo de quatro anos levado a cabo por Omigie e colaboradores (2009) procurou determinar a incidência e taxa de desenvolvimento de resistência às quinolonas de patogénicos comuns responsáveis

por infecções do trato urinário na Nigéria. Os resultados evidenciaram elevada resistência às quinolonas entre estirpes de *P. aeruginosa* (43,4%), *E. coli* (26,3%), e *Proteus* spp. (17,1%). Durante os quatro anos do estudo, observou-se um aumento da resistência a estes antimicrobianos em *P. aeruginosa* (14,6%), *S. aureus* (9,8%), e *E. coli* (9,7%). A CIP revelou-se a quinolona mais eficaz (91,2%), seguindo-se a LEV (89,2%) e a moxifloxacina (85,1%), enquanto elevadas taxas de resistência foram observadas para AN (51,7%) e perfloxacina (29,0%). Ainda numa perspectiva global deste flagelo, Fariña *et al.* (2007) reportaram uma resistência de 18,7% à CIP, LEV e gatifloxacina em estirpes de *E. coli* responsáveis por infecções do trato urinário, isoladas de humanos, no Paraguai. Também no Brasil, um estudo demonstrou uma resistência à CIP de 21,3% em isolados humanos de *E. coli* uropatogénica (De Menezes *et al.*, 2009), um resultado preocupante, visto ser preconizado pela literatura a extrema cautela ao ser administrado empiricamente este agente em infecções do trato urinário quando a sua resistência for superior a 20% (Fariña *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, também a resistência a antimicrobianos em bactérias de origem animal, incluindo animais destinados ao consumo humano, animais de companhia, peixes e outros animais aquáticos, bem como animais selvagens, tem ganho especial atenção (Schwarz *et al.*, 2010). À semelhança do que se observou em isolados bacterianos de origem humana, a introdução e o uso corrente de quinolonas foi seguido pela rápida emergência de resistência antimicrobiana em bactérias originárias de animais de produção de alimentos e subsequente disseminação de bactérias zoonóticas resistentes em humanos (Engberg *et al.*, 2001). A este respeito, um estudo holandês de Endtz e colaboradores (1991) reportou a emergência de estirpes de *Campylobacter* resistentes às FQs em humanos após uso de ENR através da água de consumo, numa produção de frangos. Similarmente, foi observado noutro trabalho uma tendência de aumento de estirpes de *Salmonella* resistentes ao AN após licenciado o uso de ENR, na Alemanha (Malorny, Schroeter & Helmuth, 1999).

Segundo os mais recentes dados publicados pela EFSA e ECDC (2011), relativos à resistência a antimicrobianos entre bactérias zoonóticas e indicadoras fornecidos por 25 Estados-Membros, em 2009, reportaram-se proporções de isolados de *Salmonella*, *Campylobacter* e *E. coli* com resistência à CIP preocupantes. No que respeita aos isolados do indicador comensal *E. coli*, o mesmo documento aponta níveis de resistência à CIP moderados a elevados em frangos e porcos e menores em bovinos. A resistência à CIP e AN, em isolados de *E. coli* comensal proveniente de *Gallus gallus*, foi de 47% e 44%, respectivamente. Já em porcos, a resistência de *E. coli* à CIP e AN foi de 12% e 8%, respectivamente. Isolados de *E. coli* de carne de porco apresentaram uma resistência de 6%, para CIP e AN (EFSA & ECDC, 2011).

No que respeita particularmente a bovinos, dados publicados pela EFSA e ECDC (2011), referentes a 2009, foram reportados por 9 Estados-Membros e pela Suíça (Tabela 4). A informação engloba isolados de *E. coli* comensal de animais saudáveis, incluindo e não discriminando bovinos de carne, bovinos de leite e vitelos. Para todos os países reportados, os níveis de resistência a todos os antimicrobianos foram mais baixos em bovinos, comparativamente a isolados provenientes de frangos e de porcos. Em bovinos, para todos os países observaram-se elevados níveis de resistência às tetraciclinas (28%), sulfonamidas (25%) e estreptomicina (23%) e moderada a ampicilina (20%); em relação às FQs, a resistência foi de 8% para a CIP e 5% para o AN, tal descrito na Tabela 4 (EFSA & ECDC, 2011). Estes dados são alarmantes, tanto em matéria de saúde humana como de saúde animal, uma vez que a *E. coli* proveniente de animais produtores de alimentos e de alimentos tem potencial para distribuir genes de resistência a antimicrobianos a bactérias patogénicas humanas e animais através de mecanismos de transferência variáveis (EFSA & ECDC, 2011).

Tabela 4. Número de isolados (n) e proporção de resistência [R(%)] à CIP e AN em isolados de *E. coli* de bovinos em países europeus, em 2009 (Adaptado de: EFSA & ECDC, 2011).

País	CIP		AN	
	n	R (%)	n	R (%)
<b>Áustria</b>	168	0,0	168	0,0
<b>Dinamarca</b>	94	0,0	94	0,0
<b>Estónia</b>	23	4	23	0,0
<b>Finlândia</b>	-	-	272	0,4
<b>Alemanha</b>	361	13	361	11
<b>Holanda</b>	307	13	307	13
<b>Polónia</b>	176	8	173	4
<b>Espanha</b>	>256	4	>256	3
<b>Suécia</b>	223	8	223	0,0
<b>TOTAL</b>	1608	8	1877	5
<b>Suíça</b>	132	2	132	0,8

Além dos dados da EFSA e ECDC, alguns países europeus produzem periodicamente relatórios referentes ao uso de agentes antimicrobianos e à ocorrência de resistência em bactérias de origem animal. Com base nas mais recentes publicações produzidas pela Dinamarca (DANMAP 2010, 2011), Finlândia (FINRES-Vet 2007-2009, 2011), França (FARM 2007-2008, 2010), Itália (ITAVARM 2003, 2003), Países-Baixos (MARAN 2008, 2010), Noruega (NORM/NORM-Vet 2010, 2011), Suécia (SVARM 2010, 2011) e Espanha (VAV 2005, 2006), reúne-se na Tabela 5 a informação reportada em matéria de resistência às FQs e AN em *E. coli* comensal recolhida de porcos, frangos e bovinos. De salientar que a Tabela 5 comporta dados de isolados de fezes de animais saudáveis, excepto nos casos de bovinos reportados pela Espanha, em que foram utilizados isolados bacterianos de animais doentes. Por este motivo, a comparação dos dados é comprometida, não só pelo referido caso da Espanha, mas também pela diferente classificação da resistência resultante da aplicação de diferentes critérios interpretativos entre os oito países.

Tabela 5. Proporção de resistência (%) às FQs e AN entre isolados de *E. coli* provenientes de porcos, frangos e bovinos

Origem e quinolona	Países (ano de investigação) e percentagem de resistência							
	DK (2010)	FI (2007-2009)	FR (2007/2008)	IT (2002-2003)	NL (2008)	NO (2010)	SE (2010)	ES (2005)
<b>Porcos</b>								
FQ	0,0 <sup>a</sup>	0,7 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup> /0,6 <sup>a</sup>	0,8 <sup>b</sup>	1,4 <sup>a</sup>	n.r.	6,0 <sup>b</sup>	4,2 <sup>a</sup>
AN	0,0	0,7	2,9/4,1	9,0	2,0	n.r.	n.r.	16,7
<b>Frangos</b>								
FQ	8,0 <sup>a</sup>	1,8 <sup>a</sup>	2,7 <sup>a</sup> /6,9 <sup>a</sup>	11,4 <sup>b</sup>	60,9 <sup>a</sup>	n.r.	13,0 <sup>a</sup>	53,0 <sup>a</sup>
AN	8,0	1,6	26,0/33,0	49,6	61,8	n.r.	13,0	89,0
<b>Bovinos</b>								
FQ	0,0 <sup>a</sup>	1,1 <sup>a</sup>	11,9 <sup>a</sup> /?	10,2 <sup>b</sup>	20,3 <sup>a,d</sup> e 4,7 <sup>a,e</sup>	0,0 <sup>a</sup>	7,0 <sup>b</sup>	8,3 <sup>a,c</sup>
AN	0,0	0,4	16,9/?	18,2	20,3 <sup>d</sup> e 5,4 <sup>e</sup>	0,0	n.r.	18,3 <sup>c</sup>

Tabela 5. (continuação).

Critérios interpretativos (mg/l)								
							>0,064 <sup>a</sup>	
FQ	>0,032 <sup>a</sup>	>0,064 <sup>a</sup>	>0,032 <sup>a</sup>	>4 <sup>b</sup>	>0,064 <sup>a</sup>	>0,064 <sup>a</sup>	e	>2 <sup>a</sup>
							>0,12 <sup>b</sup>	
AN	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16

<sup>a</sup>Ciprofloxacina, CIP.

<sup>b</sup>Enrofloxacin, ENR.

<sup>c</sup>Isolados clínicos.

<sup>d</sup>Vitelos.

<sup>e</sup>Bovinos de leite.

n.r. – não reportado.

Abreviaturas dos países: Dinamarca (DK), Finlândia (FI), França (FR), Itália (IT), Países Baixos (NL), Noruega (NO), Suécia (SE) e Espanha (ES).

Fonte de informação (país/ano de publicação): DANMAP 2010 (Dinamarca/2011), FINRES-Vet 2007-2009 (Finlândia/2011), FARM 2007-2008 (França/2010), ITAVARM 2003 (Itália/2003), MARAN 2008 (Países Baixos/2010), NORM/NORM-Vet 2010 (Noruega/2011), SVARM 2010 (Suécia/2011) e VAV 2005 (Espanha/2007).

De referir que, à semelhança do relatório publicado pela EFSA e ECDC (2011), os relatórios produzidos pelos oito países referidos na Tabela 5 evidenciam uma maior proporção de isolados resistentes às FQs e AN em frangos; em contraste, a resistência observada em isolados de bovinos supera a resistência observada em porcos, ao contrário do que se verifica segundo os dados reportados pela EFSA e ECDC (2011).

Apesar da escassez de informação relativa a Portugal, dados do projecto “Antibiotic Resistance in Bacteria of Animal Origin II” (ARBAO-II), implementado pela UE para o período de 2003-2005 com o fim de monitorizar a susceptibilidade aos antimicrobianos em bactérias indicadoras e bactérias patogénicas isoladas de animais produtores de alimentos, referem informação reportada pelo nosso país (Tabela 6).



Tabela 6. Proporção de resistência (%) às FQs entre bactérias patogénicas de animais destinados ao consumo humano, 2004 (Adaptado de: Hendriksen *et al.*, 2008).

País	Microrganismo patogénico e resistência (%) às FQs					
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>		<i>E. coli</i>		<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
	Porcos	Bovinos	Frangos	Porcos	Bovinos	Bovinos
<b>Bélgica</b>	-	35		3	-	-
<b>Dinamarca</b>	0	1	0	0	0	-
<b>Inglaterra e País de Gales</b>	4	<1	3	8	0	0
<b>Finlândia</b>	-	-	-	11	-	-
<b>França</b>	0	31	5	5	5	5
<b>Alemanha</b>	-	2	-	-	1	2
<b>Itália</b>	-	22	4	-	-	-
<b>Letónia</b>	-	-	-	44	-	-
<b>Holanda</b>	-	-	-	-	0-1	2-6
<b>Noruega</b>	-	-	2	0	-	-
<b>Polónia</b>	1	-	-	-	-	0
<b>Portugal</b>	-	-	-	76	-	-
<b>Espanha</b>	-	12	-	16	-	-
<b>Suécia</b>	0	1	-	3	<1	-

Dados de 2004 referentes unicamente à resistência de estirpes de *E. coli* de origem suína, categorizam Portugal como o país que reportou o valor mais elevado de resistência às FQs: 76% (Hendriksen *et al.*, 2008). Esta elevada proporção de resistência poderá estar relacionada com os elevados consumos de FQs em Portugal, já comentados no ponto 2.4. a propósito da Tabela 3.

Diversos estudos reportam taxas de resistência em estirpes de *E. coli* isoladas de espécies animais produtoras de alimentos, com resultados consistentes com o que é observado em estirpes isoladas de humanos. Alessiani e colaboradores (2009), estudaram, em Itália, a

resistência às FQs em isolados de *E. coli* de fezes de bovinos e galinhas resistentes ao AN, não tendo observado nenhum isolado resistente à CIP ou à ENR. Já outro trabalho, na Coreia, reportou uma resistência de 22,7% às FQs (CIP, ENR e norfloxacina) em *E. coli* proveniente de fezes de vitelos de carne diarreicos (Lim *et al.*, 2010). Ružauskas e colaboradores (2010) determinaram os valores de CIM em *E. coli* e *Salmonella enterica* de animais produtores de alimentos (frangos, porcos e bovinos), na Lituânia. Das 137 amostras de *E. coli* analisadas, observou-se uma resistência de 53% e de 34% para AN e CIP, respectivamente. As estirpes de *E. coli* isoladas de frangos registaram a resistência mais elevada, por oposição aos isolados de *E. coli* de origem bovina, cuja resistência ao AN e CIP foi de, respectivamente, 25,9% e 20,7%.

Até à data, pensa-se que *E. coli* proveniente de animais e humanos pertencem a diferentes populações e que, usualmente, *E. coli* provenientes de animais não infectam humanos, excepção feita à *E. coli* O157:H7 e outros serótipos de *E. coli* produtores de toxina “Shiga-like” (Ružauskas *et al.*, 2010). Apesar da frágil base científica sobre esta matéria, a descoberta de que a resistência às quinolonas é uma ameaça transferível alterou o foco da atenção para os elementos responsáveis pela disseminação da resistência a estes antimicrobianos (Hernández *et al.*, 2011). Pode dizer-se que existem dois tipos fundamentais de resistência às quinolonas em bactérias zoonóticas de importância para a Saúde Pública, designadamente a resistência às quinolonas de origem cromossómica e a resistência a estes agentes mediada por plasmídeos (ECDC *et al.*, 2009). Se apenas a resistência decorrente de mutações fosse observada, o único risco para a saúde humana seria o uso das quinolonas em clínica humana, visto que a única fonte de resistência disponível seriam os próprios agentes patogénicos humanos. Uma vez demonstrada a transferência horizontal da resistência às quinolonas, tornou-se evidente que a utilização destes agentes pode acarretar riscos para a saúde humana, mesmo quando usados em processos que não o tratamento de doença humana, como o uso em animais produtores de alimentos, uma vez que as barreiras da transferência de genes entre diferentes espécies de bactérias podem ser ultrapassadas se a pressão selectiva for suficientemente forte. A intensa pressão selectiva de antibióticos, não apenas em ambiente clínico, mas também em agricultura, pecuária e aquacultura, pode favorecer a persistência de populações bacterianas resistentes às quinolonas bem como a transmissão dos seus elementos de resistência (Hernández *et al.*, 2011).

Considerando a importância das FQs, representando uma das classes de antimicrobianos mais prescritas em todo o mundo, e a alarmante emergência de resistência em bactérias patogénicas e bactérias comensais de distintas origens, com relevância tanto em animais como em humanos (Quinn & Markey, 2003; Morgan-Linnell *et al.*, 2009), as estratégias com impacto

significativo na contenção da resistência são urgentes e deverão ter por base o uso racional dos antimicrobianos e a aposta na prevenção e no controlo de infeções. É, pois, fundamental que as autoridades competentes promovam uma medicina veterinária preventiva e o uso prudente destes agentes (WHO, 2011). Considerando a necessidade de tomar acções no sentido de manter a eficácia dos medicamentos veterinários que contêm quinolonas e FQs, o Comité dos Medicamentos para Uso Veterinário (CVMP, “Committee for Medicinal Products for Veterinary Use”) da “European Medicines Agency” (EMA) estabelece duas recomendações. A primeira, recomenda que o uso de FQs seja reservado ao tratamento de condições clínicas cuja resposta ou a expectativa de resposta seja fraca relativamente a outras classes de antimicrobianos; a necessidade do uso profilático deve sempre ser considerada com prudência e preservada para circunstâncias específicas. A segunda recomendação refere que o regime de dosagem das FQs deve ser cuidadosamente determinado com base nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas das FQs de forma a assegurar a óptima eficácia e a redução da selecção de resistência. Esta deverá ser uma acção a ter em consideração no desenvolvimento de novos medicamentos contendo FQs (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

### **3. Resistência aos antimicrobianos: critérios interpretativos clínicos e epidemiológicos**

Variadíssimos métodos, tais como o método de difusão em disco, “E-test”, diluição em agar e microdiluição em caldo, por exemplo, constituem boas opções para a realização de testes de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*. Qualquer que seja o método utilizado, o teste tem que ser realizado de acordo com procedimentos internacionalmente aceites, tais como aqueles preconizados pelos comités “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), “British Society for Antimicrobial Chemotherapy” (BSAC), “Deutsches Institut für Normung e.V.” (DIN), “Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie” (CA-SFM), e o “European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST). De entre estes comités internacionais, o CLSI e o CA-SFM distinguem-se pela produção de documentos separados para o uso em microbiologia humana e veterinária (Schwarz *et al.*, 2010). Importa referir, ainda, que na realização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana é fundamental testar estirpes de referência em paralelo com as estirpes testadas, por razões de controlo de qualidade. Uma lista de estirpes de referência aprovadas está incluída nos documentos produzidos pelas autoridades competentes anteriormente referidas, assim como estão incluídos os valores de CIM e os intervalos de diâmetro do halo aceitáveis, especificando claramente a metodologia e o meio utilizado a que os valores padrão se referem. As estirpes de referência deverão ser relacionadas com as espécies bacterianas testadas. Por exemplo, a

estirpe de referência *E. coli* “American Type Culture Collection” (ATCC) 25922 deve ser usada nos testes com *Enterobactereaceae* (Schwarz *et al.*, 2010).

Os testes de susceptibilidade antimicrobiana procuram categorizar os isolados bacterianos em susceptíveis, intermédios ou resistentes em relação a cada antimicrobiano testado, com base no valor da CIM ou do diâmetro do halo obtidos. Tal classificação requer critérios de interpretação aprovados; actualmente, dois tipos de critérios interpretativos estão disponíveis: critérios (“breakpoints”) clínicos e critérios epidemiológicos (ECOFF, “epidemiological cut-off value”) (Schwarz *et al.*, 2010) Do ponto de vista clínico, a resistência é definida como um estado no qual um paciente, quando infectado por um organismo patogénico específico, é tratado com as dosagens apropriadas do antimicrobiano e esquema de administração do mesmo mas os critérios clínicos de cura não são alcançados. A resistência clínica é definida usando critérios interpretativos clínicos, definidos como o valor de CIM que se correlaciona com o resultado clínico e que separa esses isolados que são considerados como clinicamente susceptíveis ou associados a uma elevada probabilidade de sucesso terapêutico, daqueles considerados clinicamente resistentes ou associados a uma elevada probabilidade de falha terapêutica (Cantón & Morosini, 2011).

Por outro lado, do ponto de vista microbiológico, a resistência é definida como o estado no qual um isolado apresenta um mecanismo de resistência que lhe confere menor susceptibilidade comparativamente a outros membros da mesma espécie que não possuem nenhum mecanismo de resistência. Esta definição é válida independentemente do nível de resistência e não se correlaciona necessariamente com resistência clínica. Isolados que são microbiologicamente resistentes podem ser reconhecidos fenotipicamente recorrendo à aplicação do ECOFF, um valor de CIM que separa a população do tipo selvagem (WT, “wild type”) daqueles isolados que desenvolveram resistência (NWT, “non-wild type”), tanto devido a mutações como por transferência horizontal de genes, independentemente de o nível de resistência ter ou não relevância clínica (Cantón & Morosini, 2011). A ênfase de cada estudo em particular determinará qual o critério a aplicar: clínico ou epidemiológico. Se os dados pretendem orientar determinada abordagem terapêutica, isto é, se o objectivo do estudo é determinar quais os agentes antimicrobianos mais adequados para o sucesso terapêutico, deverão ser aplicados os “breakpoints” clínicos; por outro lado, os ECOFF deverão ser aplicados para descrever distribuições de CIM de bactérias sem contexto clínico (Schwarz *et al.*, 2010). Neste âmbito, também a OIE refere que o critério epidemiológico é mais apropriado para efeitos de monitorização em programas de vigilância. Neste caso, apenas a população bacteriana com resistência adquirida que claramente se desvia da distribuição da população normal susceptível deverá ser designada de resistente (OIE, 2003).

O Laboratório Europeu de Referência para a Resistência Antimicrobiana (EURL-AR, “European Union Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance”) sublinha que a utilização de ECOFF padronizados é essencial para a comparação de resultados de monitorização de susceptibilidade a antimicrobianos (EURL-AR, 2011). A este propósito, o EURL-AR recomenda a utilização dos ECOFF estabelecidos pelo EUCAST, sempre que estes estejam disponíveis, permitindo a categorização das bactérias como WT ou NWT (ver Tabela 7). Para simplificar, o EURL-AR admite que o uso dos termos susceptível e resistente sejam mantidos (EURL-AR, 2011).

Tabela 7. Definições de critérios interpretativos clínicos e critérios epidemiológicos segundo o EUCAST (Adaptado de: <http://www.srga.org/Eucastwt/eucastdefinitions.htm>, último acesso a 7 de Outubro de 2011).

<b>Resistência clínica e critérios clínicos<sup>a</sup></b>
Susceptível (S)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Um microrganismo é definido como susceptível por um nível de actividade antimicrobiana associado a uma elevada probabilidade de sucesso terapêutico</li> <li>• Um microrganismo é categorizado como susceptível (S) aplicando o “breakpoint” apropriado num sistema de teste fenotípico definido</li> <li>• Este “breakpoint” pode ser alterado se se verificarem mudanças legítimas nas circunstâncias</li> </ul>
Intermédio (I)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Um microrganismo é definido como intermédio por um nível de actividade antimicrobiana do agente associada a um efeito terapêutico incerto. Implica que uma infecção causada por um isolado deve ser adequadamente tratada nos locais do organismo onde o fármaco tem concentração adequada ou quando uma dose elevada do mesmo pode ser usada; indica, ainda, uma zona intermédia que previne que os factores menores não controlados e técnicos causem discrepâncias relevantes na interpretação</li> <li>• Um microrganismo é categorizado como tendo resistência intermédia (I) aplicando o “breakpoint” apropriado num sistema de teste fenotípico definido</li> <li>• Este “breakpoint” pode ser alterado se se verificarem mudanças legítimas nas circunstâncias</li> </ul>
Resistente (R)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Um microrganismo é definido como resistente por um nível de actividade antimicrobiana associado a uma elevada probabilidade de falha terapêutica</li> <li>• Um microrganismo é categorizado como tendo resistência (R) aplicando o “breakpoint” apropriado num sistema de teste fenotípico definido</li> <li>• Este “breakpoint” pode ser alterado se se verificarem mudanças legítimas nas circunstâncias</li> </ul>

Tabela 7. (continuação).

<b>Resistência microbiológica e critérios epidemiológicos<sup>b</sup></b>
“Wild type” (WT)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Um microrganismo é definido como WT para uma espécie pela ausência de mecanismos adquiridos e mutacionais de resistência ao fármaco em causa</li> <li>• Um microrganismo é categorizado como WT para uma espécie aplicando o critério (“cut-off”) apropriado num sistema de teste fenotípico definido</li> <li>• Este critério não é alterado independentemente das circunstâncias</li> <li>• Os microrganismos WT podem ou não responder clinicamente ao tratamento com o antimicrobiano</li> </ul>
Resistência microbiológica ou “non-wild type” (NWT)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Um microrganismo é definido como NWT para uma espécie pela presença de um mecanismo adquirido ou mutacional de resistência ao fármaco em causa</li> <li>• Um microrganismo é categorizado como NWT para uma espécie aplicando o critério apropriado num sistema de teste fenotípico definido</li> <li>• Este critério não é alterado independentemente das circunstâncias</li> <li>• Os microrganismos NWT podem ou não responder clinicamente ao tratamento com o antimicrobiano</li> </ul>

<sup>a</sup>Valores apresentados como  $S \leq x$  mg/l;  $I > x$ ,  $\leq y$  mg/l;  $R > y$  mg/l.

<sup>b</sup>Valores apresentados como  $WT \leq z$  mg/l e  $NWT > z$  mg/l.

O uso dos critérios epidemiológicos estabelecidos pelo EUCAST e a separação da população bacteriana WT da população que apresenta mecanismos de resistência (NWT) foi recentemente adoptado por vários laboratórios, fundamentalmente com propósitos de monitorização (Cavaco & Aarestrup, 2009). A Tabela 7 ilustra a população WT separada pelo ECOFF correspondente de uma população bacteriana com mecanismos de resistência. Esta tabela inclui também os valores correspondentes aos “breakpoints” clínicos (susceptível, intermédio e resistente) segundo os critérios estabelecidos por dois dos principais comités que estabelecem linhas orientadoras nesta matéria: CLSI e EUCAST. Neste exemplo, observa-se que a população clinicamente susceptível inclui a população WT e parte da população microbiologicamente resistente. Importa salientar que os critérios clínicos (tal como definidos pelo CLSI e EUCAST) não tentam detectar os organismos resistentes e são definidos, basicamente, para o tratamento de pacientes. Deste modo, uma bactéria pode possuir um mecanismo de resistência e ainda assim ser susceptível do ponto de vista clínico, embora possa ser considerado microbiologicamente resistente.

Dada a sua transferibilidade e a possibilidade de causarem aumentos na resistência que podem afectar a resposta clínica ao tratamento, a detecção de resistência mediada por plasmídeos às

quinolonas deve ser efectuada de forma rotineira. A detecção de resistência às quinolonas pode ser facilitada através da selecção de fármacos que sejam mais adequados para uso em testes de susceptibilidade e pelo reconhecimento dos fenótipos esperados, isolados que poderão ser posteriormente estudados no âmbito genotípico (Cavaco & Aarestrup, 2009). Aquando da monitorização de resistência às quinolonas, o AN deve ser usado como um marcador de reduzida susceptibilidade causada por mutações cromossómicas. Além disso, e devido à recente preocupação com a emergência de RQMP em *Enterobacteriaceae*, a determinação de CIMs de FQs como a CIP e a interpretação segundo os ECOFF definidos pelo EUCAST devem ser usados (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007). Neste contexto, resultados de um trabalho de Cavaco e colaboradores (2008) indicam que a análise fenotípica permite a separação da população WT das estirpes com resistência de baixo nível apresentando apenas uma mutação cromossómica num gene-alvo das quinolonas usando os ECOFF definidos pelo EUCAST. Os autores deste estudo sugerem ainda que o uso do AN para análise demonstrou ser útil para detecção de mutantes de primeira linha (Cavaco *et al.*, 2008). Refira-se, no entanto, que o uso do AN pode não ser apropriado para a detecção dos recentemente descritos determinantes de resistência mediados por plasmídeos que não afectam a CIM de AN da mesma forma que as mutações nas topoisomerasas. Além disso, se os testes de susceptibilidade forem analisados à luz das linhas orientadoras do CLSI, os isolados que expressem estes mecanismos de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos seriam classificados como susceptíveis, uma vez que medeiam uma redução na susceptibilidade às quinolonas que se situa abaixo dos critérios clínicos actuais. A sua relevância clínica é, contudo, ainda pouco clara (Cavaco & Aarestrup, 2009).

No que respeita à comparação de taxas (percentagens) de resistência entre diferentes estudos publicados, os autores deverão assegurar que as mesmas metodologias e os mesmos critérios interpretativos são usados (Schwarz *et al.*, 2010). De ressaltar, ainda, que de forma a aumentar a velocidade e fidedignidade dos testes de resistência a antimicrobianos, o uso de uma abordagem genotípica tem sido defendido (Wheat, 2001).

#### **4. Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas**

Três mecanismos de resistência às quinolonas são actualmente reconhecidos: mutações que alteram as regiões-alvo das quinolonas, mutações que reduzem a acumulação do fármaco no interior da célula e plasmídeos que protegem as células bacterianas dos efeitos letais das quinolonas (Jaboby, 2005; Xia *et al.*, 2010; Cavaco *et al.*, 2008). No entanto, os mecanismos de resistência às FQs não afectam igualmente as CIMs de todas as FQs; em geral, as CIMs de

CIP e de norfloxacin são afectadas por todos estes mecanismos, enquanto as CIMs de LEV e de gatifloxacin são menos afectadas (Morgan-Linnell *et al.* 2009).

Inicialmente acreditava-se que as mutações nos genes que codificam as proteínas-alvo ou os transportadores seriam os únicos mecanismos que conferiam resistência às quinolonas. Esta proposta baseava-se na informação até então disponível relativamente à origem dos genes de resistência, que se pensavam adquiridos pelas bactérias após a introdução dos antimicrobianos para o tratamento de infecções. Foi inclusivamente descrito que as famílias de plasmídeos presentes em microrganismos patogénicos humanos antes e depois o uso clínico de antimicrobianos eram semelhantes (Hernández *et al.*, 2011).

Mesmo após a descoberta de outros mecanismos de resistência às quinolonas além das mutações nos genes-alvo, permanecia o consenso geral de que os determinantes de resistência em plasmídeos ou transposões não deveriam ser considerados e que a contribuição dos genes de transferência horizontal para a resistência às quinolonas era negligenciável. Esta previsão era assente na ideia de que as bactérias não necessitavam de expressar elementos de resistência às quinolonas devido à origem sintética destes fármacos. Tal previsão caiu por terra, mais tarde, quando Martínez-Martínez e colaboradores (1998) demonstraram *in vitro* que a resistência às quinolonas por transmissão horizontal de genes codificados em plasmídeos era possível. O plasmídeo pMG252, responsável por mediar o baixo nível de resistência às quinolonas observado, foi descoberto numa estirpe de *K. pneumoniae* isolada em Julho de 1994 da urina de um paciente no Alabama e foi nomeado *qnr*. Seguiu-se a descoberta de outros genes de RQMP, tendo sido descritas, até à data, cinco famílias de genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* e *qnrD*). Mais tarde, outros genes de resistência transferíveis foram identificados como responsáveis por reduzida susceptibilidade às quinolonas: a variante *cr* da acetiltransferase de aminoglicosídeos (*aac(6')-Ib-cr*) e, por último, um mecanismo de extrusão de quinolonas mediado pelos genes codificantes de bomba de efluxo *qepA* ou *oqxAB* que, embora maioritariamente codificado em cromossomas, também pode ter origem plasmídica. Estes mecanismos de RQMP providenciam um baixo nível de resistência às quinolonas e demonstraram, *in vitro*, facilitar a emergência de mutantes de elevada resistência às quinolonas quando na presença de doses terapêuticas desta classe de antimicrobianos (Périchon *et al.*, 2007; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011b).

A resistência às quinolonas em *Enterobacteriaceae* é maioritariamente mediada por mutações pontuais numa região designada determinante da resistência a quinolonas (QRDR, “quinolone resistance-determining region”) dos genes codificantes da ADN girase e da topoisomerase IV, levando a uma alteração do alvo (Cavaco *et al.*, 2009). Nas bactérias Gram-negativas, a resistência às quinolonas de elevado nível deve-se principalmente a mutações nos genes



codificantes das subunidades da ADN girase *gyrA* e *gyrB* (principalmente em *gyrA*), enquanto mutações nos genes *parC* e *parE*, que codificam as subunidades da topoisomerase IV, são secundárias (Hernández *et al.*, 2011).

O principal mecanismo de resistência às quinolonas é a acumulação de mutações nas enzimas bacterianas alvo das FQs: ADN girase e topoisomerase IV. Geralmente, são necessárias múltiplas mutações para que resulte uma resistência clinicamente relevante, uma vez que os organismos WT são muito susceptíveis. Considerando que as mutações espontâneas duplas constituem eventos genéticos pouco comuns (ocorrendo numa frequência de  $10^{-14}$  a  $10^{-16}$  no caso das FQs), a compreensão tradicional da resistência às quinolonas como um fenómeno mutacional não é suficientemente satisfatória para explicar a frequência da resistência a esta classe de antimicrobianos que se verifica actualmente. Tal fenómeno poderia ser melhor entendido se se considerasse que os elementos transferidos horizontalmente pudessem promover algum grau de reduzida susceptibilidade às quinolonas, suficiente para que os organismos sobrevivessem tempo suficiente face a dada concentração de FQs, dando espaço à ocorrência de mutações sequenciais, mais do que simultâneas (Strahilevitz, Jacoby, Hooper & Robicsek, 2009).

#### **4.1. Resistência às quinolonas mediada por mutações no cromossoma bacteriano**

A resistência às quinolonas mediada por mutações no cromossoma bacteriano está relacionada com genes codificantes das topoisomerases, ADN girase e topoisomerase IV, ou genes estruturais ou regulatórios envolvidos na penetração do composto na célula e/ou eliminação por efluxo activo (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011b). Este mecanismo de resistência às quinolonas surge espontaneamente perante pressão antimicrobiana devido a mutações que resultam em: i) substituições de aminoácidos nas subunidades das enzimas ADN girase (*gyrA*, *gyrB*) e/ou topoisomerase IV (*parC*, *parE*); ii) descréscimo na expressão das porinas da membrana; ou iii) hiperexpressão de bombas de efluxo multi-fármaco (EMEA/CVMP/342/99, 1999).

As mutações nos genes que codificam para a ADN girase e topoisomerase IV constituem o mecanismo mais prevalente de resistência às quinolonas em *Enterobacteriaceae* (Ito *et al.*, 2008; Cavaco *et al.*, 2009). Mutações nos genes *gyrA* e *gyrB*, *parC* e *parE* em regiões que formam o lugar de ligação das FQs, as QRDRs, alteram a estrutura da enzima de um modo que as FQs se tornam incapazes de se ligar a este locais-alvo. Mutações simples afectam primeiramente as quinolonas mais antigas, como o AN. Nestes casos, a CIM do AN varia entre 64 e 128 mg/l, enquanto as CIMs das FQs variam geralmente entre 0,25 e 1,0 mg/l. Este nível de resistência às FQs é usualmente considerado epidemiológico e não clínico. Mutações

adicionais são requeridas para redução da susceptibilidade às FQs mais antigas (flumequina) bem como às mais recentes (CIP, LEV, ENR, danofloxacina, difloxacina, marbofloxacina). Estas mutações adicionais resultam, frequentemente, no desenvolvimento de resistência clínica, com valores de CIM para as FQs superiores a 2 mg/l (ECDC *et al.*, 2009).

Nas bactérias Gram-negativas, a ADN girase é mais susceptível à inibição pelas quinolonas do que a topoisomerase IV, enquanto nas bactérias Gram-positivas, a topoisomerase IV é usualmente o alvo primário destes agentes. Consequentemente, nas bactérias Gram-negativas as mutações que conferem resistência ocorrem primeiro no gene *gyrA* e nas bactérias Gram-positivas ocorrem primeiro no gene *parC* (Jacoby, 2005). Em ambos os casos, o nível final de resistência está directamente relacionado com o número total de mutações (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011b). Pelo menos três mutações, duas das quais no gene *gyrA*, são requeridas para alcançar resistência de acordo com os critérios clínicos definidos pelo CLSI e as CIMs de mutantes quádruplos são 10 vezes mais elevadas do que as dos triplos mutantes (Morgan-Linnell *et al.*, 2009). Mutações equivalentes nas subunidades B, da ADN girase, e E, da topoisomerase IV, têm sido descritas, embora pareçam ser clinicamente menos relevantes (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011b). Deste modo, a resistência envolve substituições de aminoácidos nas QRDRs e no caso específico da ADN girase de *E. coli*, ocorre entre os nucleótidos 201 e 230 e codifica resíduos de aminoácidos entre as posições 67 e 106 no gene *gyrA*, com locais preferenciais para ocorrência de mutações nos aminoácidos situados nas posições 83 e 87 (Jacoby, 2005; Ito *et al.*, 2008). As mutações nos genes que codificam a topoisomerase IV, particularmente no gene *parC*, ocorrem geralmente nas posições 78, 80 e 84 dos aminoácidos, com substituição da glicina por aspartato, serina por arginina ou isoleucina e glicina por aspartato, respectivamente (Ito *et al.*, 2008). Uma vez ocorrida uma primeira mutação que confira reduzida susceptibilidade da ADN girase num organismo Gram-negativo, mutações adicionais nos genes *gyrA*, *gyrB* ou *parC* podem ocorrer, aumentando a resistência (Jacoby, 2005). De referir, ainda, que as mutações de resistência no gene *parE* são muito menos frequentes, embora a substituição de leucina por histidina tenha sido descrita na posição 445 (Silva, 2002; Ito *et al.*, 2008).

Além das mutações nas QRDRs, a caracterização de bombas de efluxo multi-fármaco, codificadas no genoma de todas as bactérias, abriu novas portas para a compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência às quinolonas. Notavelmente, apesar da sua origem sintética, as quinolonas estão entre os substratos mais comuns destas bombas. Bombas de efluxo multi-fármaco codificadas cromossomicamente são usualmente expressas a um muito baixo nível, como consequência da actividade de reguladores da transcrição específicos. Esta expressão de baixo nível é, porém, suficiente para permitir que bombas de efluxo multi-

fármaco contribuam para a resistência intrínseca às quinolonas. A hiperexpressão destas bombas de efluxo não origina elevados níveis de resistência, resultando geralmente em pequenos aumentos nas CIMs. Existem, contudo, algumas exceções, como a *SmeDEF* presente na *Stenotrophomonas maltophilia*; neste organismo, elevados níveis de resistência são conseguidos em mutantes através da hiper-expressão desta bomba de efluxo. Adicionalmente, a combinação da expressão de diferentes bombas de efluxo no mesmo organismo pode resultar no aumento da resistência às quinolonas. Finalmente, alguns estudos demonstraram que a máxima resistência às quinolonas é conseguida quando ambos os mecanismos, mutações nos genes-alvo e sistemas de bombas de efluxo multi-fármaco, estão presentes ao mesmo tempo. Tais evidências indicam que a combinação de mecanismos que reduzam a concentração intracelular de quinolonas para o desenvolvimento de elevada resistência não deve ser subestimada (Hernández *et al.*, 2011).

Até à data, as bombas de efluxo responsáveis pela extrusão de quinolonas foram descritas tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas, tendo sido demonstrado que os transportadores capazes de extrusar quinolonas pertencem a quatro das cinco famílias de sistemas de multirresistência: a família ATP “binding cassette” (ABC); a “major facilitator superfamily” (MFS); a família “resistance-nodulation division” (RND); e a família “multidrug and toxic compound extrusion” (MATE). Na maioria dos casos, as quinolonas são bombeadas por sistemas de bombas de efluxo multi-fármaco com relativa baixa especificidade para o substrato, conferindo um baixo nível de resistência às quinolonas quando em hiperexpressão. Apenas nalguns casos, como o gene *NorC* no *Staphylococcus aureus* ou *Rv1634* em *Mycobacterium tuberculosis*, a especificidade foi demonstrada para as quinolonas; dada a natureza sintética destes antimicrobianos, o papel primário destes sistemas de efluxo deverá ser outro que não a extrusão de FQs (Hernández *et al.*, 2011).

Nas *Enterobacteriaceae*, a perda de porina constitui outro mecanismo envolvido na resistência intrínseca (usualmente de baixo nível) às quinolonas. A hiperexpressão destes sistemas, geralmente determinados por mutações nos genes reguladores, aumentam o nível de resistência. Curiosamente, algumas mutações nos genes reguladores decrescem a expressão das porinas e aumentam simultaneamente a actividade das bombas de efluxo, alcançando assim o efeito sinérgico de aumento da resistência. Além dos mecanismos referidos, foram descritos recentemente genes cromossómicos relacionados com os genes *qnr*, geralmente mediados por plasmídeos, em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, contribuindo de igual modo para a resistência intrínseca (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011b).

#### 4.2. Resistência às quinolonas mediada por plasmídeos

Os genes de RQMP alcançaram distribuição global numa variedade de ambientes plasmídicos e géneros de bactérias, com três diferentes mecanismos de resistência reportados até então (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011a). A RQMP, particularmente reconhecida em *Enterobacteriaceae* (Gay *et al.*, 2011; Sjölund-Karlsson *et al.*, 2009), foi primeiramente observada por Martínez-Martínez *et al.* (1998), tendo sido demonstrado que a resistência às quinolonas por transmissão horizontal de genes era possível. O gene codificante do plasmídeo responsável pelo fenótipo de resistência observada foi nomeado *qnr* e, mais tarde, renomeado *qnrA1* (Strahilevitz *et al.*, 2009). Mammeri e colaboradores (2005) reportaram a primeira detecção de RQMP em *E. coli* na Europa e até à data são conhecidas cinco famílias de genes *qnr* descritas em plasmídeos: além do referido *qnrA*, *qnrB* (Jacoby *et al.*, 2006), *qnrS* (Hata *et al.*, 2005), *qnrC* (Wang, Xu, Wu, Zhu & Wang, 2009a) e *qnrD* (Cavaco *et al.*, 2009). Nos últimos anos, elementos adicionais de RQMP foram descritos, indicando que ainda se está longe de compreender totalmente os mecanismos na origem deste fenótipo. Entre estes novos mecanismos, encontram-se o gene *aac(6')-Ib-cr*, uma variante da acetiltransferase de aminoglicosídeos capaz de reduzir a actividade da CIP e da norfloxacin (Robicsek *et al.*, 2006a), e duas bombas de efluxo codificadas por plasmídeos, a saber, *qepA* (Yamane *et al.*, 2007) e *oqxAB* (Hansen, Jensen, Sorensen & Sorensen, 2007).

Desde a descoberta do gene *qnr*, em 1998, muitos trabalhos se seguiram para descrever este e outros genes de RQMP, alguns dos quais descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Prevalência dos genes de RQMP (*qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA*).

Prevalência de genes de RQMP [% (n)]							Ano de colheita	Isolados (origem)	N.º de estirpes	Referência
<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qepA</i>				
18(6)	-	-	-	-	-	-	1994-1995	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> and <i>Klebsiella</i> spp. (humanos)	33	Jacoby, Chow & Waites (2003)
0,7(3)	-	-	-	-	-	-	1990s?	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> (humanos)	425	Rodríguez-Martínez, Pascual, García & Martínez-Martínez (2003)
0,4(1)	4,8(13)	4,8(13)	-	-	0,4(1)	0	1996-2006	<i>Salmonella</i> não-typhi (humanos)	273	Gay <i>et al.</i> (2006), Sjolund- Karlsson <i>et al.</i> (2009)
7,3(8)	-	-	-	-	-	-	1999-2002	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> (humanos)	110	Wang, Sahm, Jacoby & Hooper (2004a)
10,9(34)	12,5(39)	0	-	-	14(44)	-	1999-2004	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp. (humanos)	313	Park, Robicsek, Jacoby, Sahm & Hooper (2006), Robicsek, Strahilevitz, Sahm, Jacoby & Hooper (2006)
0	-	-	-	-	≈25(?)	-	1999-2004	<i>E. coli</i> (humanos)	78	Morgan-Linnell, Boyd, Steffen & Zechiedrich (2009)
1,5(2)	4,5(6)	0,7(1)	-	-	0,7(1)	-	2007	<i>Enterobacteriaceae</i> (humanos)	134	Castanheira, Mendes, Rhomberg & Jones (2008)

Tabela 8. (continuação).

2,4(1)	2,4(1)	0	-	-	0	0	2006-2007	<i>K. pneumoniae</i> (humanos)	42	Endimiani <i>et al.</i> (2008)
2,9(3)	-	0	-	-	-	-	2000-2002	<i>Enterobacteriaceae</i> (humanos)	102	Poirel <i>et al.</i> (2006b)
0	0	0	-	-	4,1(6)	-	2004	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>M. organii</i> (humanos)	148	Pitout, Wei, Church & Gregson (2008)
0	0,2(1)	0,7(3)	-	-	13(55)	-	2007	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>M. organii</i> (humanos)	416	Pitout, Wei, Church & Gregson (2008)
0,4(1)	0	0	-	-	0	-	2003	<i>E. coli</i> (humanos)	257	Minardi, Van De Loo, Poirel, Martinez-Martinez, & Nordmann (2005)
0	4,9(9)	0	-	-	5,4(10)	-	2002-2005	<i>E. coli</i> (humanos)	183	Pallecchi <i>et al.</i> (2009)
0	44,4(8)	0	-	-	-	-	Não especificado	<i>Enterobacteriaceae</i> (humanos)	18	Quiroga <i>et al.</i> (2007)
-	-	-	-	-	2,9(2)	-	2006	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp, outras <i>Enterobacteriaceae</i> (humanos)	68	Cordeiro <i>et al.</i> (2008)
-	-	-	-	-	95,3(41)	-	2000-2006	<i>E. coli</i> (humanos)	43	Coque <i>et al.</i> (2008)

Tabela 8. (continuação).

0,2(1)	-	-	-	-	-	-	1997-1998	<i>Enterobacteriaceae</i> (humanos)	514	Paauw, Fluit, Verhoef & Leverstein-van Hall (2006)
1,5(2)	-	-	-	-	-	-	2000-2003	<i>Enterobacteriaceae</i> (humanos)	136	Jonas, Biehler, Hartung, Spitzmuller & Daschner (2005)
-	-	-	-	-	4(3)	-	1999-2001	<i>E. coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp., Citrobacter spp., P. mirabilis, S. marcescens</i> (humanos)	75	Fihman <i>et al.</i> (2008)
0,2(1)	0	0	-	-	-	-	2002	<i>Salmonella não-typhi</i> (humanos)	516	Cattoir, Weill, Poirel, Fabre, Soussy & Nordmann (2007c) Cattoir, Poirel & Nordmann (2007b), Mammeri, Van De Loo, Poirel, Martinez-Martinez & Nordmann (2005), Poirel, Leviandier & Nordmann (2006), Poirel, Van De Loo, Mammeri & Nordmann (2005)
1,3(5)	0,5(1)	2,2(8)	-	-	-	-	2002-2005	<i>E. coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp., Citrobacter spp., Proteus spp., P. stuartii, S. marcescens, M. organii, S. enterica serovar Typhimurium</i> (humanos)	371	
1,9(28)	-	-	-	-	-	-	2002-2005	<i>E. coli, Klebsiella spp., E. cloacae, E. aerogenes, C. freundii, C. koseri, Proteus spp., Serratia spp., M. organii</i> (humanos)	1466	Cambau <i>et al.</i> (2006)
0	0	2(1)	-	-	1	-	2002-2005	<i>Aeromonas spp.</i> (ambiente)	50	Picaño <i>et al.</i> (2008)

Tabela 8. (continuação).

0	0	0	-	-	33,8(25)	-	2000-2005	<i>Klebsiella</i> spp. (humanos)	74	Avgustin, Keber, Zerjavic, Orazem, & Grabnar (2007)
0	4,3(7)	0	-	-	31,9(52)	-	2000-2005	<i>Enterobacteriaceae</i> (humanos)	163	Sabtcheva, Kaku, Saga, Ishii & Kantardjiev (2009)
3(7)	0,8(2)	0,4(1)	-	-	8(19)	-	2002-2006	<i>K. pneumoniae, E. coli, Enterobacter</i> spp., <i>C. freundii</i> (humanos)	237	Szabo <i>et al.</i> (2008)
31,9(15)	-	-	-	-	-	-	2003-2005	<i>K. pneumoniae, E. coli, E. cloacae, C. freundii, M. morgani</i> (humanos)	47	Corkill, Anson & Hart (2005)
0	0	5,1(6)	-	-	-	-	1993-2005	<i>Salmonella enterica</i> (humanos)	118	Hopkins, Wootton, Day & Threlfall (2007)
0	0	0,4(1)	-	-	5,7(13)	-	2000-2005	<i>E. coli</i> (humanos)	227	Jones <i>et al.</i> (2008)
0,8(1)	0	0,8(1)	-	-	9,7(12)	-	1996-2006	<i>E. coli</i> (humanos e porcos)	124	Cavaco <i>et al.</i> (2008)
0	7,7(3)	79,5(31)	-	-	0	-	1999-2006	<i>Salmonella</i> spp. (humanos, frangos, porcos, vitelos, outros animais)	39	García-Fernaández, Fortini, Veldman, Mevius & Carattoli (2009), Veldman, van Pelt & Mevius (2008)
94(78)	-	-	-	-	-	-	2001-2003	<i>E. cloacae</i> (humanos)	83	Paauw, Fluit, Verhoef & Leverstein-van Hall (2006)
0	2,7(8)	1,3(4)	-	-	-	-	1999-2007	<i>Enterobacteriaceae</i> (humanos)	301	Fang <i>et al.</i> (2009)



Tabela 8. (continuação).

4,6(14)	0	0,3(1)	-	-	-	-	2003-2004	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>E. cloacae</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Salmonella</i> não-typhi, <i>Hafnia alvei</i> , <i>Raoultella ornithinolytica</i> , <i>M.</i> <i>morganii</i> (humanos)	305	Lavilla <i>et al.</i> (2008)
0	1(2)	11(22)	-	-	1,5(3)	-	2004-2005	<i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> (humanos)	200	Cano <i>et al.</i> (2009)
0	1,6(1)	0	-	-	-	-	2004-2006	<i>E. coli</i> (animais de companhia)	61	Pomba, da Fonseca, Baptista, Correia & Martínez-Martínez (2009)
4,1(2)	-	-	-	-	-	-	2002-2004	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i> (humanos)	49	Nazic, Poirel & Nordmann (2005)
6,4(5)	0	0	-	-	-	-	2001	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> (humanos)	78	Oktem, Gulay, Bicmen & Gur (2008)
0	4,7(3)	0	-	-	-	-	2002-2004	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Proteus</i> <i>mirabilis</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>C. freundii</i> , <i>S. marcescens</i> (humanos)	64	Cattoir, Poirel, Rotimi, Soussy & Nordmann (2007a)
1,4(5)	1,1(4)	1,4(5)	-	-	9,9(36)	-	1998-2002	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> (humanos)	362	Jiang <i>et al.</i> (2008)
7,7(6)	-	-	-	-	51,3(40)	-	2000-2001	<i>E. coli</i> (humanos)	78	Robicsek <i>et al.</i> (2006b), Wang <i>et al.</i> (2003)

Tabela 8. (continuação).

1,3(7)	-	-	-	-	-	-	2005	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., outras <i>Enterobacteriaceae</i> , bacilos não-fermentadores (humanos, frangos, porcos, vitelos, outros animais)	541	Veldman, van Pelt & Mevius (2008)
6,2(5)	6,2(5)	8,6(7)	-	-	3,7(3)	-	2005	<i>E. cloacae</i> (humanos)	81	Xiong <i>et al.</i> (2008)
6,8(18)	18,5(49)	13,2(35)	-	-	17(45)	-	2006	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i> (humanos)	265	Yang <i>et al.</i> (2008)
0	6(14)	5,6(13)	-	-	0,9(2)	-	2003-2005	<i>E. coli</i> (frangos, porcos)	232	Yue <i>et al.</i> (2008)
0	2,1(1)	18,8(9)	-	-	12,5(6)	58,3(28)	2005-2006	<i>E. coli</i> (porcos)	48	Liu <i>et al.</i> (2008)
2,4(10)	6,1(25)	14,9(61)	-	-	-	-	2005-2006	<i>K. pneumoniae</i> (humanos)	410	Wang <i>et al.</i> (2008a)
3,8(8)	4,7(10)	3,8(8)	-	-	-	-	2005-2006	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> (humanos)	213	Wang <i>et al.</i> (2008b)
0,9(2)	0,5(1)	0,5(1)	-	-	8,1(18)	-	2006	<i>Salmonella</i> não-typhi (humanos)	221	Cui <i>et al.</i> (2009)
0	3,2(101)	1,3(40)	-	-	-	-	1999-2005	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> (humanos)	3182	Wu, Ko, Wu & Yan (2008b)
0	0,4(2)	0,4(2)	-	-	-	-	2003-2006	<i>Salmonella</i> não-typhi (humanos)	446	Wu <i>et al.</i> (2008a)

Tabela 8. (continuação).

0,6(3)	10,1(53)	6,5(34)	-	-	-	-	2004	<i>E. cloacae</i> (humanos)	526	Wu, Ko, Tsai & Yan (2007)
24,4(11)	-	-	-	-	-	-	1999	<i>Enterobactereaceae</i> (humanos)	45	Poirel, Van De Loo, Mammeri. & Nordmann (2005b)
1,3(6)	8,4(39)	2,8(13)	-	-	2,2(10)	2,2(10)	1998-2001, 2005-2006	<i>K. pneumoniae, E. coli, E. cloacae</i> (humanos)	461	Kim <i>et al.</i> (2009c)
1,1(4)	36,7(135)	0,5(2)	-	-	-	-	2004-2006	<i>Enterobactereaceae</i> (humanos)	368	Tamang <i>et al.</i> (2008)
5(32)	12,6(32)	0,3(2)	-	-	-	-	2005	<i>E. cloacae, C. freundii, E. aerogenes, S. marcescens</i> (humanos)	644	Park, Yu, Lee, Oh & Woo (2007)
0	20,3(41)	0	-	-	-	-	2005-2006	<i>K. pneumoniae, E. coli</i> (humanos)	202	Shin <i>et al.</i> (2008)
0	2,6(6)	1,7(4)	-	-	0,4(1)	-	2006	<i>E. coli, Klebsiella spp., Proteus spp., Enterobacter spp., Citrobacter spp., M. organii, Salmonella spp., S.marcescens, Aeromonas spp., P. aeruginosa, A. baumannii, P. fluorescens, Edwardsiella tarda</i> (animais de zoo: mamíferos, repteis, aves)	232	Ahmed <i>et al.</i> (2007)
0	5,2(6)	0	-	-	-	-	2008	<i>K. pneumonia</i> (humanos)	116	Teo, Ng & Lin (2009)

Tabela 8. (continuação).

4,3(1)	-	0	-	-	-	-	2002	<i>Enterobacteriaceae</i> (humanos)	23	Rodriguez-Martinez, Poirel, Pascual & Nordmann (2006)
0	0	0	-	-	62,5(10)	-	1997-2002	<i>K. pneumoniae, E. coli</i> (humanos)	16	Kanj <i>et al.</i> (2008)
0,9(11)	2(25)	0,6(7)	-	-	-	-	1990-2005	<i>K. pneumoniae, E. cloacae, E. aerogenes</i> (humanos)	1258	Kim <i>et al.</i> (2009b)
0,1(1)	0	0	-	-	4,5(32)	-	1991-2005	<i>E. coli</i> (humanos)	718	Warburg <i>et al.</i> (2009)
0	0	0	-	-	12,7(6)	-	2000-2006	<i>K. pneumoniae</i> (humanos)	47	Chmelnitsky, Hermesh, Navon- Venezia, Strahilevitz & Carmeli (2009)
0	0	0	-	-	-	2(0,3%)	2002-2006	<i>E. coli</i> (humanos)	751	Yamane, Wachino, Suzuki & Arakawa (2008)
0	0	4,3(2)	-	-	25,5(12)	0	2006	<i>Enterobacteriaceae</i> (humanos)	47	Crement <i>et al.</i> (2011)
4,3(12)	9,2(26)	2,5(7)	-	-	0	0	2005-2007	<i>Enterobacteriaceae</i> (humanos)	281	Dahmen, Poirel, Mansour, Bouallegue & Nordmann (2009)
17,6(3)	64,7(11)	0	-	-	35,3(6)	0	2001-2007	<i>Enterobacter</i> spp. (animais de companhia)	17	Gibson <i>et al.</i> (2009)
2,9(2)	8,6(6)	1,4(1)	-	-	0	0	2007	<i>Enterobacteriaceae</i> (humanos)	70	Castanheira, Mendes, Rhomberg & Jones (2008)

Tabela 8. (continuação).

0	0	0	0	0	12,8(6)	0	2004-2006	<i>K. pneumonia</i> (humanos)	47	Chmelnitsky, Hermesh, Navon- Venezia, Strahilevitz & Carmeli (2009)
-	-	-	-	-	-	0,6(4)	2006-2007	<i>E. coli</i> (humanos)	621	Kim <i>et al.</i> (2009a)
0,9(1)	0	19,3(22)	-	-	47,4(54)	4(4)	2008	<i>Enterobacteriaceae</i> (humanos)	114	Amin & Wareham (2009)
0,8(4)	3,9(21)	5,1(27)	0	-	11,7(62)	0,75(4)	2001-2007	<i>E. coli</i> (frangos)	532	Huang <i>et al.</i> (2007)
3,3(18)	3,4(19)	20,3(112)	-	-	5,6(31)	0,18(1)	2004-2006	<i>Enterobactereaceae</i> (humanos)	552	Vien <i>et al.</i> (2009)
0	0	1,4(1)	-	-	0	0	2003-2006	<i>E. coli</i> (frangos)	73	Cerquetti <i>et al.</i> (2009)
0	4,9(5)	3(3)	-	-	18,8(19)	15,8(16)	2003-2007	<i>Enterobactereaceae</i> (cães, gatos, patos, porcos, perdizes, frangos)	101	Ma <i>et al.</i> (2009)
0	0	0	-	-	44,4(8)	5,6(1)	2005-2006	<i>E. coli</i> (humanos)	18	Baudry <i>et al.</i> (2009)
0	0	10(11)	-	-	-	-	2006-2007	<i>E. coli</i> (humanos)	113	Vasilaki <i>et al.</i> (2008)
0	2,3(6)	0	-	-	0	0	2000-2005	<i>E. coli, C. freundii, K., pneumoniae</i> (humanos)	257	Minarini, Poirel, Cattoir, Darini & Nordmann (2008)

Tabela 8. (continuação).

1,8(5)	1,4(4)	2,6(7)	-	-	1,1(3)	-	2007	Bactérias Gram-negativas (aquacultura)	274	Ishida <i>et al.</i> (2010)
0	0,6(1)	2,9(5)	0	0,6(1)	0,6(1)	2,9(5)	2002	<i>E. coli</i> (porcos, frangos, humanos, ambiente)	172	Zhao <i>et al.</i> (2010)
1,6(1)	0	1,6(1)	0	0	45,9(28)	5,7(4)	2008-2009	<i>E. coli</i> (humanos)	61	Nasik <i>et al.</i> (2011)
1,7(6)	11,5(40)	0,3(1)	-	-	-	-	2006	<i>K. Pneumoniae, E.coli, E. cloacae,</i> <i>C. freundii, E. aerogenes</i> (humanos)	347	Jeong <i>et al.</i> (2011)
0	7,5(3)	17,5(7)	-	-	-	5(2)	2006-2008	<i>E. coli</i> (humanos)	40	Namboodiri, Opintan, Lijek, Newman & Okeke (2011).
0,4(2)	1,2(6)	2,7(14)	0	0	8,2(42)	0	2002-2008	<i>E. coli</i> (humanos)	514	Zhou <i>et al.</i> (2011)

---

Os diversos trabalhos no âmbito da prevalência de determinantes de RQMP descritos na Tabela 8 evidenciam, desde logo, que os determinantes de RQMP *qnr* e *aac(6')-Ib-cr* estão amplamente distribuídos em isolados de origem humana da família das *Enterobacteriaceae*. Por outro lado, um menor número de trabalhos acerca da prevalência do gene *qepA* e *oqxAB* estão disponíveis. Outra observação que importa destacar, face à informação reunida na Tabela 8, é o aparente aumento da incidência de genes *qnr* nos últimos anos em estirpes bacterianas de diferentes origens. De referir, também, que poucos estudos no âmbito da ocorrência de determinantes de RQMP entre bactérias provenientes de animais de companhia e animais produtores de alimentos têm sido publicados, sendo manifesta a existência de um maior número de relatos de prevalência destes genes em isolados de origem humana (maioritariamente isolados clínicos), por comparação com fontes ambientais e de origem animal. Salienta-se que a identificação destes genes em bactérias do ambiente levou à sugestão de que estas bactérias possam constituir a reserva ambiental dos genes de resistência às quinolonas (Hernández *et al.*, 2011). É, ainda, evidente que a *E. coli* constitui a espécie mais comum na pesquisa destes genes. Apesar disso, os genes *qnr* são reportados em maior número entre *Enterobacter* spp. e em *Klebsiella* spp., comparativamente a estirpes de *E. coli* (Strahilevitz *et al.*, 2009). Já no que concerne a variante *cr* da acetiltransferase de aminoglicosídeos, é reportada a sua maior prevalência entre estirpes de *E. coli* (Strahilevitz *et al.*, 2009).

A RQMP é frequentemente encontrada em isolados produtores de ESBL (18% a 56%) (Wang *et al.*, 2004a). A associação de *qnr* e *aac(6')-Ib-cr* com ESBL e AmpC  $\beta$ -lactamases tem sido documentada (Rodríguez-Martínez, Pascual, Garcia & Martínez-Martínez, 2003; Mammeri *et al.*, 2005; Lavilla *et al.*, 2008; Tamang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008b; Ma *et al.*, 2009). Vários estudos têm também demonstrado que a maioria dos isolados enterobacterianos *qnr*-positivos estão associados a ESBL, incluindo os tipos TEM, SHV, VEB e CTX-M, que estão, em geral, localizados em plasmídeos altamente transferíveis e que podem armazenar genes de resistência a diferentes grupos de antimicrobianos, tais como  $\beta$ -lactâmicos e FQs, ambos frequentemente prescritos em clínica para o tratamento de infecções do trato urinário por *E. coli* (Pitout, 2008; Jeong *et al.*, 2011; Nasik *et al.*, 2011).

Os genes de RQMP conferem baixo nível de resistência às quinolonas, no entanto, contribuem para alargar a janela de selecção de mutantes (MSW, “mutant selection window”) (Cavaco *et al.*, 2008). Além do conceito de CIM, nos últimos anos, especial atenção tem sido atribuída a diferentes conceitos, incluindo o MSW, que compreende um intervalo de concentrações em que as bactérias resistentes podem ser seleccionadas sob pressão selectiva de antimicrobianos. Outro conceito, a concentração de prevenção de mutação (MPC, “mutant

prevention concentration”), corresponde ao valor de concentração de um antimicrobiano que restringe a emergência de mutantes resistentes dentro de uma população susceptível. O MPC é, por isso, superior à CIM, enquanto o MSW corresponde a um valor entre a CIM e o MPC. Ambos os conceitos podem ser aplicados a mecanismos de resistência por transferência horizontal de genes (Cantón & Morosini, 2011). Rodríguez-Martínez *et al.* (2007) demonstraram, *in vitro*, que o gene *qnrA* aumenta o valor de MPC de FQs em *E. coli* e *K. pneumoniae*. Luo *et al.* (2011), demonstraram também que o MPC de CIP foi significativamente aumentado quando os genes de RQMP (nomeadamente, os genes *qnrB4*, *qnrS1*, *aac(6')-Ib-cr*, e *qepA*) estavam presentes juntamente com mutações cromossômicas nos genes *gyrA* e/ou *parC* em *Salmonella* Thyphimurium. Outros exemplos dos efeitos de diferentes mecanismos de RQMP nos valores de CIM e de MPC de CIP em *E.coli* e *Salmonella* Thyphimurium, na ausência e na presença de mutações cromossômicas que afectam a resistência às quinolonas (*gyrA* e *parC*), podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9. Efeitos de diferentes mecanismos de RQMP (*qnrB4*, *qnrS1*, *aac(6')-Ib-cr*, e *qepA*) nos valores de CIM e de MPC de CIP em *E. coli* e *Salmonella* Thyphimurium na ausência e na presença de mutações cromossômicas que afectam a resistência às quinolonas (*gyrA* e *parC*) (Adaptado de: Cantón & Morosini, 2011).

Microorganismo	Mecanismo de resistência		CIP	
	RQMP	Mutações	CIM (mg/L)	MPC (mg/L)
<i>Escherichia coli</i>	-	-	0,002	1
	-	<i>gyrA</i>	0,125	4
	<i>qnrA</i>	-	0,125	8
	<i>qnrA</i>	<i>gyrA</i>	0,5	16
	<i>qnrB</i>	-	0,125	2
	<i>qnrB</i>	<i>gyrA</i>	0,5	8
	<i>qnrS1</i>	-	0,125	4
	<i>qnrS1</i>	<i>gyrA</i>	1	8



Tabela 9. (continuação).

	-	-	0,015	0,125
	-	<i>parC</i>	0,015	0,125
	-	<i>gyrA</i>	0,25	2-4
	-	<i>parC+gyrA</i>	4	64
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	-	0,06	1
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>parC</i>	0,06	1
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>gyrA</i>	1	8-16
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>parC+gyrA</i>	16	128
	<i>qepA</i>	-	0,125	2
<b><i>Salmonella</i></b>	<i>qepA</i>	<i>parC</i>	0,125	2
<b>Thyphimurium</b>	<i>qepA</i>	<i>gyrA</i>	2	32
	<i>qepA</i>	<i>parC+gyrA</i>	16	128
	<i>qnrB4</i>	-	0,5	4
	<i>qnrB4</i>	<i>parC</i>	0,5	4
	<i>qnrB4</i>	<i>gyrA</i>	1-2	16-32
	<i>qnrB4</i>	<i>parC+gyrA</i>	8	64
	<i>qnrS1</i>	-	0,5	2
	<i>qnrS1</i>	<i>parC</i>	0,5	2
	<i>qnrS1</i>	<i>gyrA</i>	1	8-16
	<i>qnrS1</i>	<i>parC+gyrA</i>	8	64

Apesar do baixo nível de resistência promovido pelos genes de RQMP, o seu papel na resistência às quinolonas não deve, pois, ser negligenciado. O nível de resistência em isolados clínicos é com frequência alcançado por combinação de diferentes mecanismos. Além disso, tal como descrito na Tabela 9, a presença de genes *qnr* induz aumentos no MPC, favorecendo a selecção de mutantes resistentes às quinolonas, incluindo aqueles que contêm mutações nos genes-alvo (Hernández *et al.*, 2011). Como tal, para evitar a selecção de resistência, a

concentração de determinado antimicrobiano deverá ser mantida acima do MPC (Briales *et al.*, 2011).

Uma consideração final relaciona-se com a possibilidade de selecção de resistência às quinolonas na ausência de quinolonas. As bombas de efluxo podem actuar sobre outros antimicrobianos além das quinolonas. Assim, a presença de qualquer um destes fármacos irá co-seleccionar resistência às quinolonas (resistência cruzada). O mesmo princípio será aplicável aos elementos de RQMP, uma vez que os plasmídeos usualmente abrigam outros genes de resistência. Logo, a selecção por meio de algum dos antimicrobianos para os quais o plasmídeo confere resistência irá também seleccionar para a resistência às quinolonas (co-resistência) (Hernández *et al.*, 2011).

#### 4.2.1. Genes *qnr*

As proteínas Qnr pertencem à família dos pentapeptídeos repetidos, caracterizados por uma série de repetições de cinco aminoácidos. Nas repetições pentapeptídicas, nenhuma posição é completamente conservada, mas cada um dos resíduos de um pentapeptídeo individual exibe uma propensão para um restrito número de aminoácidos representados por: [Ser, Thr, Ala ou Val][Asp ou Asn][Leu ou Phe][Ser, Thr, ou Arg][Gly] (Jacoby, 2005; Strahilevitz *et al.*, 2009).

Os genes *qnr* codificados por plasmídeos foram já descritos em todos os continentes populados e na maioria das *Enterobacteriaceae* mais comuns em clínica, incluído *E. coli*, *Klebsiella* spp. (*K. pneumoniae* e *K. ocytoca*), *Enterobacter* spp. (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. amnigenus* e *E. sakazakii*), *C. freundii* e *Providencia stuartii*. Entre estas espécies, os genes *qnr* foram mais prevalentes em *Enterobacter* spp., seguido de *Klebsiella* spp. e *E. coli*; nesta última, o gene *aac(6')-Ib-cr* parece ser mais prevalente (Strahilevitz *et al.*, 2009). Além disso, outros genes cromossómicos similares aos *qnr* têm sido descritos, tais como *Vibrio vulnificus qnr*, *Vibrio parahaemolyticus qnr*, *Vibrio cholerae qnr*, *Photobacterium profundum qnr*, *E. faecalis qnr*, e *E. faecium qnr* (Cavaco *et al.*, 2009). As estruturas primárias do *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* são similares, com 9 repetições pentapeptídicas conectadas por uma única glicina, seguida de uma cisteína, com um número variável de unidades (22 no gene *qnrS*, 28 no gene *qnrA* e 29 nos genes *qnrB*, *qnrC* e *qnrD*). Uma vez que a estrutura tridimensional da proteína Qnr ainda não foi resolvida, a contribuição da glicina para a sua função é ainda desconhecida. Da mesma forma, é impossível prever alterações na sua actividade promovidas por alterações na estrutura primária entre as diferentes variantes de *qnr* (Strahilevitz *et al.*, 2009).

Apesar de o gene *qnrA* ter sido o primeiro determinante de RQMP descrito, duas estirpes recolhidas em 1988 que se revelaram positivas para *qnrB* constituem, até à data, os primeiros

genes de RQMP conhecidos (*qnrB8* num isolado de *C. freundii* e *qnrB9* num isolado de *K. pneumoniae*) (Jacoby, Gacharna, Black, Miller & Hooper, 2009).

A clonagem do gene *qnrA* identificado por Martínez-Martínez *et al.* (1998) revelou que se tratava de um produto de 657 pares de bases (pb) e o gene foi depois renomeado *qnrA1* após identificação de proteínas relacionadas (QnrA2-QnrA7) (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011b). Só mais tarde, em 2005, foi descrita outra variante destes genes por Hata e colegas. O gene de RQMP foi denominado *qnrS* e foi isolado de uma estirpe clínica de *Shigella flexneri* 2b durante um surto de intoxicação alimentar no Japão. O gene *qnrS*, contido no plasmídeo pAH0376, apresenta uma semelhança de 59% em relação ao *qnrA* (Hata *et al.*, 2005). A clonagem deste gene identificou uma proteína de 218 aminoácidos e foi nomeada *qnrS1*. Depois disso, outras variantes *qnr* foram já identificadas (*qnrS1-qnrS5*) (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011b).

Jacoby e colaboradores (2006) identificaram o gene *qnrB* num isolado de *K. pneumoniae*, na Índia. Este gene apresenta uma semelhança de 41% em relação ao *qnrA* e 39% em relação ao *qnrS* (Jacoby *et al.*, 2006), e codifica uma proteína de 214 aminoácidos, designada QnrB1 (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011b). Das cinco famílias de genes *qnr* conhecidas até à data, o *qnrB* parece ser o mais prevalente, representa a descoberta de genes *qnr* mais antiga até então documentada e apresenta, ainda, o maior número de alelos (Vetting *et al.*, 2011): *qnrB1-qnrB47* (<http://www.lahey.org/qnrStudies>, último acesso a 24 de Janeiro de 2012). O gene *qnrB* é também único por estar sob regulação do sistema SOS, de modo que a exposição às quinolonas induz a sua expressão (Da Re *et al.*, 2009; Wang, Jacoby, Mils & Hooper, 2009b; Vetting *et al.*, 2011). Neste contexto, refira-se que um estudo de Pomba e colaboradores (2009), em que se avaliou a frequência de genes *qnr* em estirpes de *E. coli* isoladas de casos de infecção do tracto urinário em cães e gatos, identificou o gene *qnrB2* numa estirpe multirresistente, em associação com outros genes de resistência mediados por plasmídeos. Esta constituiu, à data, a primeira descrição da ocorrência de RQMP em estirpes de *E. coli* uropatógenicas em animais de companhia.

Recentemente, foram identificados dois novos genes da família *qnr*: *qnrC*, encontrado num isolado de *Proteus mirabilis*, em 2008 (Wang *et al.*, 2009a), e *qnrD*, descoberto em 2009 num isolado de *Salmonella enterica* de origem humana, proveniente de infecções, na China (Cavaco *et al.*, 2009). O gene *qnrC*, produto de 666 pb, é transportado no plasmídeo pHS9 e codifica uma proteína de 221 aminoácidos. Este gene partilha uma identidade de aminoácidos de 64%, 41%, 59% e 43% com *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrS1* e *qnrD*, respectivamente (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011b). Já *qnrD*, o mais recente gene *qnr*, identificado por Cavaco e colaboradores (2009), demonstrou conferir baixo nível resistência à CIP e susceptibilidade ao

AN, um fenótipo previamente associado à presença de determinantes de resistência às quinolonas transferíveis. Todavia, comparativamente aos genes *qnrA* e *qnrS*, a expressão de *qnrD* resultou num aumento da CIM ligeiramente inferior. A análise filogenética do novo gene comprovou a sua independência dos genes *qnr* conhecidos até à data, evidenciando uma elevada similaridade com variantes dos genes *qnrB* (Cavaco *et al.*, 2009).

Com o propósito de harmonizar os critérios de definição de *qnr*, define-se actualmente *qnr* como um alelo de ocorrência natural, que codifica uma proteína pentapeptídica repetida que confere reduzida susceptibilidade ao AN ou a uma FQ. As famílias *qnr* são definidas por uma diferença  $\geq 30\%$  nos nucleótidos ou aminoácidos derivados. Dentro de cada família, os alelos *qnr* diferem em um ou mais aminoácidos (Strahilevitz *et al.*, 2009). A taxa de identidade de aminoácidos entre as diferentes famílias de proteínas Qnr varia entre 39 a 60% (Sánchez, Hernández, Rodríguez-Martínez, Martínez-Martínez & Martínez, 2008).

Por motivos de organização e ordenação da numeração dos genes *qnr* descobertos, a base de dados das designações de variantes de *qnr* foi estabelecida em <http://www.lahey.org/qnrStudies> (Jacoby *et al.*, 2008), onde os novos alelos identificados vão sendo adicionados (Tabela 10). No que respeita a genes *qnr* presentes nos cromossomas de algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, estes são designados “*qnr* de (um organismo em particular)”, com as iniciais do organismos distinguidas inicialmente sempre que uma abreviação seja requerida (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011b). Por exemplo, Efs*qnr* de *Enterococcus faecalis* (Arsène & Leclercq, 2007), Pp*qnr* de *Photobacterium profundum* (Poirel, Liard, Rodríguez-Martínez & Nordmann, 2005a), Vp*qnr* de *Vibrio parahaemolyticus* (Saga *et al.*, 2005), Vc*qnr* de *Vibrio cholera* (Fonseca, Dos Santos, Vieira & Vicente, 2008), entre outros.

Tabela 10. Nomenclatura das variantes (alelos) de *qnr* (Adaptado de: <http://www.lahey.org/qnrStudies>, último acesso a 24 de Janeiro de 2012)

Variante	N.º de acesso do GenBank Nucleótido	N.º de acesso do GenBank Proteína	Referência
<i>qnrA1</i>	AY070235	AAL60061	Tran & Jacoby (2002)
<i>qnrA2</i>	AY675584	AAT79355	Li <i>et al.</i> (não publicado)
<i>qnrA3</i>	DQ058661	AAZ04782	
<i>qnrA4</i>	DQ058662	AAZ04783	Poirel, Rodriguez-Martinez, Mammeri, Liard & Nordmann (2005)
<i>qnrA5</i>	DQ058663	AAZ04784	

Tabela 10. (continuação).

<i>qnrA6</i>	DQ151889	AAZ78355	Cambau <i>et al.</i> (2006)
<i>qnrA7</i>	GQ463707	ACV83303	Zhou (2010)
<i>qnrB1</i>	DQ351241	ABC86904	Jacoby <i>et al.</i> (2006)
<i>qnrB2</i>	DQ351242	ABC86905	
<i>qnrB3</i>	DQ303920	ABC17629	Robicsek, Strahilevitz, Sahn, Jacoby & Hooper (2006)
<i>qnrB4</i>	DQ303921	ABC17630	
<i>qnrB5</i>	DQ303919	ABC17628	Gay <i>et al.</i> (2006)
<i>qnrB6</i>	EF520349	ABP87778	Ma <i>et al.</i> (não publicado)
<i>qnrB7</i>	EU043311	ABW03156	Cattoir, Poirel, Rotimi, Soussy & Nordmann (2007a)
<i>qnrB8</i>	EU043312	ABW03157	
<i>qnrB9</i>	EF526508	ABP88094	Zhu <i>et al.</i> (não publicado)
<i>qnrB10</i>	DQ631414	ABG56269	Quiroga <i>et al.</i> (2007)
<i>qnrB11</i>	EF653270	ABS30107	Rodriguez-Zulueta <i>et al.</i> (não publicado)
<i>qnrB12</i>	AM774474	CAO82104	Kehrenberg, Friederichs, de Jong & Schwarz (2008)
<i>qnrB13</i>	EU273755	ABX72042	
<i>qnrB14</i>	EU273757	ABX72044	Tamang <i>et al.</i> (2008)
<i>qnrB15</i>	EU302865	ABX72227	
<i>qnrB16</i>	EU136183	ABV66096	Sanchez-Cespedes <i>et al.</i> (2009)
<i>qnrB17</i>	AM919398	CAP45902	Gonzalez-Lopez <i>et al.</i> (não publicado)
<i>qnrB18</i>	AM919399	CAP45903	
<i>qnrB19</i>	EU432277	ACA28712	Cattoir, Nordmann, Silva-Sanchez, Espinal & Poirel (2008)
<i>qnrB20</i>	AB379831	BAG55487	Yamane (não publicado)
<i>qnrB21</i>	FJ611948	ACM50952	Galvin, Morris & Cormican (2009)

Tabela 10. (continuação).

<b><i>qnrB22</i></b>	FJ981621	ACS71746	Bae <i>et al.</i> (2010)
<b><i>qnrB23</i></b>	FJ981622	ACS71747	
<b><i>qnrB24</i></b>	HM192542	ADI46626	Xiong (2010)
<b><i>qnrB25</i></b>	HQ172108	ADN94685	Guillard (2010)
<b><i>qnrB26</i></b>	HQ386846		Xia, Guo & Xu (2010)
<b><i>qnrB27</i></b>	HM439641	ADM52186	
<b><i>qnrB28</i></b>	HM439643	ADM52188	
<b><i>qnrB29</i></b>	HM439649	ADM52193	Shin (2010)
<b><i>qnrB30</i></b>	HM439650	ADM52194	
<b><i>qnrB31</i></b>	HQ418999	ADQ43424	Wang (2010)
<b><i>qnrB32</i></b>	JN173054	AEL00450	
<b><i>qnrB33</i></b>	JN173055	AEL00451	
<b><i>qnrB34</i></b>	JN173056	AEL00452	
<b><i>qnrB35</i></b>	JN173057	AEL00456	
<b><i>qnrB36</i></b>	JN173058	AEL00458	Jacoby, Griffin & Hooper (2011)
<b><i>qnrB37</i></b>	JN173059	AEL00459	
<b><i>qnrB38</i></b>	JN173060	AEL00461	
<b><i>qnrB39</i></b>	NZ_ABWL02000005	ZP_06352683	
<b><i>qnrB40</i></b>	JN166689	AEL31271	Jeong <i>et al.</i> (GenBank JN166689)
<b><i>qnrB41</i></b>	JN166690	AEL31272	
<b><i>qnrB42</i></b>	JN680743	AEQ94272	Guillard (2011)
<b><i>qnrB43</i></b>			
<b><i>qnrB44</i></b>			Oh (2012)
<b><i>qnrB45</i></b>			
<b><i>qnrB46</i></b>			

Tabela 10. (continuação).

<i>qnrB47</i>			Oh (2012)
<i>qnrC</i>	EU917444	ACK75961	Wang <i>et al.</i> (2009a)
<i>qnrD</i>	FJ228229	ACG70184	Cavaco, Hasman, Xia & Aarestrup (2009)
<i>qnrS1</i>	AB187515	BAD88776	Hata <i>et al.</i> (2005)
<i>qnrS2</i>	DQ485530	ABF47470	Gay <i>et al.</i> (2006)
<i>qnrS3</i>	EU077611	ABU52984	Yue <i>et al.</i> (2008)
<i>qnrS4</i>	FJ418153	ACJ24509	Torpdahl, Hammerum, Zachariassen & Nielsen (2009)
<i>qnrS5</i>	HQ631377	AEG74319	Han, Kim, Choreca, Jun & Park (GenBank HQ631377)

Estudos de prevalência de resistência às quinolonas mediada por genes *qnr* demonstram que este mecanismo parece ser pouco frequente (Jacoby, Chow & Waites, 2003; Wang *et al.*, 2004a). Os genes *qnr* estão, no entanto, amplamente disseminados entre *Enterobacteriaceae*, tanto em estirpes susceptíveis às quinolonas como em estirpes resistentes a esta classe de antimicrobianos (Jeong *et al.*, 2011). A prevalência dos genes *qnr* parece ser muito variável, contudo, um artigo de revisão de Strahilevitz e colaboradores (2009), onde é efectuada uma compilação de publicações periódicas e resumos apresentados em conferências acerca da prevalência de genes *qnr* (*A*, *B* e *S*) e *aac(6')-Ib-cr* publicados até 24 de Novembro de 2008, descreve uma prevalência média de genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr* de 1,5%, 4,6%, 2,4% e 10,8%, respectivamente. Trata-se de uma média calculada no âmbito de trabalhos que reportam mais de 20 960 isolados de diferentes origens testados para genes de RQMP. De salientar que a informação referente aos genes *qnrC*, *qnrD* e genes codificantes de bomba de efluxo mediados por plasmídeos (*qepA* e *oqxAB*) não foram incluídos no referido artigo de revisão.

A RQMP é mediada por genes que codificam proteínas que protegem a ADN girase da inibição por FQs. O nível basal de resistência às quinolonas conferido pelos genes *qnr* é, contudo, baixo, pelo que as estirpes podem parecer susceptíveis às quinolonas segundo os critérios interpretativos clínicos. A sua importância clínica reside, pois, no aumento da CIM

de estirpes resistentes às quinolonas a níveis que se tornam clinicamente relevantes (ECDC *et al.*, 2009). Allou e colaboradores (2011) demonstraram através de um modelo murino de infecção do trato urinário que o impacto do baixo nível resistência às FQs conferido pela expressão de genes *qnr* está associado a um decréscimo na actividade bactericida da CIP similar àquela conferida por uma mutação no gene *gyrA*. Embora a aquisição de genes *qnr* promova aumentos de 8 a 64 vezes nas CIMs das FQs, a CIM final permanece geralmente abaixo dos critérios interpretativos clínicos de susceptibilidade estabelecidos pelo CLSI ou mesmo pelo EUCAST (Allou *et al.*, 2011).

Foi proposto que a protecção conferida pelo *qnrA* às quinolonas é o resultado da ligação desta proteína à ADN girase ou topoisomerase IV num local de sobreposição ao local de ligação do ADN. Todavia, não é clara a forma como estas proteínas podem competir com o ADN pela ligação à girase sem inibir funcionalmente a actividade da girase *in vitro* (Strahilevitz *et al.*, 2009). As funções nativas dos genes *qnr* não são desconhecidas, mas postula-se que possam ser originalmente anti-toxinas, protegendo a ADN girase e a topoisomerase IV de toxinas naturais do meio (Strahilevitz *et al.*, 2009). Uma vez que as quinolonas são agentes sintéticos, a pressão selectiva de resistência apenas teve início com a introdução, na década de 60, do AN na prática clínica; especula-se, por isso, que os genes *qnr* possam ter outras funções que contribuíram para a sua evolução e emergência (Wang *et al.*, 2004b). Vários trabalhos apontam para os microrganismos comensais como a grande reserva e fonte de disseminação de genes de RQMP (Vien *et al.*, 2009). Estudos recentes têm vindo a suportar a ideia de que os determinantes *qnr* terão origem em bactérias que habitam na água, o que poderia justificar a larga disseminação destes genes em bactérias comensais, considerando que a transmissão fecal-oral pode facilitar a troca de genes *qnr* entre bactérias de meio aquático e bactérias entéricas de humanos e animais (Cattoir, Poirel, Rotimi, Soussy & Nordmann, 2007a; Sánchez *et al.*, 2008; Vien *et al.*, 2009).

Muitos aspectos do mecanismo de acção das proteínas Qnr permanecem por esclarecer. Por exemplo, ainda não é claro: (i) porque motivo a inibição da actividade da ADN girase varia entre diferentes proteínas de pentapeptídeos repetidos; e (ii) de que forma as proteínas Qnr contrariam a inibição das topoisomerases Tipo II pelas quinolonas sem afectar excessivamente a normal função destas enzimas celulares essenciais (Xiong *et al.*, 2011). A extensão na qual uma proteína Qnr protege isolados de *Enterobactereaceae* contra as FQs é habitualmente determinado por medição das diferenças nas CIMs de quinolonas em *E. coli* com e sem plamídeo codificante do gene *qnr* (Strahilevitz *et al.*, 2009). Tal como se pode observar na Tabela 11, de um modo geral, a aquisição de um gene de RQMP não confere



diminuição da susceptibilidade às FQs nem ao AN de acordo com os critérios clínicos preconizados pelo CLSI, embora se verifique um aumento da CIM.

Tabela 11. Actividade *in vitro* de quinolonas em *E. coli* susceptíveis (“wild type”) contendo genes de RQMP (Adaptado de: Strahilevitz *et al.*, 2009).

Quinolona	Critério interpretativo para susceptibilidade <sup>a</sup> (µg/ml)	CIM (µg/ml)							
		<i>E. Coli</i> J53 WT	<i>qnrA1</i>	<i>qnrS1</i>	<i>qnrB1</i>	<i>qnrC</i>	<i>qepA</i>	<i>qnrD</i>	<i>aac(6)-Ib-cr</i>
Ácido nalidíxico	≤16	4	16	16	16	16	s.a.	4	-
Ciprofloxacina	≤1	0,008	0,25	0,25	0,25	0,25	0,12	0,06	0,004–0,008
Levofloxacina	≤2	0,015	0,5	0,38	0,5	0,25	s.a.	-	s.a.

<sup>a</sup>De acordo com os padrões do CLSI.

s.a. – sem alteração.

Quando um agente antimicrobiano está presente numa concentração igual ou superior à CIM, o processo de selecção ocorrerá enquanto a sua concentração eliminar ou inibir a população susceptível remanescente, não afectando a população resistente. Na ausência de outros mecanismos que afectem a susceptibilidade às FQs, a presença de genes de RQMP, como os genes *qnr*, aumentam a CIM de FQs, embora para níveis ainda abaixo dos critérios clínicos de resistência, tal como observado na Tabela 12. Por este motivo, sugere-se que a expressão das proteínas Qnr facilite a selecção de mutantes com elevada resistência às quinolonas (Cantón & Morosini, 2011). Por sua vez, quando a concentração de uma quinolona permanece abaixo do valor de MPC, é muito improvável o surgimento de mutantes resistentes. Por exemplo, para *E. coli* J53 WT, o MPC de uma FQ é de 0,125 µg/ml; contudo, a mesma bactéria contendo o plasmídeo codificante do *qnrA* já apresenta um MPC pelo menos 10 vezes superior (Strahilevitz *et al.*, 2009).

Tabela 12. Impacto das proteínas Qnr sobre a susceptibilidade às quinolonas (Adaptado de: Luzzaro, 2008).

Quinolona	<i>E. coli</i> WT	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		<i>E. coli</i> ( <i>qnrA</i> )	<i>E. coli</i> ( <i>qnrB</i> )	<i>E. coli</i> ( <i>qnrS</i> )
Ácido nalidíxico	4	8-32	16	8-32
Ciprofloxacina	0,008	0,12-2	0,25-1	0,12-0,5
Levofloxacina	0,015	0,25-1	0,25-0,5	ND
Moxifloxacina	0,03	0,5-1	1-2	0,25

Os genes de RQMP conferem um nível de resistência às quinolonas que se situa abaixo dos critérios interpretativos clínicos estabelecidos pelo CLSI para susceptibilidade, tal como acontece aquando da existência de mutações simples na ADN girase, transportadores que extrusam quinolonas e baixos níveis de expressão de porinas. O fenótipo de baixo nível de resistência ao AN e reduzida susceptibilidade à CIP, que por vezes se observa entre estirpes *qnr*-positivas, não é sensível nem específico (Strahilevitz *et al.*, 2009). Deste modo, a detecção de genes *qnr* é geralmente feita por amplificação por “Polymerase Chain Reaction” (PCR) dos genes-alvo. Para facilitar o rendimento, o emprego de técnicas de PCR “multiplex” para a detecção de *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* é frequentemente usada (Cattoir *et al.*, 2007a). Este procedimento pode, contudo, reportar falsos-positivos, pelo que a confirmação por sequenciação do gene amplificado é recomendada (Strahilevitz *et al.*, 2009).

#### 4.2.2. Bomba de efluxo QepA e OqxAB

Dois transportadores de quinolonas mediados por plasmídeos são conhecidos até à data: QepA e OqxAB (Strahilevitz *et al.*, 2009). QepA foi o primeiro transportador de efluxo de quinolonas codificado em plasmídeos a ser descrito. Esta bomba de efluxo é codificada pelo plasmídeo pHPA e foi descoberta numa estirpe de *E. coli* proveniente de urina de um paciente, no Japão, recolhida em 2000 (Yamane *et al.*, 2007). Este plasmídeo demonstra um perfil de multirresistência a aminoglicosídeos, FQs e  $\beta$ -lactâmicos de largo espectro. O gene *qepA* codifica uma proteína de 511 aminoácidos, pertence à família de transportadores MFS e confere aumentos ligeiros nas CIMs de FQs, tal como descrito na Tabela 13. Desde a sua descoberta, em 2007, uma outra variante deste gene foi encontrada; apresenta duas substituições de aminoácidos em relação a *qepA*, tendo sido denominada *qepA2* (Cattoir, Poirel & Nordmann, 2008b). Esta variante confere um fenótipo semelhante ao determinante

*qepA*, entretanto renomeado *qepA1* (Strahilevitz *et al.*, 2009). Dadas as similaridades para com a família MFS das bombas de efluxo multi-fármaco de *Actinomycetes*, foi proposto que a proteína tenha originado nestas bactérias Gram-positivas, sendo transferida posteriormente para os plasmídeos das *Enterobacteriaceae*, a partir das quais disseminaram. Além das quinolonas, este determinante pode bombear outros substratos, incluindo a eritromicina, brometo de etídio e acriflavina (Hernández *et al.*, 2011). De salientar que a prevalência do gene *qepA* parece ser menor, comparativamente aos demais determinantes de RQMP (Yamane, Wachino, Suzuki & Arakawa, 2008).

Tabela 13. Impacto do gene codificante de bomba de efluxo QepA sobre a susceptibilidade às FQs hidrofílicas em *E. coli* (Adaptado de: Périchon *et al.*, 2007).

Quinolona	CIM (µg/ml)	
	<i>E. coli</i> C600	<i>E. coli</i> C600/ <i>qepA</i>
Ácido nalidíxico	2	2
Norfloxacina	0,06	1,5
Ciprofloxacina	0,02	0,25
Levofloxacina	0,03	0,03
Moxifloxacina	0,06	0,09

Ainda em 2007, um plasmídeo conjugativo, pOLA52, conferindo resistência ao antibiótico olaquinox, foi encontrado em estirpes de *E. coli* isoladas de estrume de suínos por Hansen e colaboradores (2007). A bomba de efluxo foi denominada OqxAB e é codificada pelos genes *oqxA* e *oqxB* (Zhao *et al.*, 2010). O mecanismo de resistência foi identificado como sendo uma bomba de efluxo multi-fármaco, pertencente à família RND (Strahilevitz *et al.*, 2009). No caso da bomba de efluxo *oqxAB*, além do aumento da resistência às quinolonas, verificou-se um aumento da resistência bacteriana a um largo número de antimicrobianos, como as tetraciclina ou o cloramfenicol, bem como uma resistência aumentada a biocidas, como o cloreto de benzalcônio ou o triclosan, uma vez que todos estes compostos são também substratos desta bomba de efluxo (Hernández *et al.*, 2011).

Este gene codificante de bomba de efluxo parece ser raro. Apenas 10 de 556 (1,8%) estirpes de *E. coli* isoladas entre 1995 e 1998 na Dinamarca e na Suécia demonstraram uma CIM de olaquinox  $\geq 64$  mg/l, com 9 das 10 estirpes positivas para *oqxAB* (Hansen *et al.*, 2007). Apenas um estudo chinês, de Zhao e colaboradores (2010), reportou uma elevada prevalência

deste gene em *E. coli* isolada de animais de produção, trabalhadores e ambiente de produção de quatro suiniculturas e um aviário. Num total de 172 isolados, foi observada uma prevalência de 39% do gene *oqxAB*. A elevada prevalência reportada poderá estar associada ao sobre-uso de quinoxalinas em animais que se observa na China (Zhao *et al.*, 2010).

#### **4.2.3. Variante *cr* da acetiltransferase de aminoglicosídeos (*aac(6')-Ib-cr*)**

A 6'-N-acetiltransferase de aminoglicosídeos mediada por plasmídeos, *aac(6')-Ib*, conferindo resistência à amicacina, kanamicina e tobramicina, foi descrita nos anos 80, demonstrando ter uma ampla distribuição geográfica e elevada prevalência em muitas bactérias Gram-negativas clinicamente relevantes (Jacoby *et al.*, 2009). Dada a origem sintética das quinolonas e a ausência de análogos estruturais destes antimicrobianos entre os intermediários metabólicos bacterianos, a descoberta de uma enzima inactivadora de quinolonas foi uma surpresa (Hernández *et al.*, 2011). A variante *cr* (“ciprofloxacina resistência”) da acetiltransferase de aminoglicosídeos, *aac(6')-Ib-cr*, que apresenta a surpreendente propriedade adicional de acetilar e inactivar FQs com um azoto amina acessível no anel piperazínico, foi descrita pela primeira vez em 2006, codificada por um plasmídeo oriundo de isolados clínicos, proveniente de Shangai, em 2000-2001 (Robicsek *et al.*, 2006a). A *aac(6')-Ib-cr* difere da *aac(6')-Ib* apenas por duas substituições de aminoácidos (Trp102Arg e Asp179Tyr), ambos necessários ao reconhecimento do substrato (Jacoby *et al.*, 2009); por este motivo, a confirmação deste gene envolve geralmente a amplificação de *aac(6')-Ib* seguida de sequenciação (Strahilevitz *et al.*, 2009). Depois de descoberta, percebeu-se que a variante *cr* tem uma ampla distribuição, sugerindo, por isso, uma origem antiga (Jacoby *et al.*, 2009). O facto de estas modificações comprometerem a acção da enzima contra aminoglicosídeos, indica que esta foi provavelmente seleccionada por quinolonas durante tratamento com estes antimicrobianos (Hernández *et al.*, 2011).

O aumento no valor de CIM, conferido pela variante *cr* da acetiltransferase de aminoglicosídeos, é menor comparativamente ao efeito conferido pelas proteínas *qnr*, e tal como previsto pela sua especificidade em quinolonas-alvo, apenas é selectivo para CIP e norfloxacina; outras quinolonas não são afectadas (Tabela 14). Embora o efeito na CIM seja modesto, o mesmo não se passa com o valor de MPC. Na presença de *aac(6')-Ib-cr*, clones resistentes da estirpe de *E. coli* J53 WT podem ainda ser recuperados a concentrações de CIP de 1,6 µg/ml, um nível aproximado do pico de concentração sérico de CIP livre durante a terapêutica (Strahilevitz *et al.*, 2009).

Recentemente, a associação deste gene com genes codificantes de ESBL, como a β-lactamase CTX-M-15, foi reportado (Coque *et al.*, 2008). Foram também já descritas associações entre

*aac(6')-Ib-cr* e outros genes de RQMP, incluindo *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *qepA* (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011b).

Tabela 14. Impacto do gene *aac(6')-Ib-cr* sobre a susceptibilidade às quinolonas em *E. coli*  
(Adaptado de: Robicsek *et al.*, 2006a).

Quinolona	CIM (µg/ml)	
	<i>E. coli</i> WT	<i>E. coli (aac(6')-Ib-cr)</i>
Ácido nalidíxico	0,015	0,62
Ciprofloxacina	0,02	0,08
Levofloxacina	0,08	0,08
Gemifloxacina	0,005	0,005

## II – OBJECTIVOS

A resistência aos antimicrobianos é um problema ecológico que reflecte o facto de estes agentes serem fármacos utilizados na sociedade (WHO & APUA, 2001). Redes de vigilância locais e internacionais, como a EARS-Net, assim como uma série de estudos científicos, evidenciam um crescente e global aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos nos últimos anos, particularmente em bactérias Gram-negativas, constituindo um sério problema para a Saúde Pública (ECDC & EMEA, 2009).

O declínio da susceptibilidade aos antimicrobianos é particularmente alarmante no que respeita às FQs, dada a sua importância tanto em medicina humana como em medicina veterinária (ECDC, 2011). Neste contexto, existe uma preocupação em relação ao uso de antimicrobianos em espécies animais produtoras de alimentos, dado ser consensual que esta prática pode promover a resistência, não apenas em organismos patogénicos zoonóticos, mas em bactérias comensais, bactérias resistentes que podem, subsequentemente, ser transmitidas a ao Homem através do contacto com animais ou da cadeia alimentar (McEwen, 2001; Nicholls *et al.*, 2003). Tem-se observado, com preocupação, que a reserva de resistência vem crescendo em bactérias entéricas comensais dos animais, como a *E. coli*, podendo estes mecanismos ser transferidos aos seus semelhantes, bactérias patogénicas ou ainda a bactérias comensais humanas através da troca de material genético (McEwen, 2001).

Há pouco mais de 10 anos, a compreensão dos mecanismos de resistência às quinolonas sofreu um “volte-face” com a inesperada demonstração *in vitro* da transmissão horizontal de genes codificados em plasmídeos que conferiam redução da susceptibilidade às quinolonas; o gene responsável pelo fenótipo de resistência foi denominado *qnr* (Martínez-Martínez *et al.*, 1998). Desde então, reconhece-se que, na maioria das bactérias (especialmente nas espécies Gram-negativas), os plasmídeos constituem um importante vector de transferência de genes de resistência, podendo mover-se entre bactérias da mesma espécie, espécies diferentes e até géneros diferentes (Hawkey & Jones, 2009). Três determinantes de RQMP foram descritos até à data: os genes *qnr* (famílias A, B, S, C e D), o gene *aac(6')-Ib-cr* e os genes *qepA* e *oqxAB* codificantes de bombas de efluxo (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011b). Embora a RQMP seja um mecanismo associado a reduzida susceptibilidade às quinolonas, conferindo modestos aumentos na CIM das quinolonas, os genes de RQMP demonstraram *in vitro* facilitar o aparecimento de mutantes de elevada resistência às quinolonas quando na presença de doses terapêuticas desta classe de antimicrobianos (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011a; Cantón & Morosini, 2011).

Deste modo, considerando que a) as FQs são fármacos importantes, classificados como criticamente importantes em medicina humana (WHO, 2009) e em saúde animal

(FAO/WHO/OIE, 2008), b) o uso de isolados de *E. coli* comensal como organismo indicador é recomendada no estudo dos efeitos da utilização de antimicrobianos num dado país e espécie animal, devido à sua ubiquidade em animais de produção e a sua relevância como reservatório de genes de resistência (EFSA & ECDC, 2011), c) o principal factor influenciando a ocorrência de resistência a antimicrobianos em *E. coli* indicadora é, provavelmente, a pressão selectiva exercida pelo uso de antimicrobianos (WHO, 2011) e d) o conhecimento existente sobre a presença e frequência de genes de RQMP em estirpes comensais de *E. coli* de origem bovina é escasso a nível mundial, o presente trabalho, desenvolvido no âmbito da Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, teve como objectivos: i) avaliar a frequência de genes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos, RQMP, designadamente os genes *qnr* (*A*, *B*, *C*, *D* e *S*), o gene *aac(6')-Ib-cr* e o gene codificante da bomba de efluxo *qepA*; e ii) determinar a concentração inibitória mínima, CIM, dos antimicrobianos ácido nalidíxico, AN, ciprofloxacina, CIP e levofloxacina, LEV, em isolados de *E. coli* de vitelos saudáveis, previamente isolados após pressão selectiva *in vivo* de enrofloxacin, ENR, e caracterizados previamente quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos por Centeno (2010).

### III – MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. Isolados de *Escherichia coli*

As 237 estirpes de *E. coli* que constituem o objecto do presente estudo foram previamente isoladas de fezes de vitelo após pressão selectiva *in vivo* de ENR e caracterizadas quanto à resistência aos antimicrobianos por Centeno (2010). Neste estudo anterior, que teve lugar no Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas (LRAB) da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Técnica de Lisboa (UTL), as amostras foram colhidas de vitelos saudáveis de raça Frísia por meio de zaragatoa com meio de conservação, numa única exploração (Montemor-o-Novo, distrito de Évora), entre os meses de Janeiro e Maio de 2010. A conservação dos isolados bacterianos foi realizada em caldo de triptona (BioKar<sup>®</sup>, França) 20% v/v glicerol (Applichem<sup>®</sup>, Alemanha) a -20° C.

#### 2. Caracterização da exploração

A caracterização da exploração de origem dos animais alvo do presente estudo foi feita previamente no trabalho de Centeno (2010) e do qual, com consentimento da autora (Anexo II), se destacam alguns aspectos. Os vitelos, recebidos por volta dos 15 dias de vida e vendidos por volta dos 3 meses de idade, são mantidos em boxes individuais com cama de palha ao nível do chão, dentro de um pavilhão coberto que foi desenvolvido a partir de uma estufa pré-existente na exploração. A posterior homogeneização do lote é feita por meio de agrupamento em grupos de cinco vitelos, de acordo com o seu tamanho, colocados em parques dentro do mesmo pavilhão (Centeno, 2010).

Imediatamente após a entrada na exploração, a sua alimentação consiste na ingestão de 2 a 3 litros de leite de substituição (Naturmilk<sup>®</sup>, Portugal) três vezes por dia, água *ad libitum* (no mesmo recipiente onde põem o leite de substituição) e alimento composto em pó não medicado (RAP 308 farinha, Rações Raporal<sup>®</sup>, Portugal). As tomas diárias de leite vão reduzindo gradualmente até ao desmame, altura em que iniciam uma alimentação exclusivamente à base de alimento composto em pó até atingirem o peso e tamanho ideal para venda (Centeno, 2010).

A exploração segue um plano de administração de ENR com o fim de prevenção de doenças do sistema respiratório e do trato gastrointestinal, particularmente diarreias. Ao Médico Veterinário assistente da exploração não cabe a responsabilidade deste plano de uso não-prudente de antimicrobianos, “off-label”, efectuado pelo proprietário da exploração e extrapolado do plano profilático recomendado. Este plano consiste na administração de ENR (Roxacin<sup>®</sup> - Laboratórios Calier, S.A, Barcelona, Espanha – 100mg de enrofloxacina por cada



1000ml) em doses terapêuticas por via oral, durante três períodos de cinco dias consecutivos, intervalados de 5 dias cada (Figura 3). O antimicrobiano é administrado no leite de substituição na dose de 10mg/Kg de peso vivo (Centeno, 2010).

### 3. Colheita das amostras

Centeno (2010) identificou 237 amostras positivas para *E. coli* num total de 247 amostras recolhidas de 106 animais. Cada zaragatoa foi identificada com um código ao qual corresponde o número do Sistema de Identificação Animal (S.I.A) do animal.

Os isolados de *E. coli* foram obtidos em três momentos distintos, tal como ilustrado na Figura 3: uma colheita prévia ao início da administração do antimicrobiano (T0), ou seja, à chegada do animal à exploração; uma segunda colheita logo após a aplicação do plano de administração (T1) de três administrações de cinco dias consecutivos intervaladas por cinco dias cada; por fim, uma terceira colheita, um mês após o fim do plano de administração (T2).

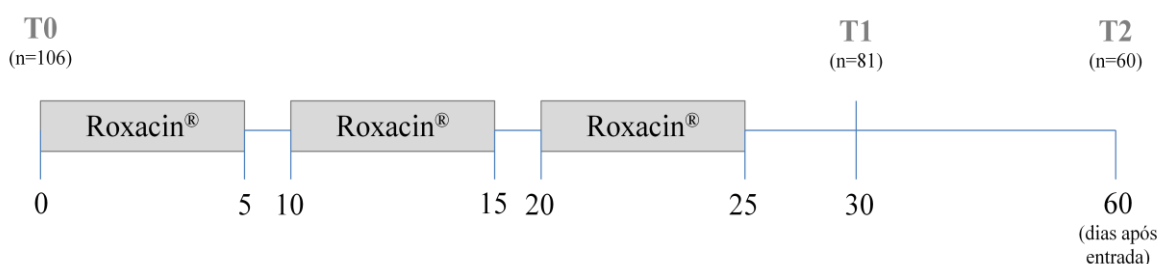


Figura 3. Cronograma da colheita de amostras (Adaptado, com consentimento, de: Centeno, 2010).

Pretendeu-se, desta forma, obter três recolhas intervaladas por 30 dias, designadamente aos 15 (T0), aos 45 (T1) e aos 75 dias (T2) de vida dos vitelos. Salienta-se, contudo, que os 106 animais incluídos na amostra não deram entrada na exploração em simultâneo, chegando em grupos menores ao longo dos meses de Fevereiro e Março, pelo que nas três colheitas registaram-se idades médias de 15,4 dias (2 a 59) em T0 (n=106), 48,6 dias (29 a 97) em T1 (n=81) e 72,1 dias (48 a 102) em T2 (n=60), verificando-se ainda um intervalo médio entre colheitas de 32,3 dias (entre T0 e T1) e de 24,2 dias (de T1 para T2) (Centeno, 2010).

Dos 106 animais amostrados, apenas 60 foram acompanhados nos três momentos do estudo. A elevada taxa de mortalidade observada [23,58% (n=25) de T0 para T1; 25,92% (n=21) de T1 para T2] foi justificada por Centeno (2010) como consequência do surto respiratório ocorrido no período do estudo. Desta forma, foram estudadas um total de 237 amostras de *E. coli*, designadamente 101, 79 e 57 isolados relativos a T0, T1 e T2, respectivamente.

Após isolamento de *E. coli* a partir das zaragoas de fezes dos vitelos amostrados, as estirpes de *E. coli* foram identificadas em placas de agar “MacConkey” (BioKar<sup>®</sup>, França) e, posteriormente, confirmadas por PCR após extração de ADN por fervura (Centeno, 2010).

#### **4. Caracterização fenotípica dos isolados de *Escherichia coli***

No presente estudo, a caracterização fenotípica das estirpes de *E. coli* foi realizada por determinação das CIMs por microdiluição para os seguintes antimicrobianos pertencentes à classe das quinolonas: ácido nalidíxico (AN), ciprofloxacina (CIP) e levofloxacina (LEV).

O AN foi usado como agente representante das quinolonas (primeira geração) e os antimicrobianos CIP e LEV foram usados como representantes das FQs (de segunda geração e terceira geração, respectivamente). A interpretação dos resultados foi efectuada com base nos critérios interpretativos epidemiológicos (ECOFF) estabelecidos pelo EUCAST (EUCAST, 2012b). Os critérios interpretativos clínicos definidos pelo CLSI (2011) e pelo EUCAST (2012a) foram também aplicados aos resultados obtidos, com o intuito de avaliar a relevância clínica dos mesmos.

##### **4.1. Determinação das concentrações inibitórias mínimas para os antimicrobianos ácido nalidíxico, ciprofloxacina e levofloxacina**

As CIMs foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo de “Muller-Hinton” (Oxoid<sup>®</sup>, Reino Unido), em microplacas de 96 poços, de acordo com o preconizado pelo CLSI na norma M100-S21 (CLSI, 2011). Para este procedimento, foram utilizadas culturas de 18-24 horas, a 37<sup>o</sup> C, semeadas em meio de agar Columbia com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux<sup>®</sup>, Portugal), obtidas por repicagem dos 237 isolados bacterianos em estudo previamente conservados a -20<sup>o</sup> C. Foram testados três antimicrobianos nas seguintes concentrações: AN (0,125->256 µg/ml), CIP (0,001->256 µg/ml) e LEV (0,001->256 µg/ml).

Para preparação das microplacas, procedeu-se à distribuição de 100 µl de caldo de “Muller-Hinton” nos 96 poços com o auxílio de uma pipeta multicanal. Seguiu-se a distribuição e diluição seriada do antimicrobiano a testar, de razão dois. No que se refere à preparação do inóculo, preparou-se uma suspensão de uma colónia isolada da cultura de 18-24 horas 0,02% (v/v) de Tween<sup>®</sup>20 (Sigma<sup>®</sup>, Portugal), equivalente a turvação de 0,5 da escala de McFarland. Adicionou-se 10 µl por poço da solução anterior, excepto nos controlos negativos, de modo a obter uma concentração final no poço de 4-5x10<sup>4</sup> unidades formadoras de colónias (UFC)/ml. Para controlo de pureza e contagem de UFC, 1 µl de cada poço de controlo positivo foi inoculado em placa de agar Columbia com 5% de sangue de carneiro. Por último, procedeu-se à incubação das microplacas e placas de controlo a 37<sup>o</sup> C, durante 18 horas.

Os ensaios foram validados por confirmação dos seguintes requisitos: (i) as placas apresentavam uma cultura pura de cada uma das estirpes bacterianas em estudo, com uma contagem de UFC entre 30 a 300 colónias; e (ii) os valores de CIM observados para a estirpe de referência *E. coli* ATCC 25922 encontravam-se de acordo com as recomendações para o controlo de qualidade (“Quality Control [QC] ranges”) aplicáveis aos antimicrobianos testados, tal como preconizado na norma M100-S21 do CLSI (2011). A leitura das microplacas foi feita visualmente. A CIM foi considerada como o valor da diluição anterior a uma leitura positiva (com turvação).

## **5. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli***

Sempre que possível, os métodos genotípicos devem ser implementados para identificar o fundo genético do fenótipo de resistência (Wheat, 2001; Cavaco *et al.*, 2008). No presente trabalho, procedeu-se à caracterização genotípica dos 237 isolados de *E. coli* através do método de amplificação por PCR dos genes de RQMP (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA*), posteriormente confirmados por sequenciação nucleotídica.

### **5.1. Amplificação por “Polymerase Chain Reaction”**

A amplificação de genes *qnr* (variantes *A*, *B*, e *S*) por PCR “multiplex” foi descrita por Robicsek *et al.* (2006b), e mais tarde por Cattoir *et al.* (2007a). Este demonstrou ser um método significativamente mais rápido e menos dispendioso por comparação com análises por PCR “simplex” dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* (amplificações separadas de cada gene) e tem sido descrito com sucesso por vários autores (Robicsek *et al.*, 2006b; Cattoir *et al.*, 2007a; Tamang *et al.*, 2008; Murray, Mather, Coia & Brown, 2008; Bouchakour *et al.*, 2010; Deepak, Koh & Chan, 2009; Nasik *et al.*, 2011). Trata-se, pois, da amplificação de mais de uma sequência-alvo numa única reacção de PCR. O método PCR “multiplex” tem sido aplicado em análises de deleções, mutações e polimorfismos, bem como em PCR em tempo real e ensaios quantitativos (Jones, 2002).

Neste trabalho, recorreu-se ao método PCR “multiplex” para detecção de genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*, com base no protocolo descrito por Cattoir *et al.* (2007a). Os genes *qnrC* e *qnrD* foram também detectados por PCR “multiplex”, através de um protocolo desenvolvido e validado no LRAB da FMV-UTL, com base nos protocolos de PCR “simplex” usados para a pesquisa dos genes *qnrC* e *qnrD* desenvolvidos por Wang *et al.* (2009a) e por Cavaco *et al.* (2009), respectivamente. Os genes *aac(6')-Ib-cr* e *qepA* foram pesquisados pelo método de PCR “simplex”, com base nos protocolos de Robicsek *et al.* (2006a) e de Périchon *et al.* (2007), respectivamente.

Os “primers” (ou oligonucleótido iniciadores) utilizados (Tabela 15) foram sintetizados comercialmente (<http://www.stabvida.com>) e usados nas reacções sob a forma de alíquotas previamente preparados (10 pmol/µl por diluição da solução inicial em água desionizada estéril). Para todos os genes pesquisados, procedeu-se à preparação de uma mistura de reacção correspondente a um volume final de 50 µl ou de 25 µl, incluindo um controlo positivo (Tabela 15) e um controlo negativo, e cujos reagentes e detalhes das etapas referentes a cada análise se encontram descritos na Tabela 16. O programa de amplificação por PCR foi realizado em termocilador com tampa aquecida (Mastercycler, Eppendorf AG<sup>®</sup>, Alemanha).

Tabela 15. “Primers” utilizados.

Gene	“Primer”	Sequência (5'→3')	Controlo positivo	Produto de PCR (pb)	Referência
<i>qnrA</i>	qnrFMVF255	CGTCTGTCTTTGGCCAACTT	<i>E. coli</i> J53 com pMG252	225	Pomba <i>et al.</i> (2009)
	qnrFMVR	GGCATTGCTCCAGTTGTTTT			
<i>qnrB</i>	qnrBFQ1	ATGACGCCATTACTGTATAA	<i>E. coli</i> 5825/04	562	Jacoby <i>et al.</i> (2006)
	qnrBRQ2	GATCGCAATGTGTGAAGTTT			
<i>qnrS</i>	qnrSf	ACGACATTCGTCAACTGCAA	<i>E. cloacae</i> positiva para <i>qnrS</i>	417	Gay <i>et al.</i> (2006)
	qnrSr	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC			
<i>qnrC</i>	qnrCfw	GGGTTGTACATTTATTGAATC	<i>E. coli</i> positiva para <i>qnrC</i>	447	Wang <i>et al.</i> (2009a)
	qnrCrv	TCCACTTTACGAGGTTCT			
<i>qnrD</i>	qnrDfw	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	<i>E. coli</i> positiva para <i>qnrD</i>	582	Cavaco <i>et al.</i> (2009)
	qnrDrv	AACAAGTCGAAGCGCCTG			
<i>aac(6')- Ib-cr</i>	AAC6lbf3	TTGCGATGCTCTATGAGTGG	<i>E. coli</i> 5825/04	482	Robicsek <i>et al.</i> (2006a)
	AAC6lbr3	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT			
<i>qepA</i>	qepAfw	TGGTCTACGCCATGGACCTCA	<i>E. coli</i> TOP 10/pAT851	1137	Périchon <i>et al.</i> (2007)
	qepArv	TGAATTCGGACACCGTCTCCG			

Tabela 16. Condições de PCR.

Gene	Mistura de reação	Programa de amplificação por PCR <sup>c</sup>
<i>qnrA</i>	12,5 µl de Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix (NZYTech <sup>®</sup> , Portugal), 1 µl de cada “primer” (“forward” e “reverse”), 3 µl de ADN <sup>b</sup>	94°C 2 min+30X( 94°C 30s+58°C 30s+72°C 1 min)+72°C 10min.
<i>qnrB</i>		
<i>qnrS</i>		
<i>qnrC</i>	5 µl de NZYTaQ 5x Gel Load Reaction Buffer (NZYTech <sup>®</sup> , Portugal), 0,5 µl de MgCl <sub>2</sub> 50mM, 0,5 µl de dNTPmix, 1 µl de cada “primer” (“forward” e “reverse”), 0,5 µl de NZYTaQ (NZYTech <sup>®</sup> , Portugal), 2 µl de ADN <sup>b</sup>	94°C 5 min+30X( 94°C 1 min+51°C 1 min+72°C 1 min)+72°C 10min.
<i>qnrD</i>		
<i>aac(6’)-Ib-cr</i>	5 µl de tampão MgCl <sub>2</sub> 10x (Fermentas <sup>®</sup> , Portugal), 1 µl de MgCl <sub>2</sub> 25mM, 0,8 µl de dNTPmix, 1 µl de cada “primer” (“forward” e “reverse”), 0,5 µl de DreamTaq (Fermentas <sup>®</sup> , Portugal), 0,26 µl de DMSO 5%, 3 µl de ADN <sup>b</sup>	94°C 5 min+ 35X( 94°C 45s +55°C 45s+ 72°C 45s)+ 72°C 10min.
<i>qepA</i>	5 µl de tampão MgCl <sub>2</sub> 10x (Fermentas <sup>®</sup> , Portugal), 2,4 µl de MgCl <sub>2</sub> 25mM, 2 µl de dNTPmix, 1 µl de cada “primer” (“forward” e “reverse”), 0,5 µl de DreamTaq (Fermentas <sup>®</sup> , Portugal), 5 µl de DMSO 5%, 2 µl de ADN <sup>a</sup>	94°C 4 min+ 30X( 94°C 1 min +53°C 1 min+ 72°C 1,5 min)+ 72°C 10min

<sup>a</sup>Volume final de 50 µl.

<sup>b</sup>Volume final de 25 µl.

<sup>c</sup>Desnaturação inicial+n.º de ciclos X (desnaturação+hibridação+extensão)+extensão final.

Após o procedimento de amplificação por PCR, os fragmentos de ADN foram visualizados por electroforese em gel de agarose (NZYTech<sup>®</sup>, Portugal), adicionado de brometo de etídio (Sigma<sup>®</sup>, Portugal) na concentração de 3 µl/100 ml de gel de agarose 1,5% (p/v) e em tampão de electroforese 0,5X TBE (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA). A cada poço, foi adicionado um volume de 10 µl do produto de PCR e 5 µl de marcador NZYDNA Ladder V, de 100 a 1000 pb (NZYTech<sup>®</sup>, Portugal). Cada corrida teve uma duração de, aproximadamente, 45 minutos (96 volts), com posterior visualização em transiluminador (GelDoc System, Pharmacia Biotech<sup>®</sup>, Portugal). Os produtos obtidos foram comparados com os controlos positivos (mesmo peso molecular) e com os controlos negativos, sendo reportado como positivos (presença de ADN) ou negativos (ausência de ADN).

## 5.2. Purificação e sequenciação de produtos de “Polymerase Chain Reaction”

As amostras positivas para os genes de RQMP pesquisados foram confirmadas posteriormente através de nova amplificação dos genes por PCR “simplex”, aplicando as mesmas condições de PCR da primeira pesquisa, excepto para os genes *qnrS* e *qnrB* (Tabela 17). Confirmada a presença do gene por electroforese, procedeu-se à purificação do produto de PCR para confirmação por sequenciação. Recorreu-se à utilização do JETquick PCR Product Purification Spin Kit (Genomed<sup>®</sup>, Alemanha) para purificação dos produtos de PCR por centrifugação em coluna, seguindo-se o procedimento recomendado pelo fabricante. Os produtos purificados foram enviados para os serviços de sequenciação nucleotídica da empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal). As sequências obtidas foram alinhadas com o auxílio do “software” MEGA<sup>®</sup> (“Molecular Evolutionary Genetics Analysis”, disponível em <http://www.megasoftware.com>), versão 5.0. Após tratamento informático, as sequências foram comparadas com sequências disponíveis na base de dados do website do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Tabela 17. “Primers” usados na amplificação por PCR para sequenciação de *qnrB* e *qnrS*.

Gene	“Primer”	Sequência (5'→3')	Mistura de reacção (volume final de 50 µl)	Produto de PCR (pb)	Referência
<i>qnrB</i>	qnrB2F	ATGGCTCTGGCACTCGTTGGC	5 µl de tampão MgCl <sub>2</sub> 10x (Fermentas <sup>®</sup> , Portugal), 1 µl de MgCl <sub>2</sub> 25mM, 0,8 µl de dNTPmix, 2 µl de cada “primer” (“forward e reverse”), 0,5 µl de NZYTaQ (NZYTech <sup>®</sup> , Portugal), 0,26 µl de DMSO 5%, 5 µl de ADN <sup>a</sup>	682	Pomba <i>et al.</i> , (2009)
	qnrB2R	CTAGCCAATAATCGCGATGCC			
<i>qnrS</i>	qnrS1seqf	ATGGAAACCTACAATCATACATATC	5 µl de tampão MgCl <sub>2</sub> 10x (Fermentas <sup>®</sup> , Portugal), 1 µl de MgCl <sub>2</sub> 25mM, 0,8 µl de dNTPmix, 2 µl de cada “primer” (“forward e reverse”), 0,5 µl de NZYTaQ (NZYTech <sup>®</sup> , Portugal), 0,26 µl de DMSO 5%, 5 µl de ADN <sup>a</sup>	650	Este estudo
	qnrS1seqr	TTAGTCAGGATAAACAACAATACC			

<sup>a</sup>2x50 µl de reacção.

## **6. Análise estatística dos resultados**

O tratamento dos resultados foi efectuado através do “software” estatístico SAS<sup>®</sup>, versão 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Todos os parâmetros foram analisados com um intervalo de confiança (IC) de 95% (foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p < 0,05$ ), tendo-se procedido a uma análise descritiva da frequência da resistência observada para os antimicrobianos testados e da frequência dos genes de RQMP investigados, para os três momentos do estudo (T0, T1 e T2). O teste Chi-quadrado de Pearson foi aplicado para determinar a associação entre a exposição à ENR e o aparecimento de genes de RQMP, bem como para determinar a associação entre isolados de *E. coli* positivos para genes de RQMP e a percentagem de resistência aos antimicrobianos AN, CIP e LEV. Para avaliar a associação entre a exposição à ENR e a resistência aos antimicrobianos AN, CIP e LEV recorreu-se à aplicação do modelo de regressão logística exacta.

## IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Valores da concentração inibitória mínima para as quinolonas e fenótipo de resistência

Duzentas e trinta e sete estirpes de *E. coli* foram sujeitas a avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos AN, CIP e LEV pelo método de determinação de CIMs por microdiluição, tal como descrito no ponto 2.1. do Capítulo V. Os resultados obtidos (Anexo III) foram interpretados segundo os ECOFF estabelecidos pelo EUCAST (2012b), resultando na categorização dos isolados bacterianos em do tipo selvagem ou “wild type” (WT) ou do tipo não-selvagem ou “non-wild type” (NWT). Para simplificar, seguiu-se a sugestão do EURL-AR (2011), que admite que os termos susceptível e resistente sejam usados em substituição dos termos WT e NWT, respectivamente.

Tabela 18. Percentagem de resistência (%R), variação de CIMs e valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> observadas para os antimicrobianos AN, CIP e LEV.

Tempo	AN				CIP				LEV			
	%R <sup>a</sup> (n)	Variação CIM (µg/ml)	CIM <sub>50</sub> (µg/ml)	CIM <sub>90</sub> (µg/ml)	%R <sup>a</sup> (n)	Variação CIM (µg/ml)	CIM <sub>50</sub> (µg/ml)	CIM <sub>90</sub> (µg/ml)	%R <sup>a</sup> (n)	Variação CIM (µg/ml)	CIM <sub>50</sub> (µg/ml)	CIM <sub>90</sub> (µg/ml)
<b>T0</b>	52,5 (53)	64->256	128	>256	52,5 (53)	0,125- 256	0,125	64	46,5 (47)	0,5-64	0,25	32
<b>T1</b>	100 (79)	128->256	>256	>256	100 (79)	0,25- 128	32	64	100 (79)	0,5-64	16	32
<b>T2</b>	82,5 (47)	128->256	>256	>256	89,5 (51)	0,25- 64	16	64	87,7 (50)	0,5-32	8	32
<b>Total</b>	75,5 (179)	64->256-	>256	>256	77,2 (183)	0,125- 128	16	64	74,3 (176)	0,5-64	8	32

<sup>a</sup>Classificação segundo os ECOFF estabelecidos pelo EUCAST (2012b): AN: R>16 µg/ml; CIP: R>0,064 µg/ml; e LEV: R>0,25 µg/ml.

Na tabela 18 estão organizados de forma sumária a percentagem de isolados resistentes (%R) segundo os ECOFF definidos pelo EUCAST (2012b), a variação de CIMs e os valores de CIM<sub>50</sub> e de CIM<sub>90</sub> observados para os antimicrobianos AN, CIP e LEV. Entre os 237 isolados de *E. coli* testados (total da Tabela 18), registou-se uma elevada resistência, com taxas



superiores a 74% para as três quinolonas estudadas, a saber, 74,3% (CIM de 0,5-64 µg/ml), 75,5% (CIM de 64->256 µg/ml) e 78,1% (CIM de 0,125-128 µg/ml) para LEV, AN e CIP, respectivamente. Verifica-se que, no total, as estirpes analisadas foram, em proporção, mais resistentes em relação à CIP, seguindo-se o AN, tendo a LEV a menor proporção de isolados resistentes.

Os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, bem como o intervalo de valores obtido, constituem parâmetros importantes dos resultados dos testes de susceptibilidade reportados quando múltiplos isolados de uma dada espécie são analisados. A CIM<sub>50</sub> representa o valor de CIM a que ≥50% dos isolados da população testada são inibidos (equivalente à mediana); a CIM<sub>90</sub> representa o valor de CIM a que ≥90% das estirpes da população testada são inibidas (Schwarz *et al.*, 2010). Neste contexto, e ainda fazendo referência aos valores de CIM observados no total das estirpes analisadas (n=237), é evidente um maior valor de CIM para o AN (CIM<sub>50</sub>>256 µg/ml e CIM<sub>90</sub>>256 µg/ml), seguido da CIP (CIM<sub>50</sub>=16 µg/ml e CIM<sub>90</sub>=64 µg/ml) e, por último, a LEV (CIM<sub>50</sub>=8 µg/ml e CIM<sub>90</sub>=32 µg/ml). Pode dizer-se, pois, que os isolados bacterianos apresentaram, maioritariamente, maior nível de resistência em relação ao AN, seguindo-se a CIP, sendo o menor nível de resistência observada para a LEV.

Particularizando a análise da prevalência dos isolados resistentes nos diferentes momentos do estudo, antes e após pressão selectiva *in vivo* de ENR, pode dizer-se que, em T0, as 101 estirpes de *E. coli* apresentaram uma resistência às quinolonas superior a 46%, tendo se observado o mesmo número de isolados resistentes à CIP e ao AN (n=53), seguido da LEV (n=47). Em T1, observou-se resistência às três quinolonas em todas as estirpes de *E. coli* (n=79; 100%). Por fim, em T2, a proporção de isolados resistentes, entre as 57 amostras, foi superior a 82%, verificando-se maior número de isolados resistentes em relação à CIP (n=51), seguido de LEV (n=50) e AN (n=47). Da análise imediata da resistência observada nos três momentos do estudo, apenas com base na observação dos dados descritos na Tabela 18, verifica-se, para as três quinolonas estudadas, um aumento da proporção de isolados resistentes de T0 (antes da administração de ENR) para T1 (após a administração de ENR) e um decréscimo da proporção de isolados resistentes de T1 para T2 (um mês após o fim do plano de administração de ENR). A associação entre a exposição à ENR e a resistência aos antimicrobianos é discutida no ponto 3. deste capítulo.

No que respeita aos valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> observados em T0, T1 e T2, de referir que o valor de CIM<sub>50</sub> é, em todos os momentos, superior para o AN (128 µg/ml em T0; 256 µg/ml em T1 e T2). Existem, contudo, diferenças em relação a este parâmetro entre CIP e LEV. Em T0, a CIM<sub>50</sub> de LEV (0,25 µg/ml) é superior à de CIP (0,125 µg/ml). O contrário observa-se em T1 e T2, sendo a CIM<sub>50</sub> de CIP (32 µg/ml em T1 e 16 µg/ml em T2) superior à de LEV

(16 µg/ml em T1 e 8 µg/ml em T2). Já a CIM<sub>90</sub> é, para as três quinolonas, igual em T0, T1 e T2, com o maior valor registado para o AN (>256 µg/ml), seguido de CIP (64 µg/ml) e, por último, LEV (32 µg/ml).

Importa referir que a comparação dos resultados obtidos em matéria de resistência com os dados descritos na literatura é difícil, não só pela escassez de estudos no âmbito da avaliação da pressão selectiva de antimicrobianos *in vivo*, como pelo facto de os trabalhos existentes usarem, por regra, critérios interpretativos de susceptibilidade diferentes: por vezes, há diferenças na norma considerada (CLSI, EUCAST, entre outros); noutros casos, mesmo com a aplicação da mesma norma, são utilizados critérios interpretativos diferentes (epidemiológicos ou clínicos). Outras disparidades tais como a recolha de amostras, o número de amostras e a metodologia laboratorial podem também existir (De Jong *et al.*, 2009). Por esse motivo, no que respeita à comparação de percentagens de resistência entre diferentes estudos publicados, recomenda-se que os autores assegurem que as mesmas metodologias e os mesmos critérios interpretativos sejam usados (Schwarz *et al.*, 2010).

Tendo em conta o propósito do presente estudo e considerando que o EURL-AR preconiza a utilização dos ECOFF definidos pelo EUCAST no âmbito da monitorização de susceptibilidade a antimicrobianos (EURL-AR, 2011), recorreu-se aos ECOFF estabelecidos pelo EUCAST (2012b) para o AN, CIP e LEV para classificação das estirpes de *E. coli* em estudo como susceptíveis ou resistentes: resistente se CIM>16 µg/ml para o AN; resistente se CIM>0,064 µg/ml para a CIP; resistente de CIM>0,25 µg/ml para a LEV. Neste contexto, também a OIE (2003) recomenda o uso de critérios epidemiológicos para efeitos de monitorização de resistência. Concretamente, o termo susceptível aplica-se à população bacteriana WT, caracterizada pela ausência de mecanismos adquiridos e mutacionais de resistência ao fármaco em causa; o termo resistente aplica-se à população bacteriana NWT caracterizada pela presença de um mecanismo adquirido ou mutacional de resistência ao fármaco (EUCAST, 2011). De referir que o ECOFF não é alterado, independentemente das circunstâncias e, ainda, que os microrganismos NWT (ou resistentes do ponto de vista epidemiológico) podem ou não responder clinicamente ao tratamento com o antimicrobiano. Do ponto de vista microbiológico, a resistência é definida como o estado no qual um isolado apresenta um mecanismo de resistência que lhe confere menor susceptibilidade comparativamente a outros membros da mesma espécie que não possuem nenhum mecanismo de resistência. (Cantón & Morosini, 2011).

A escolha dos antimicrobianos AN, CIP e LEV para avaliar a resistência às quinolonas prende-se com a sua significância clínica. Desde logo, lembre-se que as quinolonas (incluindo as FQs) constituem uma das classes de antimicrobianos mais prescritas em todo o

mundo (Morgan-Linnell *et al.*, 2009), sendo consideradas antimicrobianos criticamente importantes tanto em medicina humana (WHO, 2009) como em medicina veterinária (FAO/WHO/OIE, 2008). A OIE defende que os antimicrobianos criticamente importantes usados em medicina humana e em medicina veterinária devem ser sujeitos a monitorização de resistência (OIE, 2003). Apesar da resistência ao AN ser comum entre *Enterobacteriaceae*, resultado do seu uso na prática clínica (Silva, 2002), diversos autores sugerem que o AN tem utilidade na análise da resistência às quinolonas. Desde logo, constitui um indicador da resistência às FQs, uma vez que o desenvolvimento de resistência ao AN, representa, para a maioria das bactérias, um primeiro passo para o desenvolvimento de resistência de alto nível às FQs (FAO/WHO/OIE, 2008). Ito e colaboradores (2008), demonstraram uma correlação entre o halo de inibição do AN e as CIMs das FQs testadas, sugerindo que esta quinolona pode ser usada como um marcador para a susceptibilidade das FQs em *E. coli*. Outros autores defendem ainda o uso do AN como um indicador para a detecção de mutações simples, ou seja, bactérias que apresentam ainda uma única mutação que lhes confere reduzida susceptibilidade às quinolonas (Cavaco *et al.*, 2008). Refira-se, no entanto, que o uso do AN pode não ser apropriado para a detecção dos recentemente descritos determinantes de RQMP que não afectam a CIM de AN da mesma forma que as mutações nas topoisomerasas (Ito *et al.*, 2008).

A CIP, usada como representante das quinolonas de segunda geração, constitui um bom indicador dos mecanismos de resistência às FQs, pois apesar de estes não afectarem igualmente as CIMs de todas as FQs, em geral, as CIMs de CIP (bem como de norfloxacin) são afectadas por todos estes mecanismos (Morgan-Linnell *et al.*, 2009). Refira-se que uma vez que a CIP é um fármaco usado em medicina humana, é recomendado o seu uso em vez de ENR nos programas de vigilância de resistência na Europa (EFSA, 2008). Já a LEV, que foi utilizada neste estudo como representante das quinolonas de terceira geração, é geralmente menos afectada pelos mecanismos de resistência (Morgan-Linnell *et al.*, 2009). Neste contexto, refira-se que foi sem surpresa que se registou um menor número de isolados resistentes, em T0, para a LEV, por comparação ao AN e à CIP. Em geral, a actividade antimicrobiana das quinolonas aumenta com o desenvolvimento de novas gerações, sendo que as quinolonas da terceira e da quarta gerações são frequentemente apelidadas de quinolonas de espectro aumentado *versus* quinolonas convencionais da segunda geração (Ball, 2000). As FQs mais novas, tais como a LEV, a esparfloxacin, a grepafloxacin e a trovafloxacin, têm maior potência contra estreptococos e muitos anaeróbios, comparativamente a quinolonas mais antigas (Silva, 2002), tanto que a sua introdução na Europa foi bem sucedida em países com grande consumo de antimicrobianos e elevadas taxas de resistência (Ramalinho *et al.*,

2010). Ainda suportando a escolha da CIP e LEV como representantes da resistência às FQs, de destacar que o CLSI (2011) sublinha que os antimicrobianos CIP e LEV são indicados pela “Food and Drug Administration” (FDA) como agentes antimicrobianos com relevância clínica e devem, por isso, ser considerados para a realização de testes de rotina e reprodução de relatórios.

A exposição a antimicrobianos é tida como o factor mais importante na emergência e disseminação de resistência (Michael *et al.*, 2008; Cantón & Morosini, 2011). No que concerne a elevada resistência observada inicialmente, em T0 (antes da aplicação do plano profilático, logo, antes do efeito da pressão selectiva da ENR), sugere-se que esteja relacionada com o uso anterior das quinolonas, tanto em humanos como em animais, desde o início da utilização do AN em clínica humana, na década de 60, a seguir à qual se observou o imediato surgimento de bactérias resistentes às quinolonas (Jackson *et al.*, 1998; Engberg *et al.*, 2001, Ito *et al.*, 2008). Só no início dos anos 80, a primeira geração de quinolonas (ácido oxolínico e flumequina) foi licenciada para uso em animais e a primeira FQ, a ENR, já no final da década de 80. Desde então, FQs adicionais têm sido autorizadas, tendo se observado que à medida que o uso de quinolonas foi aumentando, a ocorrência de estirpes com reduzida susceptibilidade ou com resistência também aumentou, fenómeno reportado tanto em isolados bacterianos de origem humana como em bactérias originárias de animais produtores de alimento (Engberg *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2008; Yagci *et al.*, 2009). Considerando ainda a elevada percentagem de resistência registada em T0, sugere-se que tal observação possa não estar completamente desassociada do facto de Portugal representar, na Europa, um dos países com maior consumo de quinolonas em humanos (Ramalinho *et al.*, 2010) e ser também um dos países europeus com maior consumo de quinolonas em animais (das quais 78,9% são FQs) face às toneladas de carne produzidas (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007). De salientar, contudo, que o flagelo da resistência às quinolonas em *E. coli* é crescente por toda a Europa, tanto em isolados clínicos humanos invasivos (ECDC, 2011) como em estirpes de *E. coli* comensal isolada de animais (EFSA & ECDC, 2011).

Uma vez que descrições em matéria de emergência de resistência *in vivo* em bactérias sob condições de pressão selectiva de antimicrobianos são escassas na literatura (Cantón & Morosini, 2011), apenas se compara a resistência observada em T0 com outros trabalhos e relatórios nacionais respeitantes à resistência em estirpes de *E. coli* comensal isolada de animais saudáveis, deixando a análise da evolução da resistência após pressão selectiva *in vivo* de ENR para o ponto 3. deste capítulo. Assim, dados publicados pela EFSA e ECDC (2011), relativos à resistência a antimicrobianos entre bactérias zoonóticas e indicadoras fornecidos por 25 Estados-Membros, em 2009, reportaram proporções de resistência em

isolados do indicador comensal *E. coli*, apontando para níveis de resistência à CIP moderados a elevados em frangos e porcos e menores em bovinos. A resistência à CIP e AN, em isolados de *E. coli* comensal proveniente de *Gallus gallus*, foi de 47% e 44%, respectivamente. Já em porcos, a resistência de *E. coli* à CIP e AN foi de 12% e 8%, respectivamente. Isolados de *E. coli* de carne de porco apresentaram uma resistência de 6%, para CIP e AN (EFSA & ECDC, 2011). No que respeita particularmente a bovinos, a informação refere-se apenas a 9 Estados-Membros e à Suíça. A informação engloba isolados de *E. coli* comensal de animais saudáveis, incluindo e não discriminando bovinos de carne, bovinos de leite e vitelos, tendo-se registado valores de resistência de 8%, para CIP, e 5%, para AN, tal descrito anteriormente na Tabela 4. Salienta-se, ainda, que a resistência reportada neste relatório foi determinada por aplicação dos ECOFF definidos pelo EUCAST (EFSA & ECDC, 2011).

Com base nos últimos relatórios produzidos pela Dinamarca (DANMAP 2010, 2011), Finlândia (FINRES-Vet 2007-2009, 2011), França (FARM 2007-2008, 2010), Itália (ITAVARM 2003, 2003), Países-Baixos (MARAN 2008, 2010), Noruega (NORM/NORM-Vet 2010, 2011), Suécia (SVARM 2010, 2011) e Espanha (VAV 2005, 2006), a resistência ao AN e às FQs (CIP ou ENR) reportada em estirpes de *E. coli* de origem bovina isoladas de fezes de animais saudáveis (Tabela 5), excepto em relação aos dados reportados pela Espanha que comporta isolados bacterianos de animais doentes, oscilou entre 0,0% (Dinamarca e Noruega) a 20,3% (Países-Baixos). De referir que a resistência reportada nestes relatórios foi determinada por aplicação dos ECOFF estabelecidos pelo EUCAST à data, à excepção dos relatórios de Itália e Espanha, que aplicaram, respectivamente, os critérios clínicos definidos à data pelo CLSI e pela “Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencias a Antibióticos” (Red VAV). Lamentavelmente, a informação relativa à ocorrência de resistência em isolados de *E. coli* comensal provenientes de espécies animais produtoras de alimentos em Portugal é rara. De referir, ainda assim, que dados de 2004 referentes unicamente à resistência de estirpes de *E. coli* de origem suína, categorizam Portugal como o país que reportou o valor mais elevado de resistência às FQs nestes isolados: 76% (Hendriksen *et al.*, 2008).

Outros estudos neste âmbito evidenciam, por regra, proporções de resistência em isolados de *E. coli* (comensal ou patogénica) de bovinos inferiores às reportadas neste estudo em T0. Certamente que tais diferenças são acentuadas pela aplicação dos critérios estabelecidos pelo CLSI na classificação da resistência, que se sabem ser valores superiores aos ECOFF utilizados neste estudo. Alessiani e colaboradores (2009), estudaram, em Itália, a resistência às FQs em isolados de *E. coli* provenientes de fezes de bovinos e galinhas resistentes ao AN, não tendo observado nenhum isolado resistente à CIP ou à ENR. Na Coreia, Lim *et al.* (2010) reportaram uma resistência de 22,7% às FQs (CIP, ENR e norfloxacina) em *E. coli*

proveniente de fezes de vitelos de carne diarreicos. Ružauskas e colaboradores (2010) determinaram os valores de CIM em *E. coli* e *Salmonella enterica* de animais produtores de alimentos (frangos, porcos e bovinos), na Lituânia. Das 137 amostras de *E. coli* analisadas, observou-se uma resistência de 53% e de 34% para AN e CIP, respectivamente. As estirpes de *E. coli* isoladas de frangos registaram a resistência mais elevada, por oposição aos isolados de *E. coli* de origem bovina, cuja resistência ao AN e CIP foi de, respectivamente, 25,9% e 20,7%. De referir que este estudo foi o único em que os ECOFF estabelecidos pelo EUCAST foram aplicados (Ružauskas *et al.*, 2010), tal como no presente estudo.

Fazendo referência a alguns estudos efectuados em estirpes de *E. coli* comensal isoladas de humanos saudáveis e destacando, também aqui, a comum aplicação dos critérios estabelecidos pelo CLSI na categorização da resistência, Lamikanra *et al.* (2011) avaliaram a resistência a antimicrobianos em estirpes de *E. coli* comensal isolados de fezes de indivíduos aparentemente saudáveis no período de 2005 a 2009 na comunidade nigeriana. Este estudo evidenciou uma rápida evolução no aparecimento de *E. coli* resistente às quinolonas imediatamente após a introdução de CIP, tendo-se observado, em 2005, uma prevalência de isolados de *E. coli* resistentes ao AN e às FQs de 21,7% (n=18) e 1,2% (n=1), respectivamente. Nas estirpes recolhidas em 2009 foi observada uma resistência ao AN e às FQs de 34,5% (n=35) e 10,8% (n=11), respectivamente (Lamikanra *et al.*, 2011). Um estudo de Namboodiri e colaboradores (2011) realizado no Gana, em 293 estirpes de *E. coli* comensal isolados de indivíduos saudáveis em 2006, 2007 e 2008, reportou uma taxa de resistência ao AN e à CIP de 13,7% (n=40) e 7,8% (n=23), respectivamente. Todos estes, à excepção de um isolado, apresentaram ainda resistência a três ou mais classes de antimicrobianos.

Ora, a resistência inicial observada no presente estudo, em T0 (52,5%, 54,5% e 46,5% para AN, CIP e LEV, respectivamente), é francamente superior ao reportado em isolados de origem bovina pela EFSA e ECDC (2011), pelos supramencionados relatórios nacionais ou demais estudos, estanto, ainda assim, mais próximo da resistência de 20,3% às FQs e AN, observada pelos Países-Baixos (MARAN 2008, 2010), e de 20,7%, observada no trabalho de Ružauskas e colaboradores (2010), ambos os estudos recorrendo aos ECOFF do EUCAST para classificação da susceptibilidade dos isolados. Embora os dados observados neste estudo não sejam representativos do que se observa nas explorações de bovinos em Portugal, tratando-se de uma única recolha numa única exploração, não deixam de ser preocupantes, tanto em matéria de saúde animal como de saúde humana, dado o risco de transmissão de bactérias resistentes e/ou genes de resistência às pessoas através do consumo de alimentos, contacto directo ou outros mecanismos ambientais (WHO, 2011), sendo a cadeia alimentar

considerada uma das principais vias de transferência de resistência (Fey *et al.*, 2000; Manian, 2003; Ishida *et al.*, 2010). Mais preocupante se torna o observado tratando-se de isolados comensais de vitelos saudáveis. Estes microrganismos funcionam como reserva de genes de resistência, operando como mediadores na transmissão e disseminação desses genes, através de mecanismos de transferência variáveis, pelos vários ecossistemas, para bactérias patogênicas ou comensais, alheios a quaisquer barreiras ecológicas, geográficas ou mesmo filogenéticas (Alessiani *et al.*, 2009; Howkey & Jones, 2009; Ishida *et al.*, 2010). Desta forma, os animais e os produtos alimentares de origem animal constituem um armazém de bactérias resistentes, não-patogênicas (comensais), tais como *E. coli*, *E. faecium* e *E. faecalis*, que podem ser transferidas a humanos (contacto directo ou via alimentação) ou a partir dos quais os determinantes de resistência podem ser transferidos (transferência horizontal) a outras bactérias zoonóticas ou comensais (EFSA, 2008; Alessiani *et al.*, 2009). Por este motivo, a monitorização da resistência antimicrobiana em microrganismos indicadores comensais isolados de animais saudáveis representativos da população, constitui um bom indicador da prevalência da resistência numa população bacteriana de origem animal, assim como dos determinantes de resistência presentes nestes organismos (EFSA & ECDC, 2011).

## **2. Prevalência dos genes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos**

A presença dos genes de RQMP foi investigada em 237 estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de vitelos saudáveis pelo método de amplificação por PCR e confirmada por sequenciação nucleotídica. Descreve-se abaixo, na Tabela 19, a prevalência observada para os genes *qnr* (*A*, *B*, *S*, *C*, e *D*), *aac(6)'-Ib-cr* e *qepA*. O gene de RQMP mais frequente foi o *qnrS*, seguido de *qnrD*, *qnrB* e, por fim, o gene *aac(6)'-Ib-cr*. Os genes *qnrA*, *qnrC* e *qepA* não foram identificados em nenhum dos isolados analisados.

De referir, ainda, que a sequenciação nucleotídica dos genes de RQMP detectados, após purificação dos produtos de PCR, tal como descrito no ponto 5.2 do capítulo anterior, confirmou os genes *aac(6)'-Ib* detectados com sendo da variante *cr*, os genes *qnrS* como sendo da variante *S1*, os genes *qnrB* como sendo da variante *B2* e o gene *qnrD* como sendo o alelo *qnrD*.

Tabela 19. Frequência dos genes de RQMP.

Tempo	Genes de RQMP				
	<i>qnr</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrD</i>	<i>aac(6')Ibcr</i>
<b>T0</b>	3% (n=3)	-	3% (n=3)	-	2% (n=2)
<b>T1</b>	15,2% (n=12)	-	5,1% (n=4)	10,1% (n=8)	-
<b>T2</b>	22,8% (n=13)	7% (n=4)	10,5% (n=6)	5,3% (n=3)	-
<b>TOTAL</b>	11,8% (n=28)	1,7% (n=4)	5,5% (n=13)	4,6% (n=11)	0,8% (n=2)

A RQMP é reconhecida sobretudo em *Enterobacteriaceae* (Gay *et al.*, 2011; Sjölund-Karlsson *et al.*, 2009), sendo que estes genes codificados em plasmídeos já foram reportados em todos os continentes populados e na maioria das *Enterobacteriaceae* mais comuns em clínica, entre as quais os genes *qnr* parecem ser mais prevalentes em *Enterobacter* spp., seguido de *Klebsiella* spp. e *E. coli*; nesta última, o gene *aac(6')-Ib-cr* parece ser mais prevalente (Strahilevitz *et al.*, 2009). Apesar da larga disseminação, estudos de prevalência de resistência às quinolonas mediada por genes *qnr* demonstram que este mecanismo parece ser pouco frequente (Jacoby *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004b).

A análise da prevalência destes genes nos três momentos do estudo, parece evidenciar diferente frequência dos mesmos ao longo do tempo. Este será, no entanto, um aspecto discutido no ponto 3. No que respeita à prevalência de genes de RQMP observada (total), os resultados obtidos parecem reflectir a actual prevalência de genes *qnr* reportada em *E. coli*, independentemente do fenótipo de resistência. Desde logo, a não detecção dos genes *qnrA*, *qnrC* e *qepA* é comum em diversos trabalhos realizados em estirpes de *E. coli* de diferentes origens. Vários estudos reportaram prevalências de 0% relativamente ao gene *qnrA* em isolados de *E. coli* de origem humana (Cattoir *et al.*, 2007a; Kanj *et al.*, 2008; Minarini *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2008; Vasilaki *et al.*, 2008; Yamane *et al.*, 2008; Boudry *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2008; Morgan-Linnell *et al.*, 2009; Pallechi *et al.*, 2009; Pitout *et al.*, 2008; Namboodiri *et al.*, 2011) e animal (Ahmed *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Yue *et al.*, 2008; Cerquetti *et al.*, 2009; Pomba *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010). O gene *qnrC*, ainda pouco pesquisado dada a sua recente descoberta, também não foi encontrado nos estudos de Zhao e colaboradores (2010), em que se analisaram isolados de *E. coli* de origem humana, animal e ambiental, nem de Zhou *et al.* (2011) ou Nasik *et al.* (2011), ambos realizados em *E. coli* de origem humana. Por último, o gene codificante de bomba de efluxo *qepA* parece ter uma menor prevalência,



comparativamente aos demais determinantes de RQMP. O trabalho de Cerquetti e colaboradores (2009) também não encontrou nenhum isolado de *E. coli* positivo para este gene, em isolados de *E. coli* de frangos, à semelhança do estudo de Zhao *et al.* (2010) e ainda dos trabalhos de Minarini *et al.* (2008) Zhou *et al.* (2011), realizados em isolados de *E. coli* humanos. Já Yamane e colaboradores (2008), descreveram uma frequência de 0,3% (2 de 751 isolados) deste gene em isolados de *E. coli* colhidos de 140 hospitais japoneses entre 2002 e 2006. Em França, Cattoir e colaboradores (2008b) analisaram 121 estirpes de *Enterobacteriaceae* ESBL-positivas, detectando apenas um isolado de *E. coli* positivo para o gene *qepA* (0,8%). Outro trabalho realizado na Coreia do Sul, envolvendo 461 isolados de *Enterobacteriaceae*, identificou este gene num isolado (Kim *et al.*, 2009c). Em contraste com os trabalhos referidos anteriormente, Liu e colaboradores (2008) reportam uma prevalência de 58,3% (n=28) de *qepA* em estirpes de *E. coli* isoladas de porcos, na China.

Vários trabalhos têm descrito elevada frequência do gene *aac(6')-Ib-cr* em isolados de *E. coli* de diferentes origens, chegando a ser, nalguns estudos, o gene de RQMP dominante. Em contraste com a frequência de 0,8% (n=2) observada neste estudo, análises da presença deste gene em isolados clínicos de *E. coli* de origem humana evidenciam prevalências frequentemente mais elevadas, desde 9,7% (Cavaco *et al.*, 2008), 31,3% (Zhou *et al.*, 2011), 45,9% (Nasik *et al.*, 2011) a 64,7% (Pazhani *et al.*, 2011). No que se refere a estirpes de *E. coli* de origem animal, uma prevalência variável de *aac(6')-Ib-cr* tem sido reportada. Por exemplo, Zhao e colaboradores (2010) não detectaram este gene em nenhum dos isolados humanos e animais (frangos e porcos) analisados, descrevendo a sua presença apenas num isolado (0,6%) de *E. coli* de origem ambiental. Cavaco *et al.* (2008) também não detectaram este gene em isolados provenientes de porcos. Por outro lado, Ishida *et al.* (2010) observaram uma prevalência de 1,1% (n=3) oriundos de *E. coli* de amostras de água de uma aquacultura no Egito. Um estudo de Ma e colegas (2009) reportou uma frequência de 41,7% (n=15) da variante *cr* da acetiltransferase de aminoglicosídeos em estirpes de *E. coli* isoladas de animais de companhia, superior à observada, no mesmo estudo, em isolados de animais destinados ao consumo humano (frangos, porcos, perdizes e patos), a saber, 6,2% (n=4). Ainda, 28 (58,3%) isolados *aac(6')-Ib-cr*-positivos, de origem suína, foram reportados por Liu *et al.* (2008).

No que concerne a prevalência dos genes *qnr* observada (11,8%; n=28), parece estar em linha com o reportado na literatura até então. Estudos efectuados em isolados clínicos de origem humana descrevem prevalências destes determinantes de RQMP desde 0% (Yamane *et al.*, 2008), 2,3% (Minarini *et al.*, 2008), 3,2% (Wu *et al.*, 2008b), 3,9% (Zhou *et al.*, 2011), 4% (Robicsek *et al.*, 2006b) a 10% (Vasilaki *et al.*, 2008). Variação semelhante é observada em estirpes de *E. coli* isoladas de animais, por exemplo, com descrições de 0% em isolados de

origem suína (Cavaco *et al.*, 2008), 4,1% (n=7) em isolados de frangos e porcos (Zhao *et al.*, 2010), 5,8% (n=16) em estirpes de *E. coli* recolhidas de aquacultura (Ishida *et al.*, 2010) a 7,7% e 8,3% reportados em isolados de animais de companhia e de animais de produção (porcos e aves), respectivamente (Ma *et al.*, 2009). Ainda em *E. coli* de origem animal, frequências superiores ao observado foram também descritas, nomeadamente na China, por Liu e colaboradores (2008), que detectaram 20,9% (n=10) de genes *qnr* em isolados de origem suína.

Vários estudos parecem evidenciar o gene *qnrB* como o mais frequente em *Enterobacteriaceae*, das cinco famílias conhecidas (Minarini *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008b; Kim *et al.*, 2009b; Strahilevitz *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2011; Vetting *et al.*, 2011); no entanto, tal não se verificou neste estudo, sendo o gene *qnrB* o menos prevalente dos genes *qnr* detectados (1,7%), superado pelos genes *qnrS* (5,5%) e *qnrD* (4,6%). Não é, porém, incomum a descrição de uma baixa frequência de *qnrB* em estirpes de *E. coli*; ainda, muitos trabalhos referem também o gene *qnrS* como o mais prevalente dos *qnr*. Por exemplo, em estirpes de origem humana, Nasik e colaboradores (2011) não identificaram *qnrB* nem *qnrD* nos isolados, reportando 1,6% e 1,6% positivos para *qnrA* e *qnrS*. Vasilaki *et al.* (2008) também não detectaram nenhum isolado de *E. coli* positivo para *qnrB*, reportando uma prevalência de 10% para o *qnrS*. Zhou *et al.* (2011) reportaram 0,4%, 1,2%, e 2,7% de isolados positivos para *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*, respectivamente, não tendo identificado nenhum isolado *qnrD*-positivo. Em matéria de variantes *qnr* em isolados de *E. coli* de origem animal, a literatura evidencia um panorama semelhante ao observado, sendo comum a descrição de uma prevalência de *qnrS* superior a *qnrB*. Zhao *et al.* (2010) estudaram a frequência de genes de RQMP em 172 isolados de *E. coli* proveniente de animais, humanos e ambiente, em 2002, na China, descrevendo uma prevalência de 4,1% para genes *qnr* (um *qnrB6* de origem ambiental, cinco *qnrS1* de frangos e porcos, e um *qnrD* de porcos). Liu e colaboradores (2008) analisaram isolados de *E. coli* de origem suína, na China. Das 48 estirpes analisadas, *qnrB* e *qnrS* foram detectados em um (2,1%) e 9 (18,8%) isolados, respectivamente. Huang *et al.*, (2009) investigaram a evolução temporal dos determinantes de RQMP em frangos, entre 2001 e 2007. De um total de 532 isolados de *E. coli* estudados, 9,8% foram positivos para *qnr*. Os alelos *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* foram encontrados em 0,75% (n=4), 3,9% (n=21) e 5,1% (n=27) dos isolados examinados, nenhum dos quais foi positivo para *qnrC*.

Não obstante a concordância dos resultados obtidos com a bibliografia existente, importa destacar, em particular, a prevalência observada para o gene *qnrD* (4,6%; n=11), manifestamente superior ao reportado na literatura até então, possivelmente devido à sua parca investigação decorrente da sua descoberta ainda recente, por Cavaco e colegas (2009).

Adicionalmente, para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que descreve a identificação de resistência às quinolonas mediada por *qnrD* em isolados de *E. coli* de bovinos. De referir também que em relação às variantes dos genes *qnrS* e *qnrB* encontradas no presente estudo (*qnrS1* e *qnrB2*), o *qnrS1* parece ser o alelo *qnrS* mais reportado na literatura, tanto em estirpes de *E. coli* isolada de humanos (Lavilla *et al.*, 2008; Vasilaki *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008b; Jeong *et al.*, 2011; Lamiranka *et al.*, 2011; Namboodiri *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011) como de animais (Ma *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010). Neste contexto, de salientar que um estudo recente descreveu pela primeira vez a identificação do gene *qnrS1* de RQMP em isolados clínicos de *E. coli* provenientes de um vitelo com colibacilose, no Reino Unido. Além do *qnrS1*, esta estirpe revelou-se portadora do gene *blaCTX-M*, embora não localizado no mesmo plasmídeo (Kirchner, Wearing & Teale, 2011). Já a identificação do gene *qnrB2* aparenta ser menos comum, tanto em isolados provenientes de humanos (Jeong *et al.*, 2011; Namboodiri *et al.*, 2011) como de animais (Ma *et al.*, 2009). De referir, porém, o estudo de Pomba e colaboradores (2009) que identificou a variante *qnrB2* numa estirpe de *E. coli* multirresistente (isolada de um cão com cistite crónica sujeito a terapia antimicrobiana prolongada), em associação com outros genes de resistência mediados por plasmídeos. Esta constituiu, à data, a primeira descrição da ocorrência de RQMP em estirpes de *E. coli* uropatogénicas em animais de companhia.

Tal como observado por Hernández *et al.*, (2011) e já referido na análise anterior da Tabela 8, é patente a existência de um menor número de estudos acerca da frequência dos genes de RQMP em bactérias provenientes de animais e do ambiente, por comparação aos estudos efectuados em isolados de origem humana. É igualmente visível o menor número de trabalhos realizados em organismos indicadores, como em *E. coli* comensal, por comparação com isolados clínicos.

### **3. Pressão selectiva *in vivo* de enrofloxacina: efeitos no desenvolvimento de resistência e no aparecimento de genes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos**

Através da aplicação do modelo de regressão logística exacta, procurou-se determinar a associação entre o tempo do estudo (isto é, a exposição à ENR em T0, T1 e T2) e o aparecimento de resistência às quinolonas testadas; lembre-se que a classificação da susceptibilidade das estirpes de *E. coli* em estudo foi atribuída segundo os ECOFF do EUCAST (2012b). Tal como observado na Tabela 20, a probabilidade de resistência ao AN, à CIP e à LEV é significativamente diferente nos três momentos da colheita, aumentando de T0 para T1 ( $p < 0,0001$ ) e de T0 para T2 ( $p < 0,05$ ), embora se observe uma diminuição da resistência de T1 para T2.

Tabela 20. Associação entre a exposição à ENR e a resistência aos antimicrobianos AN, CIP e LEV.

Tempo	AN		CIP		LEV	
	Parâmetro estimado	Valor de <i>p</i>	Parâmetro estimado	Valor de <i>p</i>	Parâmetro estimado	Valor de <i>p</i>
T1 <sup>a</sup>	-4,6007	< 0,0001	-4,6007	< 0,0001	-4,8363	< 0,0001
T2 <sup>a</sup>	-1,4395	0,0002	-2,0289	< 0,0001	-2,0918	< 0,0001

<sup>a</sup>relativamente a T0

Em virtude da escassez de dados reportados a nível internacional, quer seja em humanos, bovinos ou outros animais, a comparação entre os resultados do presente estudo e outros países é difícil. Considera-se, porém, que o principal factor que contribui para a ocorrência de resistência a antimicrobianos em bactérias indicadoras é provavelmente a pressão selectiva exercida pelo uso de antimicrobianos em diferentes populações de animais destinados ao consumo humano. Desde logo, o reconhecimento de que o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento promove a selecção de resistência aos antimicrobianos na microbiota de animais de produção de alimentos e do risco de estas bactérias resistentes poderem contaminar a carne durante o processamento e, em última análise, atingir o consumidor através do seu consumo (White *et al.*, 2003) levou a que, na UE, os Estados-Membros abandonassem o uso destes agentes como promotores de crescimento em animais destinados ao consumo humano, desde Janeiro de 2006 (UE, 2003).

Tendo em conta que os 101 animais que constituíram a origem dos isolados bacterianos analisados no presente trabalho foram sujeitos a um plano de administração “off-label” de ENR, admite-se que a pressão selectiva imposta pela exposição a este antimicrobiano esteja na origem do aumento da resistência às quinolonas observado ao longo do tempo de estudo. Por outro lado, o efeito da retirada do uso de ENR parece ter tido um efeito imediato na redução da resistência, tendo se observado um decréscimo da percentagem de isolados resistentes de T1 para T2 (um mês após o término da administração da ENR). Em concordância com esta hipótese, vários autores documentam a associação entre exposição a antimicrobianos e a emergência de isolados bacterianos resistentes. Por vezes, quando a utilização de antimicrobianos é abolida ou reduzida, verifica-se um decréscimo na prevalência da resistência, possivelmente porque assim que a pressão selectiva é removida, as estirpes resistentes são eventualmente repostas por estirpes susceptíveis. (Phillips *et al.*, 2004; Cantón

& Morosini, 2011). Trabalhos realizados no âmbito do efeito das quinolonas na microbiota intestinal têm sugerido que estes agentes seleccionam estirpes de *E. coli* resistentes às quinolonas, especialmente quando usadas profilacticamente em pacientes neutropénicos ou no tratamento de infecções do trato urinário (Gupta *et al.*, 2005). Resultados de um estudo de Yagci *et al.* (2009), realizado em pacientes antes e após terapia com quinolonas, evidenciaram que a prevalência de estirpes de *E. coli* resistente às quinolonas na microbiota fecal aumentou de forma constante com a duração da terapia com estes fármacos. Acresce que a pressão selectiva do uso de antimicrobianos parece ser maior aquando da aplicação de baixa-dosagem e exposição a longo-prazo, características de promotores de crescimento e profiláticos. Importa referir que também o uso terapêutico, que requer elevadas doses em curtos períodos de tempo, pode contribuir para o aparecimento de resistência (McEwen, 2001). Exemplos concretos do efeito da descontinuação do uso de antimicrobianos na prevalência da resistência são o que se observou na Dinamarca após proibição o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, em 2000, registando-se significativa redução da proporção de isolados de *E. faecium* de frangos resistentes à avoparcina, avilamicina e virginamicina (Phillips *et al.*, 2004). Também na Dinamarca, em 2003, as FQs foram banidas para o uso em animais, traduzindo-se na redução do consumo de FQs em animais destinados à produção de alimentos para consumo humano (porcos, bovinos e frangos) de 114 Kg, em 2001, para cerca de 24 Kg, em 2006. Esta alteração resultou também no decréscimo da resistência à CIP em *E. coli* proveniente de carne de frango produzida na Dinamarca de 10%, em 2003, para 4,5%, em 2006 (Hammerum & Heuer, 2009).

Tabela 21. Associação entre a exposição à ENR e o aparecimento de genes de RQMP.

Gene de RQMP	T0 [%(n)]	T1 [%(n)]	T2 [%(n)]	Valor de <i>p</i>
<i>qnrB</i>	-	-	7 (4)	0,001622
<i>qnrS</i>	3 (3)	5,1 (4)	10,5 (6)	0,1318
<i>qnrD</i>	-	10,1 (8)	5,3 (3)	0,005695
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	2 (2)	-	-	0,2572
<b>TOTAL</b>	5 (5)	15,2 (12)	22,8 (13)	0,003706

No que concerne a análise da prevalência dos genes nos três momentos do estudo, parece verificar-se diferente frequência dos mesmos ao longo do tempo (Tabela 21). Desde logo, para o total de genes de RQMP, observou-se uma prevalência de 5% (n=5), 15,2% (n=12) e 22,8% (n=13) em T0, T1 e T2, respectivamente. Ora, como se suspeitava pelo aumento da prevalência dos genes de RQMP observado ao longo do tempo do estudo, o aparecimento de genes de RQMP (total) parece estar associado à pressão selectiva exercida pela ENR ( $p < 0,05$ ). No entanto, analisando a prevalência de cada gene em particular ao longo do tempo, esta associação só se observa estatisticamente relevante para os genes *qnrB* e *qnrD* ( $p < 0,05$ ), em contraste com os genes *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr* ( $p > 0,005$ ).

Neste contexto, encontram-se alguns trabalhos que reportam o aumento da prevalência de genes de RQMP ao longo do tempo de estudo. Kim e colaboradores (2009b) avaliaram a alteração temporal na prevalência de genes de RQMP em isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae* recolhidos de hemoculturas hospitalares por um período de 9 anos (de 1998 a 2001 e de 2005 a 2006), na Coreia, evidenciando, a par de um aumento da resistência à CIP ao longo do tempo do estudo, o aumento da prevalência geral dos genes de RQMP. Num estudo realizado na Nigéria, em que se analisou a resistência a antimicrobianos entre estirpes *E. coli* comensal isolados de fezes de indivíduos saudáveis entre 2005 e 2009, reportou-se um aumento da resistência às quinolonas bem como dos genes de RQMP após a introdução da CIP na comunidade. Em 2005, observou-se uma prevalência de isolados de *E. coli* resistentes ao AN e às FQs de 21,7% (n=18) e de 1,2% (n=1), respectivamente. Todos foram negativos para genes *qnr* (A, B e S) e *qepA*; no entanto, quatro estirpes com elevada resistência ao AN apresentaram mutações no gene *gyrA*. Nas estirpes recolhidas em 2009 foi observada uma resistência ao AN e às FQs de 34,5% (n=35) e 10,8% (n=11), respectivamente. Em nove destes isolados foram detectadas uma ou mais mutações em *gyrA* e *parC* e seis isolados foram positivos para o gene *qnrS1* (Lamikanra *et al.*, 2011). Noutro trabalho, Huang *et al.*, (2009) investigaram a evolução temporal dos determinantes de RQMP em frangos, entre 2001 e 2007, tendo observado um aumento significativo da resistência à CIP ao longo do tempo do estudo em associação com o aumento da prevalência de genes *qnr* e *aac(6')-Ib-cr*.

Tabela 22. Associação entre isolados de *E. coli* positivos para genes de RQMP e a percentagem de resistência aos antimicrobianos AN, CIP e LEV.

Gene de RQMP	AN			CIP			LEV		
	R [% <b>(n)</b> ]	S [% <b>(n)</b> ]	Valor de <i>p</i>	R [% <b>(n)</b> ]	S [% <b>(n)</b> ]	Valor de <i>p</i>	R [% <b>(n)</b> ]	S [% <b>(n)</b> ]	Valor de <i>p</i>
<i>qnrB</i>	50(2)	50(2)	0,231	75(3)	25(1)	0,8815	75(3)	25(1)	0,9728
<i>qnrS</i>	76,9(10)	23,1(3)	0,9042	100(13)	(0)0	0,04427	92,3(12)	7,7(1)	0,1258
<i>qnrD</i>	90,9(10)	9,1(1)	0,2243	90,9(10)	9,1(1)	0,2916	90,9(10)	9,1(1)	0,2959
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	100(2)	(0)0	0,4188	(100)2	(0)0	0,4515	100(2)	(0)0	0,4031
<b>TOTAL</b>	80(24)	20(6)	0,5421	93,3(28)	6,7(2)	0,03054	90(27)	10(3)	0,03488

R, resistente; S, sensível.

Considerando que os genes de RQMP, embora conferindo baixo nível de resistência às quinolonas, desempenham um papel na selecção de resistência às quinolonas em associação com outros mecanismos ainda pouco conhecido (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011a), procurou-se aferir a associação entre a prevalência de mecanismos de resistência mediados por plasmídeos e a percentagem de resistência aos antimicrobianos AN, CIP e LEV (Tabela 22). Desde logo, é visível que uma maior percentagem de isolados positivos para os genes de RQMP são resistentes às três quinolonas testadas ( $\geq 80\%$ ). Acresce que esta associação entre resistência e presença de determinantes de RQMP (total) se mostra estatisticamente significativa para as FQs CIP e LEV ( $p < 0,05$ ), por oposição ao que se verifica para o AN ( $p > 0,05$ ). Numa análise individual de cada gene de RQMP, esta associação só é estatisticamente significativa para a presença do gene *qnrS* e a resistência à CIP ( $p < 0,05$ ).

No âmbito do observado, o que se constata em estudos similares é que os genes de RQMP parecem associar-se a isolados resistentes e susceptíveis às quinolonas de forma inespecífica, ou seja, independentemente do padrão de resistência. Nasik e colaboradores (2011) reportaram uma prevalência de genes de RQMP de 45,9% (*aac(6')-Ib-cr*), 5,7% (*qepA*), 1,6% (*qnrA1*) e 1,6% (*qnrS1*) em isolados clínicos urinários de *E. coli* de origem humana, todos resistentes à norfloxacin, excepto um isolado *qnrA1*-positivo. Noutro estudo recente, na China, foi reportada uma prevalência de genes *qnr* de 3,9% em isolados de *E. coli* humanos recolhidos em hospitais. Interessantemente, a prevalência destes genes em estirpes susceptíveis à CIP (4,9%) foi superior à encontrada em estirpes resistentes (3,5%), sugerindo

que a presença destes genes em estirpes susceptíveis não é irrelevante (Zhou *et al.*, 2011). Também um trabalho de Jeong e colegas (2011), realizado em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* de origem humana, evidenciou uma ampla disseminação de genes *qnr* tanto em estirpes susceptíveis como em estirpes resistentes: entre 47 estirpes *qnr*-positivas, 51,1%, 46,8%, 46,8%, 74,5% e 53,2% foram resistentes à CIP, LEV, norfloxacin, AN e moxifloxacin, respectivamente. Em Barcelona, Lavilla *et al.* (2008) reportaram 4,9% de isolados positivos para o gene *qnr*, dos quais 26,7% foram classificados como resistentes ao AN e apenas 6,7% resistentes à CIP. Kim *et al.* (2009b) reportaram uma elevada taxa de resistência à CIP em isolados *qnr*-positivos (8%) provenientes de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae* de hemoculturas hospitalares, na Coreia. Namboodiri e colaboradores (2011) reportaram uma prevalência de 30% de genes de RQMP em isolados de *E. coli* comensais de origem humana, sendo que todos foram resistentes ao AN e 66,7% à CIP. Outro estudo reportou dois isolados de *E. coli* (origem humana) positivos para os genes *qnr* (A e S) que se demonstraram susceptíveis ao AN e apresentaram um baixo nível de resistência à CIP (Cavaco *et al.*, 2009). Em linha com estes resultados, também Robicsek e colegas (2006b) observaram uma prevalência de *qnr* similar entre organismos susceptíveis e resistentes à CIP. É sabido que, na ausência de outros mecanismos que afectem a susceptibilidade às FQs, a presença de genes de RQMP, como os genes *qnr*, proporcionam aumentos nas CIMs de FQs, embora para níveis ainda abaixo dos critérios interpretativos de resistência clínica (Cantón & Morosini, 2011), aliás, como acontece aquando de mutações simples na ADN girase, transportadores que extrusam quinolonas, e baixos níveis de expressão de porinas (Strahilevitz *et al.*, 2009). A importância da expressão destes mecanismos que conferem um fenótipo de baixo nível de resistência ao AN e reduzida susceptibilidade à CIP reside, pois, na facilitação da selecção de mutantes com elevada resistência às quinolonas (Strahilevitz *et al.*, 2009). Deste modo, a relevância clínica dos determinantes de RQMP assenta na sua capacidade de suplementar resistência devido a mutações na ADN girase, topoisomerase IV, porinas ou sistemas de efluxo, bem como na possibilidade de dar espaço à ocorrência de selecção de tais mutações cromossómicas a concentrações de quinolonas que seriam letais na sua ausência (Jacoby *et al.*, 2003).

Tendo em conta que a resistência às quinolonas em *Enterobacteriaceae* é maioritariamente mediada por mutações pontuais numa região dos genes codificantes da ADN girase e da topoisomerase IV, designada QRDR, levando a uma alteração do alvo (Ito *et al.*, 2008; Cavaco *et al.*, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009), e assumindo que a presença dos genes de RQMP, por si só, não justifica a elevada resistência observada neste estudo para os antimicrobianos AN, CIP e LEV, parece legítimo sugerir que tais mecanismos de resistência



às quinolonas mediada por mutações no cromossoma bacteriano estejam presentes nas estirpes de *E. coli* testadas. Não se despreza, porém, a importância dos genes de RQMP na expressão das mutações nas QRDR, pois, por regra, são necessárias múltiplas mutações nas enzimas-alvo das FQs para que resulte uma resistência clinicamente relevante. Ora, tendo em conta a raridade da ocorrência de mutações duplas, é sugerido que os elementos transferidos horizontalmente (como os genes de RQMP) possam proporcionar algum grau de reduzida susceptibilidade às quinolonas, suficiente para que as bactérias sobrevivam tempo suficiente na presença de uma dada concentração de FQs, dando espaço à ocorrência de mutações sequenciais, mais do que simultâneas (Strahilevitz *et al.*, 2009). Neste contexto, Briaies *et al.* (2011) analisaram o efeito *in vitro* dos genes *qnrA1*, *qnrB1* e *qnrS1* combinado com mutações nos genes *gyrA* e/ou *parC* em estirpes de *E. coli* isogénicas resistentes às FQs, reportando um aumento de 2 µg/ml na CIM de CIP aquando da co-expressão de genes *qnr* e das substituições Ser83Leu no gene *gyrA* e/ou Ser80Arg em *parC*. Reportaram, ainda, que a presença de genes *qnr* em *E. coli* com uma substituição no gene *gyrA* (Ser83Leu) aumenta os valores de MPC de diferentes FQs de 8 para 32 µg/ml.

Assim, de modo a clarificar os mecanismos responsáveis pelo fenótipo de resistência reportado neste trabalho, teria todo o interesse em realizar-se futuramente, nas 237 estirpes de *E. coli* estudadas, uma análise da frequência das mutações das subunidades da ADN girase (*gyrA* e *gyrB*) e da topoisomerase IV (*parC* e *parE*), bem como determinar a influência da pressão selectiva de ENR na sua expressão. De referir que nas bactérias Gram-negativas, a resistência às quinolonas de elevado nível deve-se principalmente a mutações nos genes codificantes das subunidades da ADN girase *gyrA* e *gyrB* (principalmente em *gyrA*), enquanto mutações nos genes *parC* e *parE*, que codificam as subunidades da topoisomerase IV, são secundárias (Hernández *et al.*, 2011). Um estudo de Ito *et al.* (2008) avaliou a actividade antimicrobiana das quinolonas contra *E. coli* isolada da urina de humanos. Mutações simples no gene *gyrA* foram detectadas em estirpes resistentes ao AN, mas sensíveis às FQs. Já nos isolados resistentes a todas as quinolonas testadas, observaram-se três mutações: duas em *gyrA* e uma em *parC*. Os autores concluíram que o nível de resistência às quinolonas em *E. coli* depende essencialmente do número de mutações acumuladas na QRDR dos genes *gyrA* e *parC*.

#### **4. Critérios epidemiológicos (ECOFF) vs. critérios clínicos**

Com vista a avaliar as discrepâncias de classificação entre a utilização de critérios interpretativos epidemiológicos e de critérios interpretativos clínicos (de dois comités diferentes) na análise das CIMs, bem como a determinar a relevância clínica (implicações na

terapêutica) da resistência às quinolonas observada nas estirpes de *E. coli* comensais estudadas, os valores de CIM obtidos foram classificados usando os critérios clínicos definidos pelo CLSI (2011) e EUCAST (2011), tal como detalhado no Anexo III, e comparados à categorização segundo os ECOFF do EUCAST constantes na Tabela 18.

Tabela 23. Percentagem de resistência (%R) observada para os antimicrobianos AN, CIP e LEV segundo a aplicação dos ECOFF estabelecidos pelo EUCAST e critérios interpretativos clínicos estabelecidos pelo EUCAST e pelo CLSI.

T	ECOFF [%R(n)]			EUCAST [%R(n)]			CLSI [%R(n)/%I(n)]		
	AN	CIP	LEV	AN	CIP	LEV	AN	CIP	LEV
<b>T0</b>	52,5 (53)	52,5 (53)	46,5 (47)	52,5 (53)	34,7 (35)	34,7 (35)	52,5(53)/0(0)	34,7(35)/0(0)	33,7(34)/1(1)
<b>T1</b>	100 (79)	100 (79)	100 (79)	100 (79)	98,7 (78)	98,7 (78)	100(79)/0(0)	96,2(76)/0(0)	83,5(66)/12,7(10)
<b>T2</b>	82,5 (47)	89,5 (51)	87,7 (50)	82,5 (47)	77,2 (44)	73,7 (42)	82,5(47)/0(0)	70,2(40)/0(0)	61,4(35)/8,8(5)
<b>Total</b>	75,5 (179)	77,2 (183)	74,3 (176)	75,5 (179)	66,2 (157)	65,4 (155)	75,5(179)/0(0)	63,7(151)/0(0)	57(135)/6,8(16)

Para a interpretação dos resultados foram utilizados os seguintes critérios interpretativos definidos para *E. coli*: critérios clínicos humanos definidos pelo CLSI (2011) na norma M100-S21 (AN: S≤16 µg/mL e R≥32 µg/mL; CIP: S≤1 µg/mL, I=2 µg/mL e R≥4 µg/mL; LEV: S≤2 µg/mL, I=4 µg/mL e R≥8 µg/mL); critérios clínicos definidos pelo EUCAST (2012a) versão 2.0 (AN: S≤16 µg/MI e R>16 µg/mL; CIP: S≤0,5 µg/mL e R≥1 µg/mL; LEV: S≤1 µg/mL e R≥2 µg/mL); ECOFF (critérios epidemiológicos) estabelecidos pelo EUCAST (2012b) (AN: R>16 µg/mL; CIP: R>0,064 µg/mL; LEV: R>0,25 µg/mL).

Relembre-se que a caracterização do fenótipo de resistência dos resultados obtidos em matéria de valores de CIM dos antimicrobianos AN, CIP e LEV testados para as 237 estirpes de *E. coli* em estudo foi efectuado segundo os ECOFF estabelecidos pelo EUCAST (2012b), tal como é recomendado para fins de monitorização de resistência (OIE, 2003; EFSA, 2008; Cavaco *et al.*, 2009; EURL-AR, 2011). Deste modo, segundo esta classificação, é possível a identificação de duas populações pela presença ou ausência de factores de resistência. A subpopulação susceptível (WT) apresenta um perfil de CIM anterior ao desenvolvimento ou aquisição de resistência, sendo que a sua distribuição consegue ser diferenciada da subpopulação resistente (NWT). Esta última, ainda que se diferencie pela presença de um ou mais mecanismos de resistência, não está necessariamente relacionada com falha terapêutica (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007). O uso do valor de 0,064 µg/ml como *cut-off*

para a CIP em *E. coli* (EUCAST, 2012b) constitui o critério mais adequado para prever a existência de mutações ou de mecanismos transferíveis mediados por plasmídeos que confirmam resistência às FQs (EFSA, 2008). Apesar de tudo, a definição de estirpes susceptíveis, ou WT, não exclui por completo a possível expressão de mecanismos desconhecidos de baixo nível de resistência às quinolonas (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011a), pelo que a avaliação do fundo genético em que assenta o fenótipo verificado é recomendada (Wheat, 2001; Cavaco *et al.*, 2008).

Tabela 24. Comparação dos resultados obtidos pelo método de determinação das CIMs, de acordo com os ECOFF e os critérios interpretativos clínicos definidos pelo EUCAST, os critérios interpretativos clínicos estabelecidos pelo CLSI.

Tempo	N.º de diferenças <sup>a</sup> / <sup>o</sup> % de acordo <sup>b</sup>								
	ECOFF vs. EUCAST			ECOFF vs. CLSI			EUCAST vs. CLSI		
	AN	CIP	LEV	AN	CIP	LEV	AN	CIP	LEV
<b>T0</b>	0/100	18/82,2	12/88,1	0/100	18/82,2	12/88,1	0/100	0/100	0/100
<b>T1</b>	0/100	1/98,7	1/98,7	0/100	3/96,2	3/96,2	0/100	2/97,5	2/97,5
<b>T2</b>	0/100	7/87,7	8/86	0/100	11/80,7	10/82,5	0/100	4/93	2/96,5
<b>Total</b>	0/100	26/89,0	21/91,1	0/100	32/86,5	25/89,5	0/100	6/97,5	4/98,3

<sup>a</sup>Isolados classificados como resistentes (e intermédios, segundo o CLSI) por uma norma e sensíveis por outra.

<sup>b</sup>Percentagem de isolados classificados na mesma categoria por ambos os métodos.

Uma vez que os ECOFF estabelecidos para as FQs CIP e LEV (EUCAST, 2012b) são distintamente inferiores aos critérios interpretativos clínicos estabelecidos, tanto pelo EUCAST (2012a) como pelo CLSI (2011), seria de esperar que a classificação segundo os ECOFF resultasse numa maior proporção de isolados resistentes por comparação à aplicação de critérios clínicos, como, aliás, se observa na Tabela 23; apenas o AN apresenta uma classificação consistente na aplicação de qualquer uma das normas, dado não existirem diferenças de classificação entre os critérios interpretativos epidemiológicos e clínicos. Por exemplo, a resistência à CIP observada nos 237 isolados é de 77,2%, 66,2% e 63,7% segundo os ECOFF do EUCAST, os critérios clínicos do EUCAST e os critérios clínicos do CLSI, respectivamente. Observando a Tabela 24, constata-se que as diferentes percentagens observadas para a CIP se devem a um número de isolados classificado de forma diferente que varia entre seis (EUCAST vs. CLSI) e 32 (ECOFF vs. CLSI) diferenças. A diferença

observada entre os valores de resistência clínica segundo o EUCAST e o CLSI são explicados pelo facto de o EUCAST estabelecer “breakpoints” mais baixos. Salienta-se também que tais diferenças vêm suportar o que já havia sido referido nesta discussão no que respeita à comparação de percentagens de resistência entre diferentes estudos publicados, claramente descredibilizada se diferentes critérios interpretativos forem usados (Schwarz *et al.*, 2010).

De referir, ainda, a preocupante taxa de resistência clinicamente relevante observada, quer por aplicação dos critérios definidos pelo EUCAST (2011) quer por aplicação daqueles definidos pelo CLSI (2011). Considerando que os critérios clínicos aplicados prevêm a eficácia clínica do antimicrobiano, pode dizer-se que o grau de resistência demonstrado está, pois, associado a uma elevada possibilidade de falha terapêutica em relação às FQs, sendo esta de 63,7% ou 66,2% para a CIP e 57% ou 65,4% para a LEV, segundo o CLSI e o EUCAST, respectivamente. Acresce que mesmo os isolados classificados como susceptíveis por aplicação de “breakpoints” clínicos, não estão necessariamente livres de mecanismos de resistência às quinolonas, uma vez que um isolado pode, através de mutações simples ou da transferência horizontal de genes de RQMP, apresentar sensibilidade reduzida a um dado antimicrobiano, mas ainda assim apresentar uma CIM suficientemente baixa para permitir que a terapia seja bem sucedida (Cantón & Morosini, 2011).

## VI – CONCLUSÃO

As 237 estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de vitelos saudáveis após pressão selectiva selectiva *in vivo* de ENR que foram objecto do presente estudo evidenciaram, desde logo, uma elevada proporção de resistência ao AN, CIP e LEV, designadamente 75,5%, 77,2% e 74,3%, respectivamente. Este achado, embora superior ao reportado na literatura, não deixa de ser concordante com o crescente e preocupante aumento de *E. coli* resistente por toda a Europa, tanto em isolados clínicos humanos invasivos, como em estirpes de *E. coli* comensal isoladas de animais. Analisando a resistência observada nos três momentos do estudo, verifica-se a existência de um efeito significativo da variável tempo de colheita na probabilidade de resistência às três quinolonas testadas, designadamente, um aumento significativo da proporção de isolados resistentes de T0 (antes da administração de ENR) para T1 (após o plano de administração de ENR) ( $p < 0,0001$ ) e de T0 para T2 ( $p < 0,05$ ), embora se verifique um decréscimo da proporção de isolados resistentes de T1 para T2 (um mês após o fim do plano de administração de ENR). Tal observação sugere que a exposição à ENR exerceu uma pressão selectiva nas bactérias que resultou num aumento da resistência a estes agentes; por sua vez, a diminuição na pressão selectiva imposta, resultado da descontinuação da administração de ENR, traduziu-se numa diminuição da percentagem de isolados resistentes às quinolonas.

A frequência observada para os genes de RQMP foi de 12,6% ( $n=30$ ), a saber, 11,8% ( $n=28$ ) positivos para genes *qnr* [1,7% *qnrB2* ( $n=4$ ), 5,5% *qnrS1* ( $n=13$ ) e 4,6% *qnrD* ( $n=11$ )] e 0,8% ( $n=2$ ) positivos para o gene *aac(6')-Ib-cr*. Desta forma, o gene de RQMP mais frequente foi o *qnrS*, seguido de *qnrD*, *qnrB* e, por fim, o gene *aac(6')-Ib-cr*. Os genes *qnrA*, *qnrC* e *qepA* não foram identificados em nenhum dos isolados analisados. Interessantemente, para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que descreve a identificação de resistência às quinolonas mediada por *qnrD* em isolados de *E. coli* de bovinos. Observou-se, ainda, um aumento da prevalência de genes de RQMP ao longo do tempo de estudo ( $p < 0,05$ ), sugerindo-se que possa estar associado à pressão selectiva exercida pela ENR. No entanto, analisando a prevalência de cada gene em particular ao longo do tempo, esta associação só se observa estatisticamente relevante para os genes *qnrB* e *qnrD* ( $p < 0,05$ ), em contraste com o que se observa para os genes *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr* ( $p > 0,05$ ). Os isolados positivos para os genes de RQMP foram maioritariamente resistentes às três quinolonas testadas ( $\geq 80\%$ ). Esta associação entre resistência e presença de determinantes de RQMP revelou-se estatisticamente significativa para as FQs CIP e LEV ( $p < 0,05$ ), mas não para o AN ( $p > 0,05$ ).

A resistência aos agentes antimicrobianos, particularmente às FQs, é um problema relevante tanto em animais como em humanos, com conseqüente preocupação no que respeita à

segurança alimentar. Existe, por esse motivo, uma apreensão generalizada no que concerne o uso destes e outros antimicrobianos em espécies animais produtoras de alimentos, bem como a respeito da sua significância para os problemas de resistência observados em medicina veterinária e em medicina humana. A monitorização da resistência aos antimicrobianos em bactérias indicadoras como *E. coli* comensal pode fornecer informação importante sobre determinantes de resistência existentes em bactérias de origem animal, que podem ser disseminados horizontalmente para bactérias zoonóticas e/ou outras através da cadeia alimentar. Além da quantificação da resistência, considera-se fundamental compreender também a natureza da resistência responsável por resistência aos antimicrobianos em diferentes espécies de bactérias (patogénicas e comensais), daí a necessidade de incrementar o uso de técnicas moleculares em estudos epidemiológicos deste âmbito.

Considerando que o principal contributo para a ocorrência de resistência a antimicrobianos em bactérias indicadoras é a pressão selectiva exercida pelo uso destes agentes em diferentes populações de animais destinados ao consumo humano, o uso judicioso de antimicrobianos, bem como a prevenção e controlo de infecções, tanto em medicina humana como em medicina veterinária, será crucial para conter a disseminação de determinantes de resistência, nomeadamente dos genes de RQMP entre *Enterobacteriaceae*. Alternativas aos antimicrobianos em produção animal incluem boas práticas de manejo que reduzam a probabilidade de ocorrência de doenças infecciosas, aumentando, em simultâneo, a eficiência produtiva (por exemplo, quarentena, vacinações, entre outras medidas de biossegurança). Neste contexto, referem-se algumas recomendações da OMS no âmbito do uso das quinolonas (incluindo as FQs) em animais produtores de alimentos: a) as quinolonas, como qualquer agente antimicrobiano, não devem ser usadas em substituição de boas práticas de manejo; b) as quinolonas devem ser administradas de acordo com práticas que maximizem o efeito terapêutico e minimizem o risco de resistência; c) deve ser descartada a utilização de quinolonas em animais produtores de alimentos para além das indicadas (WHO, 1998a). Todavia, embora tais medidas possam influenciar significativamente a redução da quantidade de antimicrobianos usados em animais, considerando que a alimentação de origem animal é significativamente exportada e importada em muitos países, as intervenções para o controlo da resistência aos antimicrobianos ao nível nacional serão insuficientes no que respeita à protecção do consumidor (Hammerum & Heuer, 2009). Neste contexto, o controlo da disseminação da resistência resultará necessariamente de um esforço conjunto de cooperação e de coordenação a nível internacional.

## VII – BIBLIOGRAFIA

- Acar, J. & Rostel, B. (2003). Antimicrobial resistance: an overview. In World Organisation for Animal Health, *OIE International Standards on Antimicrobial Resistance*. (pp. 45-68). Paris: OIE.
- Adams M.R. & Moss M.O. (2000). Bacterial agents of foodborne diseases. In M.R. Adams & M.O. Moss, *Food Microbiology*. (2<sup>nd</sup> ed.). (pp. 217). UK: Royal Society of Chemistry.
- Ahmed, A.M., Motoi, Y., Sato, M., Maruyama, A., Watanabe, H., Fukumoto, Y. & Shimamoto, T. (2007). Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6686–6690.
- Ajiboye, R.M., Solberg, O.D., Lee, B.M., Raphael, E., DebRoy, E. & Riley, L.W. (2009). Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. *Clinical Infectious Diseases*, 49(3), 365–371.
- Alessiani, A., Di Giannatale, E., Perilli, M., Forcella, C., Amicosante, G. & Zilli, K. (2009). Preliminary investigations into fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* strains resistant to nalidixic acid isolated from animal faeces. *Veterinaria Italiana*, 45(4), 521-527.
- Ali, S.Q., Zehra, A., Naqvi, B.S., Shah, S. & Bushra, R. (2010). Resistance pattern of ciprofloxacin against different pathogens. *Oman Medical Journal*, 25(4), 294-298.
- Allou, N., Cambau, E., Massias, L., Chau, F. & Fantin, B. (2011). Impact of low-level resistance to fluoroquinolones due to *qnrA1* and *qnrS1* genes or a *gyrA* mutation on ciprofloxacin bactericidal activity in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), 4292–4297.
- Amin, A.K. & Wareham, D.W. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolates associated with community and nosocomial urinary tract infection in East London, UK. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(5), 490-491.
- Arsène, S. & Leclercq, R. (2007). Role of a *qnr*-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9), 3254-3258.
- Avgustin, J.A., Keber, R., Zerjavic, K., Orazem, T. & Grabnar, M. (2007). Emergence of the quinolone resistance-mediating gene *aac(6<sup>7</sup>)-Ib-cr* in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 4171–4173.
- Ball, P. (2000) Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(SupplT1), 17-24.
- Baudry, P.J., Nichol, K., DeCorby, M., Lagace-Wiens, P., Olivier, E., Boyd, D., Mulvey, M.R., Hoban, D.J. & Zhanel, G.G. (2009). Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from Canadian

intensive care units: the 1st report of *qepA* in North America. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63(3), 319–326.

- Bouchakour, M., Zerouali, K., Gros Claude, J.D., Amarouch, H., El Mdaghri, N., Courvalin, P. & Timinouni, M. (2010). Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Morocco. *Journal of Infection in Developing Countries*, 4(12), 779-803.
- Briales, A., Rodríguez-Martínez, J.M., Velasco, C., de Alba, D.C., Domínguez-Herrera, J., Pachón, J. & Pascual, A. (2011). *In vitro* effect of *qnrA1*, *qnrB1*, and *qnrS1* genes on fluoroquinolone activity against isogenic *Escherichia coli* isolates with mutations in *gyrA* and *parC*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3), 266–269.
- Caldeira, L., Remísio, E.A., António, A., Faria, V.A., Aguiar, P., Fonseca, A., Maria, V. (2002). *Caracterização da prescrição de antibióticos em infecções do tracto respiratório por parte dos médicos de Clínica Geral e da carreira de Medicina Geral e Familiar do continente português*. INFARMED.
- Cambau, E., Lascols, C., Sougakoff, W., Bebear, C., Bonnet, R., Cavallo, J.D., Gutmann, L., Ploy, M.C., Jarlier, V., Soussy, C.-J. & Robert, J. (2006). Occurrence of *qnrA*-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002–2005. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(10), 1013–1020.
- Cano, M.E., Rodríguez-Martínez, J.M., Agüero, J., Pascual, A., Calvo, J., García-Lobo, J.M., Velasco, C., Francia, M.V. & Martínez-Martínez, L. (2009). Detection of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Enterobacter* spp. in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(7), 2033–2039.
- Cantón, R. & Morosini, M.-I. (2011). Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 977-991.
- Castanheira, M., Mendes, R.E., Rhomberg, P.R. & Jones, R.N. (2008). Rapid emergence of *bla*CTX-M among *Enterobacteriaceae* in U.S. medical centers: molecular evaluation from the MYSTIC Program (2007). *Microbial Drug Resistance*, 14(3), 211–216.
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.J. & Nordmann, P. (2007a). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(2), 394–397.
- Cattoir, V., Poirel, L. & Nordmann, P. (2007b). Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrB4* identified in France in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate coexpressing a *qnrS1* determinant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(7), 2652–2653.
- Cattoir, V., Weill, F.X., Poirel, L., Fabre, L., Soussy, C.J. & Nordmann, P. (2007c). Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4), 751–754.
- Cattoir, V.L., Poirel, L. & Nordmann, P. (2008a) Plasmid-mediated quinolone resistant determinant *qnrB4* identified in France in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate coexpressing a *qnrS1* determinant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(7), 2652-2653.



- Cattoir, V.L., Poirel, L. & Nordmann, P. (2008b). Plasmid-mediated quinolone resistance pump *qepA2* in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(10), 3801-3804.
- Cavaco, L.M. & Aarestrup, F.M. (2009). Evaluation of quinolones for use in detection of determinants of acquired quinolone resistance, including the new transmissible resistance mechanisms *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, and *aac(6')-Ib-cr*, in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and determinations of wild-type distributions. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(9), 2751-2758.
- Cavaco, L.M., Frimodt-Moller, N., Hasman, H., Guardabassi, L., Nielsen, L. & Aarestrup, F.M. (2008). Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microbial Drug Resistance*, 14(2), 163–169.
- Cavaco, L.M., Hasman, H., Xia, S. & Aarestrup, F.M. (2009). *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), 603-608.
- Centeno, M. (2010). *Influência do uso de fluoroquinolonas no aparecimento de Escherichia coli e Salmonella spp. multirresistentes em vitelos*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Cerquetti, M., Garcia-Fernandez, A., Giufre, M., Fortini, D., Accogli, M., Graziani, C., Luzzi, I., Caprioli, A. & Carattoli, A. (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), 3112–3114.
- Chmelnitsky, I., Hermesh, O., Navon-Venezia, S., Strahilevitz, J. & Carmeli, Y. (2009). First detection of *aac(6')-Ib-cr* in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Israel. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(4), 718–722.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2011). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21*. Wayne, PA: CLSI.
- Codex Alimentarius Commission/Recommended Code of Practice 61 (2005). *Code of practice to minimize and contain antimicrobial resistance*. Acedido a Jul. 22, 2011. Disponível em <http://www.codexalimentarius.net>.
- Coe, P.H. & Grooms, D. (2002). Metaphylaxis. *Cattle call*, 7(3), 2-7.
- Coque, T.M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Canton, R. & Nordmann, P. (2008). Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15. *Emerging Infectious Disease*, 14(2), 195–200.
- Cordeiro, N. F., Robino, L., Medina, J., Seija, V., Bado, I., Garcia, V., Berro, M., Pontet, J., Lopez, L., Bazet, C., Rieppi, G., Gutkind, G., Ayala, J.A. & Vignoli, R. (2008).

- Ciprofloxacin-resistant enterobacteria harboring the *aac(6')*-*Ib-cr* variant isolated from feces of inpatients in an intensive care unit in Uruguay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 806–807.
- Corkill, J.E., Anson, J.J. & Hart, C.A. (2005). High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), 1115–1117.
- Crement, L., Caroff, N., Dauvergne, S., Reynaud, A., Lepelletier, D. & Corvec, S. (2011). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL *Enterobacteriaceae* clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. *Pathologie Biologie (Paris)*, 59(3), 151-156.
- Cui, S., Li, J., Sun, Z., Hu, C., Jin, S., Li, F., Guo, Y., Ran, L. & Ma, Y. (2009). Characterization of *Salmonella enterica* isolates from infants and toddlers in Wuhan, China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(1), 87–94.
- Da Re, S., Garnier, F., Guérin, E., Campoy, S., Denis, F. & Ploy, M.-C. (2009). The SOS response promotes *qnrB* quinolone-Resistance determinant expression. *EMBO Reports*, 10(8), 929-1004.
- Da Silva, J.M.B. & Hollenbach, C.B. (2010). Fluoroquinolonas x Resistência bacteriana na medicina veterinária. *Arquivos do Instituto Biológico*, 77(2), 363-369.
- Dahmen, S., Poirel, L., Mansour, W., Bouallegue, O. & Nordmann, P. (2009). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* from Tunisia. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(7), 1019–1022.
- DANMAP 2010 (2011) *Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark*. Acedido em Out. 2, 2011. Disponível em <http://www.danmap.org>.
- De Jong, A., Bywater, R., Butty, P., Deroover, E., Godinho, K., Klein, C., Marion, H., Simjee, S., Smets, K., Thomas, V., Valle, M. & Wheadon, A. (2009). Pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(4), 733–744.
- De Menezes, K.M.P., Góis, M.A.G., Oliveira, I.D., Pinheiro, M.S. & Brito, A.M.G. (2009). Avaliação da resistência da *Escherichia coli* frente a ciprofloxacina em uroculturas de três laboratórios clínicos de Aracaju-SE. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 41(3), 239-242.
- De Sousa, J.C.F., Peixe, L.V., Ferreira, H., Pinto, M.E., Nascimento, M.S.J., Soura, M.S. & Cabral, M. (1998). Antimicrobianos. In W.F.C. Ferreira & de J.C.F. Sousa, *Microbiologia*. (pp 247-248). Lisboa: Lidel.
- Deepak, R.N., Koh, T.H. & Chan, K.S. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a large Singapore hospital. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 38(12), 1070-1073.

- Direcção Geral de Saúde (2010). *Programa Nacional de Prevenção das Resistência aos Antimicrobianos*. Lisboa: DGS.
- Endimiani, A., Carias, L.L., Hujer, A.M., Bethel, C.R., Hujer, K.M., Perez, F., Hutton, R.A., Fox, W.R., Hall, G.S., Jacobs, M.R., Paterson, D.L., Rice, L.B., Jenkins, S.G., Tenover, F.C. & Bonomo, R.A. (2008). Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing *blaKPC* in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7), 2680–2682.
- Endtz H. P., Ruijs G. J., van Klingeren B., Jansen W. H., van der Reyden T. & Mouton R.P. (1991). Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27(2), 199–208.
- Engberg J., Aarestrup F. M., Smidt P. G., Nachamkin I. & Taylor D. E. (2001). Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistant mechanisms and trends in human isolates. *Emerging Infectious Diseases*, 7(1), 24–34.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2010b). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009*. Stockholm: ECDC.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2011). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010*. Stockholm: ECDC.
- European Centre for Disease Prevention and Control & European Food Safety Authority (2011). *Shiga toxin/verotoxin-producing Escherichia coli in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC O104*. Stockholm: ECDC.
- European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority, European Medicines Agency & Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. (2009). Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. *The EFSA Journal*, 7(11), 1372.
- European Centre for Disease Prevention and Control & European Medicines Agency. (2009). *The bacterial challenge: time to react*. Stockholm: EMEA.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2012a). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 2.0*. Acedido em Abr. 2, 2012. Disponível em <http://www.eucast.org>.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2012b). *Antimicrobial wild type distributions of microorganisms*. Acedido em Abr. 2, 2012. Disponível em <http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=init>.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2011). *EUCAST definitions of clinical breakpoints and epidemiological cut-off values*. Acedido em Out. 7, 2011. Disponível em <http://www.srga.org/Eucastwt/eucastdefinitions.htm>.
- European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control (2011). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic

and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. *The EFSA Journal*, 9(7), 2154.

European Food Safety Authority (2008). Report from the task force on zoonoses data collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals. *The EFSA Journal*, 141, 1-44.

European Food Safety Authority (2011). *EFSA publishes report from its Task Force on the E. coli O104:H4 outbreaks in Germany and France in 2011 and makes further recommendations to protect consumers*. Acedido em Jan. 23, 2012. Disponível em <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/110705.htm>.

European Medicines Agency/Committee for Medicinal Products for Veterinary Use/342/99-Final. (1999). *Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines*. London: EMEA.

European Medicines Agency/Committee for Medicinal Products for Veterinary Use/Scientific Advisory Group on Antimicrobials Work Programme/184651/2005. (2007). *Public statement on the use of (fluoro)quinolones in foodproducing animals in the European Union: development on resistance and impact on human and animal health*. London: EMEA.

European Union Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance (2011). *Cut-off values recommended by the EU Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance (EURL-AR)*. Acedido a Nov. 5, 2011. Disponível em <http://www.eurl-ar.eu>.

Fàbrega, A., Sánchez-Céspedes, J., Soto, S. & Vila, J. (2008) Quinolone resistance in food chain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(4), 307-315.

Fang, H., Huang, H., Shi, Y., Hedin, G., Nord, C.E. & Ullberg, M. (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), 268–270.

Fariña, N., Sanabria, R., Laspina, F., Samudio, M., Figueredo, L. de & Miño de Kaspar, H. (2007). Actividad *in vitro* de fluoroquinolonas en bacilos gram-negativos aislados de urocultivos de pacientes ambulatorios. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 3(1), 15-18.

FARM 2007-2008 (2010). *Programme français de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries d'origine animale*. Acedido em Out. 2, 2011. Disponível em <http://www.anses.fr>.

Fey, P.D., Safranek, T.J., Rupp, M.E., Dunne, E.F., Ribot, E., Iwen, P.C., Bradford, P.A., Angulo, F. J. & Hinrichs, S.H. (2000). Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *New England Journal of Medicine*, 342(17), 1242–1249.

Fihman, V., Lartigue, M.F., Jacquier, H., Meunier, F., Schnepf, N. Raskine, L., Riahi, J., Sanson-le Pors, M.J. & Bercot, B. (2008). Appearance of *aac(6')-Ib-cr* gene among

extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a French hospital. *Journal of Infection*, 56(6), 454–459.

FINRES-Vet 2007-2009. (2011). *Finnish veterinary antimicrobial resistance monitoring and consumption of antimicrobial agents*. Acedido em Out. 2, 2011. Disponível em <http://www.evira.fi>.

Fonseca, E.L., Dos Santos, F.F., Vieira V.V. & Vicente, A.C. (2008). New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerging Infectious Disease*, 14(7), 1129-1131.

Food and Agriculture Organization of the United Nation,/World Health Organization/World Organisation for Animal Health. (2008). *Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials - Report of a meeting held in FAO, Rome, Italy, 26–30 November 2007*. Italy: FAO and Switzerland: WHO.

Gagliotti, C., Balode, A., Baquero, F., Degener, J., Grundmann, H., Gur, D., Jarlier, V., Kahlmeter, G., Monen, J., Monnet, D.L. Rossolini, G.M., Suetens, C., Weist, K., Heuer, O. & the EARSNet participants (disease specific contact points for AMR) (2011). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS), 2002 to 2009. *Euro Surveillance: European communicable disease bulletin*, 16(11), pii19819.

García, S. & Heredia, N. (2009). Foodborn pathogens and toxins: an overview. In N. Heredia, I. Wesley & S. García (Eds.), *Microbiologically Safe Foods*. (pp. 25-28). USA: John Wiley & Sons, Inc.

García-Fernández, A., Fortini, D., Veldman, K., Mevius, D. & Carattoli, A. (2009). Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(2), 274–281.

Gay, K., Robicsek, A., Strahilevitz, J., Park, C.J., Jacoby, G.A., Barrett, T.J., Medalla, F., Chiller, T.M. & Hooper, D.C. (2006). Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clinical Infectious Diseases*, 43(3), 297–304.

Gibson, J.S., Cobbold, R.N., Heisig, P., Sidjabat, H.E., Kyaw-Tanner, M.T. & Trott, D.J. (2009). Identification of Qnr and AAC(6')-1b-cr plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in multidrugresistant *Enterobacter* spp. isolated from extraintestinal infections in companion animals. *Veterinary Microbiology*, 143(2-4), 329–336.

Guo, Q., Weng, J., Xu, X., Wang, M., Wang, X., Ye, X., Wang, W. & Wang, M. (2010). A mutational analysis and molecular dynamics simulation of quinolone resistance proteins QnrA1 and QnrC from *Proteus mirabilis*. *BMC Structural Biology*, 8(10), 1-11.

Gupta, K., Hooton, T.M. & Stamm, W.E. (2005). Isolation of fluoroquinolone-resistant rectal *Escherichia coli* after treatment of acute uncomplicated cystitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 243–246.

- Hammerum, A.M. & Heuer, O.E. (2009). Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*, 48(7), 916–921.
- Hansen, L.H., Jensen, L.B., Sorensen, H.I. & Sorensen, S.J. (2007). Substrate specificity of the *oqxAB* multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(1), 145-147.
- Hata, M., Suzuki, M., Matsumoto, M., Takahashi, M., Sato, K., Ibe, S. & Sakae, K. (2005). Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 801-803.
- Hawkey, P.M. & Jones, A.M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(Spp11), i3-i10.
- Hendriksen, R.S., Mevius, D.J., Schroeter, A., Teale, C., Jouy, E., Butaye, P., Franco, A., Utinane, A., Amado, A., Moreno, M., Greko, C., Stärk, K.D.C., Berghold, C., Myllyniemi, A.-L., Hozzowski, A., Sunde, M. & Aarestrup, F.M. (2008). Occurrence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator bacteria in pigs in different European countries from year 2002–2004: the ARBAO-II study. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50(19), 1-10.
- Hernández, A., Sánchez, M.B. & Martínez, J.L. (2011). Quinolone resistance. Much more than predicted. *Frontiers in Microbiology*, 2(22), 1-6.
- Hopkins, K.L., Wootton, L., Day, M.R. & Threlfall, E.J. (2007). Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* found in *Salmonella enteric* strains isolated in the UK. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, 59(6), 1071–1075.
- Hu, F.P., Xu, X.G., Zhu, D.M. & Wang, M.G. (2008). Coexistence of *qnrB4* and *qnrS1* in a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(3), 320-324.
- Huang, S.Y., Dai, L., Xia, L.N., Du, X.D., Qi, Y.H., Liu, H.B., Wu, C.M. & Shen, J.Z. (2009). Increased prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in chicken *Escherichia coli* isolates from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(10), 1203–1209.
- Hubálek, Z. & Rudolf, H. (2011). Systematic survey of zoonotic and sapronotic microbial agents. In Z. Hubálek, & H. Rudolf (Eds.), *Microbial Zoonoses and Sapronoses*. (pp. 223). Berlin: Springer.
- Ishida, Y., Ahmed, A.M., Mahfouz, N.B., Kimura, T., El-Khodery, S.A., Moawad, A.A. & Shimamoto, T. (2010). Molecular analysis of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(6), 727–734
- ITAVARM 2003. (2003). *Monitoraggio dell'antibioticoresistenza in medicina veterinaria in Italia*. Acedido em Out. 2, 2011. Disponível em <http://www.izslt.it>.
- Ito, C.A.S., Gales, A.C., Tognim, M.C.B., Munerato, P. & Costa, L.M.D. (2008). Quinolone-resistant *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12(1), 5-9.

- Jackson, L.C., Reyes, L.A.M. & Cordiés, M.L.H. (1998). Quinolonas y terapia antimicrobiana. *Acta Médica*, 8(1), 58-65.
- Jacoby, G.A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 41(Suppl2), S120–S126.
- Jacoby, G.A., Chow, N & Waites, K.B. (2003). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(2), 559-562.
- Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martínez-Martínez, L., Nordmann, P., Pascual, A., Poirel, L. & Wang, M. (2008). *qnr* numbering and sequencing. Acedido em Jan. 24, 2012. Disponível em: <http://www.lahey.org/qnrStudies/>.
- Jacoby, G.A., Gacharna, N., Black, T.A., Miller, G.H. & Hooper, D.C. (2009). Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1665-1666.
- Jacoby, G.A., Walsh, K.E., Mills, D.M., Walker, V.J. Oh, H., Robicsek, A, & Hooper, D.C. (2006). *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1178-1182.
- Jeong, H.S., Bae, K., Shin, J.H., Jung, H.J., Kim, S.H., Lee, J.Y., Oh, S.H., Kim, H.R., Chang, C.L., Kho, W.-G. & Lee, J.N. (2011). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and its association with extended-spectrum beta-lactamase and AmpC beta-lactamase in *Enterobacteriaceae*. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, ;31(4), 257-264.
- Jiang, Y., Zhou, Z., Qian, Y., Wei, Z., Yu, Y., Hu, S., Li, L. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5), 1003–1006.
- Jonas, D., Biehler, K., Hartung, D., Spitzmuller, B. & Daschner, F.D. (2005). Plasmid-mediated quinolone resistance in isolates obtained in German intensive care units. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 773–775.
- Jones, G.L., Warren, R.E., Skidmore, S.J., Davies, V.A., Gibreel, T. & Upton, M. (2008). Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(6), 1245–1251.
- Jones, N.L. (2002). PCR: principles, procedures and parameters. In B.D.M. Theophilus & R. Rapley (Eds.), *PCR Mutation Detection Protocols*. (pp. 39). New Jersey: Humana Press.
- Kanj, S.S., Corkill, J.E., Kanafani, J.A., Araj, G.F., Hart, C.A., Jaafar, R. & Matar, G.M. (2008). Molecular characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolates at a tertiary-care centre in Lebanon. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(5), 501–504.
- Kawamura-Sato, K., Yoshida, R., Shibayama, K. & Ohta, M. (2010). Virulence genes, quinolone and fluoroquinolone resistance, and phylogenetic background of

uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 63(2), 113-115.

Kim, E.S., Jeong, J.Y., Choi, S.H., Lee, S.O., Kim, S.H., Kim M.N., Woo, J.H. & Kim, Y.S. (2009a). Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene, *qepA*, in *Escherichia coli* clinical isolates in Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 65(3), 335–338.

Kim, H.B., ParK, C.H., Kim, C.J., Kim, E.-C., Jacoby, G.A. & Hooper, D.C. (2009b). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 639-645.

Kim, H.B., Wang, M., Park, C.H., Kim, E.-C., Jacoby, G.A. & Hooper, D.C. (2009c). *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), 3582–3584.

Kirchner, M., Wearing, H. & Teale, C. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance gene detected in *Escherichia coli* from cattle. *Veterinary Microbiology*, 148(2-4), 434-435.

Lamikanra, A., Crowe, J.L., Lijek, R.S., Odetoyin, B.W., Wain, J., Aboderin, A.O. & Okeke, I.N. (2011). Rapid evolution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in Nigeria is temporally associated with fluoroquinolone use. *BMC Infectious Diseases*, 11(1), 312.

Lavilla, S., Gonzalez-Lopez, J.J., Sabate, M., Garcia-Fernandez, A., Larrosa, M.N., Bartolome, R.M., Carattoli, A. & Prats, G. (2008). Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(2), 291–295.

Laxminarayan, R. (2003). Introduction: on the Economics of Resistance. In Laxminarayan (Ed.), *Battling resistance to antibiotics and pesticides: an economic approach*. (pp. 1-17). Washington: Resources for the Future.

Lim, S-K., Lim, K-G., Lee, H-S., Jung, S-C., Kang, M. & Nam, H-M. (2010). Prevalence and molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from diarrheic cattle in Korea. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(5), 611-614.

Liu, J.-H., Deng, Y.-T, Zeng, Z.-L., Gao, J.-H., Chen, L., Arakawa, Y. & Chen, Z.-L. (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), 2992–2993.

Livermore, D.M. (2009). Has the era of untreatable infections arrived?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, (Suppl1), i29-i36.

Lorenz, I., Earley, B., Gilmore, J., Hogan, I., Kennedy, E. & More, S.J. (2011). Calf health from birth to weaning. III. Housing and management of calf pneumonia. *Irish Veterinary Journal*, 64(14), 1-9.

Luo, Y., Li, J., meng, Y., Ma, Y., Hu, C., Jin, S., Zhang, Q., Ding, H. & Cui, S. (2011). Joint effects of topoisomerase alterations and plasmid-mediated quinolone-resistant determinants in *Salmonella enterica* Typhimurium. *Microbial Drug Resistance*, 17(1), 1-5.



- Luzzaro, F. (2008). Fluorochinoloni e gram-negativi: differenze di attività e nuove evidenze sui meccanismi di resistenza. *Le Infezioni in Medicina*, 16(Suppl2), 5-11.
- Ma, J., Zeng, Z., Chen, Z., Xu, X., Wang, X., Deng, Y., Lü, D., Huang, L., Zhang, Y., Liu, J. & Wang, M. (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), 519–524.
- Malik, M., Zhao, X. & Drlica, K. (2006). Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by ADN gyrase and quinolones. *Molecular Microbiology*, 61(3), 810–825.
- Malorny B., Schroeter A. & Helmuth R. (1999). Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(9), 2278–2282.
- Mammeri, H., Van De Loo, M., Poirel, L., Martinez-Martinez, L. & Nordmann, P. (2005). Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), 71–76.
- Manian, F.A. (2003). Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. *Clinical Infectious Diseases*, 36(2), e26–e28.
- Manning, S.D. (2005). *Deadly Diseases and Epidemics, Escherichia coli infections*. Philadelphia: Chelsea House Publishers.
- MARAN 2008 (2010). *Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in The Netherlands in 2008*. Acedido em Out. 2, 2011. Disponível em <http://www.maran2008.wur.nl>.
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A. & Jacoby, G.A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351(9105), 797-799.
- McEwen, S.A. & Fedorka-Cray, P.J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infectious Diseases*, 34(Suppl3),S93–S106.
- McEwen, S.A. (2001). Improve antibiotic use in animals. In WHO & APUA, *Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups*. (pp. 65-79). Switzerland: WHO.
- Michael, A.B., Zarb, P., Ferech, M. & Goossens, H. (2008). Antibiotic consumption in southern and eastern Mediterranean hospitals: results from the ARMed project. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(4), 830-836.
- Minarini, L.A.R., Poirel, L., Cattoir, V., Darini, A.L.C & Nordmann, P. (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(3), 474–478.

- Moon, C.S., Berke, O., Avery, B.P., McEwen, S.A., Reid-Smith, R.J., Scott, L. & Menzies, P. (2011). Rates and determinants of antimicrobial use, including extra-label, on Ontario sheep farms. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(1), 1-10.
- Morgan-Linnell, S.K., Boyd, L.B., Steffen, D. & Zechiedrich, L. (2009). Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1), 235–241.
- Murray, A., Mather, H., Coia, J.E. & Brown, D.J. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance in nalidixic-acid-susceptible strains of *Salmonella enterica* isolated in Scotland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(5), 1153-1155.
- Namboodiri, S.S., Opintan, J.A., Lijek, R.S., Newman, M.J. & Okeke, I.N. (2011). Quinolone resistance in *Escherichia coli* from Accra, Ghana. *BMC Microbiology*, 11, 1-9.
- Nasik, H., Bektöre, B., Öngen, B., Ilktaç, M., Özyurt, M., Kuvat, N., Baylan, O., Keküllüoğlu, H., Haznedaroglu, T. & Kelesoglu, F.M. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* urinary isolates from two teaching hospitals in Turkey: coexistence of TEM, SHV, CTX-M and VEB-1 Type  $\beta$ -lactamases. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3), 325-334.
- Nazic, H., Poirel, L. & Nordmann, P. (2005). Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 2146–2147.
- Nicholls, T., Acar, J., Anthony, F., Franklin, A., Gupta, R., Tamura, Y., Thompson, S., Threlfall, E.J., Vose, D., van Vuuren, M., White, D.G., Wegener, H.C. & Costarrica, M.L. (2003). Antimicrobial resistance: monitoring the quantities of antimicrobials used in animal husbandry. In World Organisation for Animal Health, *OIE International Standards on Antimicrobial Resistance*. (pp. 109-117). Paris: OIE.
- NORM/NORM-VET 2010 (2011). *Usage of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway*. Acedido em Out. 2, 2011. Disponível em <http://www.vetinst.no>.
- Oktem, I.M., Gulay, Z., Bicmen, M. & Gur, D. (2008). *qnrA* prevalence in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-positive *Enterobacteriaceae* isolates from Turkey. *Journal of Infectious Diseases*, 61(1), 13–17.
- Omigie, O., Okoror, L., Umolu, P. & Ikuuh, G. (2009). Increasing resistance to quinolones: a four-year prospective study of urinary tract infection pathogens. *International Journal of General Medicine*, 2, 171–175.
- Paauw, A., Fluit, A.C., Verhoef, J. & Leverstein-van Hall, M.A. (2006). *Enterobacter cloacae* outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch hospital. *Emerging Infectious Diseases*, 12(5), 807–812.
- Pallecchi, L., Riccobono, E., Mantella, A., Bartalesi, F., Sennati, S., Gamboa, H., Gotuzzo, E., Bartoloni, A. & Rossolini, G.M. (2009). High prevalence of *qnr* genes in commensal enterobacteria from healthy children in Peru and Bolivia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2632–2635.

- Park, C.H., Robicsek, A., Jacoby, G.A., Sahm, D. & Hooper, D.C. (2006). Prevalence in the United States of *aac(6′)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3953–3955.
- Park, Y.-J., Yu, J.K., Lee, S., Oh, E.-J. & Woo, G.-J. (2007). Prevalence and diversity of *qnr* alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(4), 868–871.
- Pazhani, G.P., Chakraborty, S., Fujihara, K., Yamasaki, S., Ghosh, A., Nair, G.B. & Ramamurthy, T. (2011). QRDR mutations, efflux system & antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from an outbreak of diarrhoea in Ahmedabad, India. *Indian Journal of Medical Research*, 134(2), 214–223.
- Périchon, B., Courvalin, P. & Galimand, M. (2007). Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA *qnr* to hydrophilic fluoroquinolones by *qepA*-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(7), 2464–2469.
- Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R. & Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1), 28–52.
- Picaño, R.C., Poirel, L., Demarta, A., Silva, C.S., Corvaglia, A.R., Petrini, O. & Nordmann, P. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(5), 948–950.
- Pitout, J.D. (2008). Multiresistant *Enterobacteriaceae*: new threat of an old problem. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(5), 657–669.
- Pitout, J.D.D., Wei, Y., Church, D.L. & Gregson, D.B. (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), 999–1002.
- Poirel, L., Leviandier, C. & Nordmann, P. (2006a). 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), 3992–3997.
- Poirel, L., Liard, A., Rodríguez-Martínez, J.M. & Nordmann, P. (2005a). *Vibrionaceae* as a possible source of *qnr*-like quinolone resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), 1118–1121.
- Poirel, L., Pitout, J.D.D., Calvo, L., Rodríguez-Martínez, J.M., Church, D. & Nordmann, P. (2006b). *In vivo* selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1525–1527.

- Poirel, L., Van De Loo, M., Mammeri, H. & Nordmann, P. (2005b). Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase VEB-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 3091–3094.
- Pomba, C., da Fonseca, J.D., Baptista, B.C., Correia, J.D. & Martínez-Martínez, L. (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), 327–328.
- Quinn, P.J. & Markey, B.K. (2003). *Concise Review of Veterinary Microbiology*. Oxford: Blackwell Science.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. & Carter, J.E. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby Wolf.
- Quinn, P.J., Markey, B., Carter, M.E., Donnelly, W.J. & Leonard, F.C. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Oxford: Blackwell Science.
- Quiroga, M.P., Andres, P., Petroni, A., Soler Bistue, A.J., Guerriero, L., Vargas, L.J., Zorreguieta, A., Tokumoto, M., Quiroga, C., Tolmasky, M.E., Galas, M. & Centron, D. (2007). Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including *aac(6')-Ib-cr*, and a novel allele, *qnrB10*, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(12), 4466–4470.
- Ramalhinho, I., Cabrita, J., Ribeirinho, M. & Vieira, I. (2010). *Evolução do consumo de antibióticos em Portugal Continental (2000-2007)*. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C.H., Bush, K. & Hooper, D.C. (2006a). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12(1), 83–88.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Sahm, D., Jacoby, G.A. & Hooper, D.C. (2006b). *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(8), 2872–2874.
- Rodríguez-Martínez, J.M., Briales, A., Velasco, C., Conejo, M.C., Martínez-Martínez, L. & Pascual, A. (2009). Mutational analysis of quinolone resistance in the plasmid-encoded pentapeptide repeat proteins QnrA, QnrB and QnrS. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(6), 1128–1134.
- Rodríguez-Martínez, J.M., Briales, A., Velasco, C., de Alba, P.D., Martínez-Martínez, L. & Pascual, A. (2011a). Discrepancies in fluoroquinolones clinical categories between the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and CLSI for *Escherichia coli* harbouring *qnr* genes and mutations in *gyrA* and *parC*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(6), 1405–1407.
- Rodríguez-Martínez, J.M., Cano, M.E., Velasco, C., Martínez-Martínez, L. & Pascual, A. (2011b). Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 17(2), 149–182.

- Rodríguez-Martínez, J.M., Pascual, A., Garcia, I. & Martínez-Martínez, L. (2003). Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type  $\beta$ -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 703–706.
- Rodríguez-Martínez, J.M., Poirel, L., Pascual, A. & Nordmann, P. (2006). Plasmid-mediated quinolone resistance in Australia. *Microbial Drug Resistance*, 12(2), 99–102.
- Ružauskas, M., Šiugždinienė, R., Šeputienė, V., Sužiedėlienė, E., Virgailis, M., Daugelavičius, R., Špakauskas, V., Zienius, D., Šengaut, J. & Pavilonis, A. (2010). The situation of antimicrobial resistance of enteric bacteria isolated from animal origin to quinolones and fluoroquinolones. *Veterinarija Ir Zootechnika*, 50(72), 73-80.
- Sabtcheva, S., Kaku, M., Saga, T., Ishii, Y. & Kantardjiev, T. (2009). High prevalence of the *aac(6')-Ib-cr* gene and its dissemination among *Enterobacteriaceae* isolates by CTX-M-15 plasmids in Bulgaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1), 335–336.
- Saga, T., Kaku, M., Onodera, Y., Yamachika, S., Sato, K. & Takase, H. (2005). *Bibrio parahaemolyticus* chromosomal *qnr* homologue VPA0095: demonstration by transformation with a mutated gene of its potential to reduce quinolone susceptibility in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49(5), 2144-2145.
- Sánchez, M.B., Hernández, A., Rodríguez-Martínez, J.M., Martínez-Martínez, L. & Martínez, J.L. (2008). Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of *qnr* determinants. *BMC Microbiology*, 16(8), 1-14.
- Schuch, L.F.D. (2001). Diarréia dos bezerros. In F. Riet-Correa, A.L. Schild, M.C. Mendez & R.A. Lemos, *Doenças de Ruminantes e Equinos*. (2<sup>nd</sup> ed.). (pp. 408-409). Brazil: Varela.
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A.P. & Gaastra, W. (2010). Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(4), 601-604.
- Shin, J.H., Jung, H.J., Lee, J.Y., Kim, H.R., Lee, J.N. & Chang, C.L. (2008). High rates of plasmid-mediated quinolone resistance *qnrB* variants among ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from urinary tract infections in Korea. *Microbiology Drug Resistance*, 14(3), 221–226.
- Silva, P.P. (2002). Quinolonas, In P.P. Silva, *Farmacologia*. (pp. 1085-1091). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Sjolund-Karlsson, M., Folster, J.P., Pecic, G., Joyce, K., Medalla, F., Rickert, R. & Whichard, J.M. (2009). Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance among non-Typhi *Salmonella enterica* isolates from human in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 2142–2144.
- Smith, D.L., Harris, A.D., Johnson, J.A., Silbergeld, E.K. & Morris, J.G. (2002). Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 6434-6439.

- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. & Robicsek, A. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 664-689.
- SVARM 2010 (2011). *Swedish veterinary antimicrobial resistance monitoring*. Acedido em Out. 2, 2011. Disponível em <http://www.sva.se>.
- Szabo, D., Kocsis, B., Rokusz, L., Szentandrassy, J., Katona, K., Kristof, K. & Nagy, K. (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), 630-632.
- Tamang, M.D., Seol, S.Y., Oh, J.Y., Kang, H.Y., Lee, J.C., Lee, Y.C., Cho, D.T. & Kim J. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in a Korean hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11), 4159-4162.
- Teo, J.W., Ng, K.Y. & Lin, R.T. (2009). Detection and genetic characterization of *qnrB* in hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Singapore. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(2), 177-180.
- Trobos, M., Lester, C.H., Olsen, J.E., Fridmodt-Møller, N. & Hammerum. A.M. (2009). Natural transfer of sulphonamide and ampicillin resistance between *E. coli* residing in the human intestine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(1), 80-86.
- União Europeia. (2003). Regulamento (CE) N.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e o Conselho de 22 de Setembro de 2003 relativo aos aditivos destinados à alimentação animal *Jornal Oficial da União Europeia*, L268, 29-43.
- Vasilaki, O., Ntokou, E., Ikonomidis, A., Sofianou, D., Frantzidou, F., Alexiou-Daniel, S., Maniatis, A.N. & Pournaras, S. (2008). Emergence of the plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* in *Escherichia coli* isolates in Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2996-2997
- VAV 2005 (2006). *Red de vigilancia veterinária de resistências a antibióticos*. Acedido em Out. 2, 2011. Disponível em <http://www.vigilanciasanitaria.es>.
- Veldman, K., van Pelt, W. & Mevius, D. (2008). First report of *qnr* genes in *Salmonella* in The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(2), 452-453.
- Vetting, M.W., Hegde, S.S., Wang, M., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. & Blanchard, J.S. (2011). Structure of *qnrB1*, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor. *Journal of Biological Chemistry*, 286(28), 25265-25273.
- Vien, L.T.M., Baker, S., Le, T.P., Le, T.P., Cao, T.T., Tran, T.T., Nguyen, V.M., Campbell, J.I., Lam, M.Y., Nguyen, T.H., Nguyen, V.V., Farrar, J., Schultsz, C. (2009). High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in commensal members of the *Enterobacteriaceae* in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Journal of Medical Microbiology*, 58(pt12), 1585-1592.

- Wang, A., Yang, Y., Lu, Q., Wang, Y., Chen, Y., Deng, L., Ding, H., Deng, Q., Zhang, H., Wang, C., Liu, L., Xu, X., Wang, L. & Shen, X., (2008a). Presence of *qnr* gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. *BMC Infectious Diseases*, 8, 68.
- Wang, A., Yang, Y., Lu, Q., Wang, Y., Chen, Y., Deng, L., Ding, H., Deng, Q., Wang, L. & Shen, X. (2008b). Occurrence of *qnr*-positive clinical isolates in *Klebsiella pneumoniae* producing ESBL or AmpC-type  $\beta$ -lactamase from five pediatric hospitals in China. *FEMS Microbiology Letters*, 283(1), 112–116.
- Wang, M., Jacoby, G.A., Mills, D.M. & Hooper, D.C. (2009b). SOS Regulation of *qnrB* expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 821-823.
- Wang, M., Sahm, D.F., Jacoby, G.A. & Hooper, D.C. (2004a). Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), 1295–1299.
- Wang, M., Sahm, D.F., Jacoby, G.A., Zhang, Y. & Hooper, D.C. (2004b). Activities of newer quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), 1400-1401.
- Wang, M., Tran, J.H., Jacoby, G.A., Zhang, Y., Wang, F. & Hooper, D.C. (2003). Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(7), 2242–2248.
- Wang, M.H., Xu, X., Wu, S., Zhu, D. & Wang, M.G. (2009a). A new plasmid-mediated gene for quinolone resistance, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 1892-1897.
- Warburg, G., Korem, M., Robicsek, A., Engelstein, D., Moses, A.E., Block, C. & Strahilevitz, J. (2009). Changes in *aac(6')-Ib-cr* prevalence and fluoroquinolone resistance in nosocomial isolates of *E. coli*: 1991 through 2005. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), 1268–1270.
- Wheat, P.F. (2001). History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(S1), 1-4.
- White, D.G., Acar, J., Anthony, F., Franklin, A., Gupta, R., Nicholls, T., Tamura, Y., Thompson, S., Threlfall, E.J., Vose, D., van Vuuren, M., Wegener, H.C. & Costarrica, M.L. (2003). Antimicrobial resistance: standardisation and harmonisation of laboratory methodologies for the detection and quantification of antimicrobial resistance. In World Organisation for Animal Health, *OIE International Standards on Antimicrobial Resistance*. (pp. 223-238). Paris: OIE.
- Wileman, B.W., Thomson, D.U., Reinhardt, C.D. & Renter, D.G. (2009). Analysis of modern technologies commonly used in beef cattle production: Conventional beef production versus conventional production using meta-analysis. *Journal of Animal Science*, 87(10), 3418-3426.

- World Health Organization & The Alliance for the Prudent Use of Antibiotics (2001). *Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups*. Switzerland: WHO.
- World Health Organization (1998a). *Use of quinolones in food animals and potential impact on human health*. Switzerland: WHO.
- World Health Organization (1998b). *World Health Assembly (WHA) 51.17 Emerging and other communicable diseases: antimicrobial resistance*. Acedido em Nov. 7, 2011. Disponível em [http://www.who.int/drugresistance/AMR\\_DC\\_Resolutions/](http://www.who.int/drugresistance/AMR_DC_Resolutions/).
- World Health Organization (2011). *Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe*. Copenhagen: WHO.
- World Health Organization Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance. (2009). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*. Switzerland: WHO.
- World Organisation for Animal Health (2003). *OIE International Standards on Antimicrobial Resistance*. Paris: OIE.
- Wu, J.J., Ko, W.C., Chiou, C.S., Chen, H.M., Wang, L.R. & Yan, J.J. (2008a). Emergence of *qnr* determinants in human *Salmonella* isolates in Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(6), 1269–1272.
- Wu, J.-J., Ko, W.-C., Tsai, S.-H. & Yan, J.-J. (2007). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1223–1227.
- Wu, J.J., Ko, W.C., Wu, H.M. & Yan, J.J. (2008b). Prevalence of *qnr* determinants among bloodstream isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a Taiwanese hospital, 1999–2005. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1234–1239.
- Xia, L.N., Li, L., Wu, C.M., Tao, X.Q., Qi, Y.H., Lu, L.M. & Shen, J.Z. (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), 207-215.
- Xiong, X., Bromley, E.H.C., Oelschlaeger, P., Woolfson, D.N. & Spencer, J. (2011). Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Research*, 39(9), 3917-3927.
- Xiong, Z., Wang, P., Wei, Y., Wang, H., Cao, H., Huang, H. & Li, J. (2008). Investigation of *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in *Enterobacter cloacae* isolates from Anhui Province, China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62(4), 457–459.
- Yagci, D., Yoruk, F., Azap, A. & Memikoglu, O. (2009). Prevalence and risk factors for selection of quinolone-resistant *Escherichia coli* strains in fecal flora of patients receiving quinolone therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), 1287–1289.



- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S. & Arakawa, Y. (2008). Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1564-1566.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., kimura, k., Shibata, N., Kato, H. Shibayama, K., Konda, T. & Arakawa, Y. (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *qepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9), 3354-3336.
- Yang, H., Chen, H., Yang, Q., Chen, M. & Wang, M. (2008). High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from nine teaching hospitals in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(12), 4268-4273.
- Yue, L., Jiang, H.X., Liao, X.P., Liu, J.H., Li, S.J., Chen, X.Y., Chen, C.X., Lu, 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.
- Zhao, J., Chen, Z., Chen, S., Deng, Y., Liu, Y., Uian, W., Huang, X., Wu, C., Sun, Y., Sun, Y., Zeng, Z. & Liu J.-H. (2010). Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4219-4224.
- Zhou, T-L., Chen, X-J., Zhou, M-M., Zhao, Y-J., Luo, X-H. & Bao, Q-Y. (2011). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates in Wenzhou, Southern China, 2002-2008. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 64(1), 55-57.

## ANEXOS

**Anexo I.** Resumo da comunicação livre apresentada no V Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias (SPCV), Vale de Santarém, 2011.

*Influência do uso de enrofloxacina no desenvolvimento de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos em Escherichia coli de vitelos*

Guerreiro, L<sup>1,2</sup>, Couto, N<sup>1,3</sup>, Centeno, M.<sup>1,3</sup>, Nunes, T<sup>2,3</sup>, Cavaco, LM<sup>4</sup> Pomba, C<sup>1,3</sup>

1. Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas, Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade Técnica de Lisboa (UTL), Lisboa, Portugal
2. Mestrado de Segurança Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade Técnica de Lisboa (UTL), Lisboa, Portugal
3. Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade Técnica de Lisboa (UTL), Lisboa, Portugal
4. Research Group for Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiology, National Food Institute, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark

O conhecimento sobre a presença e frequência de genes de Resistência às Quinolonas Mediada por Plasmídeos (RQMP) em estirpes comensais de *E. coli* de origem bovina é escasso a nível mundial. O presente trabalho teve como objectivos: i) avaliar a frequência de genes de RQMP, designadamente os genes *qnr* (*A*, *B*, *C*, *D* e *S*), o gene *aac(6')-Ib-cr* e o gene codificante da bomba de efluxo *qepA*; e ii) determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos ácido nalidíxico AN, ciprofloxacina CIP e levofloxacina LEV, em isolados de *E. coli* de vitelos. Foram estudadas um total de 237 amostras previamente isoladas após pressão selectiva *in vivo* de enrofloxacina ENR e caracterizadas quanto à resistência aos antibióticos por Centeno, M. (2010): 101, 79 e 57 isolados relativos a T0, T1 (6 semanas após administração de ENR) e T2 (10 semanas após administração de ENR), respectivamente. A caracterização fenotípica foi realizada por determinação das CIMs por microdiluição e os resultados interpretados segundo a norma M100-S20 (CLSI, 2010). A caracterização genotípica da RQMP foi determinada através de amplificação por PCR dos genes anteriormente mencionados e sequenciação. A proporção de isolados de *E. coli* resistentes ao AN em T0, T1 e T2 foi de, respectivamente: 52,5% (n=53; CIM 64- >>256 µg/ml), 100% (n=79; CIM 128- >>256 µg/ml) e 82,5% (n=47; CIM 128- >>256 µg/ml). A proporção de isolados de *E. coli* resistentes à CIP e à LEV em T0, T1 e T2 foi de, respectivamente: 34,7% [n= 35; CIP (CIM 4- >>256 µg/ml); LEV (CIM 4-64 µg/ml)], 96,2% [n=76; CIP (CIM 4-128 µg/ml); LEV (CIM 4-64 µg/ml)] e 70,2% [n=40; CIP (CIM 4-64 µg/ml); LEV (CIM 4-32

µg/ml)]. No que respeita à frequência de genes de RQMP nos 237 isolados estudados foram identificados: 11,8% (n=28) positivos para genes *qnr* (*qnrB* n=4, *qnrD* n=11, *qnrS* n=13); 0,8% (n=2) isolados positivos para o gene *aac(6')-Ib-cr*. Da análise da frequência dos genes de RQMP nos isolados de *E. coli* observou-se: em T0, 3% de genes *qnr* (todos *qnrS*) e 2% do gene *aac(6')-Ib-cr*; em T1, 15,2% de genes *qnr* (10,1% *qnrD* e 5,1% *qnrS*); em T2, 22,8% de genes *qnr* (7% *qnrB*, 5,3% *qnrD* e 10,5% *qnrS*). Os dados obtidos demonstram um aumento significativo da prevalência de isolados resistentes e da percentagem de RQMPs de T0 para T1 após pressão selectiva da ENR. Embora não exista uma associação entre a presença de genes de RQMP e valores de CIM, verifica-se um aumento da frequência destes genes ao longo do estudo longitudinal. Este é o primeiro estudo que descreve a identificação de resistência às quinolonas por *qnrD* em isolados de *E. coli* de bovinos.

**Anexo II.** Declaração de autorização para a reprodução parcial de dissertação (documento digitalizado).

## DECLARAÇÃO

**Nome:** Lara Sofia Fernandes Guerreiro

**Número do Cartão de Cidadão:** 12547154 8 ZZ7

**Título de Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar:**

Influência do uso de enrofloxacina no aparecimento de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos em *Escherichia coli* de vitelos.

**Orientadores:**

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

Doutor Telmo Nunes

**Ano de conclusão:** 2012

Eu, abaixo-assinada, declaro que, para efeitos de investigação, procedi à reprodução parcial da dissertação *Influência do uso de fluoroquinolonas no aparecimento de Escherichia coli e Salmonella spp. multirresistentes em vitelos*, desenvolvida no âmbito do Mestrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa por Maria Madalena Gomes Ferreira Lopes Centeno, concluída em 2010, mediante prévia autorização da autora abaixo-assinada.

Faculdade de Medicina Veterinária da UTL, 24 / 01 / 2012

O(A) requerente:

Lara Guerreiro

O(A) autor(a)

Madalena Centeno

**Anexo III.** Resultados da pesquisa de genes de RQMP e dos testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para as 237 estirpes de *E. coli* em estudo (colhidas em T0, T1 e T2) e interpretação dos valores de CIM segundo os valores de *cut-off* epidemiológicos (ECOFF) estabelecidos pelo EUCAST e segundo os critérios clínicos definidos pelo CLSI e pelo EUCAST.

Amostra	Gene de RQMP	AN			CIP			LEV					
		CIM (µg/ml)	CLSI 2011	EUCAST 2012	ECOFF (EUCAST 2012)	CIM (µg/ml)	CLSI 2011	EUCAST 2012	ECOFF (EUCAST 2012)	CIM (µg/ml)	CLSI 2011	EUCAST 2012	ECOFF (EUCAST 2012)
VF1T0		2		S		0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
VF2T0		1		S		0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
VF3T0		2		S		0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
VF4T0		2		S		0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
VF5T0		128		R		0,125	S	S	R	0,125	S	S	S
VF6T0		>256		R		4	R	R	R	4	I	R	R
VF7T0		8		S		0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
VF8T0		2		S		0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
VF9T0	<i>qnrS</i>	8		S		0,5	S	S	R	0,5	S	S	R
VF10T0		2		S		0,007	S	S	S	0,015	S	S	S

<b>VF11T0</b>	>256	R	8	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF12T0</b>	>256	R	16	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF14T0</b>	>256	R	8	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF16T0</b>	>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF17T0</b>	<i>aac(6')- Ib-cr</i>	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF18T0</b>	>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF19T0</b>	2	S	0,007	S	S	S	0,015	S	S	S
<b>VF20T0</b>	>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF21T0</b>	>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF22T0</b>	2	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF23T0</b>	128	R	0,125	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF24T0</b>	2	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF26T0</b>	2	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF27T0</b>	2	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF28T0</b>	64	R	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF29T0</b>	4	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S

<b>VF30T0</b>	2	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF31T0</b>	2	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF32T0</b>	128	R	0,25	S	S	R	0,25	S	S	S
<b>VF33T0</b>	128	R	0,125	S	S	R	0,25	S	S	S
<b>VF34T0</b>	2	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF35T0</b>	>256	R	64	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF36T0</b>	128	R	0,25	S	S	R	0,25	S	S	S
<b>VF37T0</b>	4	S	0,015	S	S	S	0,062	S	S	S
<b>VF38T0</b>	128	R	0,125	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF39T0</b>	2	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF40T0</b>	2	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF41T0</b>	256	R	0,25	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF42T0</b>	8	S	0,015	S	S	S	0,062	S	S	S
<b>VF43T0</b>	8	S	0,015	S	S	S	0,062	S	S	S
<b>VF44T0</b>	4	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF45T0</b>	2	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S

<b>VF46T0</b>	2	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF47T0</b>	2	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF48T0</b>	2	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF49T0</b>	2	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF50T0</b>	2	S	0,015	S	S	S	0,015	S	S	S
<b>VF51T0</b>	4	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF52T0</b>	128	R	0,125	S	S	R	0,25	S	S	S
<b>VF53T0</b>	2	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF54T0</b>	>256	R	128	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF55T0</b>	2	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF56T0</b>	2	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF57T0</b>	128	R	0,25	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF58T0</b>	2	S	0,007	S	S	S	0,25	S	S	S
<b>VF59T0</b>	>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF60T0</b>	4	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF61T0</b>	>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R



<b>VF62T0</b>	<i>qnrS</i>	>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF63T0</b>		>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF64T0</b>		256	R	0,25	S	S	R	1	S	S	R
<b>VF65T0</b>		>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF66T0</b>		>256	R	128	R	R	R	64	R	R	R
<b>VF67T0</b>	<i>qnrS</i>	>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF68T0</b>		>256	R	128	R	R	R	64	R	R	R
<b>VF69T0</b>		4	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF70T0</b>		>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF71T0</b>		>256	R	64	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF72T0</b>		2	S	0,015	S	S	S	0,062	S	S	S
<b>VF73T0</b>		>256	R	0,25	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF74T0</b>		>256	R	32	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF75T0</b>		>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF76T0</b>		>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF77T0</b>	<i>aac(6')- Ib-cr</i>	>256	R	>256	R	R	R	64	R	R	R

<b>VF78T0</b>	>256	R	>256	R	R	R	64	R	R	R
<b>VF79T0</b>	>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF81T0</b>	4	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF82T0</b>	4	S	0,031	S	S	S	0,125	S	S	S
<b>VF83T0</b>	4	S	0,062	S	S	S	0,062	S	S	S
<b>VF84T0</b>	128	R	0,25	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF85T0</b>	64	R	0,125	S	S	R	0,25	S	S	S
<b>VF86T0</b>	4	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF87T0</b>	4	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF88T0</b>	4	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF89T0</b>	256	R	0,25	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF90T0</b>	>256	R	128	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF91T0</b>	>256	R	128	R	R	R	64	R	R	R
<b>VF92T0</b>	>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF93T0</b>	256	R	0,25	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF94T0</b>	4	S	0,062	S	S	S	0,125	S	S	S

<b>VF95T0</b>	4	S	0,031	S	S	S	0,125	S	S	S
<b>VF96T0</b>	256	R	0,5	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF97T0</b>	2	S	0,031	S	S	S	0,062	S	S	S
<b>VF99T0</b>	>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF100T0</b>	>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF101T0</b>	>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF102T0</b>	2	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF103T0</b>	>256	R	16	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF104T0</b>	2	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF105T0</b>	256	R	0,5	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF106T0</b>	>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF1T1</b>	>256	R	0,25	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF2T1</b>	>256	R	4	R	R	R	4	I	R	R
<b>VF5T1</b>	>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF6T1</b>	>256	R	8	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF7T1</b>	<i>qnrS</i> >256	R	16	R	R	R	16	R	R	R

<b>VF8T1</b>	>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF10T1</b>	>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF11T1</b>	>256	R	8	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF12T1</b>	>256	R	4	R	R	R	4	I	R	R
<b>VF13T1</b>	>256	R	4	R	R	R	4	I	R	R
<b>VF16T1</b>	>256	R	8	R	R	R	4	I	R	R
<b>VF17T1</b>	>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF18T1</b>	>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF19T1</b>	>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF20T1</b>	>256	R	32	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF21T1</b>	>256	R	8	R	R	R	4	I	R	R
<b>VF22T1</b>	>256	R	64	R	R	R	64	R	R	R
<b>VF23T1</b>	>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF24T1</b>	>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF25T1</b>	>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF27T1</b>	<i>qnrS</i> >256	R	16	R	R	R	16	R	R	R

<b>VF28T1</b>	>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF30T1</b>	>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF31T1</b>	>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF32T1</b>	>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF33T1</b>	>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF34T1</b>	>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF35T1</b>	>256	R	128	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF36T1</b>	>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF38T1</b>	>256	R	4	R	R	R	4	I	R	R
<b>VF39T1</b>	>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF40T1</b>	>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF42T1</b>	>256	R	16	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF43T1</b>	>256	R	64	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF46T1</b>	>256	R	64	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF47T1</b>	>256	R	64	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF48T1</b>	<i>qnrD</i> >256	R	32	R	R	R	8	R	R	R

<b>VF49T1</b>	<i>qnrD</i>	>256	R	8	R	R	R	4	I	R	R
<b>VF50T1</b>		>256	R	4	R	R	R	4	I	R	R
<b>VF52T1</b>		>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF54T1</b>		>256	R	8	R	R	R	4	I	R	R
<b>VF56T1</b>		>256	R	32	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF60T1</b>		>256	R	8	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF61T1</b>	<i>qnrS</i>	128	R	1	S	R	R	2	S	R	R
<b>VF64T1</b>		>256	R	4	R	R	R	4	I	R	R
<b>VF65T1</b>		>256	R	8	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF66T1</b>		>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF67T1</b>	<i>qnrS</i>	128	R	1	S	R	R	2	S	R	R
<b>VF68T1</b>		>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF69T1</b>		>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF70T1</b>		>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF71T1</b>		>256	R	16	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF72T1</b>		>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R

<b>VF76T1</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF77T1</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF78T1</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF79T1</b>		>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF80T1</b>	<i>qnrD</i>	>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF81T1</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF82T1</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF84T1</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF85T1</b>	<i>qnrD</i>	>256	R	128	R	R	R	64	R	R	R
<b>VF86T1</b>		>256	R	128	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF87T1</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF88T1</b>	<i>qnrD</i>	>256	R	64	R	R	R	64	R	R	R
<b>VF91T1</b>	<i>qnrD</i>	>256	R	16	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF92T1</b>		>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF93T1</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF94T1</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R

<b>VF96T1</b>	>256	R	32	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF97T1</b>	<i>qnrD</i> >256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF98T1</b>	>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF99T1</b>	>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF100T1</b>	>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF101T1</b>	>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF102T1</b>	>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF103T1</b>	>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF104T1</b>	<i>qnrD</i> >256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF106T1</b>	>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF1T2</b>	>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF2T2</b>	>256	R	32	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF5T2</b>	>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF6T2</b>	>256	R	1	S	R	R	1	S	S	R
<b>VF7T2</b>	>256	R	64	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF8T2</b>	>256	R	32	R	R	R	8	R	R	R



<b>VF10T2</b>		>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF11T2</b>		256	R	0,25	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF12T2</b>		>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF18T2</b>	<i>qnrS</i>	8	S	0,25	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF19T2</b>		>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF21T2</b>		>256	R	16	R	R	R	4	I	R	R
<b>VF23T2</b>		>256	R	16	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF27T2</b>		>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF28T2</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF31T2</b>		>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF32T2</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF33T2</b>		>256	R	0,5	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF35T2</b>	<i>qnrS</i>	128	R	1	S	R	R	2	S	R	R
<b>VF36T2</b>		>256	R	64	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF38T2</b>		>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF46T2</b>	<i>qnrS</i>	>256	R	32	R	R	R	8	R	R	R

<b>VF48T2</b>	<i>qnrB</i>	2	S	1	S	R	R	0,5	S	S	R
<b>VF50T2</b>		>256	R	64	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF54T2</b>	<i>qnrB</i>	4	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF55T2</b>		>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF56T2</b>	<i>qnrS</i>	128	R	1	S	R	R	2	S	R	R
<b>VF59T2</b>		>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF60T2</b>	<i>qnrB</i>	>256	R	4	R	R	R	4	I	R	R
<b>VF64T2</b>		>256	R	32	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF65T2</b>		>256	R	16	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF66T2</b>		>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF67T2</b>		4	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF69T2</b>		>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF71T2</b>		2	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF72T2</b>	<i>qnrB</i>	>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF76T2</b>		>256	R	16	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF77T2</b>	<i>qnrS</i>	>256	R	16	R	R	R	16	R	R	S

<b>VF78T2</b>		>256	R	8	R	R	R	2	R	R	R
<b>VF80T2</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF82T2</b>		2	S	0,015	S	S	S	0,062	S	S	S
<b>VF84T2</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF85T2</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF86T2</b>		>256	R	8	R	R	R	4	I	R	R
<b>VF87T2</b>	<i>qnrD</i>	>256	R	8	R	R	R	4	I	R	R
<b>VF88T2</b>		256	R	0,25	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF91T2</b>		16	S	0,25	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF92T2</b>	<i>qnrS</i>	4	S	0,25	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF94T2</b>		>256	R	32	R	R	R	8	R	R	R
<b>VF96T2</b>		>256	R	64	R	R	R	32	R	R	R
<b>VF98T2</b>	<i>qnrD</i>	4	S	0,015	S	S	S	0,031	S	S	S
<b>VF99T2</b>		>256	R	0,25	S	S	R	0,5	S	S	R
<b>VF100T2</b>	<i>qnrD</i>	>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF101T2</b>		4	S	0,007	S	S	S	0,031	S	S	S

<b>VF103T2</b>	>256	R	32	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF104T2</b>	>256	R	64	R	R	R	16	R	R	R
<b>VF106T2</b>	>256	R	32	R	R	R	4	I	R	R

---

AN, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina.

S, susceptível; I, intermédio; R, resistente.

Para a interpretação dos resultados foram utilizados os seguintes critérios interpretativos definidos para *E. coli*: critérios clínicos humanos estabelecidos pelo CLSI (2011) na norma M100-S21 (AN: S≤16 µg/ml e R≥32 µg/ml; CIP: S≤1 µg/ml, I=2 µg/ml e R≥4 µg/ml; LEV: S≤2 µg/ml, I=4 µg/ml e R≥8 µg/ml); critérios clínicos humanos estabelecidos pelo EUCAST (2012a) versão 2.0 (AN: S≤16 µg/ml, R>16 µg/ml; CIP: S≤0,5 µg/ml e R≥1 µg/ml; LEV: S≤1 µg/ml e R≥2 µg/ml); e ECOFF (critérios epidemiológicos) estabelecidos pelo EUCAST (2012b) (AN: R>16 µg/ml; CIP: R>0,064 µg/ml; LEV: R>0,25 µg/ml).

