



Semina: Ciências Agrárias
ISSN: 1676-546X
semina.agrarias@uel.br
Universidade Estadual de Londrina
Brasil

Barreiros de Souza, Roberta; Magnani, Marciane; Rocha Moreira de Oliveira, Tereza
Cristina

Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp.

Semina: Ciências Agrárias, vol. 31, núm. 2, abril-junio, 2010, pp. 413-427
Universidade Estadual de Londrina
Londrina, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744096014>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp.**Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella* spp.**

Roberta Barreiros de Souza¹; Marciane Magnani²;
Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira^{3*}

Resumo

A salmonelose é uma zoonose de importância mundial e uma das mais freqüentes doenças de origem alimentar. As fluoroquinolonas são a principal opção para o tratamento de salmoneloses graves ou sistêmicas. Esta revisão de literatura teve como objetivo apresentar os principais mecanismos envolvidos na resistência de *Salmonella* spp. a estes antimicrobianos. Mutações de ponto na Região Determinante de Resistência às Quinolona (QRDR) do gene *gyrA* podem gerar altos níveis de resistência a quinolonas não-fluoradas, além de reduzir a suscetibilidade as fluoroquinolonas. Outros mecanismos de resistência que também precisam ser considerados são as mutações no gene *parC*, a possibilidade do envolvimento de plasmídeos de resistência e alterações no sistema de efluxo ativo. A resistência às fluoroquinolonas ainda é incomum em *Salmonella* spp., quando comparada a outros gêneros da família Enterobacteriaceae. No entanto, o uso criterioso de fluoroquinolonas na medicina humana e veterinária é essencial para reduzir a pressão seletiva e evitar a emergência e disseminação de clones resistentes, mantendo o espectro de ação e a eficácia clínica desta classe terapêutica.

Palavras-chave: Fluoroquinolonas, mutações, salmonelose

Abstract

Salmonellosis is a common and widespread zoonotic disease of humans and a frequent cause of foodborne disease. Treatment of severe and systemic salmonellosis is usually done with fluoroquinolones. In this review resistance mechanisms of *Salmonella* to quinolones are discussed. Single point mutations in the quinolone resistant determining region (QRDR) of the *gyrA* gene may be sufficient to generate high levels of resistance to non-fluorinated quinolones and also may decrease the fluoroquinolones susceptibility. Other resistance mechanisms that should be considered are mutations in *parC* gene, the possibility of acquiring resistance through plasmidial transference and hyper-expression of efflux pumps. Fluoroquinolones resistance is still relatively uncommon in *Salmonella* compared to other species belonging to the Enterobacteriaceae family. However, the more careful use of fluoroquinolones in veterinary and human medicine is essential to decrease the selective pressure which can avoid the emergence and spread of resistant clones and consequently maintain the clinical efficacy of this group of antibiotics.

Key words: Fluoroquinolones, mutations, salmonellosis

¹ Mestre em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, – C.P: 6001, CEP: 86051-970, Londrina-Pr. E-mail: robs_unesp@yahoo.com.br

² Doutoranda em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, – C.P: 6001, CEP: 86051-970, Londrina-Pr. E-mail: magnani2@gmail.com

³ Professora Associada Doutora do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, – C.P: 6001, CEP: 86051-970, Londrina-Pr. E-mail: terezaoliveira@yahoo.com

* Autor para correspondência

Introdução

As salmoneloses são reconhecidas como causa comum de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) em humanos e representam um grave problema de saúde pública (WHO, 2006). *Salmonella* spp. é amplamente distribuída na natureza e coloniza uma variedade de animais, como mamíferos, anfíbios, répteis, aves e insetos. *Salmonella enterica* sorovares Typhi e Paratyphi são patógenos especificamente humanos, não possuem reservatório animal e podem causar infecções sistêmicas graves. Os demais sorovares causam as chamadas salmoneloses não-tifóides e podem atingir humanos e animais (BUTAYE et al., 2006; FORSHELL; WIERUP, 2006).

Embora as salmoneloses ocorram frequentemente em humanos, a transmissão direta de pessoa a pessoa não é comum, sendo a maior parte das infecções associadas ao consumo de alimentos contaminados (SALYERS; WHITT, 1994; GALES et al., 2002; TÉO; OLIVEIRA, 2005). Geralmente, as infecções devidas a *Salmonella* spp. resultam em gastroenterites auto-limitadas que incluem sintomas como dores abdominais, náuseas, vômito, diarréia, febre moderada e dores de cabeça, tratadas apenas nos casos de pacientes imunodeprimidos, neonatais e idosos, ou pacientes com febre entérica e bacteremia (SALYERS; WHITT, 1994; GALES et al., 2002; HOPKINS; DAVIES; THRELFALL, 2005).

Alimentos de origem animal são os veículos mais freqüentes de transmissão de *Salmonella* spp., especialmente os produtos avícolas (RIBEIRO et al., 2007). O primeiro caso de salmonelose em humanos foi relatado em 1880 e predominavam os casos de infecções por *S. Typhi*. As medidas de prevenção e controle para este patógeno alteraram esse quadro e, desde 1940 tem-se registrado um aumento progressivo no isolamento de *Salmonella* não-específica em humanos e animais, particularmente *S. Typhimurium* e mais recentemente, *S. Enteritidis* (FORSHELL; WIERUP, 2006).

No Brasil, *S. Enteritidis* emergiu como um grande

problema avícola e de saúde pública em 1993. Estudos epidemiológicos sugeriram que a entrada deste sorovar no país ocorreu provavelmente no final da década de 80, via importação de material genético avícola contaminado (SILVA; DUARTE, 2002).

No Paraná, dados da Secretaria da Saúde do Estado (PARANÁ, 2007) relativos à ocorrência de DTAs no período de 1978 a 2000 apontam *Salmonella* spp. como o segundo agente etiológico de maior prevalência, superada apenas por intoxicação estafilocócica (AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006; PARANÁ, 2007). O número de casos de salmonelose no Estado aumentou significativamente nos últimos anos. Em 1993, 7,1% dos surtos de toxinfecção alimentar foram causados por *Salmonella* spp. e 34% por *Staphylococcus aureus*. Já em 1995, a salmonelose foi a principal DTA notificada no Paraná e, em 1998, 57,1% dos surtos confirmados laboratorialmente foram causados por *Salmonella* spp. e 31,2% por cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* (ALCOCER et al., 2006). Nos surtos ocorridos entre 1999 e 2006, o sorovar Enteritidis foi o predominante, tanto nas amostras de pacientes (74,8%) quanto nos alimentos envolvidos em surtos (80%) (informações pessoais de Luciana Kottwitz).

Durante décadas, ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol foram as drogas mais utilizadas para o tratamento de salmoneloses graves. Porém, o aumento na resistência a estes agentes reduziram significativamente o uso na clínica médica. Consequentemente, as fluoroquinolonas (FQs) passaram a ser os principais antimicrobianos empregados para o tratamento de infecções humanas.

O aumento da incidência de cepas resistentes às quinolonas de primeira geração, como ácido nalidíxico, é preocupante considerando que esse fato pode estar relacionado à redução da suscetibilidade às FQs, como a ciprofloxacina, e ao possível surgimento de resistência a esses antimicrobianos (HOOPER, 2001).

Em geral, as infecções por *Salmonella* resistentes a antimicrobianos são adquiridas através da ingestão de alimentos contaminados de origem animal (ÂNGULO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2005). O uso contínuo de FQs na medicina veterinária e pecuária, para profilaxia de doenças infecciosas ou como promotores de crescimento pode contribuir para o aumento da prevalência de microrganismos resistentes e tem consequências para a saúde pública, com implicações no tratamento e na prevenção de doenças infecciosas em humanos e animais (SMITH et al., 2002; CARRAMINÃNA et al., 2004; BUTAYE et al., 2006).

Considerando a importância da emergência de cepas de *Salmonella* spp. resistentes à ciprofloxacina, principalmente devido à interferência na resposta ao tratamento clínico, o objetivo desta revisão foi aprofundar conhecimentos sobre os possíveis mecanismos moleculares de resistência de *Salmonella* spp. às quinolonas.

Resistência a Atimicrobianos

Devido à natureza auto-limitante da salmonelose, geralmente, o emprego de terapia antimicrobiana não é requerida nos casos de diarréias agudas. Entretanto, o uso de antimicrobianos é essencial em paciente imunodeprimidos, idosos ou crianças, ou ainda em casos de bacteremia, meningite ou outras infecções extra-intestinais por *Salmonella* (SAN MARTÍN et al., 2005; BUTAYE et al., 2006).

Estudos conduzidos pelo *Center of Disease Control* (CDC), em 1995, constataram que cerca de 40% dos pacientes com infecção por *Salmonella* que procuram os hospitais são tratados com agentes antimicrobianos. Durante anos, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol foram drogas de escolha no tratamento de infecções graves por *Salmonella*. No entanto, taxas crescentes de resistência a estes agentes reduziram significativamente sua eficácia e, consequentemente, fluoroquinolonas e cefalosporinas de amplo espectro passaram a ser administradas nestes casos. Porém,

a seleção gradativa de isolados de *Salmonella* resistentes a essas duas classes de antimicrobianos consiste em um importante problema de saúde pública, com implicações no tratamento e prevenção de doenças infecciosas em humanos e animais (CARRAMINÃNA et al., 2004; BUTAYE et al., 2006).

O emprego de agentes antimicrobianos em animais destinados à alimentação humana é, supostamente, a principal causa da emergência e distribuição de cepas de *Salmonella* resistentes, devido ao fato dos alimentos de origem animal contaminados representarem a principal fonte de transmissão de *Salmonella*, (ÂNGULO et al., 2000; SILVA; DUARTE, 2002).

Agentes antimicrobianos têm sido utilizados na medicina veterinária para o tratamento e profilaxia de doenças, bem como na produção animal, como promotores de crescimento (OLIVEIRA et al., 2005). Entretanto, algumas cepas bacterianas podem, em exposição repetida aos antibióticos, desenvolver características de resistência (THRELFALL et al., 2002).

A presença de cepas resistentes em animais de produção pode ameaçar a eficácia de antimicrobianos em humanos se estas bactérias ou seus genes de resistência forem incorporados à população bacteriana humana (SMITH et al., 2002). Apesar de contribuir para a otimização da produção animal, o uso indiscriminado de antimicrobianos pode favorecer a ocorrência de cepas resistentes em carnes e outros produtos de origem animal devido à pressão seletiva. A administração de antimicrobianos nas rações com o intuito de prevenir doenças e aumentar o ganho de peso tornou-se uma prática comum na avicultura e contribuiu para o agravamento do problema (TESSI et al., 1997). Aves poedeiras e de corte representam a principal fonte de *Salmonella* resistentes a agentes antimicrobianos. Embora o Brasil seja o segundo produtor mundial e o maior exportador de carne de frango, existem poucos estudos a respeito da resistência antimicrobiana

de isolados de *Salmonella* no país (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA, 2007).

A ocorrência de cepas resistentes limita as opções terapêuticas tanto na medicina veterinária como humana, quando há necessidade de tratamento (WITTE, 1998; ANGULO et al., 2000). Adicionalmente, a ocorrência de coinfecção com HIV pode resultar em rápida progressão da doença e causar efeito multiplicador na disseminação do patógeno resistente ao restante da população (WHO, 2006).

A administração desnecessária de antimicrobianos em casos de gastroenterites humanas auto-limitadas tem sido considerado um fator também que contribui para a disseminação de resistência (SMITH et al., 2002).

A vigilância da resistência antimicrobiana é essencial para disponibilizar informações sobre sua magnitude e tendências, e para monitorar o efeito das intervenções, pois a prevalência de resistência pode variar nas diferentes regiões ou épocas (WHO, 2006).

No Brasil, Fernandes et al. (2003) avaliaram o perfil de suscetibilidade de cepas de *S. Enteritidis* enviadas ao Laboratório Central de Saúde Pública, Laboratório de Patologia Animal e Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade de São Paulo, durante 1975 e 1995, e relataram que 67,7% das cepas foram susceptíveis a ceftazidina, cefoperazone e ciprofloxacina e, mais de 90% à ampicilina, cloranfenicol, cefalotina, gentamicina, ácido nalidíxico e trimetoprim-sulfametoaxazol.

Outro estudo brasileiro, realizado em 2000, com 1005 amostras de *S. Enteritidis* enviadas à Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), Estado do Rio de Janeiro, mostrou que 63,9% das cepas eram suscetíveis à ampicilina, cefalotina, ciprofloxacina, ceftriaxona, gentamicina, ácido nalidíxico, nitrofurantoína e trimetoprim-sulfametoaxazol. A resistência ao ácido nalidíxico foi constatada em 13,2% e à nitrofurantina em 10,5% das cepas (RODRIGUES, 2001).

Em recente pesquisa, 22 cepas de *S. Hadar* isoladas de carcaças de frango no Rio Grande do Sul apresentaram 100% de resistência à estreptomicina, tetraciclina e sulfamatoxazil-trimetoprim. Além disso, 86,36% apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e 4,54% ao cloranfenicol. Em contrapartida, todas as cepas testadas foram sensíveis a ciprofloxacina, norfloxacina, gentamicina, polimixina B, ampicilina, canamicina, enrofloxacina (RIBEIRO et al., 2006).

No Estado do Paraná, Delicato et al. (2004) estudaram 14 cepas de *S. Enteritidis* e verificaram que 50% foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados e a 50% foram resistentes a um ou mais antimicrobianos testados. O maior percentual de resistência foi observado para ampicilina (85,7%). Os sorovares Newport, Infantis, Javiana e Brandenburg foram sensíveis a todos antimicrobianos testados. *S. Glosstrup* foi resistente somente a gentamicina, entretanto, duas cepas do sorovar Typhimurium foram resistentes a 11 antimicrobianos. Quanto a sensibilidade, todas as cepas testadas foram sensíveis a amicacina, pefloxacina, imipenem e ciprofloxacina.

De acordo com Hooper (2001), as fluoroquinolonas (FQ), como ciprofloxacina, têm sido as drogas de escolha para o tratamento de infecções por *Salmonella* spp., porém, o aumento da resistência ao ácido nalidíxico, uma quinolona de primeira geração, é uma preocupação de saúde pública por estar relacionada com a redução na suscetibilidade a outros antimicrobianos desta classe, e a possibilidade de emergência de cepas resistentes.

Quinolonas

As quinolonas e fluoroquinolonas (FQs) representam uma classe de antimicrobianos sintéticos composta por drogas quimicamente semelhantes e altamente eficazes no tratamento de uma série de infecções, sobretudo de origem bacteriana, cuja atividade consiste fundamentalmente na inibição

da replicação do DNA (SADER, 1999; HOPKINS; DAVIES; THRELFALL, 2005).

O desenvolvimento das quinolonas teve início com a identificação do ácido nalidíxico por Lesher et al. (1962), à partir de um subproduto da síntese da cloroquina, o 6-cloro-1-H-etil-4-oxoquinolona-3-ácido carboxílico. Devido sua atividade contra bactérias Gram-negativas aeróbias, o ácido nalidíxico foi uma boa opção terapêutica para o tratamento de infecções urinárias nos anos 60. Entretanto, sua considerável ligação protéica e as modestas concentrações séricas e teciduais, somadas ao surgimento de resistência, restringiram sua indicação ao tratamento de infecções sistêmicas (BARLOW, 1963; SADER, 1999).

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

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

A incorporação da molécula de flúor na posição 6 do anel quinolônico aumentou a afinidade de ligação específica e facilitou a penetração desses agentes na célula bacteriana, proporcionado um importante aumento na potência destes fármacos contra bactérias Gram-negativas, e ampliando o espectro de ação para as Gram-positivas. A primeira quinolona do grupo de fluoroquinolonas foi a norfloxacina, disponibilizada em 1986 (DOMAGALA et al., 1986; SADER, 1999).

Logo após a introdução da norfloxacina no mercado, surgiram outras fluoroquinolonas que, além de serem potencialmente ativas e apresentarem amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mostraram alta absorção intestinal e excelente penetração na maioria dos órgãos e tecidos. Devido à diversidade de indicações clínicas, ciprofloxacina e ofloxacina têm sido os antimicrobianos mais amplamente utilizados nas últimas décadas (SADER, 1999; HOPKINS; DAVIES; THRELFALL, 2005).

As quinolonas comercialmente disponíveis no Brasil, possuem um átomo de flúor na posição 6 do duplo anel (fluoroquinolonas). Moxifloxacino e gatifloxacina incorporam ainda um radical metóxi na posição 8 e, por isso, tem sido denominadas C8-metóxi-quinolonas. Sua diferença está relacionada a ligação específica dentro da célula bacteriana (SADER, 1999).

A Tabela 1 apresenta a classificação das quinolonas segundo Walker (1999).

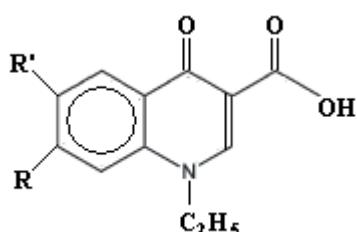


Figura 1. Fórmula Estrutural das Quinolonas
Fonte: SADER, 1999.

Tabela 1. Classificação das quinolonas de acordo com o espectro de ação, segundo Walker (1999).

Classificação	Quinolona/ Fluoroquinolona
Primeira Geração	Ácido Nalidíxico Ácido Oxolínico Cinoxacina
Segunda Geração	Norfloxacina Ciprofloxacina Enoxacina Lemofloxacina Ofloxacina
Terceira Geração	Levofloxacina Esparfloxacina Gatifloxacina Grapafloxacina
Quarta Geração	Trovafloxacina Moxifloxacina Gatifloxacina Gemifloxacina

Fonte: Walker, 1999.

Mecanismo de Ação das Quinolonas

A replicação do DNA bacteriano tem início em uma seqüência específica do cromossomo, e prossegue em sentido bidirecional até que as fitas se encontrem no lado oposto da molécula ou se deparem com seqüências terminadoras da replicação. Diversas enzimas estão envolvidas nesse processo, entre elas a DNA-helicase que desenrola a dupla fita de DNA antes da atuação da DNA-polimerase, facilitando assim a progressão da replicação. No entanto, a ação combinada dessas enzimas resulta na formação de superespirais positivas no DNA em frente ao braço de replicação. Se esta superespiralização não for corrigida, pode impossibilitar a replicação (PIDDOCK, 2002). Para solucionar os problemas topológicos do DNA, como a separação das fitas e a remoção da superespiralização positiva do DNA, enzimas chamadas topoisomerases agem tornando a replicação mais eficiente. (DRLICA; ZHAO, 1997; HOPKINS; DAVIES; THRELFALL, 2005).

Em *Salmonella* spp., são encontradas quatro topoisomerases, classificadas em dois grupos de

acordo com seu mecanismo de ação. As do Tipo I, representadas pelas topoisomerases I e III, e as do Tipo II, representada pela topoisomerase II, também denominada DNA-girase, e IV. A DNA-girase é composta por duas subunidades A (GyrA) e duas B (GyrB), codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. A topoisomerase IV, consiste em duas subunidades C (ParC) e duas E (ParE), codificadas pelos genes *parC* e *parE*, respectivamente. O alvo primário da ação de quinolonas em Gram-negativos é a DNA-girase, enquanto a topoisomerase IV é o alvo secundário (PIDDOCK, 1998b; HOOPER, 1999; HOOPER, 2001; PIDDOCK, 2002).

A DNA-girase catalisa a introdução de giros super-helicoidais negativos no DNA circular covalentemente fechado dos cromossomos e dos plasmídios, no interior da célula bacteriana, auxiliando no processo de compactação do material genético bacteriano. Além disso, esta enzima também é responsável pela remoção de giros super-helicoidais positivos que se acumulam a frente da

forquilha de replicação do DNA e interrompem o fluxo desse processo. Em relação à topoisomerase IV, sua principal função consiste na separação das moléculas-filhas de DNA interligadas (em cadeia) que são produtos da finalização de uma etapa do processo de replicação do DNA, a fim de permitir sua segregação em células-filhas (HOOPER, 2001). Desse modo, a DNA-girase e a topoisomerase IV desempenham funções distintas e essenciais na replicação bacteriana.

O mecanismo de ação das quinolonas consiste na ligação específica do agente antimicrobiano ao complexo DNA-enzima, bloqueando sua atividade após a clivagem dos filamentos e antes do resselamento do DNA. Consequentemente, forma-se uma barreira física que impedirá a progressão da forquilha de replicação (HOOPER, 1999; HOOPER, 2001). Pelo exposto, resume-se que a habilidade de penetração na bactéria, bem como de ligação à DNA girase, são processos determinantes no espectro de atividade das quinolonas.

As fluoroquinolonas de segunda geração, como ciprofloxacina e ofloxacina, apresentam maior atividade sobre a enzima DNA-girase que sobre as topoisomerase IV de bactérias Gram-negativas. Dessa maneira, bactérias Gram-negativas, como *Salmonella*, podem tornar-se resistentes à ciprofloxacina devido a mutações nos genes que codificam a enzima para qual ela apresenta maior atividade, já que a ação antimicrobiana desta droga sobre o alvo secundário não é suficiente para inibir adequadamente a bactéria (DRLICA; ZHAO, 1997).

Por outro lado, as fluoroquinolonas de quarta geração apresentam excelente atividade contra ambas enzimas, DNA-girase e topoisomerase IV, tanto em bactérias Gram-negativas quanto em Gram-positivas. Essa característica proporciona maior potência, além de dificultar a emergência de resistência ao antimicrobiano, já que serão necessárias mutações adicionais, uma vez que a atuação do antimicrobiano em qualquer uma das

enzimas será suficiente para inibir o desenvolvimento bacteriano (HOOPER, 1999).

As características peculiares apresentadas pelas fluoroquinolonas, associadas à relativa facilidade de incorporação de novos radicais ao anel quinolônico básico indicam a possibilidade do surgimento de muitos outros compostos dessa classe no futuro. No entanto, a manutenção do espectro de ação e da eficácia clínica das quinolonas e FQs, depende essencialmente do uso criterioso dos antimicrobianos dessa classe terapêutica (SADER, 1999).

Mecanismos de Resistência às Quinolonas em *Salmonella*: ênfase em mutações

O uso difundido de quinolonas, desde sua descoberta, contribuiu para o crescente aumento da incidência de cepas resistentes e pode colocar em risco a utilização clínica destes antimicrobianos (TRAN; JACOBY, 2002).

A resistência a fluoroquinolonas (FQ) ainda é relativamente incomum em *Salmonella* se comparada à freqüência em outros gêneros da família Enterobacteriaceae. Alguns pesquisadores sugerem esta situação como consequência de algum mecanismo de resistência a FQ diferenciado em *Salmonellae* que limita a emergência de cepas resistentes.

Diversos estudos demonstraram que a resistência às quinolonas surgiu devido a mutações cromossômicas nos genes que codificam as enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, que são os alvos da ação destes antimicrobianos (PIDDOCK, 1998b; HAKANEN et al., 2005; HOPKINS; DAVIES; THRELFALL, 2005; GIRAUD; BAUCHERON; CLOECKAERT, 2006).

Além das mutações nos genes que codificam a enzima DNA-girase, podem ocorrer redução do acúmulo do antimicrobiano no interior da célula bacteriana devido à hiperexpressão das bombas de efluxo e ou alterações nas porinas presentes na membrana externa, que reduzem a permeabilidade

ao agente antimicrobiano (PIDDOCK, 1998b; SOTO et al., 2003; SAN-MARTÍN et al., 2005).

Em *Salmonella* spp. a resistência às quinolonas se deve principalmente à alterações no sítio de ligação do antimicrobiano com a DNA-girase, devido à mutações em uma região específica do gene *gyrA*, entre os aminoácidos 67 e 106, denominada Região Determinante de Resistência à Quinolona (QRDR) (SOTO et al., 2003; SAN-MARTÍN et al., 2005; GIRAUD; BAUCHERON; CLOECKAERT, 2006).

Mutações de ponto na região QRDR do gene *gyrA* podem ser suficientes para gerar altos níveis de resistência a quinolonas não-fluoradas, além de reduzir a suscetibilidade a fluoroquinolonas (Cip MIC \geq 0,125 µg/mL). No entanto, são necessárias mutações adicionais para que ocorra resistência a fluoroquinolonas, como ciprofloxacina, embora cepas com suscetibilidade reduzida possam levar à falência no tratamento clínico com estes antimicrobianos. Mutações no gene *parC* das topoisomerase IV ocorrem menos frequentemente e as mutações nos genes *gyrB* e *parE* tem sido consideradas raras em *Salmonellae* (GIRAUD; BAUCHERON; CLOECKAERT, 2006; HOPKINS; DAVIES; THRELFALL, 2005; EAVES et al., 2004).

A maior freqüência de alteração na QRDR em *Salmonella* spp. resistentes ao ácido nalidíxico ocorre nos códons correspondentes a Serina-83 (Ser83) e Aspartato-87 (Asp87) (HOPKINS; DAVIES; THRELFALL, 2005). Em adição, sabe-se que alterações destes dois resíduos são freqüentemente relatadas como combinadas em cepas fluoroquinolona-resistentes (SAN-MARTÍN et al., 2005; GIRAUD; BAUCHERON; CLOECKAERT, 2006). As mutações no aminoácido Ser83 podem resultar em trocas por tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) ou alanina (Ala), enquanto que as mutações no aminoácido Asp87 podem implicar em substituições por asparagina (Asn), glicina (Gly), tirosina (Tyr) ou lisina (Lys). Cepas que carregam

estas diferentes substituições nos códons 83 e ou 87 apresentam diferentes níveis de suscetibilidade reduzida a fluoroquinolonas (HOPKINS; DAVIES; THRELFALL, 2005; GIRAUD; BAUCHERON; CLOECKAERT, 2006).

Giraud et al. (1999) estudaram duas linhagens de *S. Typhimurium* altamente resistentes a fluoroquinolonas selecionadas in vitro e verificaram alterações apenas no gene *gyrA*. Eaves et al. (2004) analisaram a prevalência de mutações na região QRDR dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* associadas a resistência à quinolonas em *Salmonella enterica*. Esses autores verificaram que do total de 182 cepas, 139 (76,4%) foram resistentes ao ácido nalidíxico e apresentavam mutações no gene *gyrA*. Dentre estas, 69 cepas (49,6%) continham mutações apenas no gene *gyrA* e as restantes (55,4%) apresentavam uma ou mais mutações adicionais no gene *gyrB* (n=2), *parC* (n=65) e/ou *parE* (n=10), apresentando diferentes graus de suscetibilidade à ciprofloxacina. No mesmo trabalho, os sorovares Enteritidis e Typhimurium não apresentaram mutações no gene *parC*.

Pesquisas de Eaves et al. (2004) demonstraram que substituições Thr57(Ser) do gene *parC* tornaram cepas de *Salmonella* Typhimurium mais suscetíveis a ciprofloxacina, mas não ao ácido nalidíxico. Assim, cepas com mutações apenas no *gyrA* podem apresentar maior resistência à ciprofloxacina do que cepas com alterações concomitantes no *gyrA* e *parC*. No que se refere ao sorovar Enteritidis, os autores verificaram que as alterações mais freqüentes foram observadas em Ser83(Phe) e Asp87(Tyr), além de Ser83(Tyr) e Asp87(Gly). Já em *S. Typhimurium*, a maioria das substituições foi representada por Ser83(Phe).

A freqüência e posição de mutações no gene *gyrA* variam conforme o sorovar. Estudos de Giraud et al. (1999) revelaram que mutações nos códons Ser83 e Asp87 não podem ser distribuídas igualmente, já que nos sorovares Newport, Virchow e Typhimurium as mutações em Ser83 foram

mais prevalentes, enquanto nos sorovares Hadar e Kottbus prevaleceram alterações em Asp87. Sob este mesmo ponto de vista, Allen e Poppe (2002), encontraram substituição de Ser83(Tyr) em todas as cepas de *S. Bredeney* e mutação de Asp87(Gly) em todas as cepas de *S. Senftenberg* testadas.

Observações recentes sugerem que altos níveis de resistência estão surgindo nos sorovares *Typhimurium*, *Choleraesuis* e *Schwarzengrund* distribuídos mundialmente (HOPKINS; DAVIES; THRELFALL, 2005). Como ocorre em *E. coli* altamente resistentes à fluoroquinolonas, todos os sorovares emergentes de *Salmonella* FQ-resistentes possuem mutações múltiplas nos genes que codificam as subunidades da DNA-girase e topoisomerase IV. Portanto, a idéia inicial de que, diferente de *E. coli*, as mutações em topoisomerase IV não tem um papel importante na resistência a FQ em *Salmonellae* necessita ser revista (GIRAUD; BAUCHERON; CLOECKAERT, 2006).

Devido ao fato de algumas cepas de *Salmonella* spp. com mutações identificadas nos genes que codificam as topoisomerases tipo II demonstrarem diferentes graus de resistência às quinolonas, o sistema de efluxo ativo tem sido reconhecido como um outro mecanismo envolvido na resistência a estes antimicrobianos (GIRAUD; BAUCHERON; CLOECKAERT, 2006). Bombas de efluxo são proteínas de transporte, envolvidas na expulsão de substratos tóxicos de dentro das células para o ambiente externo (WEBBER; PIDDOCK, 2003). Em bactérias Gram-Negativas, estes sistemas possuem tipicamente três componentes: uma bomba de efluxo localizada na membrana citoplasmática, uma proteína de membrana externa e uma proteína de fusão de membrana, que liga a bomba de efluxo à proteína de membrana externa.

O principal sistema de efluxo ativo em *Salmonella* spp. é denominado AcrAB, e utiliza a proteína TolC da membrana externa como canal de expulsão. Aparentemente a hiperexpressão desse sistema leva a uma redução na suscetibilidade de *S. Typhimurium*

ao ácido de fusídico, cloranfenicol, tetraciclina, norfloxacina e penicilina-G (ESCRIBANO et al., 2004). Estudos recentes mostraram que um outro sistema de efluxo chamado AcrEF pode ser requerido para o efluxo de fluoroquinolonas em mutantes em que o sistema AcrAB não estiver funcionando (OLLIVER, 2005).

Giraud, Baucheron e Cloeckaert (2006) desenvolveram um modelo experimental que demonstrou a importância deste mecanismo de resistência em mutantes obtidos após exposição à fluoroquinolonas, e sugeriu que o mesmo pode ocorrer antes do aparecimento de mutações no gene *gyrA*.

Inicialmente, acreditava-se que a resistência às quinolonas era mediada apenas por genes cromossomais. No entanto, uma amostra de *Klebsiella pneumoniae* descrita nos Estados Unidos, em 1998, comprovou a possibilidade de transmissão horizontal de resistência às quinolonas, via plasmídio pMG252. Atualmente, sabe-se que o gene *qnr*, responsável por este mecanismo de resistência, codifica uma proteína denominada Qnr que protege a DNA-girase da ação da ciprofloxacina (GAY et al., 2006).

Aparentemente, mutações nas topoisomerase IV não conferem resistência por si só, mas aumentam a resistência atribuída a subunidade GyrA (TRAN; JACOB, 2002). Desta forma, supõe-se que alterações na resposta ao tratamento clínico com estes antimicrobianos devido a mutações nestas enzimas só são esperadas em cepas que já possuem a DNA-girase alterada. Mutações no gene *parC* que resultam em resistência a quinolonas em *Salmonella*, geralmente acontecem no códon Ser80 ou, menos frequentemente, no códon Glu84, homólogos aos códons Ser83 e Asp87 da DNA-girase (HOPKINS; DAVIES; THRELFALL, 2005; GIRAUD; BAUCHERON; CLOECKAERT, 2006).

Redução na Suscetibilidade às Fluoroquinolonas

O primeiro relato de resposta negativa de *Salmonella* à terapia com ciprofloxacina na Europa ocorreu em 1990 em cepas do sorovar Typhimurium (DT 204) e, desde então, a incidência de cepas de diferentes sorovares resistentes a este antimicrobiano tem sido reportada em diversos países (PIDDOCK, 2002; GIRAUD; BAUCHERON; CLOECKAERT, 2006).

Nas últimas décadas, o número de isolados de *Salmonella* com suscetibilidade reduzida a ciprofloxacina e a outras fluoroquinolonas vem aumentando significativamente, o que interfere diretamente na resposta ao tratamento clínico. A maior parte das cepas com esta característica surgiu inicialmente em animais expostos a fluoroquinolonas. Posteriormente, essas cepas foram transmitidas aos seres humanos via cadeia alimentar (EAVES et al., 2004; ESCRIBANO, et al., 2004).

O critério para resistência à ciprofloxacina, de acordo com a Norma M100-S16 (vol.26, nº3) do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006), é que a cepa apresente MIC \geq 4 μ g/mL. Cientificamente, são consideradas cepas com suscetibilidade reduzida aquelas que apresentam MIC \geq 0,125 μ g/mL e que, em consequência, podem acarretar resposta negativa ao tratamento clínico com o antimicrobiano (PIDDOCK, 2002; RELLER et al., 2002).

Em 2000, os resultados de testes de sensibilidade a antimicrobianos em cepas isoladas de pacientes com salmonelose de 10 países da Europa revelaram baixa resistência clínica a ciprofloxacina, sendo que apenas 0,5% dos isolados apresentaram CipMIC \geq 1 μ g/ mL. No estudo, a resistência clínica foi mais comum em *S. Hadar* e também observada em *Enteritidis*, *Typhimurium*, *Virchow* e *Agona*. Entretanto, a resistência ao ácido nalidíxico associada à redução na suscetibilidade foi constatada em diferentes freqüências em isolados dos sorovares *Hadar*, *Virchow*, *Blockley* e *Enteritidis*,

possivelmente devido ao fato de alguns sorovares adquirirem resistência à fluoroquinolonas mais facilmente que outros (THRELFALL; FISHER; BERGHOLD, 2003).

Estudos realizados por Cebrian, Sirvent e Díaz (2003) na Espanha utilizando isolados de *Salmonella* provenientes de fonte humana mostraram que sorovares *Hadar* e *Typhimurium* apresentaram maior redução de suscetibilidade a fluoroquinolonas, após exposição a concentrações sub-inibitórias desses antimicrobianos, do que cepas de *S. Enteritidis*.

Segundo Threlfall (2002), na Inglaterra e País de Gales o aumento da incidência de suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina em *Salmonella* zoonóticas, como *Enteritidis*, *Virchow* e *Hadar*, pode ser em consequência do uso de antimicrobianos na indústria avícola. Entretanto, ao que parece, o fato envolve maior complexidade e pode estar relacionado a outros fatores como o fagotipo. Atualmente, o sorovar *Enteritidis* é subdividido em mais de 60 fagotipos. O fagotipo (PT) 1, por exemplo, parece exibir redução na suscetibilidade à ciprofloxacina em grande parte dos isolados. Em contraste, em outros fagotipos de *S. Enteritidis*, como PT 4, o decréscimo na suscetibilidade a fluoroquinolonas é raro.

Outro aspecto importante em relação à resistência refere-se ao fato de que cepas previamente resistentes ao ácido nalidíxico podem requerer menor exposição à quinolonas para que sua suscetibilidade seja alterada (HOPKINS; DAVIES; THRELFALL, 2005). Dessa forma, alguns animais podem constituir um reservatório onde cepas resistentes ao ácido nalidíxico com mutações iniciais no gene *gyrA* podem persistir e adquirir mecanismos adicionais de resistência após exposição à fluoroquinolonas (GIRAUD et al., 1999).

Diversos estudos apontam a utilização indiscriminada de ciprofloxacina e de outros antimicrobianos desta classe na medicina veterinária como importante fator de risco para a emergência de cepas resistentes.

Detecção de Mutações Associadas à Resistência às Quinolonas Através de PCR – RFLP

As alterações no gene *gyrA* que codifica a enzima DNA-girase têm sido apontadas como a principal causa da emergência de cepas de *Salmonella* spp. com altos níveis de resistência clínica às quinolonas. Assim sendo, a detecção destas substituições torna-se importante para compreensão dos mecanismos de resistência, além de contribuir em estudos epidemiológicos de transmissão e variabilidade em cepas resistentes (ALONSO et al., 2004b).

Inúmeros métodos têm sido utilizados para identificar alterações nos genes *gyrA*, *gyrB* e *parC* e associá-las com resistência a quinolonas. Tais métodos incluem a clonagem dos genes de cepas resistentes e identificação das alterações nas seqüências nucleotídicas, além da purificação das proteínas GyrA e GyrB (OUABDESELAM et al., 1995). Embora o sequenciamento direto seja uma técnica mais apurada para a detecção de mutações em nucleotídeos, os protocolos utilizados têm alto custo e demandam muito tempo. Assim, protocolos alternativos para a detecção de mutações têm sido desenvolvidos a fim de possibilitar a utilização dos mesmos em diagnósticos laboratoriais de rotina ou estudos epidemiológicos (ALONSO et al., 2004b).

A técnica de PCR-RFLP envolve a amplificação de um gene ou segmento do gene através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e posterior clivagem do produto amplificado utilizando endonucleases com sítios de restrição específicos, chamadas enzimas de restrição. Alonso, Galimand e Courvalin (2004a) desenvolveram o método de PCR-RFLP para a detecção de mutações pontuais nos genes *parC*, códons Ser79 e Asp83; *parE*, códon Asp435, e *gyrA*, códons Ser81 e Glu85, de *Streptococcus pneumoniae*, utilizando as enzimas de restrição *HinfI*, *LweI* e *MboII*.

PCR-RFLP também foi utilizada por Alonso et al. (2004b) para desenvolver um protocolo alternativo mais rápido e reproduzível para a

identificação de mutações relacionadas à resistência a fluoroquinolonas em *Campylobacter coli*. O processo envolve a introdução de um sítio de clivagem artificial para a enzima *RsaI* no produto de PCR utilizando um *primer* específico que insere uma base adjacente à seqüência de DNA do gene a ser amplificado.

Giraud et al. (2004) investigaram a resistência à quinolonas e a relação epidemiológica em cepas de *Aeromonas salmonicida* isoladas de peixes marinhos. Os autores utilizaram o método de PCR-RFLP desenvolvido por Haliassos et al. (1989) para verificar a ocorrência de mutações no códon 87. A técnica empregou dois *primers* alelo-específicos para a amplificação de fragmentos com 158 pb que, em seguida, foram digeridos com a enzima *Hpy 1881*, formando produtos com 122 e 32 pb na presença de mutação no referido códon.

Wydmuch et al. (2005) estudaram mutações no gene *gyrA* responsáveis por resistência a ciprofloxacina, de amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas em hospitais na Polônia em 2003 e empregaram a PCR-RFLP cujo protocolo utiliza a enzima de restrição *Cfr 42* que possui sítio de restrição entre os nucleotídeos 512 e 517 em cepas sem mutação e ausência do mesmo em cepas mutantes.

Giraud et al. (1999) desenvolveram uma técnica denominada AS-PCR-RFLP para detectar as mutações mais freqüentes no gene *gyrA* relacionadas a resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. A detecção envolve a amplificação da QRDR do gene *gyrA* utilizando-se um par de *primers* que insere um sítio artificial de clivagem para a enzima *HinfI* no produto amplificado, além de um *primer* alelo-específico. As diferentes mutações exibem perfil de bandas característico após a digestão com a *HinfI*, que apresenta seqüências de reconhecimento ambíguas contendo 5pb iniciadas em GA e terminadas em TC. Essa metodologia foi adotada por San Martín et al. (2005) para análise da ocorrência e caracterização molecular de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de plantéis avícolas no Chile.

Conclusões

A detecção de mutações empregando PCR-RFLP pode contribuir significativamente para o conhecimento do perfil de suscetibilidade de cepas epidêmicas por demandar menor tempo e custo em relação aos protocolos tradicionais.

A resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. ocorre, principalmente, devido à mutações na Região Determinante de Resistência à Quinolona (QRDR) do gene *gyrA*. Mutações de ponto nessa região podem gerar altos níveis de resistência a quinolonas não-fluoradas, além de reduzir a suscetibilidade a fluoroquinolonas (FQ). Outros mecanismos, como a hiperexpressão das bombas de efluxo e ou alteração das porinas na membrana externa, podem gerar resistência por reduzirem o acúmulo do antimicrobiano no interior da célula bacteriana. Além disso, deve-se considerar a possibilidade da resistência às quinolonas ser também mediada por plasmídios.

A resistência às fluoroquinolonas ainda é incomum em *Salmonella* spp., quando comparada a outros gêneros da família Enterobacteriaceae. No entanto, cepas resistentes a quinolonas de primeira geração, como ácido nalidíxico, apresentam redução na suscetibilidade às fluoroquinolonas o que pode levar a falência no tratamento clínico com estes antimicrobianos.

O uso criterioso de fluoroquinolonas na medicina humana e veterinária é essencial para reduzir a pressão seletiva e evitar a emergência e disseminação de clones resistentes, mantendo o espectro de ação e a eficácia clínica desta classe terapêutica.

Referências

- ALCOCER, I.; OLIVEIRA, K. M. P.; VIDDOTO, M. C.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Discriminação de sorovares de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango por REP e ERIC-PCR e fagotipagem do sorovar Enteritidis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 2, p. 414-420, 2006.
- ALLEN, K. J.; POPPE, C. Phenotypic and genotypic characterization of food animal isolates of *Salmonella* with reduced sensitivity to ciprofloxacin. *Microbiology Drug Resistance*, v. 4, n. 8, p. 375-383, 2002.
- ALONSO, R.; GALIMAND, M.; COURVALIN, P. An extended PCR-RFLP assay for detection of *parC*, *parE* and *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, London, v. 53, n. 4, p. 682-683, 2004a.
- ALONSO, R.; MATEO, E.; GIRBAU, C.; CHURRUCA, E.; MARTINAZ, I.; ASTORGA-FERNÁNDEZ, A. PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Bethesda, v. 48, n. 12, p. 4886-4888, 2004b.
- AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de Dados epidemiológicos relativos à ocorrências / surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.
- ANGULO, F.; JOHNSON, K.; TAUXE, R.; COHEN, M. Significance and sources of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Microbial Drug Resistance*, Larchmont, v. 6, n. 1, p. 77-83, 2000.
- BARLOW, A. M. Nalidixic acid in infections of urinary tract. *British Medical Journal*, London, v. 2, n. 5368, p. 1308-1310, 1963.
- BUTAYE, P.; MICHAEL, G. B.; SCHWARZ, S.; BARRETT, T. J.; BRISABOIS, A.; WHITE, D. G. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. *Microbes and Infection*, Paris, v. 8, n. 7, p. 1-7, 2006.
- CARRAMINÀNA, J. J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, I.; HERRERA, A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 104, n. 1/2, p. 133-139, 2004.
- CEBRIAN, L.; SIRVENT, E. R.; DÍAZ, J. C. Characterisation of *Salmonella* spp. mutants produced by exposure to various fluoroquinolones. *International Journal Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 134-139, 2003.
- DELICATO, E. L.; MICKCHA, J. M. G.; FERNANDES, S. A.; PELAYO, J. S. Resistance profile to antimicrobials of *Salmonella* spp. isolated from human infections. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 47, n. 2, p. 193-197, 2004.

- DOMAGALA, J. M.; HANNA, L. D.; HEIFETZ, C. L.; HUTT, M. P.; MICH, T. F.; SANCHEZ, J. P.; SOLOMON, M. New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *Journal of Medicinal Chemistry*, Washington, v. 29, n. 3, p. 394-404, 1986.
- DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, New York, v. 61, n. 3, p. 377-392, 1997.
- EAVES, D. J.; RANDALL, L.; GRAY, D. T.; BUCKLEY, A.; WOODWARD, M. J.; WHITE, A. P.; PIDDOCK, L. J. V. Prevalence of mutations within the Quinolone Resistance-Determining Region of *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Bethesda, v. 48, n. 10, p. 4012-4015, 2004.
- ESCRIBANO, I.; RODRÍGUEZ, J. C.; CEBRIAN, L.; ROYO, G. The importance of active efflux systems in the quinolone resistance of clinical isolates of *Salmonella* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v. 24, n. 5, p. 428-432, 2004.
- FERNANDES, S. A.; GHILARDI, A. C.; TAVECHIO, A. T.; MACHADO, A. M. O.; PIGNATARI, A. C. C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella Enteritidis* strains isolated in São Paulo, Brazil, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 59-63, 2003.
- FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics*, Paris, v. 25, n. 2, p. 541-554, 2006.
- GALES, A. C.; SADER, H. S.; MENDES, R. E.; RONALD, N. J. *Salmonella* spp. isolates causing bloodstream infections in Latin America: report of antimicrobial activity from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, New York, v. 44, n. 3, p. 313-318, 2002.
- GAY, K.; ROBICSEK, A.; STRAHILLEVITZ, J.; PARK, C. H.; JACOBY, G.; BARRETT, T. J.; MEDALLA, F.; CHILLER, T. M.; HOOPER, D. C. Plasmid-Mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 43, n. 3, p. 297-304, 2006.
- GIRAUD, E.; BRISABOIS, A.; MARTEL, J. L.; CHASLUS-DANCLA, E. Comparative studies of mutation in animal isolates and experimental in-vitro and in-vivo selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counterselection of highly fluoroquinolones-resistant strains in the field. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, Bethesda, v. 43, n. 9, p. 2131-2137, 1999.
- GIRAUD, E.; BLANC, G.; BOUJU-ALBERT, A.; WEILL, F. X.; DONNAY-MORENO, C. Mechanisms of quinolone resistance and clonal relationship among *Aeromonas salmonicida* strains isolated from reared fish with furunculosis. *Journal of Medical Microbiology*, London, v. 53, n. 9, p. 895-901, 2004.
- GIRAUD, E.; BAUCHERON, S.; CLOECKAERT, A. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes and Infection*, Paris, v. 8, n. 7, p. 1-8, 2006.
- HAKANEN, A.; LINDGREN, M.; HUOVINEN, P.; JAVALA, J.; SIITONEN, A.; KOTILAINEN, P. New quinolone resistance phenomenon in *Salmonella enterica*: nalidixic acid-susceptible isolates with reduced fluoroquinolone susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 43, n. 11, p. 5775-5778, 2005.
- HALIASSOS, A., CHOMEL, J. C., TESSON, L.; BAUDIS, M.; KRUH, J.; KAPLAN, J. C.; KITZIS, A. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. *Nucleic Acids Research*, v. 17, n. 9, p. 3606, 1989.
- HOPKINS, K. L.; DAVIES, R. H.; THRELFALL, E. J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v. 25, n. 5, p. 358-373, 2005.
- HOOPER, D. C. Mechanism of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates*, Edinburgh, v. 2, n. 1, p. 38-55, 1999.
- _____. Emerging mechanism of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 7, n. 2, p. 337-41, 2001.
- LESHER, G. Y.; FROELICH, E. J.; GRUETT, M. D.; BAILEY, J. H.; BRUNDAGE, R. P. 1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents. *Journal of Medicinal Pharmaceutical Chemistry*, Easton, v. 5, n. 5, p. 1063-1065, 1962.
- OUABDESELAM, S.; HOOPER, D. C.; TANKOVIC, J.; SOUSSY, C. J. Detection of *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* by single-strand conformational polymorphism analysis and determination of levels of resistance conferred by two different single *gyrA* mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Bethesda, v. 39, n. 8, p. 1667-1670, 1995.

- OLLIVER, A.; VALLE, M.; CHASLUS-DANCLA, E.; CLOECKAERT, A. Overexpression of the multidrug efflux operon acrEF by insertional activation with IS1 or IS10 elements in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemoter*, Bethesda, v. 49, n. 1, p. 289-301, 2005.
- OLIVEIRA, S. D.; FLORES, F. S.; SANTOS, L. R.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 297-305, 2005.
- PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Instituto de Saúde do Paraná. Surtos de Toxininfecções Alimentares no Estado do Paraná. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br:2080/Ambiental.nsf/AlimentosSurtosTabelas?OpenView>>. Acesso em: 19 abr. 2007.
- PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance: overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance. *British Medical Journal*, London, v. 317, n. 7165, p. 1029-1030, 1998a.
- _____. Antibacterials – mechanisms of action. *Current Opinion in Microbiology*, Oxford, v. 1, n. 5, p. 5002-5008, 1998b.
- _____. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 3-16, 2002.
- RELLER, M.; MCCLELLAN, J.; JOYCE, K.; POLYAK, C.; MINTZ, E.; ANGULO, F. Emerging resistance to quinolones among *Salmonella* Typhi isolates in the United States, 1999 – 2001. *National Antimicrobial Resistance Monitoring System*. Annual Scientific Meeting, Hilton Head, S.C., p. 19-22, nov., 2002.
- RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; FITTEL, A. P.; NASCIMENTO, V. P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 357-360, 2006.
- RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; BESSA, M. C.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 296-299, 2007.
- RODRIGUES, D. P. Reporte de la Vigilancia de la resistencia antimicrobiana de aislados de *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio cholerae*. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Oswaldo Cruz, 2001. Disponível em: <<http://www.paho.org/spanish/hcp/hct/arm-resultados-bra.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2007.
- SADER, H. Quinolonas: avanços e conquistas clinicamente relevantes. *Jornal Quinolonas*, 1999. Disponível em: <<http://www.bristol.com.br/medicos/infocientifica/0/jornalquinolonas1.pdf>>. Acesso em: 1 ago. 2006.
- SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. *Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach*. Washington: ASM Press, 1994. p. 229–243.
- SAN MARTÍN, B.; LAPIERRE, L.; TORO, C.; BRAVO, V.; CORNEJO, J.; HORMAZABAL, J. C.; BORIE C. Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. from poultry farms. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 110, n. 3/4, p. 239-244, 2005.
- SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis in poultry: retrospective in Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, Campinas, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.
- SMITH, D. L.; HARRIS, A. D.; JOHNSON, J. A.; SILBERGELD, E. K.; MORRIS JR., J. G. 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*, Washington, v. 99, n. 9, p. 6434-6439, 2002.
- SOTO, S. M.; RUÍZ, J.; MENDOZA, M. C.; VILA, J. In vitro fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: analysis of mechanisms involved in resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v. 22, n. 5, p. 537-540, 2003.
- TÉO, C. R. P. A.; OLIVEIRA, T. C. R. M. *Salmonella* spp.: The egg as vehicle of transmission and the implications of antimicrobial resistance for public health. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 26, n. 2, p. 195-210, 2005.
- TESSI, M. A.; SALSI, M. S.; CAFFER, M. I.; MOLGUILEVSKY, M. A. Drug resistance of Enterobacteriaceae isolated from chicken carcasses. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 60, n. 8, p. 1001-1005, 1997.
- THRELFALL, E. J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food-and water-borne infections. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 141-148, 2002.
- THRELFALL, E. J.; FISHER, I. S. T.; BERGHOLD, C. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe

- in 2000: results of international multicentre surveillance. *Eurosurveillance – European Communicable Disease Bulletin: Salmonella*, v. 8, n. 2, p. 41-45, 2003.
- TRAN, J. H.; JACOBY, G. A. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 99, n. 8, p. 5638-5642, 2002.
- UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA – UBA. *Relatório Anual 2006/2007*. 2007. Disponível em: <http://www.uba.org.Br/ubanews_files/relatório_ubá_06_07_baixa_01.pdf>. Acesso em: 01 maio. 2008.
- WALKER, R. C. The fluoroquinolones: symposium on antimicrobial agents—part XIII. *Mayo Clinic Proceedings*, Rochester, v. 74, n. 10, p. 1030-1037, 1999.
- WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, London, v. 51, n. 1, p. 9-11, 2003.
- WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, Washington, v. 279, n. 5353, p. 996-997, 1998.
- WHO. Progress report (2000-2005): building capacity for laboratory-based foodborne disease surveillance and outbreak detection and response. *WHO GLOBAL SALM-SURV*, 2006.
- WYDMUCH, Z.; SKOWRONEK-CIOŁEK, O.; CHOLEWA, K.; MAZUREK, U.; PACHA, J.; KEPA, M.; IDZIK, D.; WOJTYCZKA, R. D. GyrA mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a Silesian Hospital in Poland. *Polish Journal of Microbiology*, Warsaw, v. 54, n. 3, p. 201-206, 2005.