UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS E MEDICAMENTOS

PROGRAMA DE MESTRADO E DOUTORADO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

ROBERTA BARREIROS DE SOUZA

Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Avaliação Molecular da Resistência à Quinolonas de cepas de *Salmonella* Epidêmicas e de Origem Avícola isoladas entre 1999 e 2006 no Estado do Paraná, Brasil.

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira

Londrina

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ROBERTA BARRREIROS DE SOUZA

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA E AVALIAÇÃO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA À QUINOLONAS DE CEPAS DE *SALMONELLA* EPIDÊMICAS E DE ORIGEM AVÍCOLA ISOLADAS ENTRE 1999 E 2006 NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª. Drª. Tereza Cristina R. M. de Oliveira

LONDRINA

2008

ROBERTA BARREIROS DE SOUZA

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA E AVALIAÇÃO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA À QUINOLONAS DE CEPAS DE *SALMONELLA* EPIDÊMICAS E DE ORIGEM AVÍCOLA ISOLADAS ENTRE 1999 E 2006 NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Dra. Tereza Cristina R. M. de Oliveira

Universidade Estadual de Londrina

Profª Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Universidade Estadual de Londrina

Profª Dra. Maria Cristina Bronharo Tognim

Universidade Estadual de Maringá

Londrina, 13 de junho de 2008.

Aos meus pais, Dirce e Roberto,

Que sempre me acompanharam e me apoiaram e a quem devo o percurso de minha vida, estou grata pelo amor, confiança, estímulo e coragem que tão oportunamente me souberam transmitir.

Ao Vinicius, pelo companheirismo, compreensão e por ser meu "porto-seguro", com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira, a quem tenho profunda admiração e amizade e que tão sabiamente contribuiu para meu crescimento científico, pois com profissionalismo me incentivou a caminhar e a não desistir dos meus objetivos. Pelo incentivo constante e pelo exemplo de dedicação e competência.

À minha grande e eterna amiga Marciane Magnani, a quem considero um verdadeiro anjo em minha vida, pela imensurável ajuda durante a realização desse trabalho, por me ensinar a não desistir dos objetivos e me dar força quando achei que não fosse conseguir. Por me incentivar de maneira incondicional, mesmo nos fins de semana, feriados ou quando nem estava por perto. *"Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só, por que deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."* (Chaplin).

À Dra. Maria Cristina B. Tognim, que deu as primeiras orientações deste estudo, pelas valiosas sugestões que guiaram o desenvolvimento do trabalho e pela amizade.

À Dra. Maria Helena P. Fungaro, por quem tenho grande admiração e respeito, pela confiança em mim depositada, pela disposição, colaboração e inestimável auxílio na documentação fotográfica deste trabalho.

À Daniele Sartori, pelo exemplo de profissional e pela receptividade, simpatia e amizade que ofereceu principalmente na etapa de documentação fotográfica deste trabalho.

Ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN – Curitiba/ PR), pelo fornecimento das amostras de *Salmonella* spp. isoladas de surtos utilizadas nesse trabalho.

À Dália dos Prazeres Rodrigues, Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - Rio de Janeiro/ RJ), pela sorotipagem das cepas.

À Iliana R. A. Negrete e Luciana B. M. Kottwitz, pelo fornecimento e inúmeros esclarecimentos dos dados epidemiológicos referentes às amostras analisadas neste trabalho.

À Rafaela Gomes Ferrari, pela ajuda nas análises de laboratório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus amados pais, Dirce e Roberto, e à minha 2ª mãe, tia Cris, por todo o amor, carinho, paciência, dedicação, compreensão e apoio. Pela experiência de vida e pelo exemplo de integridade que, tão sabiamente, me incentivaram a não desistir dos meus objetivos e tornaram possível a realização desse sonho.

À minha irmã Gizelli (Tata), pelo exemplo de profissional, pelo amor, motivação e amizade que mesmo distante me confortou em momentos difíceis durante essa etapa e me ajudaram continuar a lutar.

Ao Vinicius, por todo amor, cumplicidade, compreensão, amizade e companheirismo. Agradeço também à Eunice e Emiliano, que se tornaram minha 2ª família, acompanharam minhas angustias, me acolheram nos almoços de domingo e ajudaram a superar a saudade de meus pais e as dificuldades enfrentadas durante essa etapa da minha vida.

À Ana Augusta O. Xavier, pela amizade sincera, por estar presente nos momentos de alegria e pelos abraços reconfortantes nos tempos difíceis. “Digo sem medo de errar que a vida vale à pena por causa da amizade”. Você é uma pessoa muito especial na minha vida.

Aos amigos do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, Ariane, Daryne, Denis, Fabrício, Nádia, Alexandre, Carol, Joice e Lu Berned, pelo carinho, companheirismo e amizade sincera.

Aos “Queridos” amigos da UTFPR, Sumaya, Marcão, Cassiano, Fred e Mayka, pelos momentos de descontração e “pipocas nos fins de tarde”.

"O essencial é invisível aos olhos"

Antoine de Saint-Exupéry

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala	Alanina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
AS-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Alelo-Específica
BHI	Caldo Infusão Cérebro Coração
CDC	Center of Disease Control
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
FQ	Fluoroquinolona
Glu	Glutamina
Gly	Glicina
LACEN	Laboratório Central do Estado do Paraná
Lys	Lisina
MIC	Concentração Inibitória Mínima
NAL	Ácido Nalidíxico
PAHO	Pan American Health Organization
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Phe	Fenilanina
PHLS	Public Health Laboratory Service
PT	Fagotipo
QRDR	Região Determinante de Resistência à Quinolonas
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos
Ser	Serina
Tyr	Tirosina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHO	World Health Organization

SOUZA, Roberta B. **Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Avaliação Molecular da Resistência à Quinolonas de cepas de *Salmonella* Epidêmicas e de Origem Avícola isoladas entre 1999 e 2006 no Estado do Paraná, Brasil.** Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

Foram avaliadas 212 cepas epidêmicas de *Salmonella* spp. isoladas de pacientes e alimentos entre 1999 e 2006 no Estado do Paraná, além de 19 cepas de origem avícola. Dentre as cepas provenientes de surtos 16 diferentes sorovares foram identificados, sendo que Enteritidis foi o mais freqüentemente isolado, presente em 174 amostras (82%), seguido por sete cepas de *S.* Infantis (3,3%), seis de *S.* Typhimurium (2,8%) e seis de *S.* Derby (2,8%). O perfil de suscetibilidade a aos antimicrobianos revelou que dentre as cepas epidêmicas, 95 (45%) apresentaram resistência ao ácido nalidíxico, uma (0,5%) à ampicilina e uma (0,5%) ao sulfametoxazol-trimetoprim. Todas as cepas foram suscetíveis à cefotaxima, cloranfenicol e ciprofloxacina. No período estudado, houve um aumento de 15% para 62,5% na resistência ao ácido nalidíxico e foi observada uma elevação no valor do MIC_{50} para ciprofloxacina nas cepas avaliadas. A concentração inibitória mínima de ciprofloxacina (CipMIC) foi maior para as cepas resistentes do que para as cepas sensíveis ao ácido nalidíxico. Adicionalmente, durante o período estudado, foi constatada uma tendência crescente no isolamento de cepas epidêmicas com suscetibilidade reduzida a ciprofloxacina (MIC$\geq$ 0,125µg/mL). Na avaliação do perfil de resistência das cepas de origem avícola, 13 (68,4%) foram resistentes ao ácido nalidíxico. A ocorrência de mutações na Região Determinante de Resistência as Quinolonas (QRDR) do gene *gyr*A foi avaliada através da técnica de AS-PCR-RFLP nas 95 cepas de *Salmonella* spp. resistentes ao ácido nalidíxico envolvidas em surtos e 13 cepas de origem avícola. Os perfis de RFLP das cepas epidêmicas evidenciaram a presença de mutações nos códons Asp87 (63%) e Ser83 (37%). Dentre as cepas de origem avícola, 11 (84,6%) apresentaram mutações nos códons Asp87 (54,5%) ou Ser83 (45,5%) do gene *gyr*A**.** Em duas cepas avícolas de *Salmonella* fenotipicamente resistentes ao ácido nalidíxico e com suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina, não foram identificadas quaisquer mutações no gene *gyr*A, sugerindo a ocorrência de outros mecanismos de resistência. Não foram identificadas duplas mutações no gene *gyr*A. A posição do ponto de mutação foi associada à variação dos níveis de resistência à ciprofloxacina. Cepas com mutação no códon 83 foram mais resistentes que aquelas com mutação no códon 87. Não foi observada mutação no códon Gly81 em nenhuma das cepas avaliadas. A elevada incidência de cepas de *Salmonella* resistentes ao ácido nalidíxico e com suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina que apresentam mutações no gene *gyr*A observada no presente estudo alerta para o uso criterioso de fluoroquinolonas, evitando a emergência de cepas resistentes.

Palavras-chave: *Salmonella,* resistência antimicrobiana, quinolonas, PCR-RFLP, mutação.

SOUZA, Roberta B. **Antimicrobial susceptibility profile and Molecular Evaluationof the Quinolone Resistance in *Salmonella* strains from foodborne outbreak and poultry source isolated between 1999 – 2006 in Paraná State, Brazil.** Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

The present study was carried out to evaluate the antimicrobial susceptibility of 19 *Salmonella* strains from poultry and 212 *Salmonella* strains associated to foodborne outbreaks occurred in Parana State between 1999 and 2006. A total of 16 different *Salmonella* serovars was identified among the epidemic isolates. Enteritidis was the most frequently serovar which was identified in 174 samples (82%) followed by *S.* Infantis (3,3%), *S.* Typhimurium (2,8%) and *S.* Derby (2,8%). Ninety five (45%) epidemic strains were nalidixic acid resistant, one (0,5%) was resistant to ampicillin and one (0,5%) to trimethoprim. All analyzed strains were susceptible to cefotaxim, chloramfenicol and ciprofloxacin. An increase in nalidixic acid resistance from 15.0% to 62.5% and in ciprofloxacin MIC_{50} values was observed during the period of study. The ciprofloxacin minimal inhibitory concentration (CipMIC) was higher for resistant nalidixic acid strains than for the susceptible ones. Also, an increase in isolation of epidemic *Salmonella* strains with reduced susceptibility (MIC> 0,125µg/mL) to ciprofloxacin was observed. Thirteen (68.4%) of the analyzed poultry strains were nalidixic acid resistant. Epidemic (n= 95) and poultry strains (n= 13) resistant to nalidixic acid were analyzed by AS-PCR-RFLP method in order to determine the presence of mutations in QRDR region of *gyr*A gene. RFLP patterns of epidemic strains showed mutations at codons Asp87 (63%) and Ser83 (37%). Among isolates of poultry, 11 (84.5%) showed mutations at codons Asp87 (54.5%) and Ser83 (45.5%). Any mutations at the QRDR region of *gyr*A gene were detected in two strains resistant to nalidixic acid but other molecular resistance mechanisms could be involved. No double mutations were observed in the analyzed strains. The position point mutation was associated with different levels of ciprofloxacin resistance. Strains with Ser83 mutation showed higher resistance than strains with Asp87 mutation. No mutations were observed in codon Gly81. The high prevalence of *Salmonella* strains resistant to nalidixic acid and mutation points in gene *gyr*A alerts for the rational use of fluoroquinolone in order to avoid emergence of resistance.

Key-words: *Salmonella,* antimicrobial resistance , quinolone, PCR-RFLP, mutation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12

2 OBJETIVOS..... 14

3 REVISÃO DE LITERATURA 15

3.1 Revisão de Literatura I: Epidemiologia, Incidência e Distribuição de *Salmonella* spp.. 16

3.2 Revisão de Literatura II: Mutações no gene g*yr*a como Mecanismo de Resistência de *Salmonella* spp. às Fluoroquinolonas..... 34

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 58

4.1 Artigo I**: "**Redução na Suscetibilidade à Ciprofloxacina em cepas de *Salmonella* isoladas de surtos ocorridos no Paraná, Brasil, entre 1999 e 2006"..... 59

4.2 Artigo II**:** "Detecção de mutações na Região Determinante de Resistência à Quinolonas (QRDR) em cepas de *Salmonella* spp. epidêmicas e de origem avícola isoladas no Estado do Paraná, Brasil"..... 75

5 CONCLUSÕES..... 87

1. INTRODUÇÃO

As salmoneloses são reconhecidas como causa comum de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (WHO, 2006). No Estado do Paraná, Brasil, entre 1999 e 2006, 52 dos 399 municípios notificaram surtos de salmonelose e o sorovar Enteritidis foi responsável por 82% dos surtos. Gastroenterites causadas por *Salmonella*, geralmente, não requerem emprego de terapia antimicrobiana devido a sua natureza auto-limitante. Entretanto, em pacientes imunodeprimidos, idosos ou crianças, ou ainda em casos de salmoneloses graves ou sistêmicas, o uso de antimicrobianos é essencial (SAN MARTÍN et al., 2005, BUTAYE et al., 2006).

Durante décadas, ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol foram as drogas mais utilizadas para o tratamento de salmoneloses. Porém, a crescente resistência a estes agentes reduziram significativamente o uso na clínica médica e, consequentemente, as fluoroquinolonas (FQ) passaram a ser os principais antimicrobianos empregados (PIDDOCK, 1998; BUTAYE et al., 2006).

A seleção de bactérias com resistência antimicrobiana intrínseca e ou com mecanismos adquiridos de resistência contribuem significativamente para o aumento de bactérias resistentes e, consequentemente, restringe as opções terapêuticas para o tratamento de infecções por *Salmonella.* Nesse contexto, o aumento na resistência ao ácido nalidíxico, uma quinolona de 1ª geração, representa um problema de saúde pública, considerando que pode estar relacionado à redução da suscetibilidade às fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina (PIDDOCK, 2002, ESCRIBANO et al., 2004; SAN MARTÍN et al., 2005). A maior parte das infecções por *Salmonella* em humanos ocorre em decorrência da ingestão de alimentos de origem animal contaminados. Dessa forma, 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 (ÂNGULO et al., 1999; HOPKINS et al., 2005; GIRAUD et al., 2006).

Os mecanismos de resistência às quinolonas frequentemente descritos são mutações nos genes que codificam enzimas, hiperexpressão das bombas de efluxo e alterações nas porinas da membrana externa (PIDDOCK et al., 1998; HOOPER et al., 1999; SAN-MARTÍN et al., 2005). Recentemente, foi demonstrada a possibilidade de resistência a este antimicrobiano devido à aquisição do gene *qnr*, via plasmídio, que codifica uma proteína que protege a DNA-girase da ação das quinolonas (GAY et al., 2006; TRAN & JACOBY, 2002).

O conhecimento do perfil de suscetibilidade antimicrobiana e dos mecanismos envolvidos na resistência às fluroquinolonas em *Salmonella* spp.pode auxiliar na escolha do

tratamento adequado, evitando a emergência de cepas resistentes, além de contribuir com estudos epidemiológicos. Pelo exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana em cepas de *Salmonella* spp. epidêmicas e de origem avícola, isoladas entre 1999 e 2006 no Estado Paraná. Adicionalmente, visou investigar a ocorrência de mutações na Região Determinante de Resistência às Quinolonas (QRDR), relacionadas à resistência às fluoroquinolonas.

2. OBJETIVOS

- Avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana em cepas de *Salmonella* spp. epidêmicas e de origem avícola isoladas entre 1999 e 2006 no Estado do Paraná;

- Avaliar a ocorrência de mutações na Região Determinante de Resistência às Quinolonas (QRDR) do gene gyrA relacionadas a resistência a estes antimicrobianos, empregando a técnica de AS-PCR-RFLP.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A Revisão de literatura será apresentada na forma de duas revisões que serão submetidas à publicação em revistas científicas:

Parte I - Epidemiologia, Incidência e Distribuição de *Salmonella* spp.
Periódico: Revista Biosaúde, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Patológicas

Parte II - Mecanismos de Resistência à Fluoroquinolonas em *Salmonella* spp.
Periódico: SEMINA - Ciências Agrárias

EPIDEMIOLOGIA, INCIDÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DE *Salmonella* spp.

Roberta Barreiros de Souza[1]

Marciane Magnani[1]

Tereza Cristina R. M. de Oliveira[1]

[1] Universidade Estadual de Londrina , Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Palavras-Chave: *Salmonella*, salmonelose, doenças transmitidas por alimentos (DTA), epidemiologia

RESUMO

Nos últimos anos, dados epidemiológicos vêm demonstrando considerável aumento na freqüência de cepas de *Salmonella* spp. envolvidas em surtos de toxinfecções alimentares. Atualmente, *Salmonella* é o principal agente etiológico de doenças veiculadas por alimentos (DTA). Os alimentos frequentemente envolvidos em surtos de salmonelose são produtos de origem avícola. Segundo dados recentes da União Brasileira de Avicultura, o Estado do Paraná é o maior produtor nacional de carne de frango. Entre 1999 e 2006, 55 dos 399 municípios paranaenses notificaram surtos de salmonelose e o sorovar Enteritidis foi responsável por 82% dos surtos. Considerando a produção de carne de frango e derivados no Paraná e sua contribuição no mercado brasileiro esta revisão teve como objetivo apresentar dados relativos à epidemiologia, incidência e distribuição de *Salmonella* spp.

INTRODUÇÃO

As salmoneloses são reconhecidas como causa comum de doenças transmitidas por alimentos (DTA) 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. *S*. Typhi e *S*. Paratyphi são patógenos especificamente humanos, não possuem reservatório animal e podem causar infecções sistêmicas graves. Os demais sorovares causam as chamadas salmoneloses não-tifóides que podem atingir humanos e animais (BUTAYE et al., 2006; FORSHELL; WIERUP, 2006). Geralmente, as infecções devido 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 et al., 2005). 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).

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).

Em 1993, no Brasil, *Salmonella* Enteritidis emergiu como um grande problema avícola e de saúde pública. Estudos epidemiológicos sugerem a entrada deste sorovar no país 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 (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 et. al, 2006, Secretaria do Estado do 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* (NEGRETE, 2004). 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).

Considerando a importância de *Salmonella* spp. como principal agente etiológico de DTA no Estado do Paraná desde a década de 90, o objetivo desta revisão foi apresentar dados epidemiológicos de casos e surtos de salmonelose ocorridos em diversos países.

EPIDEMIOLOGIA DA SALMONELOSE E O GÊNERO *SALMONELLA*

O gênero *Salmonella* pertence à Família Enterobacteriaceae e compreende bacilos Gram-negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, produtores de gás a partir da glicose, exceto *S.* Typhi, e capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A maioria dos sorovares é móvel, com exceção de *Salmonella* Pullorum e Gallinarum, devido à presença de flagelos peritriquiais (CORTEZ et al., 2006).

A denominação do gênero *Salmonella* sofreu algumas modificações e a nomenclatura mais aceita atualmente divide o gênero em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, com mais de 2500 sorovares (Tabela 1) (POPOFF; LE MINOR, 2001).

Tabela 1. Classificação dos sorovares de *Salmonella* spp. segundo esquema de Kauffmann-White descrito por Popoff (2001).

Espécies	***Subespécies***	***Número de Sorovares***
S. enterica	Enterica	1478
	Salamae	498
	Diarizonae	327
	Arizonae	94
	Houtenae	71
	Indica	12
S. bongori		20
TOTAL		2501

Fonte: POPOFF (2001).

Os sorovares são bioquimicamente relacionados, diferenciando-se as subespécies entre si pela combinação de seus antígenos somáticos (O) e flagelar (H). A classificação em espécies e subespécies reflete a atual relação filogenética entre os sorovares de *Salmonella*, com a análise da evolução do gênero revelando uma origem monofilética, na qual esta bactéria teria um ancestral comum, relativamente próximo a outras enterobactérias, como *Escherichia coli*. Assim, *S. enterica* e *E. coli* teriam divergido de um mesmo ancestral há 140 milhões de anos, por volta do período da origem dos mamíferos. A *E. coli* teria evoluído como um organismo comensal de aves e mamíferos, enquanto *S. enterica* como um patógeno intracelular facultativo, colonizando aves, répteis e mamíferos, com alguns sorovares apresentando acentuada

especificidade com determinados hospedeiros, como por exemplo, *S.* Typhi e *S.* Gallinarum (NASCIMENTO; SANTOS, 2002).

Salmonella spp. é amplamente distribuída na natureza e coloniza uma variedade de animais, como mamíferos, anfíbios, répteis, aves e insetos. *S*. Typhi e *S*. Paratyphi são patógenos especificamente humanos, não possuem reservatório animal e podem causar infecções sistêmicas graves. Os demais sorovares causam as chamadas salmoneloses não-tifóides que podem atingir humanos e animais (BUTAYE et al., 2006; FORSHELL; WIERUP, 2006).

Alimentos de origem animal são elementos importantes na cadeia alimentar humana, entretanto, podem representar fonte de patógenos causadores de toxinfecções alimentares, como *Salmonella*, especialmente os produtos avícolas, reconhecidos como veículos freqüentes de transmissão desse microrganismo (RIBEIRO et al., 2007).

As infecções por *Salmonella* são responsáveis por uma variedade de doenças agudas e crônicas em plantéis avícolas, sendo clinicamente classificadas em três enfermidades: pulorose, causada por *S*. Pullorum, tifo aviário, causada por *S*. Gallinarum e infecções paratíficas, reconhecidas por sua capacidade de produzir casos de toxinfecções em humanos e sem preferência por um hospedeiro em especial (NASCIMENTO; SANTOS, 2002).

As salmoneloses aviárias causadas por *S.* Enteritidis estão incluídas no grupo chamado, em patologia aviária, de salmonelose paratífica. Acomete principalmente aves jovens, até 2 semanas de idade, enquanto as mais velhas tornam-se, em geral, portadoras intestinais assintomáticas por longos períodos (NASCIMENTO; SANTOS, 2002). *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium e *S.* Heidelberg podem ocasionalmente infectar os ovários, oviduto e conteúdo dos ovos e, consequentemente, serem transmitidas verticalmente à progênie (HUMPHREY, 1994; DESMIDT et al., 1997; POPPE, 1999). Segundo Berchieri et al. (1987), *S.* Enteritidis não persiste por muitas semanas no organismo das aves, sugerindo que a transmissão vertical ocorre quando as aves em postura têm infecção recente. Há também a possibilidade de os ovos se tornarem contaminados após a formação da casca pelo contato com fezes contaminadas na cloaca ou no ambiente, em ninhos, galpões de matrizes, caminhões ou no incubatório, caracterizando a transmissão horizontal do microrganismo entre as aves (MCILROY et al., 1989).

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, atualmente o sorovar mais isolado em toxinfecções alimentares (FORSHELL; WIERUP, 2006).

Em 1993, no Brasil, *Salmonella* Enteritidis emergiu como um grande problema avícola e de saúde pública. Estudos epidemiológicos sugerem a entrada deste sorovar no país via importação de material genético avícola contaminado, provavelmente no final da década de 80 (SILVA; DUARTE, 2002).

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 E WHITT, 1994; GALES et al., 2002; TÉO; OLIVEIRA, 2005). A incidência de salmonelose causada pelo sorovar Enteritidis vem aumentando progressivamente, sendo os ovos crus ou mal cozidos, e produtos com este ingrediente os principais alimentos envolvidos em surtos (NUNES et al., 2003; NYGARD et al., 2004; ADESIYUN et al., 2006; SURESH et al., 2006). Patrick et al. (2004) alertaram para a importância da casca do ovo como um fator de risco para contaminação de alimentos por *Salmonella*, destacando a relevância da manipulação inadequada como possível fator de contaminação cruzada.

Procedimentos inadequados de manipulação contribuem para a disseminação de *Salmonella* no ambiente de preparo de alimentos, devido sua capacidade de aderir a superfícies, como teflon, aço inoxidável e vidro, pela formação de biofilmes em resposta a estresse de disponibilidade de nutrientes e água (AUSTIN et al., 1998; MATTICK et al., 2000). *S.* Enteritidis exibe resistência térmica aumentada, dificultando sua remoção difícil quando aderida a estes materiais (DOYLE & MAZZOTTA, 2000).

INCIDÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DA SALMONELOSE

Nos Estados Unidos, tal como em diversos outros países, a febre tifóide que foi extremamente comum no início do século 20, praticamente desapareceu. Entretanto, novos patógenos veiculados por alimentos têm emergido, entre os quais *Salmonella* não-tifóide que aumentou expressivamente após a II Guerra Mundial (TAUXE, 1997).

O relatório da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006) revelou que, em diversos países, os sorovares de *Salmonella* mais encontrados em fontes humanas são Enteritidis, Typhimurium, Newport, Heigelberg e Virchow (SCHLUNDT, 2002; WHO, 2006). A distribuição entre anos de 2000 e 2004 do Banco de Dados do *WHO Global Salm-Surv*, que reúne as

informações de mais de 200 países dos cinco continentes é a seguinte: 61% Enteritidis, 18% Typhimurium, 2% Newport, 2% Heigelberg e 2% Virchow e 15% outros sorovares (WHO, 2006).

No início dos anos 90, *S.* Typhimurium espalhou-se rapidamente em muitos países Europeus e América do Norte. O aumento da incidência deste sorovar em humanos se deve, sobretudo, aos sistemas de produção de gado, e mais tardiamente, a suinocultura (CDC, 1997). Em meados dos anos 90, *S.* Typhimurium tornou-se o principal causador de infecções humanas e ganhou importância devido ao surgimento de cepas multi-resistentes a agentes antimicrobianos (HELMS et al., 2005). Atualmente, *S.* Enteritidis é um dos sorovares de maior prevalência entre os casos humanos de salmoneloses não-tifoide relatados em todo o mundo, principalmente em países desenvolvidos (RABSCH et al., 2001; PATRICK et al., 2004; WHO, 2006).

S. Enteritidis surgiu nos EUA no final da década de 80, como importante causa de infecções humanas e o número de surtos relativos a este sorovar tem aumentado progressivamente (PATRICK et al., 2004; BUTAYE et al., 2006; CDC, 2006). Em 1976, a incidência de *S.* Enteritidis representava apenas 5% do total de isolados, aumentando para 10% em 1985 com taxa de 2,4/ 100.000 habitantes e chegando a 36% em 1996 (PATRICK et al., 2004; CDC, 2000).

Galanis et al. (2006) descreveram a distribuição global de sorovares de *Salmonella* isolados de fontes humanas e não-humanas no período de 2000 a 2002, e relataram *S enterica* sorovar Enteritidis como o mais comum entre isolados humanos (65%), seguido por *S.* Typhimurium (12%) e *S*. Newport (4%). Entre os isolados de fontes não-humanas no ano de 2002, *S*. Typhimurium foi o mais comumente reportado (17%), seguido por *S*. Heidelberg (11%) e *S*. Enteritidis (9%). Durante este período, a distribuição dos sorovares não-humanos foi mais homogênea do que a dos humanos.

Aproximadamente 40.000 a 50.000 casos de salmoneloses não-tifoidal são reportados a cada ano ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) nos Estados Unidos (EUA). Estes números refletem uma subestimativa da magnitude do problema, por que muitos pacientes não procuram o hospital devido à natureza auto-limitante da doença (RABSCH et al. 2001). Apenas nos EUA, estima-se que ocorram cerca de 1,4 milhões de novos casos por ano devido a infecções por *Salmonella* não-tifoide, resultando em 15.000 hospitalizações e 400 mortes (YAN et al., 2003; GALANIS et al., 2006; FORSHELL; WIERUP, 2006; SURESH et al., 2006; WHO, 2006).

Segundo o Relatório Anual do Sistema Nacional de Vigilância de *Salmonella* (CDC, 2006), os sorovares mais isolados nos EUA no ano de 2005 foram, respectivamente, Typhimurium, Enteritidis, Newport e Heidelberg, sendo que *Salmonella* Typhimurium vem

apresentando maior prevalência desde 1970 entre isolados humanos. No entanto, dados do Programa de Infecções Emergentes que coleta informações em dez Estados americanos revela que dos 5.957 casos sorotipados de infecções por *Salmonella* no ano de 2006, o sorovar Typhimurium foi responsável por 1.157 casos (19%) e Enteritidis por 1.109 (19%). Embora a incidência global de *Salmonella* não tenha reduzido significativamente, a comparação com a base de dados dos anos de 1996 a 1998 demonstra redução na incidência de *S*. Typhimurium e aumento de *S*. Enteritidis, evidenciando uma possível alteração no perfil epidemiológico das salmoneloses nos EUA (CDC, 2007).

Na Europa, os dados do WHO *Surveillance Programme for Control of Disease in Europe*, que inclui 50 países, revelaram que desde 1985 vem sendo observado um aumento geral na incidência de salmoneloses, alcançando o máximo entre os anos de 1990 e 1992 (SCHLUNDT, 2004).

De acordo com Galanis *et al*. (2006), *S*. Enteritidis correspodeu a 79% das cepas isoladas em países europeus no ano de 2002, seguido por *S*. Typhimurium, com *S*. Hadar, *S*. Virchow e *S*. Infantis se alternando na terceira posição. Esta tendência se manteve nos anos seguintes, onde o sorovar Enteritidis foi o sorovar mais frequentemente isolado na Europa entre os anos de 2000 e 2004 (WHO, 2006).

Na Alemanha, *S*. Enteritidis tornou-se o sorovar mais isolado no ano de 1986 e a maior incidência de infecções humanas foi reportada em 1992, com 74% de prevalência entre as cepas de *Salmonella* isoladas pelo Instituto Robert Koch. Em 1993, a determinação para refrigeração dos ovos com mais de 18 dias de prateleira resultou em uma redução na incidência de infecções por *S*. Enteritidis, porém, o sorovar continua sendo o mais frequentemente isolado no país (RABSCH et al., 2001).

Na Itália, o isolamento de *S*. Enteriditis começou a aumentar gradualmente a partir da década de 90, em paralelo com o avanço em toda a Europa (NASTASI et. al, 2000). Durante o período de 1982 a 1992, o isolamento de *S.* Enteritidis aumentou de 2,4 para 57,1% em humanos e de 0,5 para 22,8% em alimentos (FANTASIA; FILETICI, 1994).

Similarmente, o número de infecções humanas causadas por *S*. Enteritidis na Inglaterra e País de Gales aumentou expressivamente entre os anos de 1.983 a 1988, o que foi considerado por alguns pesquisadores como o início da pandemia deste sorovar (RABSCH et al., 2001). A partir do ano de 1997 foi constada uma redução gradual nos casos de salmonelose reportados ao Laboratório de Saúde Pública Inglês, entretanto, o número de isolamentos de *S*. Enteritidis continua alto. Em 2002, aproximadamente 65% do total de casos notificados corresponderam a este sorovar (PHLS, 2004).

No continente Asiático, de 2000 a 2002, Japão, Coréia e Tailândia reportaram *S.* Enteritidis como sendo o sorovar mais comumente diagnosticado em humanos. Em 2002, representou 38% dos isolados em humanos, mas apenas 7% em fontes não-humanas, sendo *S.* Anatum o sorovar mais frequente nestas fontes (GALANIS et al., 2006).

Na África em 2002, S. Enteritidis e *S.* Typhimurium foram responsáveis por aproximadamente 25% dos isolados humanos cada sorovar. Entre as fontes não humanas, *S.* Anatum e *S.* Enterititdis apresentaram as maiores proporções (GALANIS et al., 2006).

Neste contexto, na América Latina e no Caribe entre o ano 2000 e 2002, *S.* Enteritidis foi o sorovar de maior incidência entre isolados de fonte humana e não humana. Outros sorovares, como Typhi, Typhimurium, Montevideo e Paratyphi B também foram observados entre isolados humanos e Typhimurium, Senftenberg, Mbandaka e Agona, entre não humanos (GALANIS et al., 2006).

Na Colômbia, entre 1997 e 2004, o sistema de vigilância epidemiológica isolou 60 sorovares de *Salmonella* spp. Dentre os 1.531 isolados, 32% foram Typhimurium, 30% Enteritidis, 6% Typhi e 32% estavam distribuídos em outros sorovares (CDC, 2006).

No Uruguai vem sendo observado um aumento na incidência das DTA desde 1993, principalmente devido ao número crescente de casos de salmonelose. Entre 1995 e 2001 foram registrados 124 surtos de origem bacteriana, sendo *Salmonella* spp. responsável por 57% dos casos e o sorovar Enteritidis o de maior prevalência (89,4%), seguido por Typhimurium (4,3%) (PAHO, 2001).

No Brasil, o perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos é pouco conhecido, por que apenas alguns Estados dispõem de Programas de Vigilância, estatísticas e levantamento de dados sobre os surtos (AMSON et al., 2006).

No Estado de São Paulo, surtos de DTA causados por *S.* Enteritidis sofreram crescente aumento a partir de 1993 e, em 1995, este sorovar passou a ser o de maior prevalência, com 64,9% dos isolamentos de material biológico de origem humana e 40,6% de outras origens (PERESI et al., 1998). No período de 1996 e 2003, *S.* Enteritidis foi identificada em 67,4% dos isolados de fonte humana, seguido por *S.* Typhimurium (5,2%) (FERNANDES et. al, 2006).

Sob o mesmo aspecto, Nadvorny et. al (2004) relataram que desde 1993 o índice de notificação de salmonelose vem aumentando entre os surtos de DTA no Rio Grande do Sul, sendo *Salmonella* spp. o agente prevalente no ano de 2000. Os alimentos envolvidos nestes surtos tiveram origem na cadeia avícola, sendo principalmente a manipulação inadequada e o uso de matéria-prima sem inspeção os fatores determinantes predominantes.

No Paraná, dados da Secretaria da Saúde do Estado (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 estafolocócica (AMSON et. al, 2006, Secretaria do Estado do 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 pelo agente, contra 31,2% por cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* (NEGRETE, 2004). 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).

REFERÊNCIAS

ADESIYUN, A.; OYAH, N.; SEEPERSADSINGH, N.; RODRIGO, S.; LASHLEY, V.; MUSAI, L., Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from table eggs, Food Control, 2006.

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. *Rev. Ciênc. Agrotec.,* vol. 30, nº6, 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*, vol.6, nº1, p. 77-83, 2000.

AUSTIN, J.W.; SANDERS, G.; KAY. W.W.; COLLINSON, K.S., Thin aggregative fimbrae enhance *Salmonella* Enteritidis biofilm formation, *FEMS Microbiology Letters*, vol. 162, p. 295-301, 1998.

BERCHIERI Jr, A.; PAULILLO, A.C.; ROSSI Jr, O.D.; IRINO, K.; FERNANDES, S.A.; ÁVILA, F.A.; PESSÔA, G.V.A.; CALZADA, C.T. *Salmonella* em um abatedouro avícola. Ars Vet. 3(1), 81-87, 1987.

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, p. 1- 7, 2006.

CARRAMINÃNA, 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, v. 104, p. 133–139, 2004.

CDC. Outbreaks of Salmonella Serotype Enteritidis Infection Associated with Eating Raw or Undercooked Shell Eggs — United States, 1996–1998*, Morbidity and Mortality Weekly Report*, vol. 49, nº4, MMWR, 2000.

CDC. *Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2005. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2006.

CDC, Preliminary FoodNet Data in the Incidende of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food- 10 States, 2006, vol. 56, nº14, p. 336-339, MMWR 2007.

CORTEZ, A.L.L., CARVALHO, A.C.F.B., IKUNO, A.A., BURGER, K.P., VIDAL-MARTINS, A.M.C.. Identification of Salmonella spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR, Research in Veterinary Science, 2006.

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* phage type four after experimental infection of young chickens. *Vet. Microbiol.,* v.56, p.99-109, 1997.

DOYLE, M.E.; MAZZOTTA, A.S., Review of studies on the thermal resistance of *Salmonellae*, *Journal of Food Protection*, vol.63, nº6, 779-795, 2000.

ESAKI, H., MORIOKA, A., ISHIHARA, K., KOJIMA, A., SHIROKI, S., TAMURA, Y., TAKAHASHI, T. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated form cattle, swine and poultry (2001– 2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. J. Antimicrob. Chemother., v.16, p. 1–5, 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, v. 24, p. 428–432, 2004.

FANTASIA, M.; FILETICI, E., *Salmonella* Enteritidis in Italy, *Internacional Journal of Food Microbiology*, vol. 72, p. 7-13, 1994.

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, *Rev. do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.45, n.2, p.59-63, 2003.

FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R.; DIAS, A.M.G.; ALMEIDA, I.A.Z.C. & MELO, L.C.V. - *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo***,** vol.48 (4), p.179-184, 2006.

FORSHELL, L.P. & WIERUP, M., *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products, *Rev. sci. tech. Off, int. Epiz.*, vol.25 (2), p.541-554, 2006.

GALANIS, E.; WONG, D.M.A.; PATRICK, M.E.; BINSZTEIN, N.; CIESLIK, A.; CHALERMCHAIKIT,T.; AIDARA-KANE, A.; ELLIS, A.; ANGULO, F.J.; WEGENER, H.C., Web-based Surveillance and Global *Salmonella* Distribution, 2000–2002, *Emerging Infectious Diseases*, vol. 12, nº3, 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*, vol. 44, 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 Resistence in Non-Typhi Serotypes of *Salmonella* enterica, *Clinical Infectious Diseases*, vol.43, p.297-304, 2006.

HELMS, M.; ETHELBERG, S.; MOLBAK, K. DT104 Study Group, International Salmonella Typhimurium DT104 infections, 1992 – 2001. *Emerging Infection Disease*, n. 11, p. 859 – 867, 2005.

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, vol. 25, p. 358–373, 2005.

HOOPER, D.C., Emerging Mechanism of Fluoroquinolone Resistance, *Emerging Infectious Diseases*, vol.7, nº 2, 2001.

HUMPHREY, T.J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* Enteritidis: a review, *International Journal of Food Microbiology*, v.21, p.31-40, 1994.

KÄFERSTEIN, F.K.; MONTARJEMI, Y., Foodborne Disease Control: A Transnational Challenge. Disponível: http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol3no4/kaferste.htm

MATTICK, K.L.; JORGENSEN, F.; LEGAN, J.D.; LAPPIN-SCOTT, H.M.; HUMPHREY, T.J., Habituation of *Salmonella* spp. At reduced water activity and its effects on heat tolerance. Applied and Environmental Microbiology, vol.66, nº11, p.4921-4925, 2000.

McILROY, S.G.; McCRACKEN, R.M.; NEILL, S.D. et al. Control, prevention and eradication of *Salmonella* Enteritidis infection in broiler and broiler breeder flocks. *Vet. Rec.,* v.22, p.545-548, 1989.

MENG, J.; DOYLE, M.E., Emerging and evolving microbial foodborne pathogens, *Bull. Inst. Pasteur*, vol. 96, p. 151 – 164, 2005.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMIDT, V., Ocorrência de *Salmonella* spp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000, *Acta Scientiae Veterinariae*, vol. 32, p. 47-51, 2004.

NASCIMENTO, V.P.; SANTOS, L.R., *Salmonella* Enteritidis: Implicações em Saúde Pública e na Qualidade de Produtos Avícolas, 2002. Disponível em: www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod_publicacao=886

NASTASI, A; MAMMINA, C.; CANNOVA, L., Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Enteritidis, Southern Italy, 1990-1998, *Emerging Infectious Diseases*, vol. 6, nº4, 2000.

NEGRETE, I.R.A., Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da Universidade Estadual de Londrina, 2004.

NUNES, I. A., HELMUTH, R., SCHROETER, A., MEAD, G. C., SANTOS, M. A., SOLARI, C.A. Phage typing of *Salmonella Enteritidis* from diferent sources in Brazil. *Journal of Food Protection, 66*, 324–327, 2003.

NYGARD, K., DE JONG, B., GUERIN, P. J., ANDERSSON, Y., OLSSON, A., & GIESECKE, J. Emergence of new *Salmonella Enteritidis* phage types in Europe? surveillance of infections in returning travelers. *BMC Medicine, 2*, 32, 2004.

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, v.97, p. 297– 305, 2005.

PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2005. *Análisis De Los Brotes De Enfermedades Transmitidas Por Alimentos 2005***.** Acessado em: 17 de agosto de 2007. Disponível em: http://www.panalimentos.org/panalimentos/files/ANALISIS%20ETA05.doc.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Instituto de Saúde do Paraná. Acessado em: 19 de abril de 2007.Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br:2080/Ambiental.nsf/AlimentosSurtosTabelas?OpenView.

PATRICK, M.E.; ADCOCK, P.M.; GOMEZ, T.M.; ALTEKRUSE, S.F.;HOLLAND, B.H.; TAUXE, R.V.; SWERDLOW, D.L., Salmonella Enteritidis Infections, United States, 1985 –1999, *Emerging Infectious Diseases*, vol.10, nº 1, 2004, Disponível em: www.cdc.gov/eid

PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; LIMA, S.I.; MARQUES, D.F.; RODRIGUES, E.C.A.; FERNANDES, S.A.; GELLI, D.S.; IRINO, K., Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis, *Rev. de Saúde Pública*, vol. 32, nº5, p. 477- 483, 1998.

PHLS, *Salmonella* Enteritidis in humans faecal & unknown reports England and Wales, 1981-2003, reviewed on 06 May 2004. Disponível em: http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az/salmonella/data_human.htm. Acesso em 26/ 08/ 2007.

PIDDOCK, L.J.V., Fluoroquinolone resistance: *Overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance*, *BMJ*;317:1029–30, 1998. Downloaded from bmj.com on 29 June 2006.

PIDDOCK, LV.J., Fluoroquinolone resistance in Salmonella serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol. Rew*. 26, 3–16, 2002.

POPPE, C., Epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. In: SAEED, A.M.; GAST, R.K.; POTTER, M.E. *et al*. (Eds.) *Salmonella enterica* serovar Enteritidis *in humans and animals.* Ames: Iowa State University Press, p.3-18, 1999.

RABSCH, W.; TSCHÄPE, H.; BÄUMLER, A.J., Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems, *Microbes and Infection*, vol.3, p. 237-247, 2001.

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, vol.38, p. 296-299, 2007.

SALYERS, A.A.; Whitt, D.D. Bacterial Pathogenesis. Washington, D.C.: ASM Press, 1994. Cap.19, p. 229 – 243, 1994.

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. *Vet. Microbiol*., v.110, p. 239–244, 2005.

SCHLUNDT, J; TOYOFUKU, H.; JANSEN, J.; HERBST, S.A., Emerging food-borne zoonoses, *Rev. sci. tech. Off, int. Epiz.,* vol.23 (2), p.513- 533, 2004.

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 99, 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*, vol.22, p. 537 – 540, 2003.

SURESH, T.; HATHA, A.A.M., D. SREENIVASAN, SANGEETHA N., LASHMANAPERUMALSAMY, P. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella enteritidis* and other salmonellas in the eggs and egg-storing trays from retails markets of Coimbatore, South India, *Food Microbiology*, vol. 23, p. 294–299, 2006.

TAUXE. R., Emerging Foodborne Diseases: An Envolving Public Health Challenge, *Emerging Infectious Diseases (CDC)*, vol.3, nº4, 1997.

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*, vol.26, nº2, p.195-210, 2005.

TRAN, J.H. & JACOBY, G.A., Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance, *PNAS*, vol.99, nº8, p.5638-5642, 2002.

WHO GLOBAL SALM-SURV. Progress report (2000-2005): building capacity for laboratory-based foodborne disease surveillance and outbreak detection and response, 2006.

YAN, S.S.; PENDRAK, M.L.; RIDDER-ABELA, B.; PUNDERSON, J.W.; FEDORKO, D.P.; FOLEY, S.L. An overview of *Salmonella* typing Public health perspectives, *Clinical an Applies Immunology Reviews*, vol.4, p.189-204, 2003.

MUTAÇÕES NO GENE *GYRA* COMO MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE *Salmonella* spp. ÀS FLUOROQUINOLONAS

***Roberta Barreiros de Souza*[1]**

***Marciane Magnani*[1]**

***Tereza Cristina R. M. de Oliveira*[1]**

[1] Universidade Estadual de Londrina , Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos;

RESUMO

Nos últimos anos, dados epidemiológicos vêm demonstrando considerável aumento na freqüência de *Salmonella* spp. envolvida em surtos de toxinfecções alimentares, sendo atualmente considerado o principal agente etiológico em doenças veiculadas por alimentos. Adicionalmente, a emergência de cepas de *Salmonella* spp resistentes às fluoroquinolonas representa um problema de saúde publica, pois se trata do tratamento de escolha em salmoneloses graves ou sistêmicas. Diversos mecanismos podem estar envolvidos na resistência estes antimicrobianos em *Salmonella* spp., porém, o principal é ocorrência de mutações na Região Determinante de Resistência as Quinolonas (QRDR) do gene *gyr*A. Esta revisão de literatura teve como objetivo apresentar os principais mecanismos envolvidos na resistência a quinolonas.

Palavras chave: *Salmonella* spp., epidemiologia, antimicrobianos, resistência as quinolonas, mutações.

INTRODUÇÃO

As salmoneloses são reconhecidas como causa comum de doenças transmitidas por alimentos (DTA) e representam um grave problema de saúde pública (WHO, 2006). Geralmente, as infecções devido a *Salmonella* spp. resultam em gastroenterites auto-limitadas que incluem sintomas como dores abdominais, náuseas, vômito, diarréia, febre moderada e dores de cabeça. O tratamento é necessário apenas nos casos de pacientes imunodeprimidos, neonatais e idosos, ou nos pacientes com febre entérica e bacteremia (SALYERS; WHITT, 1994; GALES et al., 2002; HOPKINS et al., 2005).

Durante décadas, ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol foram as drogas mais utilizadas para o tratamento de salmoneloses graves. Porém, conforme dados da literatura, o aumento na resistência a estes agentes reduziram significativamente seu uso na clínica médica. Consequentemente, as fluoroquinolonas (FQ) passaram a ser os principais antimicrobianos empregados para o tratamento de infecções humanas e na produção animal para o tratamento e prevenção de doenças e como promotores de crescimento (BUTAYE et al., 2006; PIDDOCK, 1998). O aumento da resistência a quinolonas de 1ª geração, como o ácido nalidíxico, é preocupante, considerando que este fato pode estar relacionado à redução da suscetibilidade às fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, e ao possível surgimento de resistência a estes antimicrobianos (HOOPER, 2001).

A atividade antimicrobiana das FQ baseia-se na inibição da atividade de enzimas essenciais à replicação e transcrição do DNA bacteriano e os mecanismos de resistência bacteriana a esta classe de antimicrobianos geralmente envolvem mutações nos genes que codificam a enzima DNA-girase, alvo primário da ação destes antimicrobianos em *Salmonella*. Outros mecanismos envolvidos na resistência às fluoroquinolonas incluem hiperexpressão das bombas de efluxo e ou alteração nas porinas da membrana externa (PIDDOCK, 1998; SOTO et al., 2003; SAN-MARTÍN et al., 2005). Recentemente, foi demonstrada também a possibilidade de resistência devido à aquisição do gene *qnr*, via plasmídio, que codifica uma proteína denominada Qnr que confere proteção à ação das fluoroquinolonas (GAY et al., 2006; TRAN; JACOBY, 2002).

O uso contínuo de fluoroquinolonas na medicina humana e veterinária pode contribuir para o aumento da prevalência de microrganismos resistentes e representa um grave problema de saúde pública, devido a seleção de bactérias com resistência antimicrobiana intrínseca e a

posterior aquisição de mecanismos adicionais de resistência (GALES et al., 2002; PIDDOCK, 2002, ESAKI et al., 2004; ESCRIBANO et al., 2004; SAN MARTÍN et al., 2005).

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). Assim, a seleção de isolados resistentes devido ao uso não terapêutico de antimicrobianos na medicina veterinária tem conseqüências para a saúde publica, 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 com suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina, principalmente devido à interferência na resposta ao tratamento clínico, foi realizada uma revisão sobre a resistência as fluoroquinolonas no gênero *Salmonella* spp. com ênfase nas mutações no gene *gyr*A.

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

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 o uso na clínica médica 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).

Agentes antimicrobianos têm sido empregados na medicina veterinária para o tratamento e profilaxia de doenças, bem como na produção animal, como promotores de crescimento (OLIVEIRA et al., 2005). Entretanto, a utilização não-terapêutica de antimicrobianos em animais de produção pode favorecer a seleção de cepas resistentes que serão trasmitidas via cadeia alimentar (THRELFALL et al., 2000). Devido ao fato dos alimentos de origem animal contaminados representar a principal fonte de transmissão de *Salmonella*, 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 (ÂNGULO et al., 1999; SILVA; DUARTE, 2002).

A ocorrência de cepas resistentes pode causar falência no tratamento clínico, limitando 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, 2007).

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

A utilização 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, 2006).

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, 2001).

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-sulfametoxazol.

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, notrofurantoína e trimetoprim-sulfametoxazol. 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 sulfametoxazil-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.* Glostrup foi resistente somente a gentamicina, entretanto, duas cepas do sorovar Typhimurium foram resistentes a 11

antimicrobianos. Todas as cepas testadas foram sensíveis a amicacina, pefloxacina, imipenen 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.

AS QUINOLONAS E SEU MECANISMO DE AÇÃO

As quinolonas e fluoroquinolonas (FQ) 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 (SADER, 1999; HOPKINS et al., 2005).

O desenvolvimento das quinolonas teve início com a identificação do ácido nalidíxico por Lesher et al., em 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 2ª geração.

A estrutura química geral das quinolonas (Figura 1) contém dois anéis quinolônicos, com um átomo de nitrogênio na posição1, 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.

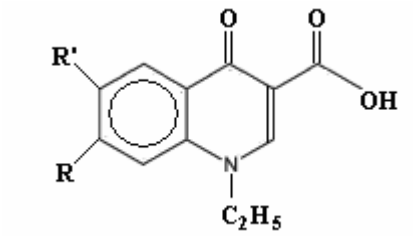

Figura 1. Fórmula Estrutural das Quinolonas
Fonte: SADER, 1999.

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 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 et al., 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).

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.

As fluoroquinolonas de segunda geração, como ciprofloxacina e ofloxacina, apresentam atividade contra a enzima DNA-girase de bactérias Gram-negativas, no entanto, sua atividade sobre as enzimas topoisomerase IV é relativamente fraca. 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, uma vez que a atuação do antimicrobiano em qualquer uma das enzimas será suficiente para inibir o desenvolvimento bacteriano (HOOPER, 1998).

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 FQ, depende essencialmente do uso criterioso dos antimicrobianos dessa classe terapêutica (SADER, 1999).

A ação antimicrobiana das fluoroquinolonas consiste fundamentalmente na inibição da replicação do DNA bacteriano. Esse processo 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. Diversas enzimas estão envolvidas na replicação do DNA bacteriano, 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 (PIDOCCK, 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 et al., 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 topoisomerases 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, 1998; 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.

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS EM *SALMONELLA*: ENFÂSE 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 conseqüência 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, 1998; HAKANEN et al., 2005; HOPKINS et al., 2005; GIRAUD, et al., 2006). Em *Salmonella* spp., tais mutações ocorrem em uma região específica do gene *gyr*A, entre os aminoácidos 67 e 106, denominada Região Determinante de Resistência à Quinolona (QRDR) (SOTO et al., 2003; SAN-MARTÍN et al., 2005; GIRAUD et al., 2006).

Uma única mutação 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$\underline{\geq}$ 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 topoisomerases IV ocorrem menos frequentemente e as mutações nos genes *gyrB* e *parE* tem sido consideradas raras em Salmonellae (GIRAUD et al., 2006; HOPKINS et al., 2005; EAVES et al., 2004).

Conforme literatura, em *Salmonella enterica* resistentes ao ácido nalidíxico a maior freqüência de alteração na QRDR ocorre nos códons correspondentes a Serina-83 (Ser83) e Aspartato-87 (Asp87). Em adição, sabe-se que alterações destes dois resíduos são freqüentemente relatadas como combinadas em cepas fluoroquinolona-resistentes (SAN-MARTÍN et al., 2005; GIRAUD et al., 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 et al., 2005; GIRAUD, et al., 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), apresentado diferentes graus de suscetibilidade à ciprofloxacina. No mesmo trabalho, os sorovares Enteritidis e Typhimurim 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*.

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.

No que se refere ao sorovar Enteritidis, Eaves et al. (2004) 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).

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 possuam a DNA-girase alterada. Mutações no gene *parC* que resultam em resistência a quinolonas em *Salmonella*, geralmente acontecem no códon Ser80 ou, menos freqüentemente, no códon Glu84, homólogos aos códons Ser83 e Asp87 da DNA-girase (HOPKINS et al., 2005; GIRAUD, et al., 2006).

Além das mutações nos genes que codificam a enzima DNA-girase, a resistência às quinolonas pode ser devido a 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, 1998; SOTO et al., 2003; SAN-MARTÍN et al., 2005).

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 importante mecanismo envolvido na resistência a estes antimicrobianos (GIRAUD et al., 2006). Bombas de efluxo são proteínas de transporte envolvidas na expulsão de substratos tóxicos de dentro das células para o ambiente externo (WEBBER, 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, que pode ser requerido para o efluxo de fluoroquinolonas em mutantes em que o sistema AcrAB não estiver funcional (OLLIVER, 2005).

Giraud et al. (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).

REDUÇÃO NA SUSCETIBILIDADE ÀS FLUOROQUINOLONAS

O primeiro relato de falência no tratamento clínico devido a infecções por *Salmonella* na Europa ocorreu em 1990 por cepas do sorovar Typhimurium (DT 204) e, desde então, a incidência de cepas de diferentes sorovares resistentes a este antimicrobiano tem sido relatada em diversos países (PIDDOCK, 2002; GIRAUD et al., 2006).

Nas últimas décadas, o número de isolados de *Salmonella* com suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina e 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 e foram, posteriormente, transmitidas a humanos via cadeia alimentar (EAVES et al., 2004; ESCRIBANO, et al., 2004).

De acordo com a Norma M100-S16 (vol.26, nº3) do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006) são consideradas resistentes à ciprofloxacina apenas as cepas que apresentam MIC $\geq$ 4µg/mL. Cientificamente, são consideradas cepas com suscetibilidade reduzida aquelas que apresentam MIC $\geq$ 0,125 µg/mL e que, em conseqüência, podem acarretar falência no 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 µg/ 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 et al., 2003).

Estudos realizados por Cebrian et al. (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.

Threlfall (2002) sugeriram que o aumento da incidência de suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina em cepas de *Salmonella* zoonóticas, como Enteritidis, Virchow e Hadar, na Inglaterra e País de Gales pode ter ocorrido em conseqüência do uso de antimicrobianos na indústria avícola. Entretanto, ao que parece, o fato envolve maior complexidade e pode estar relacionados a outros fatores como o fagotipo. Atualmente, o sorovar Enteritidis é subdividido em mais de 60 fagotipos e, segundo esse autor, cepas do fagotipo 1 (PT1), fortemente relacionadas com viagens a países estrangeiros, parecem exibir maior redução na suscetibilidade à ciprofloxacina em relação a outros fagotipos de *S*. Enteritidis não associados com viagens ao exterior, como fagotipo 4 (PT 4).

Outro aspecto importante em relação à resistência ao ácido nalidíxico refere-se ao fato de que cepas previamente resistentes requerem menor exposição à fluoroquinolonas para que sua suscetibilidade seja alterada em comparação à cepas suscetíveis ao ácido nalidíxico (HOPKINS et al. 2005). Dessa forma, alguns animais podem constituir um reservatório onde cepas resistentes ao ácido nalidíxico com mutações iniciais no gene *gyrA* persistem e, após exposição continuada à fluoroquinolonas, tornam-se resistentes (GIRAUD et al., 1999).

Assim sendo, a utilização indiscriminada não-terapêutica de agentes antimicrobianos em animais destinados à alimentação humana é, supostamente, a principal causa da emergência e distribuição de cepas de *Salmonella* resistentes (SMITH et al., 2002, HOPKINS et al., 2005; GIRAUD et al., 2006). O aumento na incidência de cepas resistentes ao ácido nalidíxico representa um problema de saúde publica por estar relacionado à redução na suscetibilidade as fluoroquinolonas, podendo levar à falência no tratamento clínico e, consequentemente, restringe as opções para o tratamento de doenças infecciosas.

DETECÇÃO DE MUTAÇÕES ASSOCIADAS A RESISTÊNCIA ÀS FLUOROQUINOLONAS ATRAVÉS DE PCR – RFLP

As alterações no gene *gyr*A 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 fluoroquinolonas (GIRAUD et al., 2006).

Inúmeros métodos têm sido utilizados para identificar alterações nos genes *gyr*A, *gyr*B e *par*C 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 (OUABDESSELAM 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, mais rápidos e com menor custo, têm sido desenvolvidos a fim de possibilitar a utilização dos mesmos em diagnósticos laboratoriais de rotina ou estudos epidemiológicos (ALONSO et al*.,* 2004).

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 et al. (2004[a]) desenvolveram o método de PCR-RFLP para a detecção de mutações pontuais nos genes *par*C, códons Ser79 e Asp83; *par*E, códon Asp435, e *gyr*A, códons Ser81 e Glu85, de *Streptococcus pneumoniae*, utilizando as enzimas de restrição *Hin*fI, *Lwe*I e *Mbo*II.

PCR-RFLP também foi utilizada por Alonso et al. (2004[b]) para desenvolver um protocolo alternativo mais rápido e reprodutível 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 *Rsa*I 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 *gyr*A responsáveis por resistência a ciprofloxacina, de amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas em hospitais na

Polônia em 2003 e empregaram a PCR-RFLP desenvolvida por Takenouchi et al. (1999). O 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 *gyr*A relacionadas a resistência à quinolonas em *Salmonella* spp. A detecção envolve a amplificação da QRDR do gene *gyr*A utilizando-se um par de *primers* que insere um sítio artificial de clivagem para a enzima *Hin*fI no produto amplificado, além de um *primer* alelo-específico. As diferentes mutações exibem perfil de bandas característico após a digestão com a *Hin*fI, que apresenta seqüências de reconhecimento ambíguas contendo 5pb iniciadas em GA e terminadas em TC. Essa metodologia foi adotada por San Martín et al. (2006) para análise da ocorrência de mutações em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de plantéis avícolas no Chile.

O emprego de técnicas de biologia molecular, como PCR-RFLP, para a detecção de mutações pode contribuir significativamente no conhecimento do perfil de suscetibilidade de cepas epidêmicas por demandar menor tempo e custo em relação aos protocolos tradicionais.

No Estado do Paraná os dados epidemiológicos indicam que a freqüência de *Salmonella* spp isolada em surtos de toxinfecções alimentares aumentou de 7,1%, em 1993, para 57,1% em 1998, sendo atualmente considerado o principal agente etiológico envolvido em doenças veiculadas por alimentos (PARANÁ, 2007). Diante desta situação, os dados apresentados nesta revisão alertam para o uso criterioso de antimicrobianos, tanto na clínica veterinária, visando a manutenção do espectro de ação e eficácia clínica das fluoroquinolonas, tendo em vista a importância desta classe terapêutica nos casos de infecções por *Salmonella* spp.

REFERÊNCIAS

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 Antimicrobial Chemother,* vol. 53, nº4, p. 682, 2004[a].

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*; vol.48; nº12, 2004[b].

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. *Rev. Ciênc. Agrotec.,* vol. 30, nº6, 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*, vol.6, nº1, p. 77-83, 2000.

BARLOW, A. M. Nalidixic acid in infections of urinary tract., *Br. Med. Journal*, 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, p. 1- 7, 2006.

CARRAMINÃNA, 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, v. 104, 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*, vol.22, p.134–139, 2003.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement*, M100-S16, vol.26, nº3, 2006.

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; vol.47, nº2, 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 Medical Chemistry*, v.29, n.3, p. 394–404, 1986.

DRLICA, K. & ZHAO, X., DNA girase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microb. Mol. Bio. Rev., v.61, 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 Qunolone-Resistant *Salmonella enterica*., *Antimicr. Agents an Chemotherapy*, vol.48, nº10, p.4012-4015, 2004.

ESAKI, H., MORIOKA, A., ISHIHARA, K., KOJIMA, A., SHIROKI, S., TAMURA, Y., TAKAHASHI, T. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated form cattle, swine and poultry (2001– 2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. J. Antimicrob. Chemother., v.16, p. 1–5, 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, v. 24, 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, *Rev. do Instituto de Medicina Tropical de 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, *Rev. sci. tech. Off, int. Epiz.*, vol.25 (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*, vol. 44, 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 Resistence in Non-Typhi Serotypes of *Salmonella* enterica, *Clinical Infectious Diseases*, vol.43, 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,* vol.43, 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*, vol. 53, p. 95-901, 2004.

GIRAUD, E.; BAUCHERON, S.; CLOECKAERT, A.; Resistance to fluoroquinolones in Salmonella: emerging mechanisms and resistance prevention strategies, Microbes and Infection, xx, 1-8, 2006.

HAKANEN, A.; LINDGREN, M.; HUOVINEN, P.; JAVALA, J.; SIITONEN, A.; KOTILAINEN, P., New Quinolone Resistence Phenomenon in Salmonella enterica: Nalidixic Acid-Susceptible Isolates with Reduced Fluoroquinolone Susceptibility, *Journal of Food Clinical Microbiology*, vol.43, nº11, p.5775-5778, 2005.

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, vol. 25, p. 358–373, 2005.

HOOPER, D.C., Emerging Mechanism of Fluoroquinolone Resistance, *Emerging Infectious Diseases*, vol.7, nº 2, 2001.

HOOPER, D.C., Mechanism of Fluoroquinolone Resistance, *Drug Resistance Updates*, vol.2, p.38-55, 1998.

LESHER et al., "1, 8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents", *Journal of Medicine Pharm. Chem*., v. 5, p. 1063 - 1065, 1962.

NEGRETE, I.R.A., Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da Universidade Estadual de Londrina, 2004.

OUABDESSELAM, S; HOOPER, D.C.; TANKOVIC, J.; SOUSSY, C.J.; Detection of *gyr*A and *gyr*B Mutatios 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 *gyr*A Mutations; *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 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 DT204 acrB mutants selected with fluoroquinolones, *Antimicrobial Agents Chemother*, vol.49, 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, v.97, p. 297– 305, 2005.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Instituto de Saúde do Paraná. Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br:2080/Ambiental.nsf/AlimentosSurtosTabelas?OpenView. Acessado em: 19 de abril de 2007.

PIDDOCK, L.J.V., Fluoroquinolone resistance: *Overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance*, *BMJ*;317:1029–30, 1998. Downloaded from bmj.com on 29 June 2006.

PIDDOCK, L.J.V., Antibacterials – Mechanisms of Action, Currente Opinion in Microbiology, vol.1, p. 5002-508, 1998.

PIDDOCK, LV.J., Fluoroquinolone resistance in Salmonella serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol. Rew*. 26, 3–16, 2002.

RELLER, M.; MCCLELLAN, J.; JOYCE, K.; POLYAK, C.; MINTZ, E.; ANGULO, F., and NARMS WORING GROUP, Emerging resistance to quinolones among *Salmonella* Typhi isolates in the United States, 1999 – 2001, *Infectious Disease Society of America,* 2002.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; FITTÉL, 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, vol.38, p. 296-299, 2007.

RODRIGUES, D.P., Reporte de la Vigilancia de la resistencia antimicrobiana de aislados de Salmonella, Shigella y Vibrio cholerae, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Barsil, 2001. Disponível em: http://www.paho.org.spanish/hcp/hct/arm-resultados-bra.pdf. Acesso em: 12/08/2007.

SADER, H., Quinolonas: Avanços e Conquistas Clinicamente Relevantes, *Jornal-Quinolonas*.pm6, 1999. Disponível em: http://www.bristol.com.br/medicos/infocientifica/0/jornalquinolonas1.pdf, acesso em 01/ 08/ 2006.

SALYERS, A.A.; Whitt, D.D. Bacterial Pathogenesis. Washington, D.C.: ASM Press, 1994. Cap.19, p. 229 – 243, 1994.

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. *Vet. Microbiol*., v.110, p. 239–244, 2005.

SILVA, E.N.; DUARTE, A., *Salmonella* Enteritidis in Poultry: Retrospective in Brazil, *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.4, n.2, p. 085 – 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 99, 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*, vol.22, 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*, vol.26, nº2, p.195-210, 2005.

TESSI, M.A.; SALSI, M.S.; Affer, M.I.; Molguilevsky, M.A., Drug resistence of Enterobacteriaceae isolated from chicken carcasses. *Journal of Food Protection*, v. 60, p. 1001-1005, 1997.

THRELFALL, E.J., Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections, *FEMS Microbiology Reviews*, nº26, 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 Bolletin: Salmonella*, vol.8,nº2, p. 41–45, 2003.

TRAN, J.H. & JACOBY, G.A., Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance, *PNAS*, vol.99, nº8, p.5638-5642, 2002.

WALKER RC. The fluoroquinolones: symposium on antimicrobial agents—part XIII, *Mayo Clinic Proceedings*, nº 74; p.1030-1037, 1999.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. *Relatório Anual 2006/2007.* Disponível em: www.uba.org.br. Acesso em: 01/05/2008.

WEBBER, M. A. & PIDDOCK, L. J. V., The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* vol. 51, p. 9–11, 2003.

WITTE, W., Medical consequences of antibiotic use in agriculture. Science v.279, p. 996– 997, 1998.

WHO GLOBAL SALM-SURV. Progress report (2000-2005): building capacity for laboratory-based foodborne disease surveillance and outbreak detection and response, 2006.

WYDMUCH, Z.; SKOWRONEK-CIOŁEK, O.; CHOLEWA, K.; MAZUREK, U.; PACHA, J.; KEPA, M.; IDZIK, D.; WOJTYCZKA, R.D.; *Gyr*A mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a Silesian Hospital in Poland*; Polish Journal of Microbiology,* vol.54, nº3, p. 201-206, 2005.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões estão apresentados nos artigos I e II que serão submetidos à publicação em revistas científicas:

Artigo I - Redução na Suscetibilidade à Ciprofloxacina em cepas de *Salmonella* isoladas de surtos ocorridos no Paraná, Brasil, entre 1999 e 2006.
Periódico: a ser submetido ao periódico Brazilian Journal of Microbiology

Artigo II - Nota de Publicação - Detecção de mutações na Região Determinante de Resistência à Quinolonas (QRDR) em cepas de *Salmonella* spp. epidêmicas e de origem avícola isoladas no Estado do Paraná, Brasil.
Periódico: a ser submetido ao periódico International Journal of Antimicrobial Agents

Redução na Suscetibilidade à Ciprofloxacina em cepas de *Salmonella* isoladas de surtos ocorridos no Paraná, Brasil, entre 1999 e 2006.

Roberta Barreiros de Souza[1], Marciane Magnani[1], Rafaela Gomes Ferrari[1], Maria Cristina Bronharo Tognim[2], Iliana del Rocio Alcocer Negrete[3], Luciana Bill Mikito Kottwitz[1], Tereza Cristina R. M. de Oliveira[1]

[1] Universidade Estadual de Londrina , Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

[2] Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas.

[3] Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Faculdad de Ciências Exactas e Naturales, Escuela de Ciências Biológicas, Quito, Ecuador.

Redução na Suscetibilidade à Ciprofloxacina em cepas de *Salmonella* isoladas de surtos ocorridos no Paraná, Brasil, entre 1999 e 2006

RESUMO

Foram avaliadas 212 cepas de *Salmonella* spp., distribuídas em 16 sorovares, isoladas de pacientes e alimentos envolvidos em surtos no Estado do Paraná, Brasil, entre 1999 e 2006. O sorovar Enteritidis foi o mais freqüente, sendo identificado em 174 das amostras, seguido por sete cepas de *S.* Infantis, seis de *S.* Typhimurium e seis de *S.* Derby. O perfil de suscetibilidade a aos antimicrobianos revelou que do total de 212 cepas analisadas, 45% apresentaram resistência ao ácido nalidíxico, 0,5% à ampicilina e 0,5% ao sulfametoxazol-trimetoprim. Todas as cepas *Salmonella* foram suscetíveis à cefotaxima, cloranfenicol e ciprofloxacina. No período estudado, houve um aumento de 15% para 62,5% na resistência ao ácido nalidíxico e foi observado uma elevação no valor do MIC_{50} para ciprofloxacina nas cepas avaliadas. A concentração inibitória mínima de ciprofloxacina (CipMIC) para as cepas resistentes ao ácido nalidíxico foi superior àquela necessária para as cepas sensíveis ao antimicrobiano. Adicionalmente, durante o período estudado, foi constatada uma tendência crescente no isolamento de cepas com suscetibilidade reduzida a ciprofloxacina (MIC$\geq$ 0,125µg/mL). Os resultados apresentados no presente estudo alertam para o uso criterioso de antimicrobianos, na clínica veterinária e humana, para a manutenção do espectro de ação e eficácia clínica.

Palavras-chave: *Salmonella,* Concentração Inibitória Mínima (MIC), quinolonas, fluoroquinolonas.

INTRODUÇÃO

As salmoneloses são reconhecidas como causa comum de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (WHO, 2006). No Estado do Paraná, Brasil, entre 1999 e 2006, 55 dos 399 municípios notificaram surtos de salmonelose e o sorovar Enteritidis foi responsável por 82% dos surtos. Gastroenterites causadas por *Salmonella*, geralmente, não requerem emprego de terapia antimicrobiana devido a sua natureza auto-limitante. Entretanto, em pacientes imunodeprimidos, idosos ou crianças, ou ainda em casos de salmoneloses graves ou sistêmicas, o uso de antimicrobianos é essencial (SAN MARTÍN et al., 2005, BUTAYE et al., 2006).

Durante décadas, ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol foram as drogas mais utilizadas para o tratamento de salmoneloses. Porém, a crescente resistência a estes agentes reduziram significativamente o uso na clínica médica e, consequentemente, as fluoroquinolonas (FQ) passaram a ser os principais antimicrobianos empregados (PIDDOCK, 1998; BUTAYE et al., 2006).

A utilização não teraupêutica de fluoroquinolonas na medicina veterinária, para a profilaxia de doenças infecciosas ou como promotores de crescimento, pode favorecer a seleção de bactérias resistentes ou com suscetibilidade reduzida a estes antimicrobianos. Devido ao fato de que a maior parte das infecções por *Salmonella* em humanos ocorre em decorrência da ingestão de alimentos de origem animal contaminados, 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 (ÂNGULO et al., 1999; HOPKINS et al., 2005; GIRAUD et al., 2006). Nesse contexto, o aumento na incidência de cepas resistentes ao ácido nalidíxico, uma quinolona de 1ª geração, representa um problema de saúde pública já que a maioria destas cepas apresenta redução da suscetibilidade às fluoroquinolonas e podem levar a falência no tratamento clínico (PIDDOCK, 2002, ESCRIBANO et al., 2004; SAN MARTÍN et al., 2005). Os mecanismos de resistência às quinolonas frequentemente descritos são mutações nos genes que codificam enzimas, hiperexpressão das bombas de efluxo e ou alterações nas porinas da membrana externa, além da possibilidade de aquisição via plasmidial de gene que confere resistência (SAN-MARTÍN et al., 2005; GAY et al., 2006).

Pelo exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana em cepas de *Salmonella* spp., isoladas de pacientes e alimentos envolvidos em surtos de salmonelose no Paraná, de 1999 a 2006, a fim de alertar para o uso criterioso de antimicrobianos, em especial das fluoroquinolonas, na clínica médica e veterinária evitando a emergência de resistência neste Estado.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Foram avaliadas 212 cepas epidêmicas de *Salmonella* spp. isoladas de pacientes ou alimentos envolvidos em surtos no Estado do Paraná (PR) ocorridos entre 1999 e 2006, cuja distribuição no período estudado está apresentada na Tabela 1. Todas as amostras bacterianas foram fornecidas pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN – Curitiba/ PR), em caldo infusão cérebro coração (BHI) com 15% de glicerol, mantidas a temperatura de -15ºC.

A sorotipagem de *Salmonella* spp. e a fagotipagem do sorovar Enteritidis foram realizados no Laboratório de Enterobactérias, Departamento de Bacteriologia, Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

Tabela 1. Distribuição das 212 cepas de *Salmonella* isoladas de pacientes ou alimentos envolvidos em surtos ocorridos no Estado do Paraná entre 1999 e 2006.

	1999	***2000***	***2001***	***2002***	***2003***	***2004***	***2005***	***2006***	***Total***
Cepas Epidêmicas*	20	18	38	30	29	34	26	17	212

*As cepas foram fornecidas pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN – Curitiba/PR) e sorotipadas e fagotipadas no Laboratório de Enterobactérias, Departamento de Bacteriologia, Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

Avaliação de suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliada através da técnica de disco-difusão, seguindo a metodologia de Kirby-Bauer (Bauer *et al*., 1966) conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006). Foram testados os agentes antimicrobianos (OXOID®): ampicilina (10µg), cefotaxima (30µg), cloranfenicol (30µg), sulfametoxazol-trimetopim (25µg), ácido nalidíxico (30µg) e ciprofloxacina (5µg). Uma suspensão bacteriana foi semeada na superfície do ágar Müller-Hinton (DIFCO®), incubada a 37ºC por 18h. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos, em mm, com auxílio de paquímetro para a classificação de acordo com as categorias interpretativas descritas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006). Posteriormente, foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) para ciprofloxacina através do método de microdiluição, utilizando caldo Müller-Hinton (DIFCO®).

As concentrações de ciprofloxacina avaliadas, entre 0,0005 e 1,0 µg/mL, foram definidas com base nos limites de sensibilidade (*breakpoints*) desta droga para a classificação de Enterobacteriaceae na categoria *Sensível* (MIC≤ 1,0 µg/mL) conforme o CLSI (2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 212 cepas de *Salmonella* estudadas, 16 diferentes sorovares foram identificados. O sorovar Enteritidis foi o mais freqüente, somando 174 amostras (82%), seguido por sete cepas de *S.* Infantis (3,3%), seis de *S.* Typhimurium (2,9%) e seis de *S.* Derby (2,9%). Os outros sorovares isolados em menor proporção foram: Anatum, Newport, London, Johannesburg, Pomona, Mbandaka, Oranienburg, Agona, Saintpaul, Heidelberg, O9:12 e Albany.

A elevada incidência de *S.* Enteritidis em toxinfecções alimentares constatada neste trabalho foi relatada anteriormente, e parece ser uma tendência mundial nos últimos anos (RIBEIRO et al., 2007; FERNANDES et al., 2006; WHO, 2006; RODRIGUEZ-AVIAL et al., 2005). De acordo com o banco de dados do Programa Global de Vigilância à *Salmonella* da Organização Mundial da Saúde (WHO), que reúne informações dos cinco continentes, os sorovares mais frequentemente isolados em fontes humanas entre os anos de 2000 e 2004 foram Enteritidis, Typhimurium, Newport, Heidelberg e Virchow, respectivamente (WHO, 2006).

No Brasil, Peresi et al. (1998) observaram um aumento na incidência do sorovar Enteritidis relacionado a surtos de DTA no Estado de São Paulo a partir do início da década de 90, sendo o mais isolado em 1995, presente em 64,9% do material de origem humana analisado. Quanto à freqüência dos sorovares de *Salmonella* isolados de fontes humanas entre 1996 e 2003 em São Paulo, Fernandes et al. (2006) constataram distribuição semelhante àquela apresentada no presente trabalho, sendo que o sorovar Enteritidis foi identificado em 67,4% dos casos e Typhimurium em 5,2%.

A análise do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos revelou que todas as cepas *Salmonella* testadas foram suscetíveis à cefotaxima, cloranfenicol e ciprofloxacina. Resultado semelhante foi observado em estudos anteriores (RIBEIRO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2005), assim como a ausência de resistência múltipla. Os resultados revelaram 95 cepas (45%) das 212 cepas analisadas foram resistentes ao ácido nalidíxico, uma (0,5%) à ampicilina (0,5%) e uma ao sulfametoxazol-trimetoprim (0,5%). No período de 1999 a 2006, foi observado um aumento de 15% para 62,5% na resistência ao ácido nalidíxico (Figura 1).

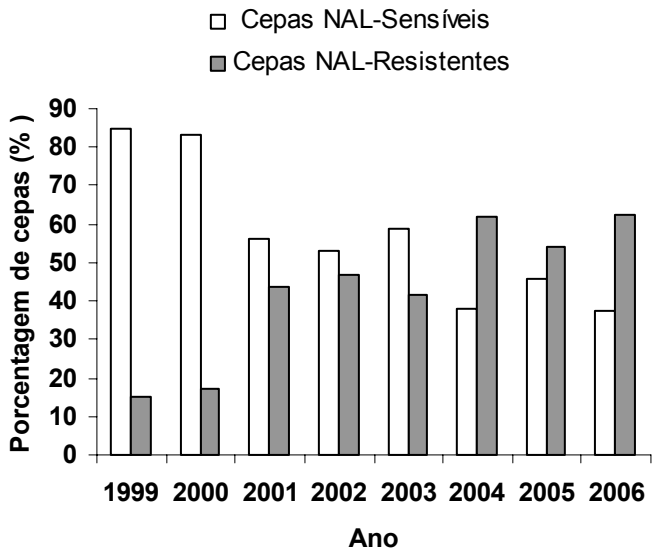

Figura 1. Perfil de suscetibilidade ao ácido nalidíxico (NAL) das cepas envolvidas em surtos de salmonelose ocorridos no Paraná entre 1999 e 2006.

Dentre os surtos de salmonelose relatados ao LACEN durante o período estudado, a região metropolitana apresentou o maior índice de notificação do Estado, destacando-se a capital Curitiba. Observou-se que a tendência de aumento no isolamento de cepas resistentes ao ácido nalidíxico no período estudado sofreu uma variação em 2003. Este fato pode ser justificado pela redução na notificação de surtos na região metropolitana nesse ano, que diminuiu de 39% para 22% do total de surtos notificados no Estado. As regiões Oeste e Sudoeste também contribuíram significativamente com a notificação, representando 17% e 13% dos casos, respectivamente.

O baixo índice de resistência observado para ampicilina pode estar relacionado à redução significativa do emprego deste antimicrobiano no tratamento da salmonelose nas últimas décadas (ROTIMI et al., 2007). Segundo Paz et al. (2000) o índice de resistência de *Salmonella* spp. à ampicilina no Brasil (7%) é significativamente menor do que aquele encontrado em outros países da América do Sul, como Argentina (60,3%) e Colômbia (20%). Estudos de Oliveira et al. (2005) na região Sul do Brasil, envolvendo cepas de *Salmonella* isoladas de fontes humanas e não-humanas também revelaram baixo índice de resistência, observada somente em 1,1% das amostras.

Dentre as 174 cepas de *S.* Enteritidis analisadas no presente estudo, 84 (48,3%) foram resistentes ao ácido nalidíxico. Este resultado foi muito superior ao obtido por Fernandes et al.

(2003), que encontraram 9,0% de resistência ao ácido nalidíxico ao avaliarem cepas de *S.* Enteritidis enviadas a Universidade de São Paulo entre 1975 e 1995. Porcentagem também inferior à observada no presente trabalho foi encontrada por Rodrigues (2001) que ao analisar 1005 amostras de *S.* Enteritidis remetidas à Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, observou 13,3% de cepas resistentes ao ácido nalidíxico. Em contrapartida, Ribeiro et al. (2007) em estudo realizado no Rio Grande do Sul verificaram 66,6% das cepas de *S.* Enteretidis isoladas de carcaças de frango eram resistentes ao ácido nalidíxico. A variação encontrada no índice de resistência ao ácido nalidíxico para cepas de *Salmonella* spp. pode estar relacionada ao período em que foram isoladas, já que a emergência de resistência às quinolonas em *Salmonella* vem sendo relatada apenas à partir do início da década de 90. Além disso, outro fator que deve ser considerado é que a região de procedência das cepas estudadas também pode interferir no índice de resistência ao antimicrobiano.

O aumento na incidência de cepas resistentes ao ácido nalidíxico, uma quinolona de 1ª geração, é considerado um indicador de decréscimo na suscetibilidade a ciprofloxacina, amplamente utilizada no tratamento de infecções por *Salmonella* (HAKENEN et al., 1999; HOOPER, 2001; MURRAY et al., 2005).

De acordo com os critérios do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006), cepas com concentração inibitória mínima (MIC) $\leq$ 1,0 µg/ mL são classificadas como sensíveis à ciprofloxacina, enquanto as que exibem MIC $\geq$ 4µg/ mL são consideradas resistentes. Estudos científicos consideram que cepas com MIC $\geq$ 0,125 µg/ mL apresentam suscetibilidade reduzida a este antimicrobiano e, consequentemente, podem mediar resposta negativa ao tratamento clínico (PIDDOCK, 2002; RELLER et al., 2002).

Embora no presente estudo, a resistência à fluoroquinolonas não tenha sido observada entre as cepas de *Salmonella* analisadas, foi constatado um aumento significativo na concentração inibitória mínima de ciprofloxacina (CipMIC) para as cepas resistentes ao ácido nalidíxico, confirmando os dados da literatura. Na Figura 2 está apresentada a distribuição do MIC para ciprofloxacina das cepas de *Salmonella* relacionada à suscetibilidade ao ácido nalidíxico. Todas as cepas resistentes ao ácido nalidíxico apresentaram CipMIC superior ao das cepas sensíveis. A maior parte das cepas resistentes ao ácido nalidíxico apresentou CipMIC oito vezes maior que das cepas sensíveis ao antimicrobiano, reforçando a relação entre resistência ao ácido nalidíxico e redução na suscetibilidade a fluoroquinolonas.

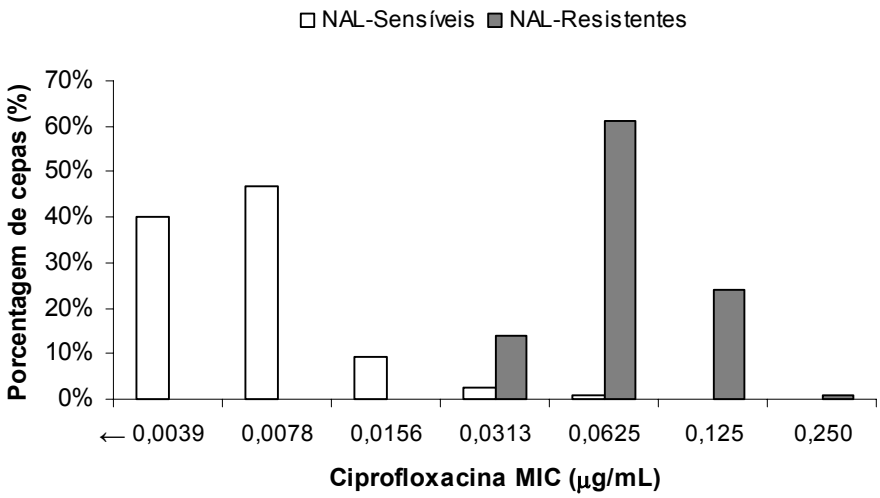

Figura 2. Distribuição do MIC para ciprofloxacina de acordo com a suscetibilidade ao ácido nalidíxico (NAL) das cepas envolvidas em surtos de salmonelose no Estado do Paraná entre 1999 e 2006.

Do total de 94 cepas de diferentes sorovares resistentes ao ácido nalidíxico, 24 (25%) apresentaram suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina, com MICs entre 0,125 µg/mL e 0,250 µg/mL. No período estudado, que compreendeu de 1999 a 2006, foi observado a partir de 2001 um aumento no número de cepas com suscetibilidade reduzida a ciprofloxacina. Esta característica não foi identificada em nenhuma cepa isolada entre 1999 e 2000.

Adicionalmente, foi observado um aumento contínuo no valor do MIC_{50} das cepas de *Salmonella* spp. no período estudado (Figura 3). Os valores de MIC_{50} são indicadores importantes da atividade *in vitro* do antimicrobiano, portanto, embora não necessariamente predigam a atividade *in vivo*, o seu aumento durante o período estudado indica uma possível redução na potência do fármaco, provavelmente relacionada ao aumento de cepas resistentes ao ácido nalidíxico e com suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina.

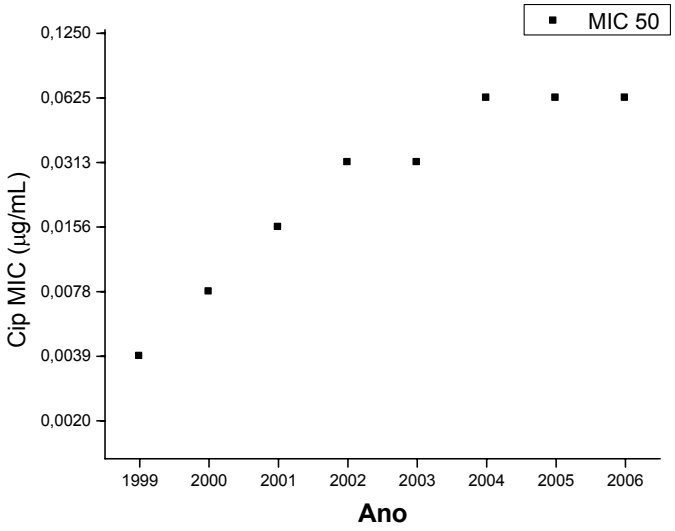

Figura 3. Distribuição do MIC 50 para ciprofloxacina das cepas envolvidas em surtos de salmonelose no Estado do Paraná entre 1999 e 2006.

Cepas com MIC elevado para ciprofloxacina têm sido associadas à mutações de ponto na região determinante de resistência a quinolonas (QRDR) da enzima DNA-girase, que é alvo primário de ação das fluoroquinolonas (PIDDOCK, 2002; GIRAUD et al., 2006). Em *Salmonella* spp., mutações de ponto na região QRDR do gene *gyrA* que codifica a DNA-girase podem ser suficientes para gerar altos níveis de resistência a quinolonas não-fluoradas, como o ácido nalidíxico. No entanto, aparentemente são necessárias mutações adicionais para atingir resistência a fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina (EAVES et al., 2004; HOPKINS et al., 2005). Sabe-se ainda, que a redução do acúmulo do antimicrobiano no interior da célula devido a hiperexpressão no sistema de bombas de efluxo contribui em *Salmonella* spp. para o aumento do MIC de quinolonas, porém é insuficiente para gerar elevados níveis de resistência a fluoroquinolonas (SOTO et al., 2003; BIEDENBACH et al., 2006).

Soto et al. (2003) cultivaram *in vitro* mutantes de *S.* Enteritidis resistentes ao ácido nalidíxico, em crescentes concentrações de ciprofloxacina para investigar os mecanismos envolvidos na aquisição de resistência. Os pesquisadores verificaram elevação de 0,5 para 1,5 µg/mL no CipMIC das cepas, relacionada a hiperexpressão no sistema de efluxo. Diversas pesquisas relatam que a administração de fluoroquinolonas em casos de infecções devido a cepas de *Salmonella* com MIC elevado, embora classificadas como suscetíveis pelos critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute*, pode gerar falência no tratamento clínico (CLSI, 2006; GIRAUD et al., 2006; HOPKINS et al., 2005). Nas últimas décadas, o número de isolados

de *Salmonella* com suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina e outras fluoroquinolonas vem aumentando significativamente, e representa um problema de saúde publica por interferir na resposta ao tratamento clínico, restringindo, consequentemente, as opções terapêuticas para doenças infecciosas (ÂNGULO et al., 1999; GIRAUD et al., 2006). De acordo com a literatura, a maior parte das cepas com esta característica surgiu inicialmente em animais expostos a fluoroquinolonas e foram transmitidas a humanos, via cadeia alimentar (EAVES et al., 2004; ESCRIBANO, et al., 2004).

A ocorrência de altos níveis de resistência a fluoroquinolonas ainda é relativamente incomum em *Salmonella* spp. se comparada a outros gêneros da família Enterobacteriaceae. Esta situação tem sido sugerida na literatura como conseqüência de suposto mecanismo de resistência a fluoroquinolonas diferenciado em *Salmonella*, que limita a emergência de cepas resistentes (HOPKINS et al., 2005; GIRAUD, et al., 2006). No entanto, deve-se considerar também que as variações nos níveis de resistência a fluoroquinolonas em *Salmonella* spp. podem estar relacionadas a fatores como sorovar e fagotipo.

O sorovar Enteritidis, responsável por 82% dos surtos investigados na presente pesquisa, é subdividido em mais de 60 fagotipos. O fagotipo 4 (PT4) foi frequentemente isolado entre os anos de 1999 e 2002, sendo identificado em aproximadamente 90% das cepas de origem humana e não humana. A partir de 2003, houve um aumento no isolamento do fagotipo 9 (PT9) e redução do PT4, supostamente devido à vacinação das aves para *Salmonella* nesse período. Os fagotipos 1 (PT1) e 7 (PT7) também foram isoladas neste período, porém, em menor freqüência do que o fagotipo 9. O aumento na resistência à quinolonas nos isolados de *S.* Enteritidis de diferentes fagotipos sugere que este fato não deve está relacionado à expansão clonal de uma única cepa resistente ao ácido nalidíxico.

Segundo Threlfall (2002), cepas de *Salmonella* Enteritidis do PT1 isoladas na Inglaterra e País de Gales, fortemente associadas com viagens ao exterior, parecem exibir maior redução na suscetibilidade à ciprofloxacina em relação a outros fagotipos não associados a viagens ao exterior, como PT4. Em pesquisa com cepas de *Salmonella* isoladas de pacientes, animais e do ambiente entre 1993 e 2003 na Escócia, Murray et al. (2005) verificaram que o sorovar Enteritidis, identificado em 72% dos isolados, apresentou aumento na resistência ao ácido nalidíxico no período estudado relacionado ao aumento na incidência do PT1. Os resultados mostraram que em 1998, 52,5% dos isolados do PT1 e 0,7% do PT4 foram resistentes ao ácido nalidíxico, chegando a 72,9% e 12,4% em 2003.

A relação entre o sorovar e os níveis de resistência consiste em outro ponto importante referente à resistência antimicrobiana em *Salmonella*. Dados da literatura indicam menor índice

de resistência às fluoroquinolonas em *Salmonella* Enteritidis se comparado a outros sorovares. Este fato provavelmente está relacionado à ausência de cepas de *Salmonella* resistentes a ciprofloxacina no presente estudo, já que o sorovar Enteritidis foi o mais frequentemente isolado. Threlfall et al. (2003) observaram diferenças entre a freqüência da resistência ao ácido nalidíxico associada à redução na suscetibilidade a fluoroquinolonas nos sorovares Hadar, Virchow, Blockley e Enteritidis, sugerindo que alguns sorovares adquirem resistência à fluoroquinolonas mais facilmente que outros. Neste contexto, pesquisas de Cebrian et al. (2003) investigaram, na Espanha, cepas de *Salmonella* isoladas de fontes humanas e observaram que os sorovares Hadar e Typhimurium apresentaram uma maior redução de suscetibilidade a fluoroquinolonas, em relação a cepas de *Salmonella* Enteritidis, após exposição a concentrações sub-inibitórias desses antimicrobianos.

Outro aspecto importante que deve ser comentado sobre a resistência ao ácido nalidíxico, refere-se ao fato de que cepas previamente resistentes requerem menor exposição à fluoroquinolonas para que sua suscetibilidade seja alterada, em comparação às cepas originalmente suscetíveis ao ácido nalidíxico (CEBRIAN et al., 2003; HOPKINS et al. 2005). Portanto, alguns animais podem constituir-se em um reservatório onde cepas resistentes ao ácido nalidíxico persistem e, após exposição continuada às fluoroquinolonas, tornam-se resistentes (GIRAUD et al., 1999). Adicionalmente, o uso de fluoroquinolonas na medicina veterinária para a profilaxia de doenças infecciosas ou como promotores de crescimento, pode favorecer a seleção de bactérias resistentes ou com suscetibilidade reduzida a estes antimicrobianos. Assim sendo, a utilização não-terapêutica indiscriminada de agentes antimicrobianos em animais destinados à alimentação humana é, supostamente, a principal causa da emergência e distribuição de cepas de *Salmonella* resistentes já que a maior parte das infecções por *Salmonella* em humanos ocorre em decorrência da ingestão de alimentos de origem animal contaminados (WINOKUR et al., 2000; SMITH et al., 2002, HOPKINS et al., 2005; GIRAUD et al., 2006).

No Estado do Paraná, os dados epidemiológicos indicam que a freqüência de *Salmonella* spp. isolada em surtos de toxinfecções alimentares aumentou de 7,1%, em 1993, para 57,1% em 1998, sendo atualmente considerada o principal agente etiológico envolvido em doenças veiculadas por alimentos (PARANÁ, 2007). Embora os valores de concentração inibitória mínima não necessariamente predizem a eficácia *in vivo*, são importantes indicadores da atividade in vitro ou potência dos antimicrobianos. Diante desta situação, os resultados apresentados no presente estudo alertam para o uso criterioso de antimicrobianos, visando a

manutenção do espectro de ação e eficácia clínica das fluoroquinolonas, tendo em vista a importância desta classe terapêutica nos casos de infecções por *Salmonella* spp.

AGRADECIMENTOS

Os autores deste trabalho agradecem,

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

- Ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN – Curitiba/ PR), Laboratório de Bacteriologia e de Bromatologia pela doação das cepas isoladas em surtos;

- À Dália dos Prazeres Rodrigues, Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - Rio de Janeiro/ RJ), pela sorotipagem das cepas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADESIYUN, A.; OYAH, N.; SEEPERSADSINGH, N.; RODRIGO, S.; LASHLEY, V.; MUSAI, L. (2006). Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from table eggs. *Food Control*, xx, xx.

2. ANGULO, F.; JOHNSON, K.; TAUXE, R.; COHEN, M. (2000). Significance and sources of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Microbial Drug Resistance*, 6 (1), 77-83.

3. BIEDENBACH, D.J.; TOLEMAN, M.; WALSH, T.R.; JONES, R.N. (2006). Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporin and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997 – 2004). *Diagnostic Microbiolgy and Infectious Disease*, 54,13-21.

4. BUTAYE P.; MICHAEL, G.B.; SCHWARZ, S.; BARRETT, T.J.; BRISABOIS, A.; WHITE, D.G. (2006). The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. *Microbes and Infection*, xx, 1- 7.

5. BAUER, A.W.; KIRBY, M.M.; SHERRIN, J.D. (1966). Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Pathology*, 45, 493-496, 1966.

6. CAMARGO, N.J.; SOUZA, I.L., PUZYNA, I.P.; PESTANA, A. (1999). Surtos de doenças transmitidas por alimentos em 1998. Curitiba: Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, Centro de Saneamento e Vigilância Sanitária.

7. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI, formerly NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2006). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* - Sixteenth International Supplement. CLSI document M100-S16., Wayne, Pennsylvania, USA.

8. CEBRIAN, L.; SIRVENT. E.R.; DÍAZ, J.C. (2003). Characterisation of *Salmonella* spp. mutants produced by exposure to various fluoroquinolones. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 22, 134–139.

9. EAVES, D.J.; RANDALL, L.; GRAY, D.T.; BUCKLEY, A.; WOODWARD, M.J.; WHITE, A.P.; PIDDOCK, L.J.V. (2004). Prevalence of Mutations within the Quinolone Resistance-Determining Region of *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* and Association with Antibiotic Resistance in Qunolone-Resistant *Salmonella enterica*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 (10), 4012-4015.

10. ESAKI, H., MORIOKA, A., ISHIHARA, K., KOJIMA, A., SHIROKI, S., TAMURA, Y., TAKAHASHI, T. (2004). Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated form cattle, swine and poultry (2001– 2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *J. Antimicrob. Chemother*. 16, 1–5.

11. ESCRIBANO, I.; RODRÍGUEZ, J. C.; CEBRIAN, L.; ROYO, G. (2004). The importance of active efflux systems in the quinolone resistance of clinical isolates of *Salmonella* spp.. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 24, 428–432.

12. FANTASIA, M.; FILETICI, E. (1994). *Salmonella* Enteritidis in Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, 72, 7-13.

13. FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R.; DIAS, A.M.G.; ALMEIDA, I.A.Z.C. & MELO, L.C.V. (2006). *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo***,** 48 (4), 179-184.

14. GALES, A.C.; SADER, H.S.; MENDES, R.E.; RONALD, N.J. (2002). *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*, 44, 313-318.

15. GAY, K.; ROBICSEK, A.; STRAHILLEVITZ, J., PARK, C.H; JACOBY, G.; BARRETT, T.J.; MEDALLA, F.; CHILLER, T.M.; HOOPER, D.C. (2006). Plasmid-Mediated Quinolone Resistence in Non-Typhi Serotypes of *Salmonella* enterica. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 297-304.

16. GIRAUD, E.; BRISABOIS, A.; MARTEL, J.L.; CHASLUS-DANCLA, E. (1999). 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. *Antimicrob. Agents Chemother.,* 43, 2131-2137.

17. GIRAUD, E.; BAUCHERON, S.; CLOECKAERT, A. (2006). Resistance to fluoroquinolones in Salmonella: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes and Infection*, xx, 1-8.

18. HAKANEN, A.; KOTILAINEN, P.; HUOVINEN, P. (2001). Reduced fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serotypes in travelers returning from Southeast Asia. *Emerging Infect. Dis.*, 7, 996–1003.

19. HOPKINS, K.L.; DAVIES, R.H.; THRELFALL, E.J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 25, 358–373.

20. HOOPER, D.C.(2001). Emerging Mechanism of Fluoroquinolone Resistance. *Emerging Infect. Dis.*, 7 (2).

21. MURRAY, A.; COIA, J.E.; MATHER, H.; BROWN, D.J. (2005). Ciprofloxacin resistance in non-typhoidal *Salmonella* serotypes in Scotland, 1993 – 2003. *J.Antimicrob. Chemother.*, 56, 110-114.

22. NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMIDT, V. (2004). Ocorrência de *Salmonella* spp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32, 47-51.

23. NEGRETE, I.R.A. (2004). Sorotipagem, fagotipagem, caracterização molecular de cepas de *Salmonella* spp. e avaliação epidemiológica de surtos ocorridos no Paraná de 1999 a 2004. Londrina, 216p. (Dr. Thesis. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. UEL).

24. OLIVEIRA, S.D.; FLORES, F. S.; SANTOS, L.R.; BRANDELLI, A. (2005). Antimicrobial resistance in Salmonella enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *Int. J. Food Microbiol.*, 97, 297– 305.

25. PAZ, O.C.; NUNES, R.; MENDES, C. (2000). The RESISTNET Group. Multicenter Evaluation of Resistance Patterns of *Klebsiella pneuminiae, Escherichia coli, Samonella* spp. and *Shigella* spp. isolated from Clinical Specimens in Brazil: RESISTNET Surveillance Program. *J. Infect. Dis.*, 5 (1), 8-11.

26. PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; LIMA, S.I.; MARQUES, D.F.; RODRIGUES, E.C.A.; FERNANDES, S.A.; GELLI, D.S.; IRINO, K. (1998). Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis, *Rev. Saúde Pública*, 32 (5), 477- 483.

27. PIDDOCK, L.J.V. (1998). Fluoroquinolone resistance: Overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance. *BMJ*, 317, 1029–1030.

28. PIDDOCK, LV.J. (2002). Fluoroquinolone resistance in Salmonella serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol. Rew*. 26, 3–16.

29. RELLER, M.; MCCLELLAN, J.; JOYCE, K.; POLYAK, C.; MINTZ, E.; ANGULO, F., and NARMS WORING GROUP. (2002). Emerging resistance to quinolones among *Salmonella* Typhi isolates in the United States, 1999 – 2001. *Infectious Disease Society of America,*XXX.

30. RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; FITTÉL, A. P.; NASCIMENTO, V. P. (2006). Resistência antimicrobiana em *salmonella enterica* subsp. *Enterica* sorovar hadar isoladas de carcaças de frango. *Arquivos do Instituto Biológico***,** São Paulo, 73 (3), 357 - 360.

31. RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; BESSA, M.C.; NASCIMENTO, V.P. (2007). *Salmonella* spp. in Raw Broiler Parts: Occurrence, Antimicrobial Resistance Profile and Phage Typing of The *Salmonella* Enteritidis Isolates. *Braz. J. Microbiol*., 38, 296-299.

32. RODRIGUES, D.P. (2001). Reporte de la Vigilancia de la resistencia antimicrobiana de aislados de Salmonella, Shigella y Vibrio cholerae, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Barsil. Disponível em: http://www.paho.org.spanish/hcp/hct/arm-resultados-bra.pdf. Acesso em: 12/08/2007.

33. RODRIGUEZ-AVIAL, I.; RODRIGUEZ-AVIAL, C.; LÓPEZ,O.; PICAZO, J.J. (2005). Trends in acid nalidixic resistance in nontyphoidal *Salmonella* isolated from 1999 to 2002: decreased susceptibility to 6 fluoroquinolones. *Diagnostic Microbiology and Infetious Disease*, 52, 261 – 264, 2005.

34. ROTIMI, V.O.; JAMAL, W.; PAL, T.; SONNEVEND, A.; DIMITROV, T.S.; ALBERT, M.J. (2007). Emergence of multidrug-resistant *Salmonella* spp. and isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Kuwait and the United Arab Emirates, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, xx, 1-7, 2007.

35. SAN MARTÍN, B.; LAPIERRE, L.; TORO, C.; BRAVO, V.; CORNEJO, J.; HORMAZABAL, J. C.; BORIE C. (2005). Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. from poultry farms. *Vet. Microbiol*., 110, 239–244.

36. Secretaria da Saúde do Estado do Paraná, Disponível em http://www.saude.pr.gov.br/, Acesso em: 30/ 08/ 2007.

37. SMITH, D.L., HARRIS, A.D., JOHNSON, J.A., SILBERGELD, E.K., MORRIS JR., 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, 6434– 6439.

38. SOTO, S.M.; RUÍZ, J.; MENDOZA, M.C.; VILA, J. (2003). In vitro fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: analysis of mechanisms involved in resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 22, 537 – 540.

39. TRAN, J.H. & JACOBY, G.A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *PNAS*, 99 (8), 5638-5642.

40. THRELFALL, E.J. (2002). Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, 141-148.

41. THRELFALL, E.J.; FISHER, I.S.T.; BERGHOLD; C. (2003). 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 Bolletin: Salmonella*, 82 (2), 41–45.

42. WINOKUR, P.L.; GRUEGGEMENN, A.; DESALVO, D.L.; HOFFMANN,L.; APLEY, M.D.; UHLENHOPP, E.K.; PEAFLLER, M.A.; DOER, G.V. (2000). Animal and human multidrug resistance, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolated expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC β-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother,* 44: 2777 – 2783.

43. WHO GLOBAL SALM-SURV. (2006). Progress report (2000-2005): building capacity for laboratory-based foodborne disease surveillance and outbreak detection and response.

Detecção de mutações na Região Determinante de Resistência à Quinolonas (QRDR) em cepas de *Salmonella* spp. epidêmicas e de origem avícola isoladas no Estado do Paraná, Brasil.

Roberta Barreiros de Souza[1], Marciane Magnani[1], Rafaela Gomes Ferrari[1], Tereza Cristina R. M. de Oliveira[1]

[1] Universidade Estadual de Londrina , Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos;

Detecção de mutações na Região Determinante de Resistência à Quinolonas (QRDR) em cepas de *Salmonella* spp. epidêmicas e de origem avícola isoladas no Estado do Paraná, Brasil.

RESUMO

A ocorrência de mutações na Região Determinante de Resistência as Quinolonas (QRDR) do gene *gyr*A foi avaliada através da técnica de AS-PCR-RFLP em 95 cepas de *Salmonella* spp. resistentes ao ácido nalidíxico responsáveis por surtos e em 19 cepas de origem avícola. As cepas de origem avícola foram caracterizadas quanto à resistência ao ácido nalidíxico e concentração inibitória mínima para ciprofloxacina (CipMIC). Mutações nos códons Asp87 e Ser83 foram observadas em 63% e 37% das cepas envolvidas em surtos, respectivamente. Não foram identificadas duplas mutações no gene *gyr*A. A posição da mutação de ponto foi associada à variação dos níveis de resistência à ciprofloxacina, sendo observado para cepas com mutação no códon 83, maior decréscimo na suscetibilidade em relação àquelas com mutação no códon 87. Na avaliação do perfil de resistência das cepas de origem avícola, 68,4% foram resistentes ao ácido nalidíxico. Dentre estas, em 84,6% foram identificadas mutações pontuais nos códons Asp87 (54,5%) ou Ser83 (45,5%) do gene *gyr*A**.** Em duas cepas de *Salmonella* fenotipicamente resistentes ao ácido nalidíxico e com suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina, não foram identificadas quaisquer mutações no gene *gyr*A, sugerindo a presença de outros mecanismos de resistência. Não foi observada mutação no códon Gly81 em nenhuma das cepas avaliadas. A elevada incidência de cepas de *Salmonella* com mutações no gene *gyr*A alerta para o uso criterioso de fluoroquinolonas na clínica veterinária e humana, evitando a emergência de cepas resistentes.

INTRODUÇÃO

A emergência de cepas de *Salmonella* resistentes às fluoroquinolonas tornou-se uma preocupação para a saúde publica, por serem usualmente utilizadas no tratamento de salmoneloses humanas graves ou sistêmicas (Aznar et al., 2007). O principal mecanismo de resistência às quinolonas são mutações no gene *gyr*A, que codifica a enzima DNA-girase, alvo primário de ação desses antimicrobianos (PIDDOCK, 2002; GIRAUD et al., 2006). Outros mecanismos de resistência como hiperexpressão das bombas de efluxo e alterações nas porinas da membrana externa também têm sido relatados, além da possível aquisição de gene que confere resistência via plasmidial (GIRAUD et al., 1999; HOPKINS et al., 2005; GAY et al., 2006).

A ocorrência de elevados níveis de resistência à fluoroquinolonas ainda é relativamente incomum em *Salmonella* spp. se comparada a outros gêneros da família Enterobacteriaceae (GIRAUD et al., 2006). Entretanto, pesquisas recentes revelaram um aumento significativo da incidência de cepas resistentes ao ácido nalidíxico e que apresentam também um decréscimo na suscetibilidade a fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina. A emergência de cepas que apresentam suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina (MIC$\geq$ 0,125µg/mL) representa um problema de saúde pública devido a possibilidade de falência no tratamento clínico com este antimicrobiano (CEBRIAN et al., 2003; ESCRIBANO et al., 2004; SAN MARTÍN et al., 2005; ROTIMI et al., 2007).

Pontos de mutação na região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) do gene *gyrA*, compreendida entre os aminoácidos 67 e 106, podem ser suficientes para gerar altos níveis de resistência de *Salmonella* spp. às quinolonas não-fluoradas, como o ácido nalidíxico. No entanto, aparentemente são necessárias mutações adicionais para que ocorra resistência às fluoroquinolonas (EAVES et al., 2004; HOPKINS et al., 2005). Assim sendo, a detecção dessas mutações é importante para a compreensão dos mecanismos de resistência às fluoroquinolonas. Uma opção que pode ser utilizada é a metodologia descrita por Giraud et al. (1999) que associa técnicas moleculares de Reação em Cadeia da Polimerase e Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição, denominada AS-PCR-RFLP. Esse métodos permite detectar as mutações mais freqüentes na região QRDR relacionadas a resistência a fluoroquinolonas que ocorrem nos códons 81, 83 e 87 do gene *gyr*A em *Salmonella* spp.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de mutações na Região Determinante de Resistência às Quinolonas (QRDR) associadas à resistência ao ácido nalidíxico e a ciprofloxacina em cepas de *Salmonella* spp. epidêmicas e de origem avícola isoladas entre 1999 a 2006 no Estado do Paraná, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Um total de 95 cepas de *Salmonella* spp. resistentes ao ácido nalidíxico, isoladas de pacientes ou alimentos envolvidos em surtos de salmonelose no Estado do Paraná (PR), entre 1999 e 2006, foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN, Curitiba, PR). Além destas, 19 cepas de *Salmonella* de origem avícola também foram analisadas. A suscetibilidade ao ácido nalidíxico foi avaliada através da metodologia de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966) conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006). A determinação da concentração inibitória mínima para ciprofloxacina (CipMIC) foi conduzida por microdiluição em caldo Müller-Hinton (DIFCO®) (CLSI, 2006). A sorotipagem de *Salmonella* spp. foi realizada no Laboratório de Enterobactérias, Departamento de Bacteriologia, Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

Avaliação da ocorrência de mutações no gene *gyr* A através de AS-PCR-RFLP

As cepas foram incubadas em caldo BHI (Acumedia®) durante 18h, a 37ºC, para posterior extração do DNA genômico por fervura, conforme proposto por Swanenburg et al. (1998). Reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 1 µL de cada *primer* STGYRA1 (25ρmol), STGYRA-*Hin*fI/87 (50 ρmol) e AS-81 (25ρmol), 2 µL de dNTPs, 3,75 µL de $MgCl_2$ (10mM), 2,5 µL de tampão da enzima (10x), 8,65 µL de água bidestilada estéril, 0,5U de Taq-polimerase (Invitrogen®) e 5 µL da solução contendo o DNA. As reações foram conduzidas em termociclador, com desnaturação inicial de 3 min a 94ºC seguida de 35 ciclos de 1 min a 94ºC, 1 min a 57ºC e 1 min a 72ºC, e com extensão final de 10 min a 72ºC. Os *primers* (Invitrogen®) STGYRA1 (5'-TGTCCGAGATGGCCTGAAGC-3') e STGYRA-*Hin*fI/87 (5'-ATGTAACGCAGCGAGAATGGCTGCGCCATACGAACGATGGAG-3') permitiram a obtenção de um fragmento de 195 pares de bases (pb), com um sítio de restrição para *Hin*fI no códon correspondente a Ser83, além da inserção de um sítio de clivagem artificial no códon Asp87. O *primer* alelo-específico AS-81 (5'-GGTAAATACCATCCCCACG-3'), cujo nucleotídeo 3'-terminal corresponde ao primeiro do códon 81 permitiu, na ausência deste nucleotídeo, a obtenção de um fragmento de 80 pb contendo sítio de restrição natural e artificial para *Hin*fI.

Para as reações de RFLP, 5 µL de cada produto da PCR foram digeridos com 5U enzima *Hin*fI (Invitrogen®) em volume final de 7,5 µL, a 37ºC por 2h. Os fragmentos digeridos e

não digeridos foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 3%. Foram utilizados marcadores moleculares de 100 pb e 25 pb (Invitrogen®). Os géis foram tratados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta (UV) e documentados. O perfil de bandas obtido na RFLP para cada cepa de *Salmonella* foi avaliado quanto a ocorrência de mutações no gene *gyrA*, e caracterizados conforme a Tabela 1 proposta por Giraud et al. (1999).

Tabela 1. Padrões de Restrição da região QRDR do gene *gyr*A em *Salmonella* spp. segundo Giraud et al. (1999)

Perfil de suscetibilidade ao NAL[a] X CIP[b]	AS – PCR - RFLP		Mutação QRDR do gene gyrA
	Comprimento do Fragmento (pb)		
	Antes *Hinf* I	Após *Hinf* I	
Sensível/ Sensível	195 - 80	137 - 43 – 22 - 15	Nenhuma
Resistente/ Sensível	195 - 80	137 – 58 – 22	Códon 87 (GAC/ AAC)
Resistente/ Sensível	195 - 80	152 – 43 – 37	Códon 83 (TCC/ TTC)
Resistente/ Sensível	195	137 – 43 -15	Códon 81 (GGC/ TGC)
Resistente/ Resistente	195 - 80	195 – 80	Códon 83 (TCC/ TTC) Códon 87 (GAC/ GGC)
Resistente/ Resistente	195	137 - 58	Códon 81 (GGC/ TGC) Códon 87 (GAC/ GGC)

[a]NAL, ácido nalidíxico
[b]CIP, ciprofloxacina

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 95 cepas de *Salmonella* isoladas de pacientes e alimentos envolvidos em surtos ocorridos no Estado do Paraná entre 1999 e 2006, que foram avaliadas neste estudo pertenciam a 6 diferentes sorovares, todos resistentes ao ácido nalidíxico. O sorovar Enteritidis foi o mais freqüente, representando 90% do total de amostras (85 cepas), seguido por três cepas do sorovar Typhimurium (3%), três cepas Joannesburg (3%), uma O9:12 (1%), uma Albany (1%) e uma Newport (1%).

Os resultados da amplificação da região QRDR por PCR revelaram perfil de bandas com fragmentos de 195pb e 80 pb para todas as cepas de *Salmonella* spp.. Não foi observado o perfil de bandas descrito por Giraud et al. (1999) com apenas um fragmento de 195 pb, evidenciando ausência de cepas com mutação no códon Gly81. Estes dados corroboram com aqueles obtidos por San Martín et al. (2005) que avaliaram a resistência a fluoroquinolonas em cepas de *Salmonella* e observaram mutações apenas em Ser83 e Asp87.

Os fragmentos obtidos por RFLP demonstraram a presença de mutações na QRDR do gene *gyr*A nas cepas de *Salmonella* isoladas de pacientes e alimentos, que resultaram em substituições nos aminoácidos codificados. Tais substituições ocorreram mais frequentemente no códon correspondente a Asp87 (63%) em relação a Ser83 (37%), apresentando fragmentos de 137-58-22 pb e 152-43-37 pb, respectivamente (Figura 2). Não foram identificadas mutações duplas no gene *gyr*A para as cepas investigadas.

De acordo com a literatura, as alterações no gene *gyr*A são o principal mecanismo envolvido na resistência de *Salmonella* spp. às quinolonas (GIRAUD et al., 2006, HOPKINS et al., 2005; PIDDOCK et al., 2002). Os resíduos Ser83 e Asp87 são os mais freqüentemente alterados em cepas resistentes ao ácido nalidíxico (GIRAUD et al., 2006). Em adição, sabe-se que alterações nestes dois resíduos comumente estão combinadas em cepas fluoroquinolona-resistentes (TURNER et al., 2006). Embora outros mecanismos contribuam para a resistência às fluoroquinolonas em *Salmonella* spp., a ocorrência de uma mutação inicial no *gyr*A parece ser essencial para elevar o nível da resistência a estes antimicrobianos. Frequentemente, alterações no gene *par*C estão associadas com mutações simples ou duplas no *gyr*A em cepas que apresentam níveis elevados de resistência a fluoroquinolonas (TURNER et al.,2006).

Eaves et al. (2004) avaliaram a prevalência de mutações na região QRDR do gene *gyrA* de *S. enterica* e verificaram mutações de substituição em 100% das cepas resistentes ao ácido nalidíxico. A freqüência de mutações em Ser83 (57%) e Asp87 (39,6%) foi semelhante àquela verificada no presente estudo. Hakanen et al. (2001) também investigaram a ocorrência de mutações no gene *gyr*A em cepas de *Salmonella* com redução de suscetibilidade a fluoroquinolonas. Dentre as mutações mais freqüentemente detectadas foram identificadas substituições em 26% das cepas estudadas em Asp87(-Tyr) e 25,6% em Ser83(-Phe).

A freqüência e a posição das mutações no gene *gyrA* também foram analisadas no presente trabalho em relação aos diferentes sorovares de *Salmonella* avaliados. Os resultados observados com as 85 cepas epidêmicas do sorovar Enteritidis evidenciaram mutações mais freqüentes no códon Asp87 (65%) em relação àquelas encontradas no códon Ser83 (35%). Em

contrapartida, as três cepas do sorovar Typhimurium analisadas apresentaram mutação em Ser83.

Estes dados estão de acordo com o obtido por outros autores. Eaves et al. (2004) verificaram que para o sorovar Enteritidis, as alterações em Asp87 (57,2%) foram mais freqüentes do que em Ser83 (42,9%). Giraud et al. (1999) relataram que mutações no códon Ser83 do *gyr*A são frequentes no sorovar Typhimurium, enquanto alterações em Asp87 são mais comuns em outros sorovares.

Pontos simples de mutação identificados na presente pesquisa são associados com resistência à quinolonas não-fluoradas, como ácido nalidíxico. Porém, aparentemente, são necessárias mutações adicionais para que ocorra resistência às fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina (HOOPER, 1999; EAVES et al., 2004; HOPKINS et al., 2005; SAN-MARTÍN et al., 2005).

Outro aspecto importante observado no presente estudo refere-se a diferenças na CipMIC em relação à posição da mutação no gene *gyr*A. Foi verificado que as cepas com mutação no códon Ser83 exibiram maior decréscimo na suscetibilidade a ciprofloxacina em relação àquelas com mutação em Asp87, embora todas as cepas tenham permanecido sensíveis a ciprofloxacina de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006). O valor da MIC_{50} para ciprofloxacina para cepas sensíveis ao ácido nalidíxico, observado em trabalho anterior (dados não publicados), que foi de 0,0078 µg/mL, aumentou 8 vezes nas cepas com mutações em Asp87 (0,0625 µg/mL), e 16 vezes naquelas com mutações em Ser83 (0,125 µg/mL).

A Figura 1 apresenta a distribuição do MIC para ciprofloxacina de acordo com a posição da mutação no *gyr*A em cepas envolvidas em surtos de salmonelose no Estado do Paraná entre 1999 e 2006. É possível perceber que a maior parte das cepas com mutação em Asp87 apresenta CipMIC entre 0,0313 e 0,0625 µg/mL, enquanto nas cepas com mutação em Ser83 a CipMIC ficou entre 0,0625 e 0,125 µg/mL.

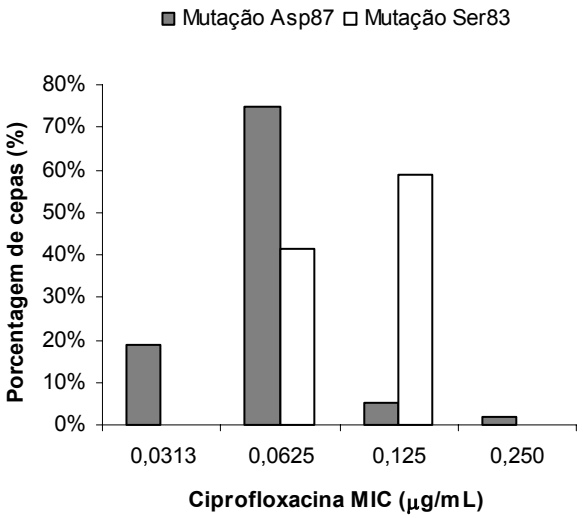

Figura 1. Distribuição do MIC para ciprofloxacina de acordo com a posição da mutação no *gyr*A, em cepas envolvidas em surtos de salmonelose no Estado do Paraná entre 1999 e 2006.

Variações na CipMIC relacionadas à posição da mutação no *gyr*A em cepas de *Salmonella* spp. já foram relatadas em pesquisas anteriores. Segundo Hopkins et al. (2005), cepas com diferentes substituições nos códons 83 e ou 87 apresentaram níveis variados de suscetibilidade reduzida a fluoroquinolonas. Ling et al. (2003) sugeriram que mutações em Ser83 estão associadas a níveis mais elevados de resistência do que mutações em outros códons do *gyr*A, como Asp87.

Dentre as 19 cepas de origem avícola avaliadas no presente estudo, 11 (58%) pertenciam ao sorovar Enteritidis. Os demais sorovares identificados foram duas cepas de *S.* Heidelberg (10,5%), duas Panama (10,5%), uma Brenedey (5%), uma Corvallis (5%), uma Ohio (5%) e uma Anatum (5%). Em comparação às cepas isoladas de pacientes e alimentos envolvidos em surtos, a diversidade de sorovares identificada foi proporcionalmente maior nas de origem avícola, contudo, em ambas o sorovar Enteritidis foi prevalente.

A análise do perfil de suscetibilidade ao ácido nalidíxico revelou 13 cepas de origem avícola (68,4%) resistentes. Dentre estas, 11 (84,6%) apresentaram mutações simples no gene *gyr*A, nos códons Asp87 (54,5%) ou Ser83 (45,5%)**.** Não foi observada a ocorrência de mutação no códon correspondente a Gly81. Do total de cepas com mutações, 9 (81,8%) pertenciam ao sorovar Enteritidis e 2 (18,2%) a Heidelberg. Todas as cepas resistentes ao ácido nalidíxico de origem avícola apresentaram redução na suscetibilidade para ciprofloxacina, sendo observados

MIC 0,250 µg/mL para uma cepa do sorovar Enteritidis e MIC 0,500 µg/mL para uma cepa de *S.* Heidelberg.

Uma importante observação na análise das cepas de origem avícola refere-se a ocorrência de duas cepas resistentes ao ácido nalidíxico pertencentes aos sorovares Bredeney e Corvallis, que não apresentaram mutação no gene *gyr*A. Na análise de RFLP, estas duas cepas apresentaram o mesmo padrão de restrição daquelas suscetíveis a esse antimicrobiano, com fragmentos de 137-43-22-15 pb. Fenotipicamente, além do perfil de resistência ao ácido nalidíxico, as duas cepas apresentaram suscetibilidade reduzida a ciprofloxacina, com MICs de 0,125 e 0,250 µg/mL respectivamente. Este fato sugere a presença de outros mecanismos envolvidos na resistência às fluoroquinolonas nestas cepas, estando possivelmente relacionado hiperexpressão de bomba de efluxo. Além disso, deve–se considerar a possibilidade da ocorrência de mutações em outros códons do gene *gyr*A que não são detectadas pela técnica de AS-PCR-RFLP.

Na Figura 2 estão apresentados os perfis de AS-PCR-RFLP, observados no presente estudo, antes e após a restrição com a enzima *Hinf* I.

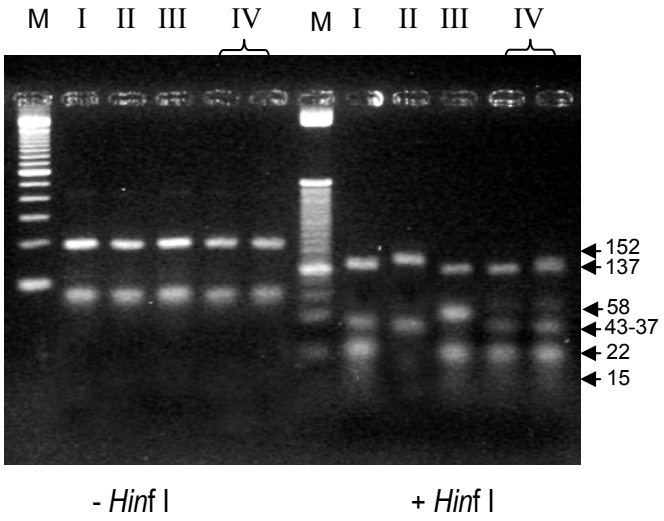

Figura 2. Perfis obtidos por AS-PCR-RFLP de quatro cepas de *Salmonella* representativas antes (- *Hinf* I) e após a restrição (+ *Hinf* I). O perfil I (137-43-22-15 pb) corresponde às cepas sensíveis ao ácido nalidíxico. Os perfis II (152-43-37 pb) e III (137-58-22 pb) representam cepas resistentes a este antimicrobiano e com mutação nos códons Ser83 e Asp 87, respectivamente. O perfil IV (137-43-22-15 pb) refere-se às duas cepas de origem avícola resistentes ao ácido nalidíxico, sem quaisquer mutações na QRDR do gene *gyr*A..

Pesquisas de Giraud et al. (1999) demonstraram *in vitro* a ocorrência de resistência ao ácido nalidíxico em níveis elevados para cepas de origem avícola com mutações simples no

*gyr*A, sugerindo a existência de outros mecanismos envolvidos na resistência as quinolonas em *Salmonella* spp. No mesmo estudo, os pesquisadores verificaram menor freqüência de mutação no códon 87 do gene *gyr*A em cepas de origem animal em relação às de fontes humanas. Soto et al. (2003) cultivaram *in vitro* mutantes de *S.* Enteritidis resistentes ao ácido nalidíxico, em crescentes concentrações de ciprofloxacina para investigar os mecanismos envolvidos na aquisição de resistência. Os pesquisadores verificaram elevação de 0,5 para 1,5 µg/mL no CipMIC das cepas, relacionada a hiperexpressão no sistema de efluxo.

O crescente número de isolados de *Salmonella* com suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina representa um problema de saúde pública já que pode causar falência no tratamento clínico e, consequentemente, restringir as opções terapêuticas para o tratamento para salmoneloses graves ou sistemicas (ÂNGULO et al., 1999; GIRAUD et al., 2006). Um importante aspecto sobre a resistência ao ácido nalidíxico refere-se ao fato de que tais cepas requerem menor exposição às fluoroquinolonas para alteração de sua suscetibilidade se comparadas àquelas suscetíveis ao ácido nalidíxico (CEBRIAN et al., 2003; HOPKINS et al. 2005).

Diante desta situação, a elevada incidência de cepas de *Salmonella* com mutações simples no gene *gyr*A observada no presente trabalho alerta para o uso criterioso de fluoroquinolonas na clínica veterinária e humana evitando a emergência de cepas resistentes. Além disso, evidencia a importância da detecção de mutações no gene *gyr*A para melhor compreensão dos mecanismos de resistência a estes antimicrobianos, contribuindo com estudos epidemiológicos de transmissão e variabilidade em cepas de *Salmonella* resistentes às quinolonas.

REFERÊNCIAS

ANGULO, F.; JOHNSON, K.; TAUXE, R.; COHEN, M.; Significance and sources of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States, *Microbial Drug Resistance*, vol.6, nº1, p. 77-83, 2000.

AZNAR, E.; ALARCON, T.; BUENDÍA, B.; GARCÍA-PEÑUELA, E.; LÓPEZ-BREA, M., Detection of decreased susceptibility to fluoroquinolones in *Salmonella* spp. by five different methods including real-time polymerase chain reaction (PCR), *International Journal of Antimicrobial Agent,* vol. 30, p. 67-71, 2007.

BAUER, A.W.; KIRBY, M.M.; SHERRIN, J.D., Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Pathology*, vol.45, p. 493-496, 1966.

CEBRIAN, L.; SIRVENT. E.R.; DÍAZ, J.C. Characterisation of *Salmonella* spp. mutants produced by exposure to various fluoroquinolones, *International Journal Antimicrobial Agents*, vol.22, p.134–139, 2003.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement*, M100-S16, vol.26, nº3, 2006.

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 Qunolone-Resistant *Salmonella enterica*., *Antimicr. Agents an Chemotherapy*, vol.48, nº10, 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, v. 24, p. 428–432, 2004.

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 Resistence in Non-Typhi Serotypes of *Salmonella* enterica, *Clinical Infectious Diseases*, vol.43, 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,* vol.43, p.2131-2137, 1999.

GIRAUD, E.; BAUCHERON, S.; CLOECKAERT, A.; Resistance to fluoroquinolones in Salmonella: emerging mechanisms and resistance prevention strategies, Microbes and Infection, xx, 1-8, 2006.

HAKANEN, A.; KOTILAINEN, P.; HUOVINEN, P., Reduced fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serotypes in travelers returning from Southeast Asia, *Emerging Infectious Disease*, vol.7, p.996–1003, 2001.

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, vol. 25, p. 358–373, 2005.

HOOPER, D.C., Mechanism of Fluoroquinolone Resistance, *Drug Resistance Updates*, vol.2, p.38-55, 1999.

LING, J.M.; CHAN, E.W.; LAM, A.W.; CHENG, A.F., Mutations in Topoisomerase Genes of Fluoroquinolone-Resistant Salmonellae in Hong Kong, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol.47, n.11, p.3567-3573, 2003.

PIDDOCK, LV.J., Fluoroquinolone resistance in Salmonella serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol. Rew*. 26, 3–16, 2002.

ROTIMI, V.O.; JAMAL, W.; PAL, T.; SONNEVEND, A.; DIMITROV, T.S.; ALBERT, M.J., Emergence of multidrug-resistant *Salmonella* spp. and isolates with reduced susceptibility to

ciprofloxacin in Kuwait and the United Arab Emirates, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2007.

SAN MARTÍN, B.; L. LAPIERRE, L.; TORO, C.; BRAVO, V. ; J. CORNEJO, J.; HORMAZABAL, J. C.; BORIE C., Veterinary Microbiology, v. 110, p. 239–244, 2005.

TURNER, A.K.; NAIR, S.; WAIN, J., The acquisition of full fluoroquinolone resistance in *Salmonella* Typhi by accumulation of point in the topoisomerase targets, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, p.1- 8, 2006.

5. CONCLUSOES

- *Salmonella* Enteritidis foi o sorovar mais freqüentemente encontrado entre as cepas analisadas no Estado do Paraná entre 1999 e 2006, seguido por *S.* Infantis, *S.* Typhimurium e *S.* Derby;

- Foi observada uma crescente incidência de cepas resistentes ao ácido nalidíxico e elevação nos valores de MIC_{50} para ciprofloxacina das cepas de *Salmonella* spp. no período estudado;

- Houve um aumento significativo na concentração inibitória mínima de ciprofloxacina (CipMIC) para as cepas resistentes ao ácido nalidíxico;

- A ocorrência de cepas com suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina (MIC$\geq$ 0,125 µg/mL) passou de 24% em 2001 para 30% em 2006;

- Dentre as cepas de *Salmonella* spp. resistentes ao ácido nalidíxico provenientes de surtos e de origem avícola, 98% apresentaram mutações no gene *gyr*A;

- Duas cepas resistentes ao ácido nalidíxico e com suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina, pertencentes aos sorovares Bredeney e Corvallis, não apresentaram quaisquer mutações no gene gyrA;

- As mutações no gene *gyr*A foram identificadas nos códons Asp87 e Ser83 com freqüência de 63% e 37%, respectivamente, nas cepas envolvidas em surtos. Nas cepas de origem avícola a freqüência foi 54,5% das mutações em Asp87 e 45,5% em Ser83;

- Não foi observada mutação no códon Gly81 em nenhuma das cepas avaliadas;

- Não foram identificadas duplas mutações no gene *gyr*A em nenhuma das cepas avaliadas.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo