

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**TESE**

**DISSEMINAÇÃO DE CLONES DE *SALMONELLA* SPP.  
RESISTENTES A DIFERENTES GERAÇÕES DE  
QUINOLONAS NA CADEIA ALIMENTAR.**

**Bruno Rocha Pribul**  
**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DISSEMINAÇÃO DE CLONES DE *SALMONELLA* SPP. RESISTENTES  
A DIFERENTES GERAÇÕES DE QUINOLONAS NA CADEIA  
ALIMENTAR.**

**BRUNO ROCHA PRIBUL**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Miliane Moreira Soares de Souza**

*e Co-orientação da Professora*  
**Dalia dos Prazeres Rodrigues**

Tese submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Ciências**, no Curso de  
Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2015

579.344

Pribul, Bruno Rocha, 1985-

P945d

T

Disseminação de clones de Salmonella spp. resistentes a diferentes gerações de quinolonas na cadeia alimentar / Bruno Rocha Pribul. - 2015.

159 f.: il.

Orientador: Miliane Moreira Soares de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2015.

Bibliografia: f. 101-130.

1. Salmonella - Teses. 2. Alimentos - Microbiologia - Teses. 3. Quinolonas - Teses. 4. Agentes antiinfeciosos - Teses. 5. Drogas - Resistência em microorganismos - Teses. I. Souza, Miliane Moreira Soares de, 1970- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

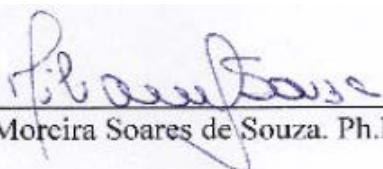
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

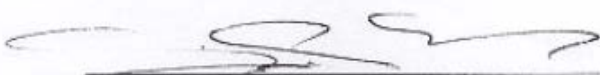
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

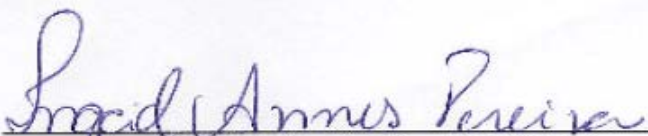
**BRUNO ROCHA PRIBUL**

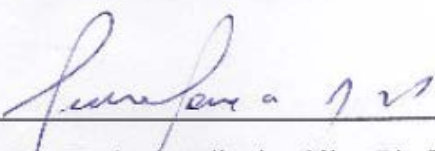
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

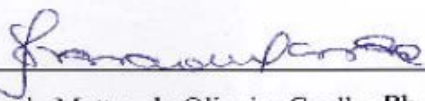
TESE APROVADA EM 25/02/2015.

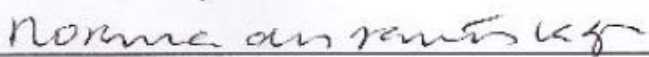
  
Miliane Moreira Soares de Souza. Ph.D. UFRRJ (Orientador)

  
Dália dos Prazeres Rodrigues Dsc. FIOCRUZ (Co-orientador)

  
Ingrid Annes Pereira Dsc. FIOCRUZ

  
Pedro Paulo de Oliveira Silva Ph. D. UFRRJ

  
Shana de Mattos de Oliveira Coelho Ph. D. UFRRJ

  
Norma dos Santos Lázaro DSC. FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”*

A Deus por guiar meus passos e por tornar isto tudo realidade.

As minhas orientadoras, Professora Dra MILIANE MOREIRA SOARES DE SOUZA e Dra DALIA DOS PRAZERES RODRIGUES por ter possibilitado imenso crescimento profissional e pessoal através deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e do Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas por toda amizade e apoio nos momentos em que mais precisei.

Ao Curso de PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da UFRRJ e aos seus funcionários, meu sincero agradecimento pelo apoio em materiais e pelas excelentes condições que recebemos para trabalhar.

Aos funcionários da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e do LRNEB do Instituto Oswaldo Cruz que desde o início ajudaram para que este trabalho se tornasse realidade.

A minha família por acreditar em tudo o que quis realizar até agora e apoiar incondicionalmente minhas opções. Em especial ao meu pai CLAUDIO GOMES PRIBUL que a cada dia passa a me dar mais motivos para crer que tudo é possível, basta querer.

A minha amada Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro que me acolhe já fazem 10 anos e fez minha vida mudar completamente.

A todos que auxiliaram a execução deste trabalho e que tiveram presentes neste momento: obrigado.

Agradeço ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (Cnpq) e a COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) pelo apoio técnico científico investido no projeto.

## RESUMO

PRIBUL, Bruno Rocha. **Disseminação de clones de *Salmonella* spp. resistentes a diferentes gerações de quinolonas na cadeia alimentar.** 2015. 136p Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

As salmonelas são reconhecidas como causa comum de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em humanos e representam um grave problema de saúde pública. Uma dificuldade adicional no controle das infecções bacterianas decorrentes deste gênero é a crescente resistência antimicrobiana. As quinolonas/fluoroquinolonas aparecem como uma estratégia terapêutica frente a estes isolados resistentes. A aquisição de resistência às quinolonas por *Salmonella* spp. são um alerta para comunidade científica assim como a possibilidade de transmissão de resistência pelo envolvimento de plasmídeos. O presente trabalho buscou avaliar os mecanismos envolvidos com a resistência às quinolonas e fluorquinolonas em isolados de *Salmonella* spp. Foram avaliados 152 isolados, sendo 39 oriundos de fontes alimentares de origem animal, 14 de origem ambiental, 32 de origem animal e 67 de origem humana, encaminhados ao Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB) no período de 2009 a 2013 que apresentaram perfil de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas testadas. Foi possível reconhecer 33 sorovares sendo os 6 prevalentes *S. Typhimurium* (63/152), seguido de *S. Enteritidis* (25/152), *S. Gallinarum* (23/152), *S. Muenchen* (4/152), *S. Heidelberg* (3/152), *S. Infantis* (3/152) e *S. Saintpaul* (3/152). No teste de difusão em disco foram detectados 83,5% de resistência ao ácido nalidixico, 52% à enrofloxacina, 39,5% a ciprofloxacina, 36,8% a ofloxacina e 31,6% a levofloxacina. Outras classes de antimicrobianos foram testadas para avaliação de resistência. Elevadas taxas de resistência em isolados resistentes às quinolonas/fluoroquinolonas foram evidenciadas frente as tetraciclinas, beta-lactâmicos e aminoglicosídeos. No teste de microdiluição em caldo para determinação da CIM percentuais de resistência foram observados para: ácido nalidixico (94,7%), enrofloxacina (66,4%), ciprofloxacina (58,5%), ofloxacina (28,9%) e levofloxacina (25,7%). Quanto a detecção de genes de resistência foi possível verificar a presença de 18 isolados positivos para os genes *qnr* (8 *qnrS*, 6 *qnrB* e 4 *qnrD*), e 23 isolados *aac(6')-Ib* positivos. O gene integron foi detectado em 63 isolados com regiões variáveis entre +/- 600pb a >1000pb. O aumento de isolados de *Salmonella* spp. carregando genes PMQR é um sério problema que deve ser cuidadosamente monitorado. A avaliação da relação clonal entre os sorovares prevalentes que apresentaram resistência a diferentes classes de quinolonas, através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE), revelou que alguns pulsotipos encontrados foram relacionados à circulação de cepas resistentes as quinolonas, sendo estas encontradas nas diferentes fontes de isolamento e algumas circulantes em todo o território nacional.

Palavras chave: *Salmonella* spp., cadeia alimentar, quinolonas/fluoroquinolonas

## ABSTRACT

PRIBUL, Bruno Rocha. **Dissemination of clones of *Salmonella* spp. resistant to different generations of quinolones in animal production chain species.** 2015. 136p Tesis (Doctor in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Salmonellosis are recognized as a common cause of foodborne disease (FBD) in humans and represent a serious public health problem. The increasing of antimicrobial resistance is an additional difficulty in controlling bacterial infections from *Salmonella* spp. Quinolones/fluoroquinolones appear as a therapeutic strategy against these resistant isolates. The acquisition of resistance to quinolones in *Salmonella* spp. are a warning to the scientific community as well as the possibility of transmission of resistance by the involvement of plasmids. This study aimed to evaluate the mechanisms involved in resistance to quinolones and fluoroquinolones in isolates of *Salmonella* spp. We evaluated 152 isolates, 39 originated from food animal sources, 14 of environmental origin, 32 animal and 67 of human origin, referred to the National Reference Laboratory of Enteric Disease (LRNEB/IOC/RJ) in the period 2009-2013 that showed resistance profile of the quinolones/fluoroquinolones tested. It was possible to recognize 33 serotypes being the sixth most prevalent *S. Typhimurium* (63/152), followed by *S. Enteritidis* (25/152), *S. gallinarum* (23/152), *S. Muenchen* (4/152), *S. Heidelberg* (3/152), *S. Infantis* (3/152) and *S. Saintpaul* (3/152). In disk diffusion test were detected 83.5% resistance to nalidixic acid, 52% to enrofloxacin, ciprofloxacin 39.5%, 36.8% ofloxacin and 31.6% levofloxacin. Other classes of antimicrobials were tested to evaluate resistance. Tetracyclines, aminoglycosides and beta-lactams showed high rates of resistance in isolates with resistance to quinolones/fluoroquinolones. The broth microdilution test for MIC determination the following percentages of resistance were obtained: 94.7% to nalidixic acid, 66.4% for enrofloxacin, 58.5% to ciprofloxacin, 28.9% to ofloxacin and 25,7% to levofloxacin. As the detection of resistance genes was possible to verify the presence of 18 isolates positive for *qnr* genes (8*qnrS*, 6 *qnrB* and 4 *qnrD*), and 23 isolates *aac(6')-Ib* positive. The integron gene was detected in 63 isolates the variable regions of the +/- 600pb > 1000pb. The increase of isolates of *Salmonella* spp. silted PMQR genes is a serious problem that must be carefully monitored. The isolates were subjected to molecular typing method by pulsed field gel electrophoresis which were evaluated clonally among the most prevalent serovars that are resistant to different classes of quinolones. Some found pulsotypes were related movement of the strains resistant to quinolones, which are found in different sources of isolation and some circulating throughout the national territory.

Keywords: *Salmonella* spp., food chain, quinolones/fluoroquinolones

## LISTA DE ABREVIACÕES

*aac(6')-Ib*= gene que codifica a síntese da enzima acetiltransferase de aminoglicosídeos

*aac(6')-Ib-cr* = gene que codifica a síntese da variante *cr* da enzima acetiltransferase de aminoglicosídeos

ABC ATP= “binding cassette”

AN = ácido nalidíxico

ATCC = American Type Culture Collection

CIM = concentração inibitória mínima

CIP = ciprofloxacina

CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute

DDA= doença diarreica aguda

DNA = ácido desoxiribonucléico

DTA= doenças transmitidas por alimentos

ECDC = European Center for Disease Prevention and Control

EFSA= European Food Safety Authority

ENR = enrofloxacin

ESBL =  $\beta$ -lactamases de espectro alargado

EUA = Estados Unidos da América

EUCAST = European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing

FAO = Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação

FDA = Food and Drug Administration

FQs = fluoroquinolonas

*gyrA*= gene que codifica a síntese da subunidade A da girase

*gyrB*= gene que codifica a síntese da subunidade B da girase



INT = Intermediário

IOC= Instituto Oswaldo Cruz

LVX = levofloxacina

MMDA= monitoramento de doenças diarreicas agudas

MDR = multirresistência

NCBI= “National Center for Biotechnology Information”

OIE = Organização Mundial da Saúde Animal

OMS = Organização Mundial de Saúde

*oqxAB* = gene que codifica a bomba de efluxo OqxAB

*parC* = gene que codifica a síntese da subunidade C da topoisomerase IV

*parE* = gene que codifica a síntese da subunidade E da topoisomerase IV

pb = pares de bases

PCR = Polimerase Chain Reaction

PMQR = plasmid-mediated quinolone resistance

QC = “quality control”

*QepA* = gene que codifica a bomba de efluxo QepA

*qnr* = gene que codifica a síntese da proteína Qnr

QRDR = quinolone resistance-determining regions

RES = Resistente

RNA = ácido ribonucleico

RND = resistance-nodulation division

RQMP = resistência às quinolonas mediada por plasmídeos

SVS= secretaria de vigilância sanitária

TBE = Tris-borato-EDTA

UE = União Europeia

UFC = unidades formadoras de colônias

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura básica das quinolonas.	12
<b>Figura 2</b>	Estruturas de alguns exemplares de quinolonas.	13
<b>Figura 3</b>	Complexo ternário: DNA GIRASE-DNA-QUINOLONAS.	16
<b>Figura 4</b>	Mecanismo de ação das quinolonas.	17
<b>Figura 5</b>	Percentual de isolados com resistência às quinolonas no período avaliado pelo território brasileiro.	41
<b>Figura 6</b>	Produto da amplificação dos genes <i>QnrB</i> e <i>QnrS</i> obtidos através da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) – Multiplex em <i>Salmonella</i> spp.	63
<b>Figura 7</b>	Produto da amplificação do gene <i>QnrD</i> obtido através da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em <i>Salmonella</i> spp.	64
<b>Figura 8</b>	Produto da amplificação do gene <i>aac(6')-Ib</i> através da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em <i>Salmonella</i> spp.	65
<b>Figura 9</b>	Produto da amplificação da região conservada do Integron através da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em <i>Salmonella</i> spp.	66
<b>Figura 10</b>	Produto da amplificação da região variável do Integron através da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em <i>Salmonella</i> spp.	67
<b>Figura 11</b>	Gel de agarose à 1% com o perfil de macrorestrição obtidos através da eletroforese em campo pulsado após a digestão com a enzima Xba I.	80

<b>Figura 12</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Agona avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	80
<b>Figura 13</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Anatum avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	81
<b>Figura 14</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Brandenburg avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	81
<b>Figura 15</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Bredeney avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	82
<b>Figura 16</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Corvallis avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	82
<b>Figura 17</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Gallinarum avaliados através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	83
<b>Figura 18</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. GIVE avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	84
<b>Figura 19</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Hadar avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	85
<b>Figura 20</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Heidelberg avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	85

<b>Figura 21</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Infantis avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	86
<b>Figura 22</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Livingstone avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	87
<b>Figura 23</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Tennessee avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	88
<b>Figura 24</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Mbandaka avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	88
<b>Figura 25</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Muenchen avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	88
<b>Figura 26</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Orion avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	89
<b>Figura 27</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Panama avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	90
<b>Figura 28</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Rissen avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	91
<b>Figura 29</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Schwarzengrund avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	91

<b>Figura 30</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Senftenberg avaliados através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	92
<b>Figura 31</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Tennessee avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	92
<b>Figura 32</b>	Distribuição dos grupos filogeneticos de <i>Salmonella</i> ser. Typhimurium avaliados através de PFGE digeridos pela enzima <i>XbaI</i> , e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.	94

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Distribuição quantitativa dos sorovares de <i>Salmonella</i> , de acordo com as espécies e subespécies.	6
<b>Quadro 2</b>	Classificação das quinolonas (Adaptado de: Silva, 2002)	14
<b>Quadro 3</b>	Perfil bioquímico de <i>Salmonella</i> spp., segundo Edwards & Ewing, 1986.	25
<b>Quadro 4</b>	Drogas antimicrobianas (MARCA OXOID) utilizadas na avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana.	26
<b>Quadro 5</b>	Padrão de Interpretação do Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos, CLSI humano e veterinário (atualizado anualmente).	28
<b>Quadro 6</b>	Solvente e diluente utilizado no preparo da solução antimicrobiana, de acordo com o CLSI 2013 (de uso humano e veterinário).	29
<b>Quadro 7</b>	Padrão de Interpretação do Teste de Microtitulação em Caldo, de acordo com o CLSI (atualizado anualmente).	30
<b>Quadro 8</b>	Limites aceitáveis em cepas padrão utilizadas no controle de qualidade do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, CLSI (atualizado anualmente).	31
<b>Quadro 9</b>	Sequência de oligonucleotídeos utilizados neste estudo	32
<b>Quadro 10</b>	Componentes e Concentrações utilizadas no preparo do MIX para PCR	33
<b>Quadro 11</b>	Condições de amplificação empregadas na caracterização de genes de resistência.	34

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Sorovares resistentes as quinolonas/fluorquinolonas por fonte de isolamento	38
<b>Tabela 2</b>	Perfil de resistência às quinolonas associado às outras classes de antimicrobianos testadas	46,47
<b>Tabela 3</b>	Perfil de Sorovares multirresistentes por fonte de isolamento	50
<b>Tabela 4</b>	Resultado de acuraria entre os testes de difusão em disco simples e microdiluição em caldo para as quinolonas/fluorquinolonas.	54
<b>Tabela 5</b>	Perfis de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas testados por microdiluição em caldo	59
<b>Tabela 6</b>	Percentual dos antibiótipos prevalentes relacionados à origem de isolamento	60
<b>Tabela 7</b>	Perfil de suscetibilidade as quinolonas dos isolados <i>qnr</i> positivos, por sorovar, fonte de isolamento, região e associação a outros genes de resistência	71
<b>Tabela 8</b>	Perfil de suscetibilidade as quinolonas e aminoglicosídeos dos isolados <i>aac(6')-Ib</i> positivos, por sorovar, fonte de isolamento, região e associação ao integron	74
<b>Tabela 9</b>	Distribuição dos Sorovares positivos para o gene <i>integrase</i> , de acordo com seu perfil de suscetibilidade e fonte de isolamento.	77
<b>Tabela 10</b>	Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar <i>S. Agona</i>	81
<b>Tabela 11</b>	Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar <i>S. Bredeney</i>	82
<b>Tabela 12</b>	Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar <i>S. Corvallis</i>	83
<b>Tabela 13</b>	Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar <i>S. Gallinarum</i>	84
<b>Tabela 14</b>	Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar <i>S. Heidelberg</i>	86



<b>Tabela 15</b>	Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar <i>S. Infantis</i>	87
<b>Tabela 16</b>	Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar <i>S. Livingstone</i>	87
<b>Tabela 17</b>	Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar <i>S. Muenchen</i>	89
<b>Tabela 18</b>	Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar <i>S. Orion</i>	90
<b>Tabela 19</b>	Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar <i>S. Panama</i>	91
<b>Tabela 20</b>	Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar <i>S. Tennessee</i>	93
<b>Tabela 21</b>	Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar <i>S. Typhimurium</i>	96,97

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Distribuição percentual da prevalência dos dez sorovares de <i>Salmonella</i> spp. resistentes à quinolonas.	37
<b>Gráfico 2</b>	Frequência anual de isolados com resistência a quinolona/fluoroquinolona por fonte de isolamento no período referente ao estudo.	40
<b>Gráfico 3</b>	Percentual de resistência e suscetibilidade intermediária as quinolonas dos isolados de <i>Salmonella</i> spp.	43
<b>Gráfico 4</b>	Percentual de resistência das classes antimicrobianas testadas referentes aos isolados com resistência às quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.	44
<b>Gráfico 5</b>	Percentual de isolados multiresistentes por período avaliado.	49
<b>Gráfico 6</b>	Percentual de resistência e suscetibilidade intermediária as quinolonas dos isolados de <i>Salmonella</i> spp., pelo teste de microdiluição em caldo	52
<b>Gráfico 7</b>	Percentual de resistência e suscetibilidade intermediária dos testes de microdiluição em caldo (MC) e difusão em disco simples (DD)	53
<b>Gráfico 8</b>	Percentual de isolados de <i>Salmonella</i> spp. em relação a CIM detectada ao ácido nalidíxico.	55
<b>Gráfico 9</b>	Percentual de isolados de <i>Salmonella</i> spp. em relação à CIM detectada a ciprofloxacina.	56
<b>Gráfico 10</b>	Percentual de isolados de <i>Salmonella</i> spp. em relação a CIM detectada da enrofloxacin	56
<b>Gráfico 11</b>	Percentual de isolados de <i>Salmonella</i> spp. em relação a CIM detectada da levofloxacin	57
<b>Gráfico 12</b>	Percentual de isolados de <i>Salmonella</i> spp. em relação à CIM detectada da ofloxacin	58

<b>Gráfico 13</b>	Percentual de isolados de <i>Salmonella</i> spp. resistentes aos antimicrobianos testados em relação ao período (ano) do estudo em questão.	62
<b>Gráfico 14</b>	Frequência dos genes associados a elementos móveis em <i>Salmonella</i> spp.	68
<b>Gráfico 15</b>	Percentual dos diferentes genes <i>qnrs</i> avaliados	69
<b>Gráfico 16</b>	Percentual de isolados atribuído a regiões variáveis do integron.	75

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1 Doenças Transmitidas por Alimentos	3
2.2 Gênero <i>Salmonella</i> spp.	4
2.2.1 Considerações gerais	4
2.2.2 Histórico	4
2.2.3 Classificação	5
2.2.4 Epidemiologia	7
2.3 Quinolonas	9
2.3.1 História da descoberta e evolução das quinolonas	10
2.3.2 Estrutura química e classificação	11
2.3.3 Mecanismos de ação	15
2.3.4 Mecanismos de resistência	17
2.3.4.1 Resistência às quinolonas mediada por mutações cromossômicas	18
2.3.4.1.1 Mutações no sitio alvo	18
2.3.4.1.2 Mutações que restringem o acesso do antimicrobiano ao sitio de ação	18
2.3.4.1.2.1 Alterações nas porinas	18
2.3.4.1.2.2 Bombas de efluxo	19
2.3.4.2 Resistência às quinolonas mediada por plasmídeo	19

2.3.4.2.1 Determinantes QNR	19
2.3.4.2.2 Determinantes AAC(6')-Ib-cr	21
2.3.4.2.3 Bomba de efluxo de transferência plasmídeal (QepA e OqxAB)	22
2.4 Mecanismo de Resistência mediado por Integrons	23
<b>3 OBJETIVOS</b>	24
3.1 Geral	24
3.2 Específicos	24
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	25
4.1 Amostragem	25
4.2 Confirmação/Identificação Bioquímica	25
4.3 Caracterização Antigênica	25
4.4 Confirmação do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos de Interesse	25
4.4.1 Teste de disco difusão em Agar	26
4.4.1.1 Preparo do inóculo	26
4.4.1.2 Antimicrobianos avaliados	26
4.4.1.3 Realização da técnica	27
4.4.1.4 Leitura e Interpretação	28
4.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos avaliados	28
4.4.2.1 Preparo da Solução Antimicrobiana	28
4.4.2.2 Preparo das Placas de Microtitulação	29

4.4.2.3 Preparo do inóculo	29
4.4.2.4 Execução da Técnica de Microdiluição	29
4.4.2.5 Interpretação e divulgação dos resultados	29
4.4.3 Controle de Qualidade do Teste	30
4.5 Caracterização Genotípica da Resistência às quinolonas	31
4.5.1 Amostragem	31
4.5.2 Extração e Amplificação do DNA Bacteriano	31
4.5.3 Primers empregados na caracterização de genes de resistência	32
4.5.4 Preparo do MASTER MIX	33
4.5.5 Condições de Amplificação	33
4.5.6 Corrida e Visualização do Perfil Molecular	34
4.6 Relacionamento Clonal por Métodos Moleculares	34
4.6.1 Eletroforese em Campo Pulsado ( <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis-PFGE</i> )	34
4.6.1.1 Preparo do inóculo	35
4.6.1.2 Preparo dos plugs de agarose	35
4.6.1.3 Lise celular dos plugs de agarose	35
4.6.1.4 Lavagem dos plugs de agarose após a lise celular	35
4.6.1.5 Digestão do DNA com enzima de restrição Xbal nos plugs de agarose	35
4.6.1.6 Preparo do gel de agarose	35
4.6.1.7 Condições de corrida em campo pulsado e visualização do perfil genético	35
4.6.1.8 Padronização do teste	36

4.6.1.9 Análise computacional dos perfis de macro restrição	36
4.7 Análise Estatística	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	37
<b>6 CONCLUSÕES</b>	100
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	101





## 1 INTRODUÇÃO

As salmoneloses são reconhecidas como causa comum de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em humanos e representam um grave problema de saúde pública (WHO, 2012) sendo uma das principais zoonoses em todo o mundo. Sua ocorrência é decorrente de suas características de endemicidade, alta morbidade e, sobretudo, devido à dificuldade da adoção de medidas no seu controle.

O espectro das DTA tem aumentado gradativa e exponencialmente nos últimos anos. A quantidade de produtos alimentícios disponíveis no mercado oferece ao consumidor a oportunidade de ampla escolha. Apesar do progresso alcançado em sua produção, as enfermidades causadas por patógenos de origem alimentar continuam apresentando problemas significativos para a saúde e economia e, neste particular o gênero *Salmonella* spp. assume papel relevante tanto nos países desenvolvidos quanto nos emergentes (PLYM-FORSHELL; WIERUP, 2006).

Considerando que a maioria dos quadros de gastroenterite transcorre sem a necessidade de hospitalização, a ocorrência da salmonelose na população humana transmitida por alimentos é provavelmente subestimada. Segundo Forsythe (2002), somente 10% do total de surtos de origem alimentar são notificados no Brasil, devido às falhas no sistema de notificação e de fiscalização.

Segundo dados do Sistema de Vigilância Sanitária em Saúde durante o período de 1999 e 2010 foram notificados no Brasil 6.062 casos de surtos DTA, envolvendo 117.330 pessoas doentes e 64 óbitos. Entre os agentes etiológicos associados aos 2.974 surtos investigados, 84% corresponderam a agentes bacterianos, seguidos por vírus, parasitas e químicos. As principais espécies bacterianas detectadas em surtos de DTA estão destacadas as seguintes espécies: *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Shigella* sp., e *Salmonella* Typhi

A presença de *Salmonella* spp. em animais de produção reflete a importância da cadeia alimentar como principal via de transmissão, sendo este o agente etiológico de inúmeras enteroinfecções tendo as aves, suínos e bovinos, papel de destaque na sua veiculação. Consequentemente, o progresso da produção dessas espécies animais no Brasil vem proporcionando uma crescente necessidade de elaborar avaliações específicas que forneçam dados para balizar medidas de controle da qualidade microbiológica destes produtos.

Sabe-se que a contaminação do alimento pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva, inclusive durante seu preparo final pelo consumidor. Em geral, os riscos são aumentados quando há ausência de procedimentos tecnológicos adequados nas diferentes etapas da produção, comercialização e consumo.

Adicionalmente a este problema é observado o aumento progressivo de resistência aos antimicrobianos, devido à utilização desordenada destes fármacos com fins terapêuticos, profiláticos e para o crescimento de animais de produção como aves, suínos e bovinos.

As quinolonas são um grupo de agentes antimicrobianos sintéticos que foram gerados no início da década de 60, quando no processo de síntese da cloroquina (agente para tratamento da malária), chegou-se ao ácido nalidíxico. Na década de 80, com a adição de um átomo de flúor no carbono seis da molécula de quinolona, surgiram as fluoroquinolonas.

O uso contínuo de fluoroquinolonas (FQ) na medicina veterinária incluindo pecuária, para profilaxia de doenças infecciosas ou como promotores de crescimento pode contribuir para o aumento da prevalência de microrganismos resistentes e tem consequências para a saúde pública, com implicações no tratamento e prevenção de doenças infecciosas em humanos e animais.

Durante décadas, ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol foram aos fármacos mais utilizados para o tratamento de salmoneloses invasivas. Porém, o aumento na resistência a estes fármacos reduziu significativamente o seu uso, sendo substituídos pelas fluoroquinolonas. No entanto, ao uso destas segue-se a emergência de isolados cujo perfil de suscetibilidade detectado através de determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM), apresentou valores elevados para esta classe de antimicrobianos, com cepas resistentes ao ácido nalixídico (CIM de 32mg/L) e suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina (CIM: 0,125-1 mg/L). Estes isolados são caracterizados por mutações pontuais no gene *gyrA* (DNA girase) e ocasionalmente uma substituição adicional de nucleotídeos no gene *parC* (CHAU, et al., 2007).

A propagação destes organismos é preocupante quando se considera a falta de alternativas viáveis e a crescente correlação entre CIM de fluoroquinolonas crescentes e falhas terapêuticas (PARRY et al., 2011).

Os alvos para ação das quinolonas são a DNA girase e a topoisomerase IV, cujas subunidades são codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* e genes *parC* e *parE*, respectivamente (HIROSE et al., 2002). Mutações pontuais individuais na região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) no gene *gyrA* levam a resistência ao ácido nalixídico e a sensibilidade diminuída à ciprofloxacina, e mutações adicionais podem ser necessárias para se atingir um alto nível de resistência às fluoroquinolonas (HOOPER, 2001; JACOBY, 2005).

Inicialmente, acreditava-se que a resistência às quinolonas era mediada apenas por genes cromossômicos. Contudo, a situação mudou radicalmente com a descoberta de uma variedade de determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (RQMP) (XIONG et al., 2011). 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). Cinco famílias de genes *qnr* são conhecidas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* e *qnrD*). Outro mecanismo determinante de RQMP reconhecido é o gene *aac(6)-Ib-cr*, que codifica uma variante da acetiltransferase de aminoglicosídeos (ROBICSEK et al., 2006a).

Os genes de RQMP conferem um baixo nível de resistência às quinolonas, no entanto, a sua relevância clínica deriva da sua capacidade de poderem suplementar mecanismos de resistência pré-existentes devido a mutações cromossômicas nas regiões-alvo das quinolonas e ainda permitir a seleção de mutantes resistentes a concentrações de quinolonas (doses terapêuticas) que seriam letais na sua ausência.

A possibilidade de transmissão de resistência entre *Salmonella* spp. e outros microrganismos presentes no meio ambiente, pelo envolvimento de plasmídeos servem como importantes ferramentas para a compreensão dos mecanismos de resistência a quinolonas e fluoroquinolonas, e a possível dispersão destes mecanismos, assim como detectar se a aquisição desta resistência esta associada ou não a presença dos antimicrobianos por pressão de seleção.

A eletroforese de campo pulsado (PFGE) é baseada na análise da estrutura genética de um organismo e incluem polimorfismos em padrões de restrição no DNA com base na clivagem do cromossoma por enzimas de restrição, bem como a presença ou ausência de DNA extra-cromossômico. Esta metodologia está menos sujeita a variação natural, embora possa ser afetada por inserções ou exclusões de DNA no cromossomo, o ganho ou a perda de DNA extra-cromossômico ou mutações aleatórias que podem criar ou eliminar os sítios de restrição das endonucleases, permitindo com isso avaliar a variação gênica de cepas resistentes e a dispersão de clones por região, período e origem de isolamento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Doenças Transmitidas por Alimentos

Doença transmitida por alimento (DTA) é uma síndrome de natureza infecciosa ou tóxica causada pela ingestão de alimentos e/ou de água que contenham agentes etiológicos de origem biológica, física ou química em quantidades que afetam a saúde do consumidor individual ou de um grupo da população, constituindo um grave problema de ordem pública, podendo acarretar perdas econômicas significativas (NYACHUBA, 2010; WELKER et al., 2010).

A sub-notificação de surtos de origem alimentar mascara a real importância da DTA na saúde da população (GREIG; RAVEL, 2009). Grande parte dos casos não é notificada às autoridades sanitárias, devido à natureza branda dos sintomas causados por muitos dos patógenos relacionados à DTA, sendo descartada a procura por auxílio médico (COSTALUNGA; TONDO, 2002; FORSYTHE, 2010). Surtos relacionados à DTA costumam ser notificados na maioria dos países (inclusive no Brasil) quando envolvem um número significativo de indivíduos, ou quando o período dos sintomas é prolongado (CARMO et al., 2005).

Embora a dificuldade de registro das DTA mascare a real situação em nível mundial, relatos oficiais demonstram um aumento significativo de DTA. Este possivelmente está associado a fatores como: o aumento da população; existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; processo de urbanização, na maioria das vezes desordenado; produção e consumo de alimentos em condições inadequadas; aumento na produção de alimentos e do comércio internacional; melhoria dos sistemas de vigilância epidemiológica e a melhoria dos métodos de diagnóstico e estrutura laboratorial para análises (TAUXE, 2002; BRASIL, 2010).

Outros fatores adicionais incluem a utilização de novas modalidades de produção, aumento no uso de aditivos, mudanças de hábitos alimentares, alterações climáticas e ambientais, globalização e facilidades atuais de deslocamento da população, em nível nacional e internacional, podem colaborar de forma menos expressiva (TAUXE, 2002; BRASIL, 2010).

Segundo Scallan e colaboradores (2011), os quatro enteropatógenos de maior importância a nível mundial relacionados a casos de morbidade e mortalidade são, *Salmonella* spp. não tifóide, *Campylobacter* sp., *Shigella* spp. e *Yersinia enterocolitica*, porém, o Ministério da Saúde (MS) aponta como agentes etiológicos de maior relevância em surtos de DTA *Salmonella* spp., *E. coli*, *S. aureus*, *Shigella* spp., *B. cereus* e *C. perfringens* (BRASIL, 2010).

A relevância da *Salmonella* spp. como patógeno causador de DTA é também verificada em diversas partes do mundo (GREIG; RAVEL, 2009). Esta afirmativa pode ser corroborada por trabalho realizado por Greig e Ravel (2009), onde ao analisar relatórios publicados de fontes governamentais e artigos publicados relacionados a surtos identificados no período de 1988 e 2007 ocorridos nos EUA, Canadá, União Européia (UE), Austrália, Nova Zelândia e outros países, registraram 4.093 surtos, sendo 70% causados por *Salmonella* spp, *Norovirus* e *E. coli*.

Neste contexto os sorovares *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* são os mais relacionados aos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil (BABU et al., 2006).

Com o intuito de obter mais informações a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do Ministério da Saúde, desenvolveu o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA). Esse sistema, implantado em 1999, em parceria com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Instituto Pan-Americano de Alimentos, da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), visa reduzir a incidência das DTA no Brasil (BRASIL, 2010).

De acordo com o Sistema de Monitoramento de doenças diarréicas agudas (MDDA), Ministério da Saúde, de 1999 a 2004, ocorreram 2.395.485 casos de doença diarréica aguda (DDA) (BRASIL, 2005).

No Brasil 9.719 surtos de DTA foram notificados entre o período de 2000 a 2014 (BRASIL, 2009), sendo a *Salmonella* spp. o agente causal de maior relevância (38,2% de casos identificados), seguidos dos casos relacionados à *Staphylococcus* spp. (19,5%), *Escherichia coli* (13,3%) e *Bacillus cereus* (7,8%). Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná e Santa Catarina foram os Estados que apresentaram maior registro de surtos, o que pode estar relacionado com a melhor implantação do sistema de VE-DTA nos municípios (BRASIL, 2014).

## **2.2 Gênero *Salmonella* spp.**

### **2.2.1 Considerações gerais**

O gênero *Salmonella* spp. é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae* que se apresentam como bastonetes corados em rosa (negativa) quando da utilização da técnica de Gram. Possuem dimensões aproximadas de 0,7-1,5  $\mu\text{m}$  de largura por 2-5 $\mu\text{m}$  de comprimento, não são produtoras de esporos, são aero-anaeróbios facultativos, produtores de ácido e gás a partir da fermentação da glicose (com exceção do sorovar *S. Typhi*), com a capacidade de utilizar o citrato como única fonte de carbono (CLARKE; GYLES, 1993; BARROW, 1999; POPOFF et al., 2004; D'AOUST; MAURER, 2007; SVS, 2011).

Outras características bioquímicas deste gênero são a capacidade de descarboxilação da lisina e ornitina pela ação de descarboxilases, produção de sulfeto de hidrogênio, produção da enzima catalase, indol, Voges-Proskauer e oxidase negativos (LE MINOR, 1984; SVS, 2011).

A temperatura ótima para multiplicação celular deste gênero ocorre entre 35 e 37°C, podendo suportar uma variação de temperatura de 5 a 47°C (sendo que a temperatura mínima e máxima varia entre os diferentes sorovares). O pH ótimo de crescimento fica próximo de 7,0 com valores de pH superiores a 9 e inferiores a 4 apresentando ação bactericida. Em se tratando de acidificação, diferentes ácidos com maior potência podem variar quanto ao pH ótimo para inibição das salmonelas podendo subir para 5,5, como é o caso dos ácidos propiônico, acético e butírico que são mais potentes que o ácido clorídrico em um mesmo pH. São também inibidas pela presença de nitrito (que é potencializado pela acidificação do pH). Apresentam baixa tolerância a altas concentrações de sal sendo inibidas em concentrações de sal maiores que 9% (LE MINOR, 1984; D'AOUST; MAURER, 2007; FERREIRA; BAILEY et al., 2010).

Outra característica importante deste gênero bacteriano é a mobilidade que a maioria dos sorovares apresenta devido à presença de flagelos peritríqueos (com algumas exceções como *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* que são imóveis) (LE MINOR, 1984; BAILEY et al., 2010).

Embora a atividade hídrica interfira diretamente no crescimento (sendo 0,94 a tolerância mínima de atividade da água) este gênero bacteriano é capaz de sobreviver por mais de um ano em alimentos com baixa atividade de água (BAILEY et al., 2010; SVS, 2011).

### **2.2.2 Histórico**

O gênero *Salmonella* spp. foi assim denominado em 1900 pelo pesquisador Lignières que propôs este nome em homenagem dada ao médico veterinário Daniel E. Salmon do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA) que em 1885 isolou estes bacilos de suínos doentes, sendo responsabilizados de forma equivocada como o agente etiológico da peste suína, posteriormente denominado de *Bacillus cholerae suis*. Em 1888 foi novamente identificada em um cadáver humano sendo o óbito ocorrido devido a uma gastroenterite associada à ingestão de carne bovina crua. Esta bactéria foi então denominada de *Bacillus enteritidis*, nomenclatura aceita até a sua modificação para *Salmonella* por Lignières em 1900 (aceita até os dias atuais) (MERCHANT; PARKER, 1980; SNOEYENBOS; WILLIAMS, 1991). Há ainda relatos mais antigos do isolamento de *Salmonella* spp. como patógenos em 1880 por Eberth, que isolou as bactérias até então conhecidas como *Bacterium typhosa*, a partir de baço e linfonodos de seres humanos. Apenas entre 1920 e 1930 ocorreram os primeiros relatos de surtos em aves relacionados à salmoneloses em frangos e perus (SILVA et al., 2007).

Em 1925 a partir da utilização de provas sorológicas foram identificados mais de 900 sorotipos de *Salmonella*, através das terminologias aplicadas por White que deram origem ao esquema de Kauffman-White (que foi reconhecido pela comunidade científica em 1932), facilitando a classificação deste gênero bacteriano que era considerada de difícil realização no início do século XX (CÔRREA; CORRÊA, 1992).

Embora o avanço conseguido pelas provas sorológicas aliadas ao esquema de Kauffman-White tenha facilitado sua classificação taxonômica a nomenclatura da *Salmonella* spp. ainda passava por dificuldades na manutenção de uma classificação universal (GRIMONT et al., 2000).

Em 1944 as salmonelas foram classificadas como pertencentes às espécies *S. typhosa*, *S. choleraesuis* e *S. Kauffmannii*, ocorrendo mais tarde à modificação da nomenclatura da espécie *S. Kauffmannii* que em 1952 passou a se chamar *S. enterica* (SKERMAN et al., 1980).

Já em 1966 foi proposto um novo sistema de classificação baseado na classificação bioquímica com a criação de quatro subgêneros, sendo em 1980 criado uma nova lista contendo 5 espécies de *Salmonella*, sendo estas a *S. arizonae*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhi* e *S. typhimurium* (SKERMAN et al., 1980), porém logo em seguida Le Minor e colaboradores (1982) propuseram uma nova classificação onde todos os sorotipos de *Salmonella* spp. detectados fossem englobados em apenas uma espécie a *S. choleraesuis* sendo esta espécie subdividida em seis subespécies: *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, *S. choleraesuis* subsp. *salamae*, *S. choleraesuis* subsp. *arizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *diarizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *Houtenae* e *S. choleraesuis* subsp. *bongori*. Mais uma subespécie (denominada *S. choleraesuis* subsp. *indica*) foi identificada por Le Minor e colaboradores (1986) dando origem a sexta subespécie.

Com o auxílio de técnicas de biologia molecular (como hibridação do DNA) as salmonelas são classificadas em duas espécies: *S. enterica*, com 2.637 sorovares e *S. bongori* (ISSENHUT-JEANJEAN et al., 2014).

Desde a sua fundação o Centro de Colaboração da Organização Mundial de Saúde (WHOCC-Salm) passou pela supervisão de diferentes representantes sempre com a função de manter, atualizar e regularizar a lista dos diferentes sorovares de *Salmonella* spp. existentes. Com a mesma visão o Centro contou com a atuação de Kauffmann do *Staten Serum Institute*, localizado em Copenhague, na Dinamarca do período de 1934 a 1965, passando por Le Minor no *Institut Pasteur* em Paris entre 1965 a 1989, Popoff do *Institut Pasteur* no período de 1989 a 2003 e Grimont e Weil de 2003 a 2007 (GRIMONT; WEIL, 2007).

O primeiro esquema de Kauffmann-White publicado apresentava 44 sorovares distintos. Já em 1964 com a saída de Kauffmann já haviam sido relatados 958 sorovares. Em

1989 a lista já contava com 2267 sorovares, sendo que em 2003 Popoff já havia relatado 2555 sorovares diferentes de salmonela (POPOFF et al., 2004).

### 2.2.3 Classificação

O gênero *Salmonella* spp. é identificado a partir de suas características bioquímicas e antigênicas (GRIMONT et al., 2000; POPOFF et al. 2004). Atualmente é dividido em duas espécies *S. enterica* e *S. bongori*, sendo a espécie *S. enterica* subdividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, e *S. enterica* subsp. *Indica*. No caso da *Salmonella bongori* esta não apresenta subespécie (POPOFF et al. 2004; CORTEZ et al., 2006; FORSHELL; WIERUP, 2006, GERMANO; GERMANO, 2008).

Atualmente 2.659 sorovares de *Salmonella* spp. foram identificados e classificados segundo o esquema de Kaufman e White (2014) sendo diferenciados com base na composição dos seus antígenos de parede, mais precisamente na combinação entre seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e os antígenos capsulares (Vi) (POPOFF et al. 2004; FORSHELL; WIERUP 2006; FERREIRA; BAILEY et al., 2010; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). O quadro 1 apresenta as espécies subespécies e distribuição quantitativa dos sorovares identificados até os dias atuais.

**Quadro 1** Distribuição quantitativa dos sorovares de *Salmonella*, de acordo com as espécies e subespécies.

Espécies	Subespécies	Nº de sorovares
<i>S. enterica</i>	<i>Enterica</i>	1586
	<i>Salamae</i>	522
	<i>Arizonae</i>	102
	<i>diarizonae</i>	338
	<i>Houtenae</i>	76
	<i>Indica</i>	13
<i>S. bongori</i>		22
Total		2659

Fonte: (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014).

O antígeno somático é composto por lipopolissacarídeos que fazem parte da parede celular bacteriana, sendo responsáveis por quadros febris quando lançados na corrente sanguínea do hospedeiro por sua endotoxidade (DOYLE; CLIVER, 1990).

O antígeno flagelar tem sua composição baseada em material protéico (flagelina) que se estende além da parede celular tendo a função de locomoção da célula bacteriana (DOYLE; CLIVER, 1990).

O antígeno capsular (Vi) é encontrado em apenas alguns sorotipos de *Salmonella* como a *S. Typhi*, *S. Dublin*, *S. Hirschfeldii* e *S. Paratyphi C* (DOYLE; CLIVER, 1990).

Há ainda outro tipo de antígeno celular as fimbrias (antígeno F ou pili tipo 1) que apresentam a função de adesão celular, estando presentes na superfície celular (DOYLE; CLIVER, 1990).

Tendo em vista a grande variação de sorotipos pertencentes a este gênero estes foram agrupados a partir do antígeno somático ao qual pertencem sendo criado pelo Manual de

Bergey 50 grupos somáticos que são classificados em ordem alfabética por letras maiúsculas, como por exemplo, sorogrupos A, B, C1, C2, D entre outros sendo que 98% dos sorotipos mais prevalentes pertencem aos 12 primeiros grupos (DOYLE; CLIVER, 1990). Porém por não haver letras suficientes a classificação dos grupos somáticos deve de continuar com os números indo de 51 a 67 (GRIMONT; WEILL, 2007).

Atualmente esta forma de referenciar os grupos somáticos tem caído em desuso, sendo estes referenciados com base na característica do fator O. Porém ainda se encontra publicações que referenciam o grupo somático pelas letras em parênteses, como por exemplo, O: 9 (D) (GRIMONT; WEILL, 2007).

Segundo o esquema proposto por Kaufman e White (2004) os sorovares de salmonela são descritos com a primeira letra do nome maiúscula não usando o itálico em sua descrição (POPOFF, 2001). Estes são classificados de acordo com a relação entre seus antígenos somáticos, flagelares e capsulares (para os sorotipos que apresentam este tipo de antígeno), sendo que os antígenos somáticos (antígenos O) são classificados através de números arábicos (1, 2, 3, 4...) e os flagelares (antígeno H) por letras do alfabeto em minúsculo e números arábicos. Os antígenos flagelares ocorrem em duas fases (1 e 2), sendo a primeira fase classificada por letras minúsculas(a, b, c, d...) e a fase 2 classificada por números arábicos (1, 2, 3, 4...). A maioria das salmonelas são bifásicas (apresentam as duas fases flagelares), outras (por deleções nos genes responsáveis pela produção flagelar) podem se apresentar monofásicas e algumas podem ser imóveis (não apresentar flagelo algum) (GERMANO; GERMANO, 2008).

Em relação à grafia do gênero, espécie, sub-espécie e sorovar, considera-se internacionalmente aceito o esquema proposto pelo CDC dos Estados Unidos, no qual o gênero, a espécie e a subespécie são escritos em letras itálicas e o sorovar em letras romanas, por exemplo: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis. Por conveniência, costuma-se citar apenas o gênero e o sorovar, grafando-se, por exemplo, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis, etc (CDC, 2002).

Os antígenos O e Vi são termorresistentes tolerando temperaturas de aquecimento de até 100 °C sem que haja perdas em sua estrutura enquanto que os antígenos flagelares são termolábeis podendo ser destruídos a altas temperaturas (GERMANO; GERMANO, 2008).

#### **2.2.4 Epidemiologia**

As salmoneloses são amplamente distribuídas no ambiente sendo seu habitat natural o trato gastro-intestinal do homem e de animais, como aves em geral, mamíferos domésticos e silvestres, répteis, sem a manifestação de sintomas na maioria das espécies hospedeiras, sendo estas portadoras assintomáticas eliminando continuamente *Salmonella* spp. nas fezes (GERMANO; GERMANO, 2008).

Alguns sorotipos de *Salmonella* spp. tem um reservatório animal específico, como por exemplo, a *S. Enteritidis* PT4, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* em aves, a *S. Choleraesuis* em suínos e *S. Abortus ovis* em ovinos (HUMPHREY, 2000; GERMANO; GERMANO, 2008).

São adaptadas ao hospedeiro humano a *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B e C, respectivamente, agentes da febre tifóide e Paratifóide (HUMPHREY, 2000; GERMANO; GERMANO, 2008). Vale ressaltar o papel dos animais de estimação como principais reservatórios de *S. Typhimurium*, *Enteritidis* e *Newport* (SILVA JUNIOR, 1995).

Essa diversidade leva a classificação epidemiológica da *Salmonella* spp. em três grupos distintos: as que podem infectar homens e animais, por não apresentarem hospedeiro específico; as específicas de humanos (*S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B e C), sendo transmitidas de uma pessoa para outra de forma direta ou indireta; as espécie-específicas de animais (como *S. Pullorum* e *Galinarum* em aves), que não causam enfermidades em humanos (CAFFER; TERRAGNO, 2001).

A maioria dos sorovares de *Salmonella* spp. é patogênica para animais, sejam domésticos ou silvestres, os quais atuam como reservatório da infecção humana (LINS, 1970; 1971a; LOUREIRO, 1985; HUMPHREY, 2000). Dessa forma, sua transmissão pode estar associada à ingestão de alimentos derivados de fontes animal (BAÚ, et al., 2001).

De modo geral, a patogenicidade da *Salmonella* spp. está associada a diferentes fatores ligados ao hospedeiro e à bactéria, ou seja, varia com o sorotipo, idade e condições de saúde (FONSECA et al., 2008).

Este grupo de sorovares que não apresentam especificidade de hospedeiro, classificados como “salmonelas zoonóticas”, são responsáveis pelos quadros de gastroenterite (enterocolite) ou infecções alimentares no homem. Destacam-se os sorovares *Salmonella* ser. Typhimurium, que além do quadro gastroentérico pode determinar infecção septicêmica em animais jovens e no homem, assim como *Salmonella* ser. Infantis e *Salmonella* ser. Agona reconhecidas por determinar infecções graves em crianças (BOYEN et al., 2008; FONSECA et al., 2008).

Pode-se considerar atualmente a *Salmonella* spp. como sendo um dos microrganismos mais frequentes envolvidos em casos de doenças de origem alimentar pelo mundo, frequentemente reportado em países como: Áustria (MUCH et al., 2009); Brasil (TAVECHIO et al., 2002; NADVORNY et al., 2004; GEIMBA et al., 2005; VAN AMSON et al., 2006); Estados Unidos (GERNER-SMIDT; WHICHARD, 2007); Espanha (DOMÍNGUEZ et al., 2007); Inglaterra e Gales (HUGHES et al., 2007); Japão (KUBOTTA et al., 2008) e outros.

A *European Food Safety Authority* reportou que, no período entre 2001 e 2005, ocorreram 5.355 surtos de doenças de origem alimentar, dos quais 3.406 (63,6%) foram causados por *Salmonella* spp. Em 2009 ocorreram 108.614 surtos de salmoneloses, com uma diminuição de 17,8% em relação ao número de surtos ocorridos em 2008 (EFSA, 2011). Os sorovares predominantes encontrados na região europeia foram *S. Enteritidis* e *S. Choleraesuis* (GREIG; RAVEL, 2009).

A estimativa apresentada é de cerca de 8000 mortes/ano nos Estados Unidos, com incidência de cerca de 20 casos por 100.000 habitantes/ano. Na Hungria e na Finlândia a estimativa é de 120 casos por 100.000 habitantes/ano (WHO, 2012). Em razão da sua elevada endemicidade e, sobretudo, pela dificuldade de controle (SANTOS et al., 2002; ANTUNES et al., 2003), representam uma das zoonoses mais problemáticas para a saúde pública em todo o mundo, com significantes índices de morbidade e mortalidade (CARDOSO et al., 2002).

Em relação ao Brasil, sob o ponto de vista epidemiológico foi evidenciado que no período entre 2005 a 2010, 4.716 surtos de DTA notificados, com 98.018 pessoas acometidas e registros de 39 óbitos segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (WHO, 2012). Particularmente no Estado de São Paulo, foram notificados ao Departamento de Vigilância Epidemiológica (DEVEP/SVS), 878 surtos de doenças transmitidas por alimentos, com 20.471 casos. No Rio Grande do Sul, foram notificados 1.275 surtos de DTA residenciais, atribuídas a ingestão de alimentos de origem animal (44%) e 18% por alimentos de origem mista. Basicamente entre as matrizes alimentares envolvidas, 83,6% dos casos tiveram alimentos oriundos da cadeia avícola: com incidência de 72,2% de alimentos preparados com ovos e incidência 11,4% de carne de frango. No entanto, esse quadro não demonstra completamente a realidade atual, visto que muitas vezes há a falta/omissão de notificação de casos ao Sistema de Saúde.

Mudanças constantes vêm sendo observadas nos últimos anos em relação à distribuição, frequência e prevalência de determinados sorovares em diversos lugares do mundo. Ressalta-se o aparecimento súbito e multifocal da *Salmonella* ser. Agona no início da década de 70 nos Estados Unidos, Reino Unido, Holanda e Israel (CLARK et al., 1973), cuja introdução recaiu na hipótese sobre a contaminação da farinha de peixe peruana utilizada como ingrediente das rações, sendo posteriormente veiculada, implantada e propagada em



diferentes espécies animais de abate, atingindo subsequentemente o homem. De modo semelhante, difundiu-se internacionalmente, situando-se em posição de relevância em vários países, constituindo o sorovar mais prevalente no Brasil especialmente na década de 80 (SOLARI et al., 1986).

No entanto, este panorama foi alterado com a emergência da *Salmonella* ser. Enteritidis a partir dos anos 90, representando um sério problema no setor avícola e em saúde pública, devido seu elevado índice em quadros de infecções humanas, decorrentes da ingestão de alimentos contaminados (REIS, 1994; OLSEN et al., 2001; CARDOSO; CARVALHO, 2006).

Durante esta década, salmonelose humana por *Salmonella* ser. Enteritidis vinha sendo descrita como um grave e crescente problema em vários países de avicultura desenvolvida, particularmente nos Estados Unidos (EUA) e União Européia (HUMPHREY, 1990; BARROW, 1993; MUNRO et al., 1999; VELGE et al., 2005; ASSEVA et al., 2006), com os quais o Brasil vinha mantendo forte intercâmbio comercial na compra de material genético (SILVA; DUARTE, 2002).

Consequentemente, o reflexo da disseminação da *Salmonella* ser. Enteritidis foi prontamente evidenciada no Brasil, pelas constatações realizadas por Peresi e colaboradores (1998) de surtos ocorridos no estado de São Paulo no período entre 1993 a 1997; Alves e colaboradores (2001) em São Luís /MA; e ainda na região Sul, por Santos e colaboradores (2002), no período 1995 e 1996; Geimba e colaboradores (2005), em 1999 e 2000; e Oliveira (2005) entre 2001 e 2002.

Particularmente no Brasil, há evidências de alguns sorovares prevalentes como *S. enterica* sorovares Enteritidis, Typhimurium, Mbandaka, Minnesota, Panama, Infantis. Estes detectados através de estudos epidemiológicos e de monitoramento demonstram oscilações quanto à sua frequência, no entanto se mantém presentes em níveis variáveis em todas as fontes da cadeia alimentar (RODRIGUES et al., 2010).

Um levantamento epidemiológico recentemente realizado pelo Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB, IOC/FIOCRUZ/RJ) apontou um panorama global dos sorovares de *Salmonella* spp. circulantes no país no período de 2000 a 2009, retratando a incidência de *Salmonella* spp. em diferentes fontes da cadeia epidemiológica, incluindo isolados de fonte humana, alimentar, animal, ambiental, matéria-prima e rações (RODRIGUES et al., 2010). Segundo os autores, o número de sorovares detectados neste período (em torno de 93), manteve-se relativamente constante, mas avaliando a ordem dos sorovares individualmente dentro do ranking de prevalência, podem-se observar flutuações ano a ano. Neste estudo, foi possível reconhecer que particularmente a *Salmonella* ser. Enteritidis foi considerada durante 7 anos o sorovar mais prevalente em isolados de origem humana, cujos índices diminuíram a partir de 2004, dando lugar a *Salmonella* ser. Typhimurium. Em cepas de origem animal, entre os 10 mais prevalentes nos anos de 2008 e 2009, destacaram-se a *S. enterica* sorovares Typhimurium, Enteritidis e Schwarzengrund, enquanto que para as provenientes de matéria-prima, rações e ambiente, os índices apontaram a prevalência dos sorovares Agona, Panama, Minnesota e Senftenberg, envolvendo diferentes regiões do país. Por outro lado, em cepas de origem alimentar, o aumento da incidência de *Salmonella* ser. Corvallis vêm sendo evidenciado nos últimos anos, desde sua introdução em 2007 (RODRIGUES et al., 2010).

### 2.3 Quinolonas

As quinolonas são amplamente utilizadas na clínica médica e na medicina veterinária, como profiláticos, promotores de crescimento na produção animal ou no tratamento de infecções clínicas (CATTOIR; NORDMANN, 2009).

No tratamento de infecções humanas são usados como alternativa para diversas infecções, como as intestinais por *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. além da utilização em infecções por bactérias produtoras de ESBL. Na medicina veterinária seu principal uso se refere ao controle de agentes bacterianos relacionados à produção animal principalmente em aves e suínos (PHILIPS et al., 2004), sendo a evolução da resistência um problema em ambas as áreas.

Nas últimas décadas é cada vez mais frequente o aparecimento de isolados de *Escherichia coli* na clínica médica com o perfil de resistência elevado as fluoroquinolonas de segunda geração assim como em alguns tipos de animais de produção. Este fato não parece ser recíproco quando se avalia isolados do gênero *Salmonella* spp. onde estes padrões de altos níveis de resistência não são frequentemente encontrados em amostras de origem animal ou humana. Alguns pesquisadores sugerem esta situação como consequência de algum mecanismo de resistência a fluoroquinolona diferenciado em *Salmonella* spp. que limita a emergência de cepas resistentes (SOUZA et al., 2010).

O gênero *Salmonella* spp. não costuma apresentar resistência as quinolonas quando se utiliza os parâmetros do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) como referência. Embora ainda seja considerada relativamente incomum neste gênero se comparada à frequência a outros da família Enterobacteriaceae, é cada vez mais comum a detecção de isolados com suscetibilidade reduzida a esta classe de antimicrobianos. Porém atualmente percebe-se uma mudança neste quadro de resistência, com a alteração no ponto de corte da ciprofloxacina em 2013 pelo CLSI para isolados do gênero *Salmonella* spp. (KE et al., 2014).

### **2.3.1 História da descoberta e evolução das quinolonas**

O ácido nalidíxico é considerado o predecessor da família das quinolonas, pertencente à primeira das quatro gerações existentes atualmente desta classe de antimicrobianos. A quinolona foi primeiramente descoberta em 1962, quando Leshner e colaboradores descreveram o ácido nalidíxico como resultado de alterações de um composto isolado da produção da droga anti-malárica a cloroquina, a 7 cloroquinolona, que apresentava características bactericidas (LESHNER et al., 1962; SOUZA et al., 2006). Porém o ácido nalidíxico foi aprovado para uso clínico apenas em 1967. A atividade limitada às enterobactérias e o fato de não alcançar concentração sérica adequada restringiram a indicação deste para o tratamento de infecções urinárias não complicadas (ANDRIOLE, 1998; LUZZARO, 2008). Algumas pesquisas acreditam que a cloroquina, do qual o ácido nalidíxico é derivado, seja a primeira fluoroquinolona (ANDRIOLE, 1998; BALL, 2000).

A primeira geração também inclui quinolonas como o ácido pipemídico, o ácido oxolínico e o cinoxacino que foram introduzidas em meados dos anos setenta, sendo estes apenas melhorias do ácido nalidíxico. Apesar de possuírem atividade antimicrobiana discretamente superior à do ácido nalidíxico, tais compostos não constituíram descoberta significativa, embora o ácido pipemídico (sintetizado no Japão) já apresentar alguma atividade, ainda que limitada, contra *Pseudomonas aeruginosa*. Com características farmacocinéticas semelhantes ao NAL, ele também é indicado para infecções urinárias não complicadas (ANDRIOLE, 1998; MERÉNS; SERVONNET, 2010).

A identificação da enzima DNA girase em 1976 levou a uma melhor compreensão do mecanismo de ação, possibilitando o desenvolvimento das quinolonas. Outro fator significativo foi à capacidade de manipular o núcleo quinolônico, levando à obtenção de inúmeras substâncias substituídas em várias posições no anel central, com melhora nas propriedades farmacocinéticas, aumento na meia-vida e ampliação da atividade antibacteriana (ANDRIOLE, 1998; MERÉNS; SERVONNET, 2010).

A partir da década de 1980, foram realizadas maciças pesquisas a partir das quinolonas de primeira geração, dando origem as chamadas quinolonas de segunda geração, com a

incorporação da molécula de flúor na posição 6 do anel quinolônico, sendo denominadas a partir de então de fluorquinolonas (CATTOIR; NORDMANN, 2009).

Lançada em 1986, a primeira quinolona desse grupo foi a norfloxacin, que apresenta excelente atividade em bactérias Gram-negativas aeróbias, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, e boa atividade também contra bactérias Gram-positivas. Indicada para infecções urinárias, infecções gonocócicas uretrais e cervicais não complicadas e prostatite e infecções gastrointestinais, embora com limitações em termos de farmacocinética e farmacodinâmica (MERÉNS; SERVONNET, 2010).

As principais representantes a ciprofloxacina, enrofloxacin, orbifloxacin, difloxacina e marbofloxacina. A descoberta das fluorquinolonas ampliou o leque de atividades das quinolonas, uma vez que estas apresentam, além da ação contra Enterobacteriaceae, ação contra a *P. aeruginosa* e a ampliação do espectro de ação para as bactérias Gram-positivas; ciprofloxacina e a ofloxacina apresentam ainda atividade contra *Chlamydia* sp., *Mycoplasma* sp. e *Legionella* sp. (MERÉNS; SERVONNET, 2010).

### 2.3.2 Estrutura química e classificação

Por se tratar de uma classe de antimicrobianos com diversos representantes as quinolonas são normalmente subdividas em gerações, entretanto, existem divergências entre autores quanto à proposta de classificação baseada nas estruturas químicas ou atividades biológicas. Alguns fazem a divisão baseados no espectro de ação, enquanto outros no período de lançamento (SILVA, 2002).

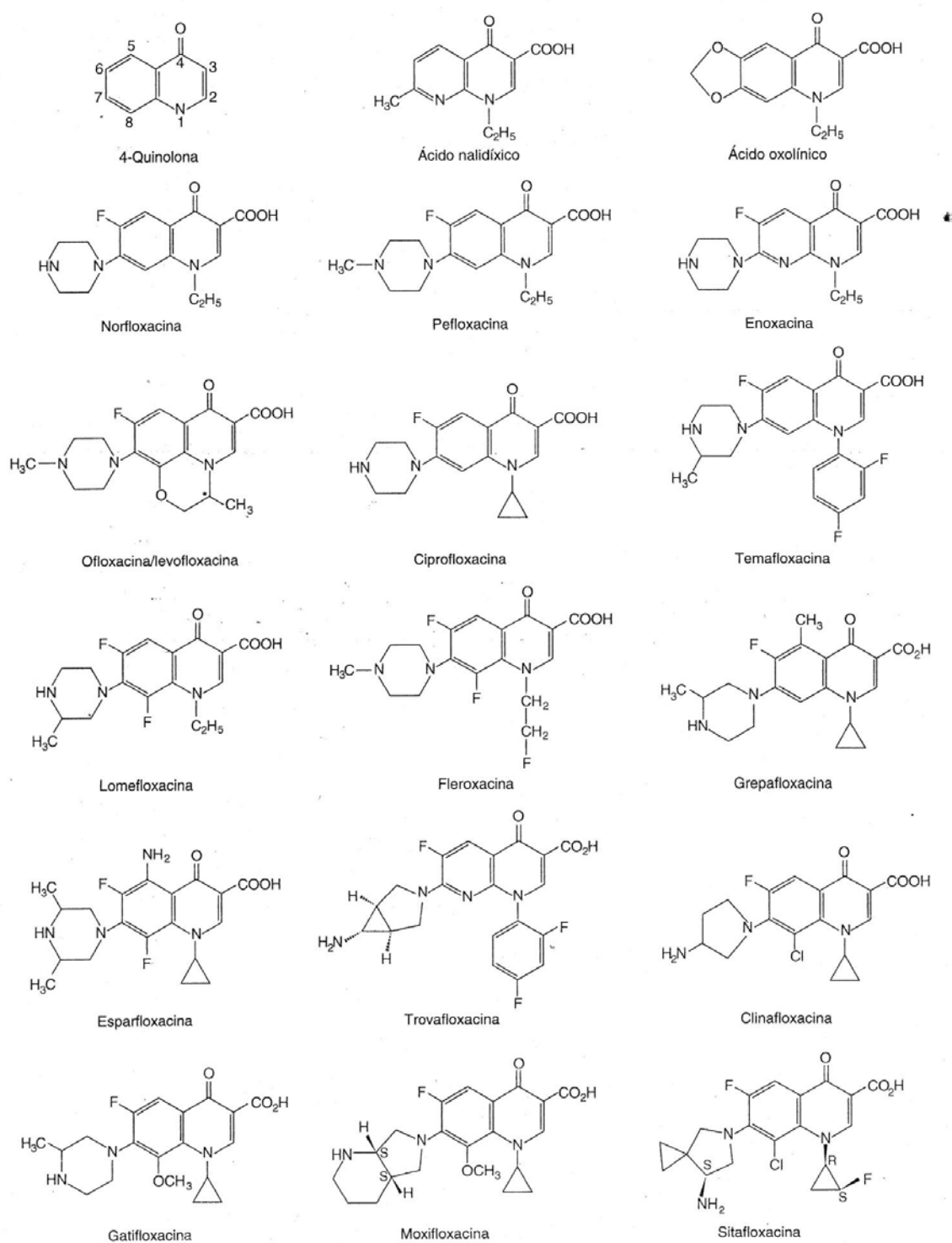
Outro agravante quanto à classificação desta classe de antimicrobianos é o número de novos compostos sintetizados, com diversas estruturas químicas e atividades antimicrobianas, dificultando a elaboração de uma classificação prática e completa (BRYSKIER; CHANTOT, 1995; SILVA, 2002), devido a esse incremento as quinolonas de terceira e quarta gerações são apelidadas de quinolonas de espectro ampliado enquanto as quinolonas de primeira e segunda de quinolonas convencionais (BAAL, 2000).

Atualmente não existe um padrão universal para classificação das quinolonas, sendo que o único consenso internacionalmente empregado é quanto à classificação das quinolonas pertencentes à primeira geração por não apresentarem moléculas de flúor em suas estruturas químicas.

As quinolonas de primeira geração, também chamadas de 4-quinolonas ou ácidos carboxílicos quinolônicos, tem sua estrutura baseada em um ciclo comum (Figura 1), o ácido 4-oxo-1,4-diidropiridino-3-carboxílico condensado na posição orto com outro ciclo de natureza aromática, sendo que este núcleo é denominado 4-oxo-1,4-quinolona ou simplesmente 4-quinolona (CARVALHO, 1998). Essa estrutura de dois anéis hexagonais com um azoto na posição 1, um grupo carbonil na posição 4 e um grupo carboxil ligado ao carbono na posição 3 do primeiro anel como ilustrado na Figura 2 (SILVA 2002).



**Figura 1** Estrutura básica das quinolonas (HOOPER, 2000).



**Figura 2** Estruturas de alguns exemplares de quinolonas (SILVA, 2002).

O ácido Nalidíxico é estruturalmente uma 1,8-naftiridina com substituintes 1-etil e 7-metil. O ácido oxolínico (anel de quinolona) e a cinoxacin (anel de cinolina) também possuem substituintes 1-etil e um anel dióxido ligando as posições 6 e 7 (SILVA, 2002).

Nem todas as quinolonas desenvolvidas apresentam este núcleo principal, algumas possuem estrutura química, características farmacológicas e antimicrobianas semelhantes. Esses análogos podem pertencer ao grupo das naftiridinas, cinolinas, piridopirimidinas e 2-

piridonas. Contudo, todos os compostos disponíveis atualmente são quinolonas ou naftiridinas (HOOPER, 2001).

O quadro 2 de classificação das quinolonas é baseada no espectro de atividade antimicrobiana, criando quatro gerações de quinolonas, com o aumento da atividade antimicrobiana das quinolonas relativo ao desenvolvimento de novas gerações (BALL, 2000).

**Quadro2** Classificação das quinolonas (Adaptado de: SILVA, 2002).

Classificação	Quinolonas/fluorquinolonas
<b>Primeira geração</b>	Ácido nalidíxico Ácido oxolínico Cinoxacina
<b>Segunda geração</b>	Norfloxacin Ciprofloxacina <sup>a</sup> / Enrofloxacin <sup>b</sup> Enoxacina Lomefloxacina Ofloxacin
<b>Terceira geração<sup>c</sup></b>	Levofloxacina <sup>d</sup> Esfarfloxacina Gatifloxacina <sup>e</sup> Grepafloxacina <sup>f</sup>
<b>Quarta geração</b>	Gatifloxacina <sup>e</sup> Gemifloxacina <sup>g</sup> Trovafloxacina <sup>g</sup> Moxifloxacina <sup>g</sup>

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

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

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

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

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

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

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

A primeira geração de quinolonas tem ação antimicrobiana restrita à Gram-negativos, com exceção à *Pseudomonas aeruginosa*, não apresentando atividade inibitória frente a bactérias Gram-positivas, atípicas e anaeróbias (SOUZA et al., 2006; LUZZARO, 2008). Este grupo se caracteriza pela presença de estruturas moleculares menos complexas, sem a presença do flúor em sua composição, como por exemplo, o Ácido Nalidíxico, o Ácido Pipemídico, o ácido Oxolínico, a Rosoxacina e a Cinoxacina (SOUSA et al., 2006; CATTOIR; NORDMANN, 2009). A primeira geração de quinolonas é raramente utilizada hoje em dia, sendo seu uso restrito às infecções urinárias não complicadas.

A segunda geração de quinolonas é representada pelas primeiras quinolonas fluoradas ou fluoroquinolonas desenvolvidas a partir da incorporação de uma molécula de flúor na posição R6 do anel quinolônico. Esta modificação levou a uma potencialização no poder de penetração destes agentes na célula bacteriana ampliando seu potencial de ação frente às

bactérias Gram-negativas e englobando algumas bactérias Gram-positivas em seu espectro de ação. (LUZARO et al., 2008; CATTOIR; NORDMANN, 2009; SOUZA et al., 2010; SINGH et al., 2012).

Como representantes desta geração destacam-se as quinolonas monofluoradas como a norfloxacin, ciprofloxacina, enrofloxacin (uso restrito à medicina veterinária) ofloxacin, tosufloxacin e perfloxacin. (LUZARO et al., 2008; CATTOIR; NORDMANN, 2009; SINGH et al., 2012). Devido à diversidade de indicações clínicas, ciprofloxacina e ofloxacin têm sido os antimicrobianos mais amplamente utilizados nas últimas décadas (SADER, 1999; HOPKINS et al., 2005). A ciprofloxacina é a quinolona com maior atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e ainda apresenta a vantagem de ter boa penetração óssea.

A emergência de resistência bacteriana nas gerações anteriores e a constante evolução das fluoroquinolonas levaram ao desenvolvimento das terceiras e quarta gerações de quinolonas (APPELBAUM; HUNTER, 2000; SOUZA et al., 2006).

A terceira geração se caracteriza pelo aumento de atividade antimicrobiana frente a isolados Gram-positivos, por possuir ação restrita contra algumas bactérias anaeróbias e por microrganismos atípicos como *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae*. Embora esta geração apresente um maior potencial de ação contra as bactérias Gram-negativas do que as gerações anteriores (PALLO-ZIMMERMAN et al., 2010; SOUZA et al., 2010; SINGH et al., 2012).

Esta geração é representada pelas fluoroquinolonas bi e tri-fluoradas, como por exemplo, a grepafloxacin e a gatifloxacin entre outras. A orbifloxacin é o único representante veterinário reconhecido nesta geração (PALLO-ZIMMERMAN et al., 2010). Este amplo espectro de ação se deve ao emprego de um grupamento NH<sub>2</sub> na posição 5 conferindo maior potencial frente a bactérias Gram-positivas (SOUZA et al., 2006).

A quarta geração de quinolonas apresenta eficácia terapêutica frente à Gram-negativos, Gram-positivos, anaeróbios estritos, microrganismos atípicos intracelulares, anaeróbios e possui atividade similar a da ciprofloxacina frente a isolados de *Pseudomonas* sp. (CATTOIR; NORDMANN, 2009; SOUZA et al., 2010; SINGH et al., 2012). Isto se deve principalmente à introdução de um radical metóxi na posição 8, sendo assim denominados C8-metóxi-quinolonas (SADER, 1999; SOUZA et al., 2010; SINGH et al., 2012). As alterações realizadas nas drogas pertencentes a esta geração permitiram a redução do efluxo da célula bacteriana e aumentar a potência contra *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. resistentes a outras quinolonas (FUKUDA et al., 2001). Na quarta geração encontram-se os mais novos representantes das quinolonas, como a clinafloxacina, gatifloxacin, moxifloxacin e trovafloxacin (SOUZA et al., 2010; SINGH et al., 2012).

### 2.3.3 Mecanismos de ação

O mecanismo de ação das quinolonas é baseado na inibição das atividades catalíticas das enzimas DNA girase e topoisomerase IV, ambas com importantes funções relacionadas à replicação, recombinação e transcrição do DNA bacteriano (SOUZA et al., 2010).

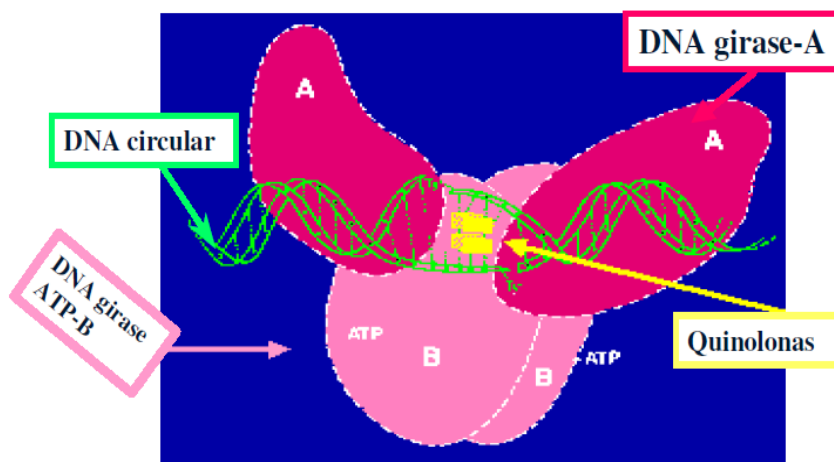
As topoisomerases são enzimas de importância, na arquitetura do DNA cromossômico bacteriano. O mecanismo de ação está relacionado com a ligação ao DNA formando complexos capazes de ser captados pelas quinolonas. Neste caso, o complexo ternário quinolona-enzima-DNA bloqueia a replicação do DNA, o movimento do ácido ribonucleico (RNA) polimerase e, conseqüentemente, o crescimento celular (GENTRY; OSHEROFF, 2013).

A DNA girase é a única enzima bacteriana que introduz superespirais negativos e retira superespirais positivos da molécula de DNA. Esta é uma enzima tetramérica formada por duas subunidades A e duas subunidades B (A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>), codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*,

respectivamente (DOUGHERTY et al., 2001; CATTOIR; NORDMANN, 2009; MÉRENS; SERVONNET, 2010).

Outra enzima que participa do processo de replicação celular bacteriana é a topoisomerase IV que esta envolvida no relaxamento e na separação do DNA tendo a função de separar os círculos ligados resultantes da duplicação do DNA bacteriano (separação das moléculas-filhas de DNA interligadas, que são os produtos da finalização), permitindo posteriormente a segregação das células filhas (HOOPER, 2001; SILVA, 2002). Esta é também uma enzima tetramérica, formada por duas subunidades C e duas subunidades E (C2E2), codificadas pelos genes *parC* e *parE*, respectivamente (DOUGHERTY et al., 2001; ALDRED et al., 2013).

As quinolonas se ligam especificamente ao complexo DNA-enzima (não se ligam a enzima DNA girase sozinha), bloqueando a ação desta após a clivagem dos filamentos e antes do religamento (recolagem) do DNA. A inativação deste complexo gera uma ruptura do DNA que a célula dificilmente consegue reparar constituindo assim uma barreira física impedindo o avanço da forquilha de replicação (HOOPER, 1999; HOOPER, 2001; SILVA, 2002). As quinolonas se fixam através de pontes de hidrogênio, entre os grupos carbonila e carboxila dos anéis quinolônicos e as bases do DNA, sendo que os grupamentos adjacentes são unidos à mesma fita, orientados em sentidos opostos para evitar repulsão de cargas (DRLICA, 1999). As quinolonas ainda são responsáveis por promover um efeito tóxico para a célula ao capturar uma ou ambas as enzimas do cromossomo bacteriano criando um complexo ternário, medicamento-enzima-DNA (Figura 3), no qual as fitas duplas rompidas do DNA são mantidas juntas pelas enzimas (ALDRED et al., 2013).

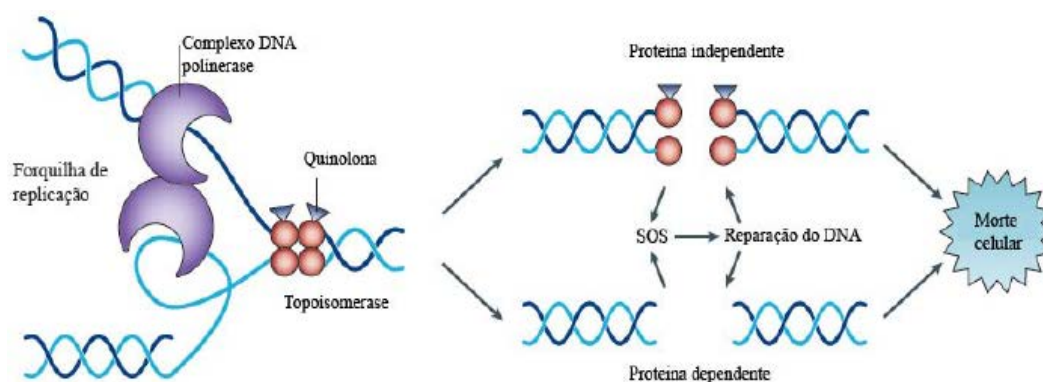


**Figura 3** Complexo ternário: DNA GIRASE-DNA-QUINOLONAS (HOOPER, 2001).

As quinolonas, utilizadas no tratamento de infecções causadas por enterobactérias, agem principalmente se ligando na subunidade A da DNA girase impedindo que ocorra o religamento dos cortes produzidos por esta enzima, gerando um efeito bacteriostático (CÉSPEDES, 2008; ALDRED et al., 2013). Com a remoção do complexo quinolona-DNA Girase, há a liberação da dupla fita rompida de DNA.

O efeito bactericida é provocado pela manutenção das rupturas geradas que vão relaxar as espirais do DNA, fazendo com que este ocupe maior espaço que o contido no limite do corpo bacteriano. Além disso, as extremidades livres do DNA induzem a síntese descontrolada de RNA mensageiro que leva a uma exagerada produção de proteínas e de exonucleases. As rupturas no DNA geram ainda um sinal para ação destas exonucleases, que ao clivar os nucleotídeos, vão gerar cortes permanentes em todo DNA bacteriano (TAVARES, 1996; HOOPER, 1999; CÉSPEDES, 2008; CARTTOIR, 2009) (figura 4).





**Figura 4** Mecanismo de ação das quinolonas (KOHANSKI et al., 2010).

A afinidade pelo sítio de ação depende do gênero da bactéria e da estrutura química da quinolona. Nas bactérias Gram-negativas atuam com maior eficácia na enzima DNA girase tendo atividade secundária nas topoisomerases IV, enquanto que nas Gram-positivas o seu sítio de atuação principal é a topoisomerase IV (SOUZA et al., 2006; PALLO-ZIMMERMAN et al., 2010).

A estrutura química das quinolonas irá influenciar diretamente seu mecanismo de ação. Quinolonas de segunda geração como a ciprofloxacina e a ofloxacina apresentam excelente atividade contra a DNA girase de bactérias Gram-negativas e contra as topoisomerase IV de bactérias Gram-positivas. Porém, contra a DNA girase de Gram-positivos e contra as topoisomerase IV de Gram-negativos sua ação é relativamente fraca. Com isso, mutações pontuais nos genes bacterianos que codificam a enzima pela qual a quinolona apresenta maior atividade podem gerar resistência, pois sua atuação na outra enzima (Girase de Gram-positivos ou Topoisomerases IV de Gram-negativos) não será suficiente para inibir o crescimento bacteriano (DRLICA; ZHAO, 1997).

No entanto, a estrutura química das novas quinolonas faz com que estas apresentem excelente atividade contra ambas às enzimas, tanto em bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas, proporcionando não só maior potência como também tornando mais difícil o desenvolvimento de resistência, devido à necessidade de apresentação de mutações nas duas enzimas, para ineficácia completa do antimicrobiano, pois a atuação em qualquer uma das enzimas será suficiente para inibir o crescimento bacteriano (HOOPER, 1999).

Pode se concluir que a penetração na bactéria, assim como sua afinidade as topoisomerases, são processos determinantes no espectro de atividade das quinolonas (TRETTER; BERGER, 2012).

#### 2.3.4 Mecanismos de resistência

Os principais mecanismos de resistência às quinolonas estão associados a modificações no sítio de ação do fármaco e mutações que levam a diminuição da concentração celular e do acesso ao alvo das quinolonas (CATTOIR; NORDMANN, 2009; LASTOURS; FANTIN, 2010; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, et al., 2011a). Os primeiros são representados pelo mecanismo de resistência mediado por plasmídeo, que codificam uma família de pentapeptídeos interferindo na ação das quinolonas em seus alvos, e por mutações em genes que codificam as enzimas DNA girase e Topoisomerase IV especificamente em uma região denominada QRDR (Quinolone Resistance-Determining Region). Os segundos mecanismos estariam relacionados às alterações genéticas que levam a diminuição da permeabilidade celular e bombas de efluxo que diminuem a concentração celular das quinolonas, sendo que estes últimos na maioria das vezes levam à resistência a outras classes de antimicrobianos (CAVACO; AARESTRUP, 2009; XIA, 2010).

Estes mecanismos de resistência podem se apresentar de forma isolada ou em combinação. Em bactérias Gram-negativas as mutações no gene *gyrA* é o principal responsável pela determinação de resistência (RUIZ et al., 2012), porém a detecção de resistência as fluoroquinolonas de diferentes gerações se deve provavelmente a atuação de vários destes mecanismos simultaneamente (RODRIGUES-MARTÍNEZ et al., 2011b).

Outros genes de resistência transferíveis foram identificados como responsáveis por reduzida susceptibilidade às quinolonas: a variante *cr* da acetiltransferase de aminoglicosídeos (*aac(6')-Ib-cr*) e, por último, um mecanismo de extrusão de quinolonas mediado pelos genes codificantes de bomba de efluxo *qepA* ou *oqxAB* que, embora majoritariamente codificado em cromossomas, também pode ter origem plasmídica. Estes mecanismos de RQMP providenciam um baixo nível de resistência às quinolonas e demonstraram, *in vitro*, facilitar a emergência de mutantes de elevada resistência às quinolonas quando na presença de doses terapêuticas desta classe de antimicrobianos (PÉRICHON et al., 2007; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011b).

### **2.3.4.1 Resistência às quinolonas mediada por mutações cromossômicas**

#### **2.3.4.1.1 Mutações no sítio alvo**

As mutações nos genes que codificam para a DNA girase e topoisomerase IV constituem o mecanismo mais prevalente de resistência às quinolonas em *Enterobacteriaceae* (ITO et al., 2008; CAVACO et al., 2009). Este ocorre de modo escalonado e cumulativo, ou seja, mutações simples no sítio principal de ação da droga são associadas a moderados graus de resistência, enquanto mutações adicionais no sítio primário e/ou secundário levam ao alto grau de resistência (ITO et al., 2008; CAVACO et al., 2009).

Mutações simples tendem a elevar as CIM a níveis significativos em quinolonas de 1ª geração, como no caso do ácido nalidíxico que tende a apresentar um fenótipo de resistência, com CIM entre 64 e 128 µg/mL em Gram-negativos que apresentam mutações simples na região QRDR enquanto que as fluoroquinolonas apresentam CIM de 0,25-1,0 µg/mL nas mesmas condições, de baixa relevância clínica levando em consideração os pontos de corte do CLSI (ECDC, 2010). Porém, a presença de mutações adicionais acarreta um aumento da CIM, não só nas quinolonas de primeira geração, como também em fluoroquinolonas de gerações mais recentes como ciprofloxacina, levofloxacina, enrofloxacina, danofloxacina, difloxacina, marbofloxacina, que passam a apresentar valores acima de 2 µg/mL (ECDC, 2010).

#### **2.3.4.1.2 Mutações que restringem o acesso do antimicrobiano ao sítio de ação**

##### **2.3.4.1.2.1 Alterações nas porinas**

Outro mecanismo de resistência às quinolonas esta relacionado ao transporte desta classe de antimicrobianos entre as membranas da célula bacteriana, levando a redução da concentração intracelular, diminuindo o acesso das quinolonas em seu sítio alvo.

Devido ao seu papel fundamental na difusão entre a membrana externa de bactérias Gram-negativas (sendo a velocidade de difusão diretamente relacionada ao seu tamanho, carga elétrica e grau de hidrofilia) o número e o tamanho de porinas estão diretamente associados ao perfil de suscetibilidade as quinolonas. Com isso qualquer modificação no perfil destas porinas pode ser responsável pela aquisição bacteriana de redução da suscetibilidade as quinolonas. Geralmente estas alterações estão associadas a mutações em genes relacionados à expressão de porinas (RODRÍGUEZ-MARTINEZ et al., 2011a).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* apresentam três principais porinas: OmpA, OmpC e OmpF, sendo que a diminuição da expressão OmpF é responsável por aumentar o

perfil de resistência a diversas quinolonas (exceto Tosufloxacina e Esparfloxacina) e a determinados  $\beta$ - lactâmicos (CÉSPEDES, 2008; COYEN et al., 2011).

Atualmente há vertentes científicas que acreditam que estes eventos não estão relacionados a um perfil de resistência às quinolonas uma vez que ele só retarda o acúmulo destes antimicrobianos no interior da célula bacteriana (KE et al., 2014). Este fato pode ser corroborado pelo pequeno número de trabalhos que conseguiram relacionar a diminuição destas porinas ao perfil de suscetibilidade reduzida as quinolonas (ROBICSEK et al., 2006a; CAGNACCI et al., 2008; RODRÍGUES-MARTINEZ et al., 2011a; KE et al., 2014).

#### **2.3.4.1.2.2 Bombas de efluxo**

Outro mecanismo de resistência relacionado à diminuição da concentração de quinolonas no interior da célula bacteriana é a retirada das moléculas deste antimicrobiano por transporte ativo através de bombas de efluxo (RODRÍGUES-MARTINEZ et al., 2011b). Embora as quinolonas sejam de origem sintética, estes antimicrobianos servem de substratos para grande parte destas bombas de efluxo (HERNÁNDEZ et al., 2011).

Estas bombas são compostas por proteínas presentes na membrana celular com a função de eliminar substâncias tóxicas (incluindo antimicrobianos) do meio inter para o extracelular (NELSON, 2002; WEBBER; PIDDOCK, 2003), podendo ser específicas para um determinado tipo de substância ou transportando uma variedade de substâncias quimicamente semelhante.

A presença na membrana plasmática de bombas de efluxo com a função de reconhecimento das quinolonas como substrato, expulsarão este antimicrobiano do meio intracelular impedindo sua atuação no seu sítio alvo na DNA girase ou na topoisomerase IV. Bombas com este perfil são encontradas em diferentes espécies bacterianas. Mutações nos genes correspondentes podem levar a um aumento exponencial na expressão destas bombas gerando um aumento de 2 a 4 vezes na CIM do antimicrobiano (HOOPER, 2001).

Atualmente são reconhecidas 5 super famílias de bombas de efluxo de sistemas de multirresistência, sendo estas a família MF (main facilitator), MATE (multidrug and toxic extrusion), RND (resistance-nodulation-division), SMR (small multidrug resistance) e ABC (ATP binding cassette) (HERNÁNDEZ et al., 2011).

Estas famílias trabalham a partir da força de protomotriz para gerar energia ao transporte, com exceção da família ABC que utiliza como fonte de energia a hidrólise do ATP para extrusão celular de seus substratos (WEBBER; PIDDOCK, 2003; VILA et al., 2004; SÁNCHEZ-CÉSPEDES et al., 2007; KIM et al., 2009b).

Das superfamílias de bombas de extrusão anteriormente apresentadas apenas a família MF não demonstrou capacidade de extrusão celular às quinolonas sendo que as outras 4 apresentaram tal capacidade podendo ser encontradas tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas (HERNÁNDEZ et al., 2011). Na maioria dos casos as bombas de efluxo multidrogas não são específicas para um determinado substrato, o que acaba por gerar uma pequena variação no perfil de suscetibilidade as quinolonas quando estas se encontram com expressão aumentada na célula bacteriana (HERNÁNDEZ et al., 2011).

#### **2.3.4.2 Resistência às quinolonas mediada por plasmídeos**

##### **2.3.4.2.1 Determinantes QNR**

A descoberta de um mecanismo de resistência mediado pela transferência horizontal de genes por plasmídeo trouxe uma nova problemática à utilização desta classe de antimicrobianos frente a isolados da família *Enterobacteriaceae* (STRAHILEVITZ et al., 2009; KARAH et al., 2010; RODRIGUEZ- MARTINEZ et al., 2011a).

A resistência às quinolonas mediada por plasmídeos foi primeiramente descrita em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* em 1994 por Martinez-Martinez e colaboradores (1998) e mais tarde em *Escherichia coli* por Jacob e colaboradores (2003) e Wang e colaboradores (2003). Desde então o plasmídeo envolvido na resistência a quinolonas tem sido descrito em muitos outros gêneros da família *Enterobacteriaceae* (NORDMANN; POIREL, 2005; STRAHILEVITZ et al., 2009; RUIZ et al., 2012).

A descoberta deste mecanismo de resistência ocorreu com a utilização de quinolonas como antimicrobiano seletivo em experimentos para caracterização de um plasmídeo conjugativo (Pmg252), que continha genes que mediavam resistência a diversos antimicrobianos (como a  $\beta$ -lactamase FOX-5). Neste experimento a linhagem de *Escherichia coli* utilizada como receptora, apresentou um aumento significativo de sua concentração inibitória mínima às quinolonas de 8 a 64 vezes maior após a aquisição deste plasmídeo, sem apresentar alterações em suas porinas. O gene responsável por este perfil de resistência às quinolonas foi clonado, apresentando uma sequência de 657 nucleotídeos dando origem a uma proteína denominada Qnr, que mais tarde foi chamada QnrA devido à descoberta de variantes desta proteína (TRAN; JACOB, 2002; ROBICSEK et al., 2006), sendo novamente renomeado QnrA1 após a identificação de proteínas relacionadas (QnrA2-QnrA7) (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011b).

As proteínas QnrA são formadas por 218 aminoácidos tendo a função de proteção da *DNA girase* e da *topoisomerase IV* por competição ao sítio alvo impedindo a ligação das quinolonas, atuando de uma forma concentração dependente, desencadeando resistência ao Ácido Nalidíxico e diminuição da concentração inibitória mínima das fluoroquinolonas por impedimento da formação do complexo topoisomerase/DNA/quinolona, essencial para funcionabilidade desta classe de antimicrobianos (MINARINI et al., 2008; TEO et al., 2009; RODRIGUES-MARTINEZ et al., 2011b). No entanto a forma como estas proteínas competem com o DNA pela ligação à girase sem inibir funcionalmente sua atividade *in vitro* não foi bem elucidada (STRAHILEVITZ et al., 2009).

As proteínas Qnr (**Qui**Nolone **R**esistence) pertencem à família dos pentapeptídeos repetidos, sendo sua estrutura tridimensional ainda desconhecida (STRAHILEVITZ et al., 2009). Está representada por 500 membros sendo caracterizada por uma série de repetições de cinco aminoácidos. Nas repetições pentapeptídicas, nenhuma posição é completamente conservada, mas cada um dos resíduos exibe uma propensão para um restrito número de aminoácidos representados por: [Ser, Thr, Ala ou Val][Asp ou Asn][Leu ou Phe][Ser, Thr, ou Arg][Gly] (JACOBY et al., 2009; STRAHILEVITZ et al., 2009; CATTOIR; NORDMANN, 2009). Os genes *qnr* codificadores destas proteínas são amplamente difundidos tanto em estirpes suscetíveis, como nas resistentes entre as espécies da família *Enterobacteriaceae* (JEONG et al., 2011).

Outros genes codificantes de Qnr foram descritos após a descoberta desse mecanismo de resistência á quinolonas. Dentre estes destacam-se cinco famílias distintas destes genes sendo estas *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* e *qnrD* (CATTOIR; NORDMANN, 2009; STRAHILEVITZ et al., 2009; RODRIGUES-MARTINEZ et al., 2011b).

As estruturas primárias do *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* são semelhantes, com 9 repetições pentapeptídicas conectadas por uma única glicina (de função desconhecida), seguida de uma cisteína, com um número variável de unidades (22 no gene *qnrS*, 28 no gene *qnrA* e 29 nos genes *qnrB*, *qnrC* e *qnrD*) (STRAHILEVITZ et al., 2009).

Sua origem é desconhecida e muito questionada atualmente. Acredita-se que tiveram origem cromossômica provenientes de bactérias Gram-negativas e positivas de diferentes hábitat (CATTOIR; NORDMANN, 2009; STRAHILEVITZ et al., 2009; RODRIGUES-MARTINEZ et al., 2011b).

A integração dos genes *qnr* em diferentes plasmídeos tem sido um fator importante na disseminação entre os isolados da família *Enterobacteriaceae*. Estes costumam ser identificados em plasmídeos com 54 a 180 kb de tamanho aproximadamente, estando associada a uma ampla variedade de estruturas gênicas de captura e mobilização responsáveis por distintos mecanismos de disseminação (NORDMAN; MAMMERI, 2007).

Com o intuito de normatizar a classificação e a organização das proteínas QNR recentemente descobertas, foi criado um banco dados onde os novos alelos *qnr* são armazenados no site <http://www.lahey.org/qnrStudies> (JACOBY et al., 2008). Os alelos gênicos descobertos em DNA cromossômicos de uma determinada bactéria são classificados com as iniciais dessa bactéria, seguidos da abreviação *qnr*, como por exemplo, *Vcqnr* de *Vibrio cholera* (FONSECA et al., 2008).

#### 2.3.4.2.2 Determinantes AAC(6')-Ib-cr

Em 2005 um novo mecanismo de resistência às quinolonas mediado através de transferência plasmidial fora descrito nos Estados Unidos por Robicsek e colaboradores (2006) ao trabalhar com isolados clínicos oriundos de Shangai coletados no período de 2000 a 2001. Este mecanismo de ação baseia-se na inativação enzimática de algumas fluoroquinolonas, levando à redução da atividade destes antimicrobianos antes de alcançarem seu sítio de ação (MÉRENS; SERVONNET, 2010). A enzima AAC(6')-Ib-cr, codificada pelo gene (*aac(6')-Ib-cr*) de origem plasmidial, é a responsável pela acetilação da amina no anel piperazínico das fluoroquinolonas quadruplicando assim a CIM destas drogas. (NORDMANN; POIREL, 2005; PARK, et al., 2006; ROBICSEK et al., 2006; BONOMO et al., 2007; PITOUT et al., 2008; JACOB et al., 2009; KIM et al., 2009b).

Ao se estudar estes isolados clínicos, oriundos da China, verificou-se um aumento significativo da CIM a ciprofloxacina nos isolados que apresentavam o gene *qnrA*, sendo este aumento superior aqueles de outros isolados que continham o mesmo gene. Diferentemente do que se era esperado estes não apresentavam um aumento da expressão do gene *qnrA* levantando a hipótese do possível envolvimento de outro mecanismo de resistência associado à presença de *qnrA*. A partir do detalhamento do integron que continha o gene *qnrA*, percebeu-se que havia a presença de outros genes associados a resistência no cassete gênico, sendo um destes o gene *aac(6')-Ib-cr* que foi implicado como o responsável por este aumento no fenótipo de resistência à ciprofloxacina (ROBICSEK et al., 2006).

Esta enzima é uma variante cr (do inglês ciprofloxacin resistance) da subclasse das enzimas AAC(6')-I, denominadas aminoglicosídeo-N-transeferases (AAC) por ter sua ação baseada na modificação de aminoglicosídeos por acetilação de seus grupos NH<sub>2</sub>, mediada por plasmídeos *aac(6')-Ib*, que geram resistência à Amicacina, Kanamicina e Tobramicina em isolados bacterianos que adquirem estes genes (ROBICSEK et al., 2006; BONOMO et al., 2007; JACOBY et al., 2009).

Após sua primeira aparição poucos relatos foram efetuados sobre estes genes, sendo verificada sua presença em Enterobactérias de origem asiática, algumas regiões da América do norte, Eslovênia (AVGUSTIN et al., 2007) e em países da América do Sul (QUIROGA et al., 2007; CORDEIRO et al., 2008).

Nos Estados Unidos foram detectados 44 isolados de *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. que apresentaram o gene *aac(6')-Ib-cr*, porém não foi possível correlacionar sua presença com a resistência à ciprofloxacina uma vez que os genes foram relatados tanto em isolados sensíveis como resistentes (PARK et al., 2006). Park e colaboradores (2006) chegaram ainda à conclusão de que a disseminação do gene *aac(6')-Ib-cr* pode ser realizada a partir de diferentes plasmídeos com a capacidade de carrear este gene, sendo sua dispersão oriunda de diferentes clones bacterianos.

A capacidade da enzima AAC(6')-Ib-cr acetilar não só aminoglicosídeos como também as quinolonas é de suma importância na capacidade de resistência bacteriana uma vez que estas últimas são de origem sintética, não havendo assim metabólitos com estruturas químicas análogas que pudessem explicar o surgimento de uma enzima com a capacidade de inativá-las (HERNÁNDEZ et al., 2011).

As diferenças estruturais apresentadas pela variante AAC(6')-Ib-cr estão resumidas pelas mutações nos códons 102 (pela substituição do triptofano pela arginina) e 179 (pela substituição do ácido aspártico pela tirosina), sendo ambas as mutações nos aminoácidos responsáveis pelo reconhecimento da enzima ao substrato, o que leva a uma consequente diminuição da capacidade de acetilar os aminoglicosídeos (PARK et al., 2006; ROBICSEK et al., 2006; PITOUT et al., 2008; JACOBY et al., 2009; KIM et al., 2009b).

#### **2.3.4.2.3 Bomba de efluxo de transferência plasmídeal (QepA e OqxAB)**

Além dos mecanismos de resistência às quinolonas associados à veiculação plasmídial apresentados anteriormente, outros elementos genéticos plasmídiais tem o papel de alterar o perfil de suscetibilidade a esta classe de antimicrobianos, através de um mecanismo relacionado à expulsão de moléculas de quinolonas do interior da célula bacteriana. Tal mecanismo é associado a duas proteínas transportadoras de quinolonas conhecidas como QepA e OqxAB (STRAHILEVITZ et al., 2009).

O primeiro sistema de efluxo a quinolonas identificado foi QepA descrito por Yamane e colaboradores (2007) identificado em uma cepa de *Escherichia coli* oriunda do Japão em um caso de infecção urinária em 2000, determinando um fenótipo resistência às quinolonas. Este sistema de efluxo de origem proteica é codificado pelo gene *qepA* encontrado no plasmídeo pHPA da linhagem *Escherichia coli* C316 localizado em um elemento de transposição entre duas cópias de IS26 (PERICHON et al., 2007; YAMANE et al., 2008), sendo responsável por determinar um perfil de resistência a aminoglicosídeos e  $\beta$ -talactâmicos de amplo espectro dando origem a isolados multirresistentes. Esta proteína apresenta ainda a capacidade de expulsar substâncias como o brometo de etídio e a acriflavina (CATTOIR; NORDMANN, 2009; STRAHILEVITZ et al., 2009; HERNÁNDEZ et al., 2011; RODRÍGUES-MARTÍNEZ et al., 2011a).

A bomba de efluxo QepA é uma proteína transmembranar composta por 511 aminoácidos, apresentando similaridade com proteínas da família de transportadores de 14 segmentos transmembranares pertencentes à superfamília MFS (Major Facilitator Superfamily Transporters). Esta proteína apresenta uma variante QepA2 codificada pelo gene *qepA2* com apenas duas substituições em relação à *qepA1* (Glicina ao invés de Alanina na posição 99 e Isoleucina no lugar de Valina na posição 144) sendo que esta variante confere um fenótipo similar de resistência às fluoroquinolonas comparado a QepA1 com capacidade de elevar em 32 a 64 vezes a CIM de determinados isolados (CATTOIR, et al., 2008; MINARINI et al., 2008; KIM et al., 2009a; STRAHILEVITZ et al., 2009).

A proteína transmembrana OqxAB é uma bomba de efluxo com capacidade de eliminar do interior da célula bacteriana não só uma gama significativa de antimicrobianos (incluindo as fluoroquinolonas) como também outras substâncias com características biocidas como o cloreto de benzalcônio e o triclosan (HERNÁNDEZ et al., 2011). Esta proteína pertence à família das bombas de efluxo RND (Resistance Nodulation Division) sendo codificada por dois genes (*oqxA* e *oqxB*) localizados em um mesmo operon, veiculados pelo plasmídeo conjugativo pOLA52, sendo ativados na presença do antibiótico olaquinox (um antibiótico derivado da quinolaxina amplamente utilizado como promotor de crescimento em criação de animais destinados ao consumo humano) (ZHAO et al., 2010; HERNÁNDEZ et al., 2011; COYEN et al., 2011).

Este mecanismo de resistência associado ao transporte ativo de antimicrobianos por ação de OqxAB foi identificado por Hansen e colaboradores (2007) em uma cepa de *Escherichia coli* isolada de fezes de suínos em 1995 que apresentava resistência ao olaquinox (HANSEN et al., 2007; STRAHILEVITZ et al., 2009; ZHAO et al., 2010; RODRIGUES-MARTINEZ et al., 2011a).

Acreditasse que os genes *oqxA* e *oqxB* encontrados no plasmídeo pOLA52 sejam originados de *Klebsiella pneumoniae* devido a similaridade gênica de 99,5 e 99% entre os genes *oqxA* e *oqxB* de isolados desta espécie. Transportadores ativos pertencentes à família RND se caracterizam pela necessidade da presença do gene *tolC* que codifica o canal transmembranar TolC, essencial na expulsão de antimicrobianos do interior da célula bacteriana por esta via (KIM et al., 2009a; ZHAO et al., 2010).

#### **2.4 Mecanismo de Resistência mediado por Integrons**

Avanços recentes na caracterização molecular dos mecanismos de resistência a antibióticos relatam a existência de estruturas genéticas, chamadas integrons, relacionadas à aquisição de genes de resistência (HALL; COLLIS, 1995). Estes elementos de DNA têm sido relatados frequentemente em cepas multirresistentes isoladas de animais e humanos, e são localizados no cromossoma bacteriano ou em plasmídeos de uma ampla gama de hospedeiros (CARATTOLI, 2001). Os integrons promovem a captura de um ou mais conjuntos de genes com o mesmo sítio de ligação, formando assim clusters compostos de genes resistentes a antibióticos (CARATTOLI, 2001). Atualmente são conhecidas nove classe de integrons, sendo os integrons de classe 1 os mais amplamente encontrados isolados clínicos, animais e ambientais.

Por estarem presentes em plasmídeos e transposons, contribuem para a disseminação e associação com a multirresistência aos antimicrobianos em membros da família Enterobacteriaceae e outras bactérias Gram-Negativas (LEVERSTEIN-VAN HALL et al., 2002).

As primeiras tentativas de descrever integrons sugeriam que estes consistiam de duas regiões conservadas vizinhas a uma região variável contendo um ou mais genes de resistência (CARATTOLI, 2001). Uma descrição mais detalhada de sua estrutura estabeleceu os componentes essenciais dos integrons, que são o gene *integrase* (*intl1*), o sítio de ligação (*attI1*) e o promotor, que promove a expressão de qualquer conjunto de cassetes de genes integrados ao sítio *attI1* (RECCHIA et al., 1994). Os integrons pertencentes à classe 1 também são caracterizados pela presença do gene *sul1*, que confere resistência a sulfonamidas, localizados distalmente no segmento conservado-3' ou 3'-CS (HALL; COLLIS, 1995). Este segmento também inclui o gene *qacEΔ1*, que confere resistência aos compostos de amônio quaternário. Estes cassetes móveis de genes estão integrados entre o 5'-CS e o 3'-CS (CARATTOLI, 2001).

A região variável do integron pode apresentar diversos cassetes gênicos inseridos, estes são compostos por um único gene e por uma sequência curta, denominada de elemento base 59 (59be) que funciona como sítio de recombinação específica, chamada de "sítio aatC" (RECCHIA et al., 1994). Os genes presentes nos cassetes gênicos normalmente não apresentam promotores, necessitando desta forma, da região integrase presente no integron para sua expressão. A integrase permite a interação e excisão dos cassetes na região variável do Integron (GONZÁLES et al., 2004). O número de cassetes gênicos associados aos integrons pode variar de nenhum a mais de 100 (). Os cassetes de genes que possuem integrons são capazes de conferir resistência a vários antibióticos diferentes, incluindo aminoglicosídeos, cefalosporinas, cloranfenicol, penicilinas e trimetoprim, e para cada um destes antibióticos, foram relatados vários cassetes de genes (GONZÁLES et al., 2004).

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Geral

O presente estudo teve como objetivo caracterizar os sorovares de *Salmonella* spp. circulantes na cadeia alimentar que apresentaram resistência às quinolonas de diferentes gerações, bem como avaliar o mecanismo genético de resistência e a dispersão clonal em diferentes regiões do Brasil no banco de dados do LRNEB.

### 3.2 Específicos

- Selecionar cepas resistentes a diferentes classes de quinolonas em banco de dados efetivando a confirmação de suas características;
- Caracterizar os sorovares de *Salmonella* spp. isolados da cadeia produtiva que apresentem resistência às quinolonas e/ou fluoroquinolonas;
- Detectar a presença de genes referentes à resistência adquirida as diferentes classes de quinolonas entre os isolados avaliados
- Avaliar a relação clonal entre os sorovares de maior prevalência que apresentam resistência as diferentes classes de quinolonas, através da técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PGFE).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostragem

Os isolados utilizados no presente estudo representam a totalidade de cepas pertencentes ao gênero *Salmonella* spp. que apresentaram resistência a quinolonas e fluoroquinolonas, selecionadas no banco de dados do Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas/LRNEB/IOC/RJ (N=152) no período de janeiro de 2009 a fevereiro de 2013. Destes, 39 isolados são oriundos de fontes alimentares de origem animal, 14 de origem do ambiente de produção animal, 32 de origem animal e 67 de origem humana. Todas as cepas são acompanhadas de fichas, sobre seu perfil epidemiológico, cujas informações foram inseridas em banco de dados utilizando programa Excel.

### 4.2 Confirmação/Identificação Bioquímica

As cepas selecionadas, mantidas em caldo BHI/glicerol -70°C e/ou Agar Nutriente Fosfatado (COSTA & HOFER, 1972), foram inoculadas em Caldo Nutriente (DIFCO) e incubadas a 37°C por 12–18 horas, sendo posteriormente semeadas em Agar Entérico Hektoen (OXOID) e incubadas à 37°C por 18 a 24 horas. Em sequência, as colônias características do gênero *Salmonella* foram repicadas simultaneamente em meio de triagem Costa & Vérnin (COSTA & HOFER, 1972) e Agar Nutriente inclinado (DIFCO) para as avaliações subsequentes ou diretamente do caldo BHI/glicerol -70°C, a partir do qual foi efetuado o inóculo necessário para a realização das técnicas de biologia molecular.

A confirmação do perfil bioquímico foi avaliada através da metodologia descrita por Edwards & Ewing (1986) (Quadro 3). Foram realizados os testes de produção de gás em meio de glicose, capacidade de utilização do citrato como única fonte de carbono em Meio Citrato de Simons (DIFCO), avaliação da mobilidade, produção de gás sulfídrico e de indol em Meio de SIM (DIFCO), e capacidade de descarboxilação do aminoácido lisina.

**Quadro 3** Perfil bioquímico de *Salmonella* spp., segundo Edwards & Ewing, 1986.

Provas Bioquímicas	Gênero <i>Salmonella</i>
Produção de Indol	-
Motilidade	+
Produção de H <sub>2</sub> S	+
Produção de gás em Glicose	+
Citrato de Simons	+
Descarboxilação da Lisina	+

### 4.3 Caracterização Antigênica

Todas as cepas tiveram seu perfil antigênico caracterizado através da técnica de soroglutinação rápida em lâmina, com antissoros poli e monovalentes, somáticos (O) e flagelares (H), preparados no Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, IOC/FIOCRUZ, RJ. A identificação do sorovar específico foi realizada com base no esquema sorológico de Kauffmann-White e representada de acordo com os critérios de Popoff e Le Minor (2007).

### 4.4 Confirmação do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos de Interesse

Para a confirmação dos valores de resistência e ou suscetibilidade intermediária a quinolonas e/ou fluoroquinolonas previamente analisados, e que motivaram a seleção destes isolados, foram realizados os testes de difusão em disco simples e microdiluição em caldo segundo os parâmetros estipulados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013 (CLSI), atualizado anualmente.

#### **4.4.1 Teste de disco difusão em agar**

##### **4.4.1.1 Preparo do inóculo**

Os testes de difusão em disco foram efetuados em cepas previamente identificadas segundo a metodologia recomendada pelo CLSI (2013).

As cepas de *Salmonella* spp. foram semeadas por esgotamento em Ágar Nutriente (DIFCO) e incubadas a 37° C por 24 horas, para obtenção de colônias isoladas.

A padronização do inóculo foi obtida a partir da seleção e repique de 4 a 5 colônias de cada cepa em 4,0 mL de Caldo Mueller-Hinton - MH (OXOID), sendo incubadas a 37° C por 2 a 6 horas até se obter uma turvação entre 8 a 10% de absorbância num comprimento de onda de 625nm no espectrofotômetro (densichek plus-biomerieux) equivalente a 0,5 da escala de Mac Farland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml).

##### **4.4.1.2 Antimicrobianos avaliados**

Foram utilizados fármacos representativos de diferentes gerações da classe de quinolonas, cujo critério de escolha teve por base, os antimicrobianos eletivos no controle e terapêutica das salmoneloses humana e veterinária, assim como aqueles empregados como promotores de crescimento animal.

Foram utilizados ainda fármacos representativos das classes: beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas de 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> geração); fenicóis; tetraciclinas; aminoglicosídeos; carbapenemas, inibidores de folatos e nitrofuranos (Quadro 4) de acordo com a orientação da OMS, quanto aos antimicrobianos utilizados no monitoramento da resistência bacteriana, incluindo drogas de última geração.

**Quadro 4** Drogas antimicrobianas (MARCA OXOID) utilizadas na avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana.

CLASSES	ANTIMICROBIANOS	SIGLA
Quinolonas (1ª geração)	Ácido nalidixico	<b>NAL</b>
Fluorquinolonas (2ª geração)	Ciprofloxacino	<b>CIP</b>
	Ofloxacino	<b>OFL</b>
	Enrofloxacino <sup>a</sup>	<b>ENO</b>
Fluorquinolonas (3ª geração)	Levofloxacino	<b>LEV</b>
Aminoglicosídeos	Gentamicina	<b>GEN</b>
	Estreptomicina	<b>EST</b>
Antifolatos	Sulfametoxazol-trimetoprim	<b>SXT</b>
Beta-lactâmicos		
Penicilinas	Ampicilina	<b>AMP</b>
Cefalosporinas	Cefoxitina	<b>FOX</b>
	Ceftriaxona	<b>CRO</b>
	Ceftazidima	<b>CAZ</b>
Carbapenemas	Imipenem	<b>IPM</b>
Fenicóis	Cloranfenicol	<b>CHL</b>
Tetraciclinas	Tetraciclina	<b>TCY</b>
Nitrofuranos	Nitrofurantoina	<b>NIT</b>

<sup>a</sup>antimicrobiano de uso restrito à medicina veterinária

#### 4.4.1.3 Realização da técnica

Os testes de difusão em disco foram efetuados segundo a metodologia recomendada pelo CLSI (2013) utilizando o Ágar Mueller-Hinton - MH (OXOID), preparado e esterilizado de acordo com as recomendações do fabricante, distribuído em placas de Petri de 100 mm de diâmetro, em volume de aproximadamente 20 mL, visando obtenção de camada interna de 4mm de profundidade.

A semeadura foi realizada com auxílio de swab em três direções (horizontal, vertical e diagonal). Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura com o auxílio de um dispensador (OXOID), após a absorção do inóculo, sendo posteriormente incubados por 18-24 horas a 35<sup>o</sup> C.

#### 4.4.1.4 Leitura e Interpretação

Após o período de incubação os diâmetros dos halos formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos foram observados e medidos, em milímetros com o auxílio de um paquímetro digital (MITUTOYO – Absolute Digimatic) (KOHNER et al., 1999). Os valores obtidos foram interpretados, segundo CLSI (2013) na tabela padrão de interpretação do teste de suscetibilidade antimicrobiana pelo método disco-difusão.

O quadro 5 especifica as zonas de inibição do diâmetro avaliado em milímetros dos antibióticos utilizados.

**Quadro 5** Padrão de Interpretação do Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos, CLSI humano e veterinário (atualizado anualmente).

Agente Antimicrobiano	Concentração do Disco	Diâmetro da Zona (mm)		
		S	I	R
Ácido Nalidíxico	30µg	≥19	14 – 18	≤13
Ciprofloxacina	5µg	≥31	21 – 30	≤20
Enrofloxacin <sup>a</sup>	5µg	≥23	17 – 22	≤16
Levofloxacina	5µg	≥17	14 – 16	≤13
Ofloxacina	5µg	≥16	13 – 15	≤12
Ampicilina	10 µg	≥17	14 – 16	≤13
Ceftriaxona	30µg	≥23	20 – 22	≤19
Cefoxitina	30µg	≥18	15 – 17	≤14
Ceftazidima	30µg	≥21	18 -20	≤17
Estreptomina	10 µg	≥15	12 – 14	≤11
Gentamicina	10µg	≥15	13 – 14	≤12
Tetraciclina	30µg	≥15	12 – 14	≤11
Sulfametoxazol-Trimetoprim	1.25/23.75µg	≥16	11 – 15	≤10
Cloranfenicol	30µg	≥18	13 – 17	≤12
Nitrofurantoina	300µg	≥17	15 – 16	≤14
Imipenem	10 µg	≥23	20 – 22	≤19

<sup>a</sup> antimicrobiano de uso veterinário

#### 4.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos avaliados

O método da microdiluição em caldo permitiu a avaliação da menor concentração antimicrobiana capaz de impedir o crescimento bacteriano.

##### 4.4.2.1 Preparo da Solução Antimicrobiana

Para realização desta técnica, foi preparada uma solução estoque de todos os antimicrobianos testados na concentração de 10mg/mL, utilizando-se os solventes e diluentes recomendados pelo CLSI (2013) (Quadro 6) sendo filtradas em filtro Millipore 0,2µm, distribuídas em alíquotas de 2 ml e acondicionadas em tubos de criopreservação, devidamente rotulados e mantidos em freezer a – 20°C.

**Quadro 6** Solvente e diluente utilizado no preparo da solução antimicrobiana, de acordo com o CLSI 2013 (de uso humano e veterinário).

ANTIMICROBIANO	MARCA	SOLVENTE	DILUENTE
Ácido Nalidixico	Sigma	Água	Água
Ciprofloxacina	Sigma	Água	Água
Enrofloxacina	Sigma	½ do volume de água e depois adicionar NaOH 0,1 mol/L gota a gota ate dissolver.	Água
Levofloxacina	Sigma	½ do volume de água e depois adicionar NaOH 0,1 mol/L gota a gota ate dissolver.	Água
Ofloxacina	Sigma	½ do volume de água e depois adicionar NaOH 0,1 mol/L gota a gota ate dissolver.	Água

#### 4.4.2.2 Preparo das placas de microtitulação

O meio recomendado é Caldo CAMHB-OXOID (CLSI 2013). Estes foram previamente preparados de acordo com as recomendações do fabricante, ajustando o pH entre 7.2-7.4 à cada partida de meio.

Posteriormente, foi acrescido ao Caldo CAMHB, o volume de solução antimicrobiana previamente preparada tomando-se por base as concentrações recomendadas pelo CLSI.

Foi distribuído 50µL de meio de cultura (acrescido de solução antimicrobiana), em placas de microtitulação esterilizadas com tampa, contendo 96 orifícios. Estas foram vedadas com parafilme e armazenadas a – 20° C.

#### 4.4.2.3 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo seguiu os mesmos procedimentos descritos no item 4.4.1.1

#### 4.4.2.4 Execução da Técnica de Microdiluição

Para a Determinação da Concentração Mínima Inibitória em placas de microtitulação, foram retirados 50µl do inóculo e adicionado nas microplacas previamente sensibilizadas com caldo CAMHB + solução antimicrobiana em diferentes concentrações. Estas foram incubadas 18 às 24h/35°C.

#### 4.4.2.5 Interpretação e divulgação dos resultados

Para a realização da leitura, as microplacas foram colocadas em superfície escura não reflexiva, para observar a presença ou ausência de turvação. A leitura é efetuada com base na observação de turbidez do último orifício com crescimento bacteriano e interpretada de modo quantitativo ou qualitativo, cujos critérios empregados, são apontados e revisados anualmente pelo CLSI (Quadro 7).

**Quadro 7** Padrão de Interpretação do Teste de Microtitulação em Caldo, de acordo com o CLSI (atualizado anualmente).

Agente Antimicrobiano	Padrão de Interpretação do MC (µg/mL)		
	S	I	R
Ácido Nalidixico	≤ 16	-	≥ 32
Ciprofloxacina	≤ 0.006	0.12-0.5	≥ 1
Enrofloxacina	≤ 0.25	0.5-1	≥ 2
Levofloxacina	≤ 0.25	0.5-1	≥ 2
Ofloxacina	≤ 0.25	0.5-1	≥ 2

#### 4.4.3 Controle de Qualidade do Teste

O controle de qualidade na execução e confiabilidade dos resultados foram obtidos com o uso de cepas padrão (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), sob as mesmas condições de meios de cultivo e incubação, segundo CLSI (2013).

Os resultados foram registrados e avaliados quanto aos níveis aceitáveis, de acordo com os valores referentes aos pontos de corte das cepas utilizadas como controle, segundo CLSI (2013) (Quadro 8).

**Quadro 8** Limites aceitáveis em cepas padrão utilizadas no controle de qualidade do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, CLSI (atualizado anualmente).

Agente Antimicrobiano	<i>S. aureus</i> ATCC® 29213		<i>E. coli</i> ATCC® 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853		<i>S. aureus</i> ATCC® 25923		<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	
	Mm	µg/mL	Mm	µg/mL	Mm	µg/mL	mm	µg/mL	Mm	µg/mL
Acido Nalidíxico	-	-	22-28	1-4	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacina	-	0,12-0,5	30-40	0,004-0,015	25-33	0,25-1	22-30	-	-	0,25-2
Enrofloxacina	-	0.03-0.12	32-40	0.008-0.03	15-19	1-4	27-31	-	-	0.12-1
Levofloxacina	-	0.06-0.5	29-37	0.008-0.06	19-26	0.5-4	25-30	-	-	0.25-2
Ofloxacina	-	0.12-1	29-33	0.015-0.12	17-21	1-8	24-28	-	-	1-4
Gentamicina	-	0,12-1	19-26	0,25-1	16 -21	0,5-2	-	-	-	4-16
Estreptomicina	-	-	12-20	-	-	-	14-22	-	-	-
Ampicilina	-	0,5-2	16-22	2-8	-	-	27-35	-	-	0,5-2
Ceftazidima	-	4-16	25 -32	0,06-0,5	22-29	1-4	16-20	-	-	-
Cefoxitina	-	1-4	23-29	2-8	-	-	23-29	-	-	-
Ceftriaxona	-	1-8	29-35	0,03-0,12	17-23	1-4	22-28	-	-	-
Cloranfenicol	-	2-16	21-27	2-8	-	-	19-26	-	-	-
Nitrofurantoina	-	8-32	20-25	4-16	-	-	18-22	-	-	4-16
Tetraciclina	-	0,12-1	18-25	0,5-2	-	8-32	24 -30	-	-	8-32
Imipenem	-	0,01-0,06	26-32	0,06-0,25	20-28	1-4	-	-	-	0.5-2
Sulfametoxazol-trimetopin	-	-	23-29	-	-	-	24-32	-	-	-

#### 4.5 Caracterização genotípica da resistência às quinolonas

##### 4.5.1 Amostragem

Para a caracterização de genes de resistência foi utilizada a Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em cepas que apresentaram o perfil intermediário ou resistente para as classes Quinolonas/Fluoroquinolonas após a realização das técnicas fenotípicas de determinação de resistência.

##### 4.5.2 Extração e Amplificação do DNA Bacteriano

Após crescimento em Caldo Trypticase Soja - TSB (MERCK) a 37°C/18h, alíquota de 1,5 mL da suspensão bacteriana foi transferida para tubo Eppendorf. Para extração do DNA total foi utilizada a técnica de adsorção seletiva do ácido nucléico em membrana de sílica gel, seguindo as recomendações descritas no KIT DNEASY TISSUE (QIAGEN). A medição do DNA purificado foi realizada através do Nanodrop (ND-1000 *Spectrophotometer* Uniscience) para obtenção de uma concentração final padronizada em 50nm.

#### 4.5.3 Primers empregados na caracterização de genes de resistência

As sequências de nucleotídeos iniciadores - "primers" (αDNA) utilizadas para a detecção de cassetes gênicos estão descritos no quadro 9. Foram avaliados genes relacionados à resistência às quinolonas mediada por elementos genéticos móveis (*QnrA*, B, S) e o gene *rrs* para o controle da reação multiplex, os genes *qnrC* e D para as reações simplex, os elementos genéticos associados a resistência aos aminoglicosídeos e quinolonas *aac(6)-Ib* e genes relacionados a presença de integron (*integrase*, integron variável), cuja sequência dos iniciadores e combinações encontram-se no GeneBank .

**Quadro 9** Sequência de oligonucleotídeos utilizados neste estudo

Primers	Sequência do primer (5'-3')	Gene alvo	Amplicon	Referência
QnrA-F	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	<i>qnrA</i>	516pb	Jacoby et al. (2009)
QnrA-R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA			
QnrB-F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	<i>qnrB</i>	469pb	Jacoby et al. (2009)
QnrB-R	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC			
QnrC-F	GGGTTGTACATTTATTGAATCG	<i>qnrC</i>	307pb	Kim et al. (2009)
QnrC-R	CACCTACCCATTTATTTCA			
QnrD-F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	<i>qnrD</i>	582pb	Cavaco et al. (2009)
QnrD-R	AACAAGCTGAAGCGCCTG			
QnrS-F	ACGACATTCGTCAACTGCAA	<i>qnrS</i>	417pb	Jacoby et al. (2009)
QnrS-R	TAAATTGGCACCCTGTAGGC			
rrs1	GGATTAGATACCCTGGTAGTCC	<i>rrs</i>	320pb	Pitout et al. (2008)
rrs2	TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC			
AAC(6')-Ib-F	TATGAGTGGCTAAATCGAT	<i>aac(6')-Ib</i>	482pb	Park et al. (2006)
AAC(6')-Ib-R	CCCGCTTTCTCGTAGCA			
Integrase-F	CCTCCCGCACGATGATC	<i>Integrase</i>	250pb	Peirano et al. (2006)
Integrase-R	TCCACGCATCGTCAGGC			
Integron-3	AAGCAGACTTGACCTGA	<i>Integron</i> (região variável)	Variável	Peirano et al. (2006)
Integron-5	GGCATCCAAGCAGCAAG			

As reações de amplificação foram preparadas em volume de 25µL, para avaliação através da PCR-multiplex e simplex realizado em um termociclador com programação, correspondendo cada uma a três etapas: desnaturação do DNA; anelamento dos iniciadores na região alvo e alongamento da fita de DNA, em diferentes tempos e temperaturas, correspondentes a cada iniciador utilizado.



#### 4.5.4 Preparo do MASTER MIX

Para a reação em cadeia da polimerase foram preparadas soluções de 25 $\mu$ L de Master Mix Platinum (INVITROGEN) nas concentrações apontadas no quadro 10.

**Quadro 10** Componentes e Concentrações utilizado no preparo do MIX para PCR

Componentes	Concentração Final	Objetivo
Tampão	1X	Estabilização o pH da reação
MgCl <sub>2</sub>	1,5Mm	Co-fator da enzima Taq DNA polimerase
DNTP	0,2Mm	Síntese de DNA
Primers	1.0 $\mu$ M/20 picomol	Oligonucleotídeo complementar para a amplificação
<i>Taq DNA</i> polimerase	0.025 U/ $\mu$ l	Ligação dos oligonucleotídeos à fita molde de DNA
DNA molde	1 $\mu$ g	DNA a ser analisado

#### 4.5.5 Condições de Amplificação

O material foi amplificado em termociclador (THERMO PX2 Thermal Cycler), cujas condições estão descritas no quadro 11.

**Quadro 11** Condições de amplificação empregadas na caracterização de genes de resistência.

GENES		CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO
<i>qnrA</i> <i>qnrB</i> <i>qnrS</i> <i>rrs</i>	Desnaturação Inicial	94°C 6 min, 1 ciclo
		94°C 45 seg, 53°C 45 seg, 72°C 1 min - 30 ciclos
	Extensão final	72°C 7 min, 1 ciclo - 4∞
<i>QnrC</i>	Desnaturação Inicial	94°C 30 seg, 1 ciclo
		94°C 45 seg, 50°C 50 seg, 72°C 45 seg – 30 ciclos
	Extensão final	72°C 2 min, 1 ciclo - 4∞
<i>QnrD</i>	Desnaturação Inicial	94°C 5 min, 1 ciclo
		94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min – 30 ciclos
	Extensão final	72°C 10 min, 1 ciclo - 4∞
<i>aac (6) Ib</i>	Desnaturação Inicial	94°C 2 min, 1 ciclo
		94°C 45 seg, 55°C 45 seg, 72°C 45 seg- 34 ciclos
	Extensão final	72°C 30 seg, 1 ciclo - 4∞
<i>Integrase</i>	Desnaturação Inicial	94°C 10 min, 1 ciclo
		94°C 1 min, 55°C 30 seg, 72°C 1 min - 35 ciclos
	Extensão final	72°C 10 min, 1 ciclo - 4∞
<b>Integron Variável</b>	Desnaturação Inicial	94°C 5 min, 1 ciclo
		94°C 1min, 54°C 1 min, 72°C 5 min - 35 ciclos
	Extensão final	72°C 10 min, 1 ciclo - 4∞

#### 4.5.6 Corrida e visualização do perfil molecular

Os produtos da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de Agarose 1% (SIGMA) em tampão TBE 1X (Tris Base 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 20 mM pH8,0 - ROCHE) em 90V por 1 hora e 30 minutos. Foi utilizado como referência o marcador de peso molecular eletivo de 1-kb (ladder-Gibco BRL). Após a migração os produtos foram corados pela imersão do gel em solução de Brometo de Etídio (10µd/mL) durante 10 minutos e posteriormente visualizado no equipamento ImageQuant 300 (GE Healthcare, **Waukesha, WI, EUA**) sendo realizada a foto-documentação para posterior análise.

#### 4.6 Relacionamento Clonal por Métodos Moleculares

##### 4.6.1 Eletroforese em campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*-PFGE)

Os critérios adotados para realização desta técnica seguiram os protocolos empregados pelo PulseNet ([www.cdc.gov/pulsenet](http://www.cdc.gov/pulsenet)) incluindo resumidamente na preparação do DNA os procedimentos de acordo com Heir e colaboradores (2000) e digestão com enzimas de restrição, segundo as orientações ditadas por Pfaller e colaboradores (1992), Tenover e colaboradores (1997) e Cooper (2006). A definição de clones teve como base as orientações preconizadas por Tenover e colaboradores (1997) e Barrett e colaboradores (2006).

#### **4.6.1.1 Preparo do inóculo**

As cepas de *Salmonella spp.* foram semeadas por esgotamento em Ágar Nutriente (DIFCO) e incubadas a 37 °C por 18 horas, para obtenção de colônias isoladas.

Cada isolado bacteriano foi suspenso em 4 mL de tampão para suspensão celular (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0), com auxílio de “swab” estéril, até a obtenção de turvação entre 8 a 10% de absorvância num comprimento de onda de 610nm no espectrofotômetro (densichek plus-biomerieux) equivalente a 1,0 da escala de Mac Farland ( $3 \times 10^8$  UFC/ml).

#### **4.6.1.2 Preparo dos plugs de agarose**

Um volume de 200 µL de cada suspensão bacteriana foi transferido para tubos tipo eppendorf estéreis, aos quais foi adicionada 10 µL de Proteinase K (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, EUA) na concentração de 20 mg/mL. Após esta etapa, foram acrescentados 200 µL de agarose Seakem Gold 1% (Cambrex Bio Science Rockland, Inc. Rockland, ME USA) em tampão TE, mantida à 50°C, e, imediatamente após ligeira homogeneização, a mistura foi dispensada em moldes re-utilizáveis, devidamente montados e identificados, para obtenção de pequenos blocos de gel de agarose contendo o DNA genômico, sendo 2 blocos por amostra.

#### **4.6.1.3 Lise celular dos plugs de agarose**

Após a solidificação em temperatura ambiente por 10 a 15 minutos, os blocos foram dispensados em tubos cônicos (50 mL) contendo 5 mL da solução tampão de lise celular (50 mM Tris: 50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosyl), acrescida de 25 µL de proteinase K a (20 mg/mL).

O DNA bacteriano contido nos blocos foi lisado por 2 horas a 55°C, com agitação de 150-175 rpm.

#### **4.6.1.4 Lavagem dos plugs de agarose após a lise celular**

Duas lavagens seriadas dos blocos foram realizadas com 10 mL de água MilliQ pré-aquecida a 50° C, com incubação a 50° C sob agitação de 175-200 rpm por 10 minutos em cada lavagem. Quatro lavagens subsequentes, com tampão TE (10 mM Tris: 1 mM EDTA, pH 8.0) pré-aquecido a 50° C, foram realizadas nas mesmas condições descritas acima. Após a última lavagem, os blocos foram imersos em 1 mL de TE em tubos de criopreservação e, então, mantidos a 4° C ou submetidos à digestão enzimática, conforme descrito a seguir.

#### **4.6.1.5 Digestão do DNA com enzima de restrição XbaI nos plugs de agarose**

Um corte de aproximadamente 2 mm de um bloco de cada amostra foi colocado em tubo tipo eppendorf estéril contendo a solução para digestão enzimática com 50 U da enzima de restrição *XbaI* (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, EUA) e, em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 2 horas. A reação de digestão foi, então, interrompida pela troca da mistura de digestão por 200 mL de TBE 0,5X.

#### **4.6.1.6 Preparo do gel de agarose**

Após a montagem adequada dos blocos digeridos no pente, a agarose Seakem Gold (Cambrex Bio Science Rockland, Inc. Rockland, ME USA) a 1,2% foi colocada no suporte para gel horizontal, onde permaneceu por 30 minutos em temperatura ambiente para solidificação.

#### **4.6.1.7 Condições de corrida em campo pulsado e visualização do perfil genético**

O gel foi, então, submetido à eletroforese de campo pulsado no equipamento CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), com TBE 0,5X a 14°C, com pulso inicial

de 2,2 e pulso final de 63,8, a 6 V/cm<sup>3</sup> por 19 horas. Após o final da eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio por 30 minutos e descorado em água destilada por uma hora. Os fragmentos gerados pela restrição enzimática foram visualizados em luz UV no equipamento ImageQuant 300 (GE Healthcare, Waukesha, WI, EUA) sendo realizada a fotodocumentação para posterior análise.

#### **4.6.1.8 Padronização do teste**

Uma amostra de *S. Braenderup* H9812, considerada o padrão universal para o PulseNet (HUNTER et al., 2005), foi utilizada como padrão para os fragmentos de restrição obtidos após a digestão, sendo dois blocos aplicados nas laterais e um no centro de cada gel.

#### **4.6.1.9 Análise computacional dos perfis de macro restrição**

Utilizando o software BioNumerics IV (Applied Maths), foram avaliadas as similaridades “pair wise” entre os padrões de restrição pela enzima *Xba*I com sequência de reconhecimento T↓\*CTAGA para *Salmonella*, sendo calculados pelo coeficiente de similaridade DICE com os clusters baseados no “Unweighted Pair-Group Method with Averages” (UPGMA) tendo tolerância e otimização de 1,5%. A *Salmonella* Braenderup cepa H9812 (ATCC BAA 664) foi utilizada como padrão de referência de bandejamento.

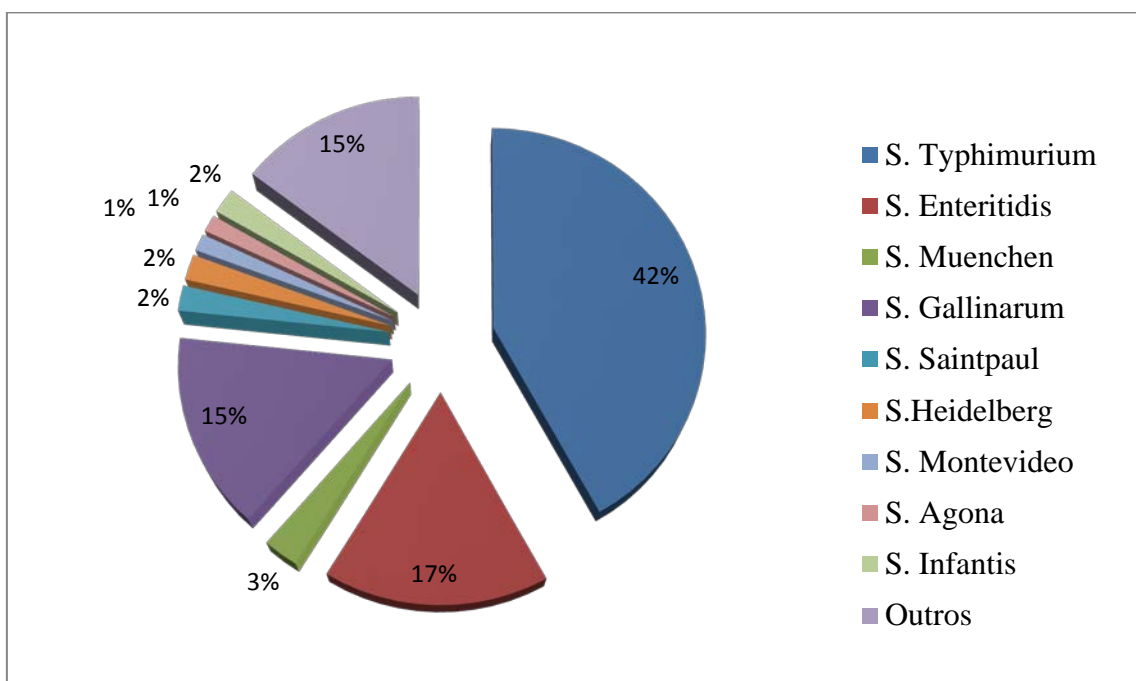
#### **4.7 Análise estatística**

Para se avaliar a correlação entre os testes fenotípicos de detecção de resistência às quinolonas/fluorquinolonas pela difusão em disco simples foi realizada a análise estatística dos resultados do teste de disco difusão e microdiluição em caldo, levando em consideração a classificação de sensibilidade e resistência. Para essa associação, as cepas sensíveis foram agrupadas sob a denominação “ausência de resistência”. As quinolonas também apresentaram discrepâncias na categoria intermediária. No entanto, esses resultados não interferiram na avaliação da sensibilidade e especificidade, pois a categoria “intermediária” foi incluída no grupo dos resistentes. Foram calculados a sensibilidade, especificidade, o valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi analisado um total de 152 isolados de *Salmonella* spp. encaminhados ao LRNEB (Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas) no período de janeiro de 2009 a fevereiro de 2013 que apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e/ou à ciprofloxacina. Destes 67 (44,08%) foram obtidos a partir de amostras humanas decorrentes de surtos de DTA, 39 (25,66%) representantes de alimentos destinados ao consumo humano, 32 (21,05%) isoladas de animais destinados ao consumo humano e 14 (9,21%) de amostras ambientais.

As amostras analisadas foram representativas de todo o território nacional. Foram identificados 35 sorovares distintos relacionados à resistência sendo os 9 prevalentes elucidados no gráfico 1.



**Gráfico 1** Distribuição percentual da prevalência dos dez sorovares de *Salmonella* spp. resistentes à quinolonas.

Dentre os isolados avaliados, o de maior prevalência foi o sorovar *S. Typhimurium*, seguido de *S. Enteritidis*. Vale ressaltar o elevado percentual de resistência associado ao sorotipo *S. Gallinarum*, sorovar espécie-específica de aves, indicando não só a circulação destes em granjas como também sua importância como possíveis veiculadores de genes de resistência relacionados à classe das quinolonas.

A literatura aponta *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* como os prevalentes e importantes em todo o mundo (HUEHN et al., 2010).

A relevância do sorovar *S. Enteritidis* começou a ser evidenciada no final da década de 80 com o aumento da frequência de salmoneloses causadas por este em humanos e animais ultrapassando inclusive o sorovar *S. Typhimurium* até então predominante. Esta mudança foi primeiramente evidenciada em países da Europa sendo posteriormente demonstrado em países da América (CASTILLA et al., 2006).

Um expressivo surgimento de casos de DTA relacionados ao sorovar *S. Enteritidis* no Brasil foi relatado na década de 90 (PERESI et al., 1998; TAVECHIO et al., 2002; FERNANDES, 2003). Este fato pode ser ressaltado por Geimba e colaboradores (2005) que

verificaram a mudança do quadro no Rio Grande do Sul onde em 1990 foram relatados 86% de *S. Typhimurium* relacionados a alimentos e nenhum isolado de *S. Enteritidis*, e em 1993 que apresentou 64% de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos relacionados a surtos de DTA e apenas 4% de *S. Typhimurium*.

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, no período de 1999 a 2009 foram registrados 1313 casos de salmoneloses sendo que destes 279 com identificação laboratorial com 77% de isolados pertencentes ao sorovar *S. Enteritidis* e os outros 23% atribuídos a 18 sorovares diferentes (BRASIL, 2009).

Pode-se admitir que a prevalência de *S. Typhimurium* se deve a amostragem tomada na presente avaliação (2009-2013) período observado de redução vertiginosa do sorovar *S. Enteritidis*, aliado ao critério de escolha (isolados com resistência às quinolonas e fluoroquinolonas) visto que *S. Typhimurium* é reconhecido em nosso meio como sorovar detector de perfil de resistência fenotípica e detecção de genes de resistência (HERRERO et al., 2009; KINGSLEY, et al., 2009).

A tabela 1 refere-se a distribuição dos sorotipos mais frequentes que apresentaram resistência às quinolonas/fluoroquinolonas em relação à sua fonte de isolamento.

**Tabela 1** Sorovares resistentes as quinolonas/fluoroquinolonas por fonte de isolamento

Sorotipo de <i>Salmonella</i>	Numero de NTS* isolados de fontes:				Total
	Humanas	Alimentares	Ambientais	Animais	
<i>S. Typhimurium</i>	35	22	4	2	63
<i>S. Enteritidis</i>	24	1	-	-	25
<i>S. Gallinarum</i>	-	-	-	23	23
<i>S. Muenchen</i>	2	2	-	-	4
<i>S. Saintpaul</i>	1	-	-	2	3
<i>S. Infantis</i>	1	1	1	-	3
<i>S. Heidelberg</i>	-	2	1	-	3
Outros	5	12	9	5	28
<i>Total</i>	67	39	14	32	152

\*Salmonela não tifóide

Observa-se que o sorovar *S. Typhimurium* apresentou uma elevada incidência numérica em amostras de origem humana seguido das amostras de origem alimentar. Isso demonstra a provável relação entre a contaminação humana por alimentos referentes a este sorovar.

Ainda levando em consideração a fonte de isolamento vale ressaltar a alta taxa de isolados do sorovar *Enteritidis* em amostras humanas.

Três dos seis sorotipos mais frequentes no presente estudo (*S. Enteritidis*, *S. Infantis* e *S. Typhimurium*) estão no ranking dos 5 sorotipos mais frequentes associadas à salmonelose humana na Europa nos últimos anos (VELASCO et al., 2009; EFSA, 2011). Nos EUA, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças relataram que *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e

*S.* Newport, nesta ordem, são os sorovares mais prevalentes relatados pelos laboratórios de saúde pública (CDC, 2013).

De acordo com o banco de dados do Programa Global de Vigilância à Salmonela 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, 2007).

Dados da União Européia, relatam *S. Infantis* e *S. Enteritidis* como os sorotipos mais prevalentes em carcaças de frangos em 2009, com *S. Typhimurium* alcançando o quarto lugar (EFSA, 2011). Este sorotipo também foi o predominante em produtos avícolas em estudos anteriores, em que as carnes de aves e ovos foram identificados como o principal reservatório de *S. Enteritidis* (CARDINALE et al., 2005; DOGRU et al., 2010; HERNÁNDEZ et al., 2011).

Os modelos matemáticos que combinam dados epidemiológicos com criações de aves sugerem que *Salmonella ser. Gallinarum* e *Salmonella ser. Pullorum*, responsável pela doença Pullorose e febre tifóide em aves, foram excluídas competitivamente pelo sorovar *S. Enteritidis* de aves (RABSCH et al., 2000). Durante 1960 e 1970 foram implementadas medidas de controle para diminuir ambas as infecções de aves. Portanto, parece provável que *S. Enteritidis* tenha preenchido um nicho ecológico que foi criado pela diminuição de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* em aves de capoeira (FOLEY et al., 2008; ÁLVAREZ-FERNANDEZ et al., 2012).

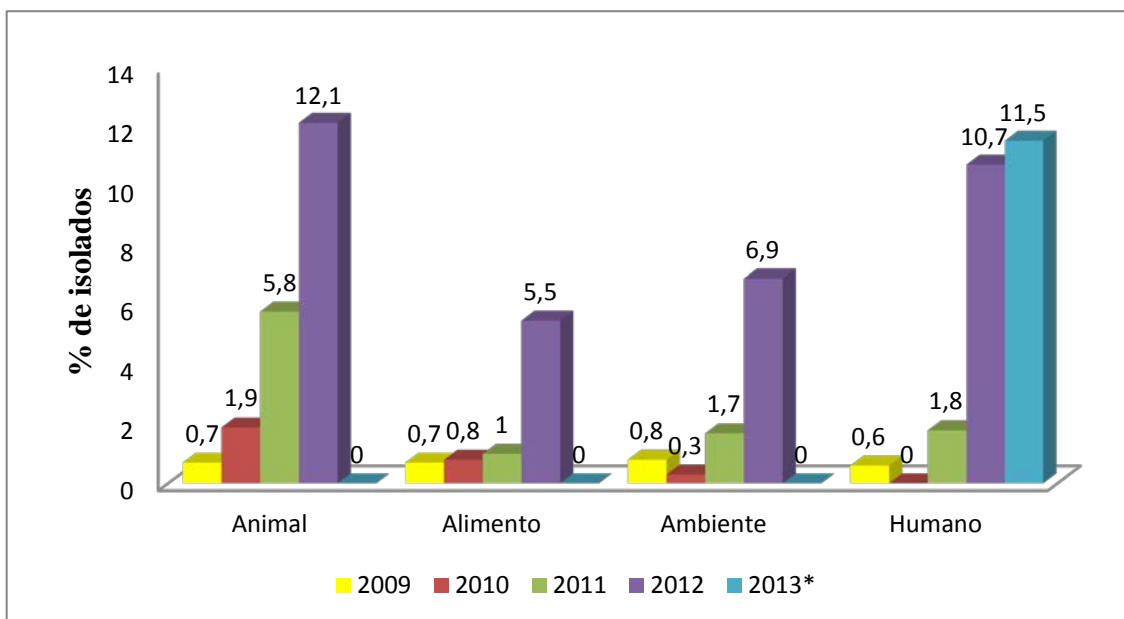
A elevada incidência de *S. Enteritidis* em casos humanos constatada neste trabalho foi relatada anteriormente (RODRIGUEZ-AVIAL et al., 2005; FERNANDES et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007; WHO, 2007).

A alta prevalência de *S. Enteritidis* em aves reflete a presença desses organismos no trato intestinal de frangos de corte (CAPITA et al., 2007). Isto leva a um aumento da prevalência de infecção em aves destinadas ao consumo e humanos. Sendo uma prerrogativa para os dados da Ásia, Europa e América Latina que indicam ser *S. Enteritidis* o sorotipo mais comum entre os isolados humanos (EFSA, 2011; GALANIS et al., 2006).

Estirpes de *S. Typhimurium* têm uma maior capacidade para provocar a salmonelose humana do que outros serotipos (SARWARI et al., 2001). Embora a distribuição de *S. Typhimurium* seja generalizada, cepas deste sorotipo são frequentemente detectadas em aves (PARVEEN et al., 2007; ARSLAN; EYI, 2010; YILDIRIM et al., 2011). Na Espanha, *S. Typhimurium* foi o segundo sorotipo, depois de *S. Enteritidis*, em sua frequência de detecção em isolados clínicos humanos em 2000-2008 (MARTÍNEZ et al., 2008).

Vários pesquisadores (CETINKAYA et al., 2008; ABDELLAH et al., 2009; COOK et al., 2009; YILDIRIM et al., 2011) relataram o isolamento de *S. Infantis* principalmente em aves de corte. Este fato confirma que muitos casos de salmonelose humana podem ter como fonte de infecção as aves (CAPITA et al., 2007).

O gráfico 2 aponta o percentual de isolados resistentes a quinolonas/fluoroquinolonas em relação à quantidade de isolados encaminhados ao LRNEB por fonte de isolamento no período avaliado.



**Gráfico 2** Frequência anual de isolados com resistência a quinolona/fluoroquinolona por fonte de isolamento no período referente ao estudo. \*o ano de 2013 apresenta apenas dados referentes aos meses de janeiro e fevereiro

Verifica-se o aumento de isolados de fonte humana entre os anos de 2011 a 2013. Observa-se ainda a expressiva circulação de isolados resistentes em cepas originárias de animais de produção.

O gráfico aponta elevado índice de resistência observado em 2012 com um aumento substancial em todas as fontes de isolamento quando comparados aos anos anteriores.

Em relação ao período de 2009 a 2011 estes apontaram reduzidas variações entre as diferentes fontes de isolamento, excetuando-se os isolados de origem animal em 2011.

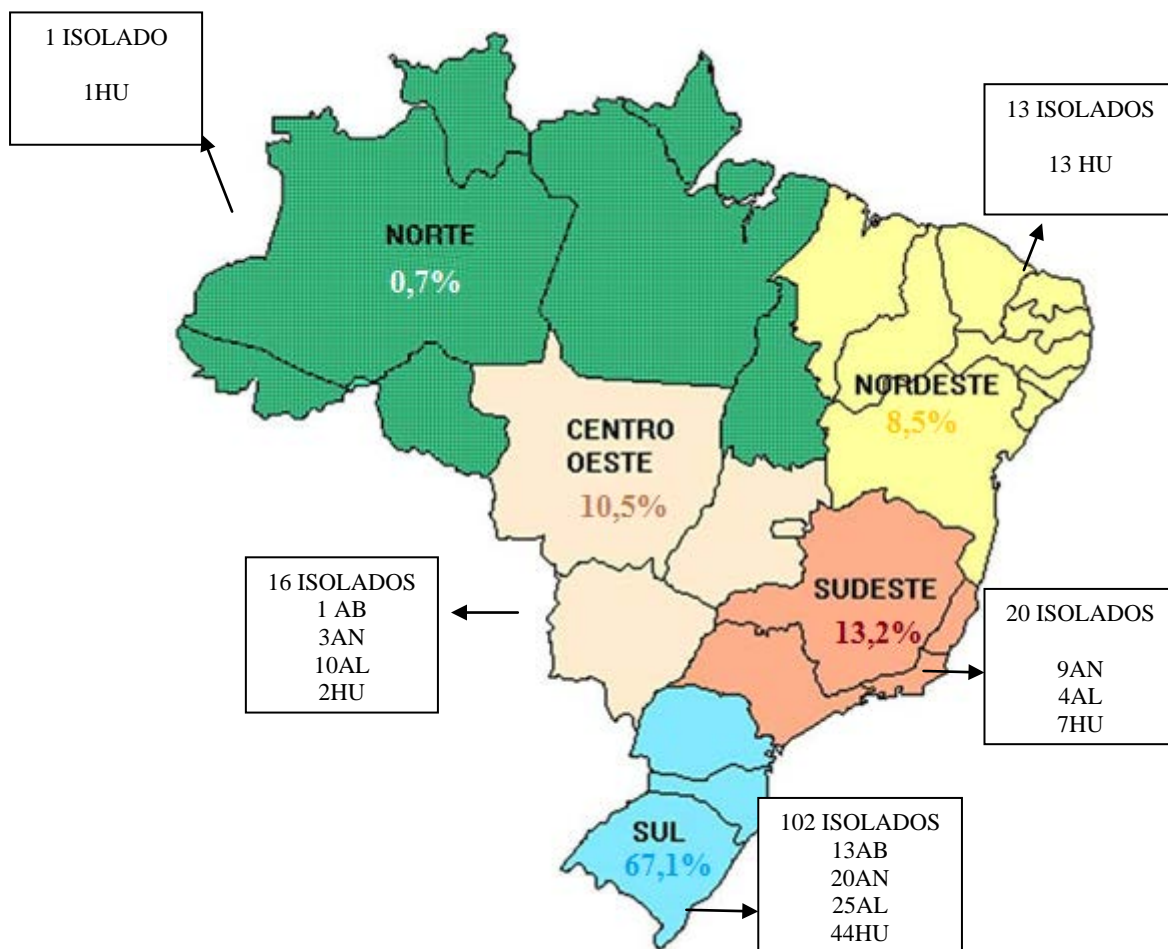
Embora os isolados apresentem uma baixa frequência de resistência às quinolonas e/ou fluoroquinolonas estes dados não devem ser subjulgados uma vez que estas classes de antimicrobianos são eleitas para o tratamento de infecções por salmoneloses multiresistentes.

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 consequência de suposto mecanismo de resistência a fluoroquinolonas diferenciado em *Salmonella* spp., 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 (SCALLAN et al., 2011).

Salmonelose é um problema de saúde pública cada vez mais crescente tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. *Salmonella* spp. têm uma variedade de reservatórios animais e vias de transmissão que podem resultar na infecção humana. No, entanto na maioria das vezes as infecções estão relacionadas a exposições de origem alimentar (SCALLAN et al., 2011).

Quanto à distribuição geográfica pode-se observar que a resistência a quinolonas/fluoroquinolonas no período avaliado obteve representantes de todas as regiões do país, como elucidado na figura 5 que representa o percentual de isolados com resistência às quinolonas por região e a distinção destes por fonte de isolamento.





**Figura 5** Percentual de isolados com resistência às quinolonas no período avaliado pelo território brasileiro. HU= humano, AL= alimento, AB= ambiente, AN= animal.

Sob o ponto de vista geográfico, o maior número de cepas resistentes às quinolonas/fluoroquinolonas foi identificado na região Sul 67,1% (102/152), seguido da região Sudeste 13,2% (20/152), Centro-Oeste 10,5% (16/152), Nordeste 8,5% (13/152) e Norte 0,7% (1/152). O alto índice de resistência observado na região Sul se deve a maior remessa de material encaminhada ao LRNEB por essa região, assim como o baixo percentual de isolados resistentes na norte pode ser explicado também pelo mesmo motivo.

A distribuição apontada na figura 5 elucida a variação da circulação dos isolados resistentes em relação à fonte de isolamento de região para região. Observa-se que os de origem humana foram detectados em todas as regiões do país. No Sul do Brasil a detecção de resistência teve maior incidência em amostras humanas e alimentares.

No sudeste, ressalta-se a presença de um quantitativo considerável de resistência em isolados de amostras animais. Na região Centro-Oeste foi possível detectar uma taxa de resistência relevante em amostras de origem alimentar, enquanto que no Nordeste e Norte, todos os isolados que apresentaram resistência foram obtidos de amostras humanas.

Acredita-se que a utilização indiscriminada de antimicrobianos não somente para tratamento de doenças na medicina humana e veterinária, mas também para melhorar os índices zootécnicos dos animais de produção têm contribuído para o surgimento e manutenção de bactérias multirresistentes em todo o mundo (HUR et al., 2012). Existem indícios de que a utilização indiscriminada em animais de produção pode transmitir resistência antimicrobiana aos seres humanos por meio de seus produtos e derivados, sendo

também uma importante fonte de distribuição regional através do mercado interno de produtos de origem animal (MOTA et al., 2005; HUR et al., 2012).

Além das características de endemicidade, morbidade e especial dificuldade no controle da disseminação de *Salmonella* spp., o ponto de urgência clínica e epidemiológica tem sido a emergência de cepas resistentes a antibióticos de diversas classes especialmente pelo risco potencial de infecções extraintestinais que acometem grupos mais sensíveis da população (KIESSLING et al., 2002; MCEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002; ORMAN et al., 2002; VAZ et al., 2010).

Dentre os vários gêneros bacterianos existentes, *Salmonella* spp. é um importante objeto de estudos nessa área, pois apresenta alta variabilidade genética, reflexo de uma interação dinâmica entre patógeno, meio ambiente e hospedeiro (LIU et al., 2011).

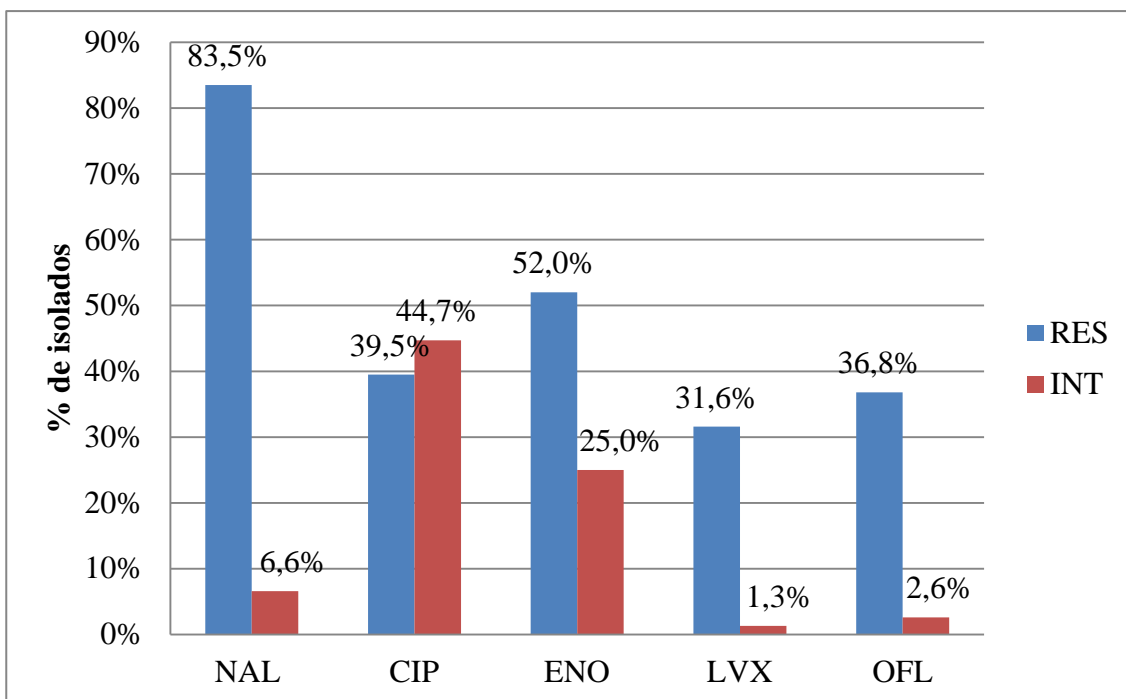
Atualmente este gênero é reconhecido como um dos principais patógenos implicados em doenças de transmissão alimentar, assumindo importância mundial pela ocorrência de cepas multirresistentes a antimicrobianos. Em espécies de animais destinadas à produção de alimentos, representam um grande risco tendo em vista sua endemicidade sendo responsável pela disseminação de uma quantidade significativa de elementos móveis carreadores de genes de resistência (RODRIGUES-MARTINEZ et al. 2011b).

Portanto é extremamente importante que sejam compreendidos os processos evolutivos e epidemiológicos dessas populações bacterianas, para que seja possível traçar e avaliar o impacto de ações dentro de um programa de controle de doenças, como por exemplo, a utilização adequada de determinado antibiótico em determinada região (HANAGE et al., 2006).

Os isolados selecionados foram submetidos ao teste de disco difusão segundo os critérios preconizados pelo CLSI (2013) utilizando representantes da classe quinolonas de uso terapêutico humano e uso veterinário: levofloxacina, ofloxacina e enrofloxacina. O ácido nalidíxico e a ciprofloxacina foram retestados para verificar a permanência das características de resistência. Os isolados foram submetidos ainda ao teste de suscetibilidade aos aminoglicosídeos gentamicina e estreptomina para verificar padrões de resistência fenotípica que pudessem estar associados à presença do gene *aac(6')-Ib*. e a outras classes de antimicrobianos para se obter o perfil de suscetibilidade antimicrobiana.

A escolha dos antimicrobianos para avaliar a resistência às quinolonas se prende com a sua significância clínica. Tendo em vista que as quinolonas (incluindo as FQs) constituem uma das classes de antimicrobianos mais prescritas em todo o mundo (MORGAN-LINNELL et al., 2009), sendo consideradas antimicrobianos criticamente importantes tanto em medicina humana (WHO, 2009) como em medicina veterinária (FAO/WHO/OIE, 2008). A OIE e WHO defendem que os antimicrobianos criticamente importantes usados em medicina humana e veterinária devem ser sujeitos ao monitoramento de resistência (OIE, 2003).

O gráfico 3 apresenta o percentual de resistência e de suscetibilidade intermediária obtido a partir do teste de suscetibilidade antimicrobiana por disco difusão dos isolados avaliados para as quinolonas testadas.



**Gráfico 3** Percentual de resistência e suscetibilidade intermediária às quinolonas dos isolados de *Salmonella* spp. Sendo CIP=Ciprofloxacina, NAL = Ácido Nalidíxico, ENO = Enrofloxacin, LEV = Levofloxacin, OFL = Ofloxacin. RES = Resistente, INT =Intermediário.

Como esperado, ocorreu um elevado percentual de resistência ao ácido nalidíxico, seguido da enrofloxacin e ciprofloxacina. A levofloxacin, quinolona de terceira geração, foi o antimicrobiano com o menor percentual de resistência.

Nas últimas décadas, o número de isolados de *Salmonella* spp. com suscetibilidade reduzida a ciprofloxacina e a outras fluoroquinolonas vem aumentando significativamente, o que interfere diretamente na resposta ao tratamento clínico (EAVES et al.,2004; ESCRIBANO, et al., 2004).

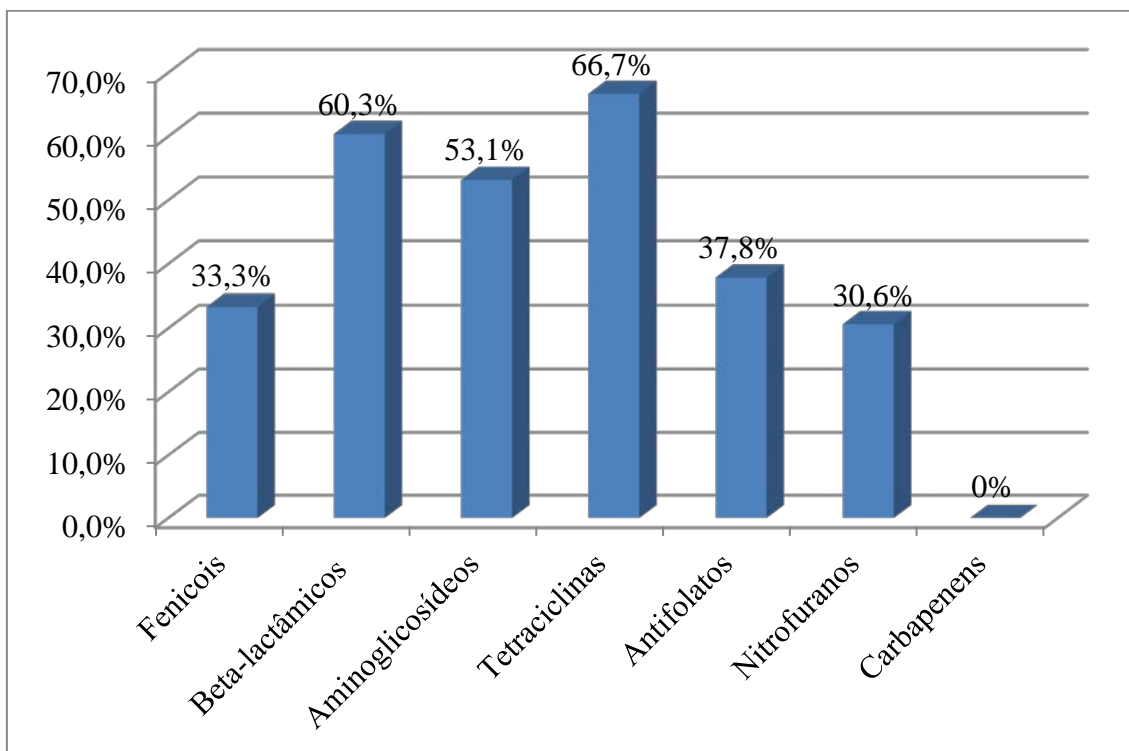
Apesar da resistência ao ácido nalidíxico ser comum entre *Enterobacteriaceae*, resultado do seu uso na prática clínica (SILVA, 2002; ITO et al., 2008), diversos autores sugerem que o AN tem utilidade na análise da resistência às FQs, constituindo-se em um indicador da resistência às FQs, uma vez que o desenvolvimento de resistência ao AN, representa para a maioria das bactérias, um primeiro passo no desenvolvimento de resistência de alto nível às fluoroquinolonas (FAO/WHO/OIE, 2008). Ito e colaboradores (2008) demonstraram uma correlao entre o halo de inibio do ácido nalidíxico e as concentraoes inibitórias mínimas das fluoroquinolonas testadas, sugerindo que esta quinolona pode ser usada como um marcador para a suscetibilidade das FQs. Outros autores defendem ainda o uso do AN como um indicador para a deteco de mutaoes simples, ou seja, bactérias que apresentam uma única mutao que lhes confere reduzida suscetibilidade às quinolonas (CAVACO et al., 2009). Entretanto o uso do AN pode não ser apropriado para a deteco dos determinantes de RQMP que não afetam a CIM de AN da mesma forma que as mutaoes nas topoisomerases (ITO et al., 2008).

A pesquisa de resistência ao ácido nalidíxico pelo método de disco difusão não necessariamente serve como prerrogativa de resistência a ciprofloxacina, uma vez que outros mecanismos de resistência, como alteraoes na permeabilidade de membrana podem ser atribuídos à resistência (CRUMP et al., 2011).

A CIP, usada como representante das quinolonas de segunda geração, constitui-se em um bom indicador dos mecanismos de resistência às FQs, pois apesar destes não afetarem igualmente as CIMs de todas as FQs, em geral, as CIMs de CIP (bem como de norfloxacin) são afetadas por todos os mecanismos de resistência, inclusive relacionados às RQMP (MORGAN-LINNEL et al.,2009). Já a LVX, utilizada neste estudo como representante das quinolonas de terceira geração, é geralmente menos afetada pelos mecanismos de resistência devido a diferenças estruturais que as tornam mais eficazes (MORGAN-LINNEL et al., 2009).

Ainda suportando a escolha da CIP, LVX e OFL como representantes da resistência às FQs, há de se destacar que o CLSI (2013) sublinha que os antimicrobianos CIP e LVX são indicados pela “Food and Drug Administration” (FDA) como agentes antimicrobianos com relevância clínica e devem, por isso, ser considerados para a realização de testes de rotina e reprodução de relatórios. O uso da ofloxacina se deve ao fato deste ser o isômero da levofloxacina que deu origem a este antimicrobiano (HEEB et al. 2011).

Quanto a associação entre a presença de resistência às quinolonas e/ou fluorquinolonas e as outras classes de antimicrobianos testadas o gráfico 4 aponta os percentuais obtidos.



**Gráfico 4** Percentual de resistência das classes antimicrobianas testadas referentes aos isolados com resistência às quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

O gráfico acima ilustra um elevado percentual de isolados que apresteram resistência às quinolonas/fluorquinolonas com as outras classes de antimicrobianos testadas com exceção das carbapenemas. Destacam-se neste grupo as tetraciclínas, beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, demonstrando uma dificuldade adicional em se traçar uma estratégia terapêutica frente á estes perfis.

Vários autores e organizações têm relatado um aumento expressivo na identificação de microrganismos isolados de animais e alimentos resistentes aos antimicrobianos (SCHMIDT; CARDOSO, 2003; TESSMANN et al., 2008; HOPKINS et al., 2010). Muitos afirmam que esta ocorrência é particularmente associada ao emprego de doses terapêuticas e sub-terapêuticas de antimicrobianos nos animais e ao uso indiscriminado de antimicrobianos na

medicina humana, tanto nos hospitais como na comunidade (SCHMIDT; CARDOSO, 2003; BEGUM et al., 2010).

No relatório da PREBAF (BRASIL, 2009), sobre monitoramento da resistência aos antimicrobianos de *Salmonella* spp. e *Enterococcus* sp. isolados de carcaças de frango, aponta limitações no emprego de fluorquinolonas, aminoglicosídeos, betalactâmicos e cefalosporinas de terceira geração para o tratamento de infecções por enteropatógenos.

O elevado percentual de resistência às tetraciclinas (66,7%) foi superior aos 15,4% encontrados por Oliveira e colaboradores (2005), ao analisar *Salmonella* ser. Enteritidis isolados de humanos, alimentos, carcaças de frango e amostras clínicas e ambientais de criação de aves na região Sul do Brasil, e que os 36% detectados por Antunes e colaboradores (2003), em *Salmonella* spp. isoladas de produtos de aves em Portugal. Cabe destacar, a detecção de elevados percentuais por Cortez e colaboradores (2006) em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves no Estado de São Paulo e por Ribeiro e colaboradores (2007) em cepas de *Salmonella* ser. Hadar isolados de carcaças de frango do Rio Grande do Sul.

A resistência aos nitrofuranos (30,6%) foi considerada baixa em comparação aos resultados obtidos por Cardoso e colaboradores (2006) que detectaram 95% de resistência em isolados de carcaça de frango no Rio Grande do Sul e por Ribeiro e colaboradores (2007) que detectaram 52,6% de resistência em *Salmonella* spp. oriundas de carcaça de frango na região Nordeste do Brasil.

A resistência aos aminoglicosídeos foi considerada alta quando comparada ao encontrado na literatura por Ribeiro e colaboradores (2008) ao analisar isolados de *Salmonella* ser. Enteritidis na região Sul do Brasil.

Em relação aos beta-lactâmicos, resultados similares foram detectados por Santos e colaboradores (2000) que ao avaliarem o perfil de suscetibilidade de cepas de *Salmonella* spp. evidenciaram índices acentuados para resistência à ampicilina (100%), à cefalotina (75%), cefoxitina (52,1%).

O menor percentual de resistência associado aos antifolatos, nitrofuranos e fenicóis deve estar associado a localização de seus genes de resistência muitas vezes alocados em plasmídeos, na ilha genômica 1 de *Salmonella* (SGI1) ou integrons, que podem ser co-transferidos ou co-selecionados na ausência de uma pressão seletiva direta. Isso provavelmente indica que estes antimicrobianos, agora não mais usados com frequência, exerceram pressões menos seletivas sobre a disseminação de genes de resistência a estes antimicrobianos (MICHAEL et al., 2006; LO et al., 2012).

Iniciativas como o monitoramento da resistência de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças congeladas de frango em todo o país, realizada pela ANVISA no projeto PREBAF (BRASIL, 2009) fornecem dados importantes. As informações geradas permitem a visualização adequada do problema e fornece subsídio para as medidas de controle necessárias. Esta pesquisa deve ser ampliada para todos os produtos de origem animal.

A tabela 2 elucida os perfis de resistência obtidos a partir do teste de difusão em disco simples com todos os antimicrobianos testados relacionada aos antibiótipos de resistência às quinolonas testadas relacionados às outras classes de antimicrobianos.

**Tabela 2** Perfil de resistência às quinolonas associado às outras classes de antimicrobianos testadas. Continua

PERFIL DE RESISTENCIA		Nº
QUINOLONAS	OUTRAS CLASSES	isolados
	AMP,CHL,TCY,STR,GEN,SXT	21
	AMP,CHL,TCY,STR,GEN,SXT,NIT	6
	AMP,CHL,TCY,STR,GEN	4
	AMP,TCY,STR,GEN,SXT	3
	AMP,TCY,STR,SXT,NIT	1
NAL,CIP,ENO,LVX,OFL	AMP,TCY,STR,GEN,NIT	1
	TCY,STR,GEN,SXT	1
	AMP,TCY,STR,GEN	1
	CHL,TCY,STR,SXT	1
	AMP,TCY,GEN	1
	AMP,TCY,STR	1
	TCY,NIT	1
NAL,CIP,ENO,OFL	AMP,TCY,STR,GEN,SXT	1
	AMP,TCY,STR,GEN	1
	AMP,TCY,STR	1
	AMP,TCY	1
	TCY,STR,GEN	1
	*	1
NAL,CIP,LVX,OFL	TCY,NIT	1
NAL,CIP,ENO	*	5
	AMP,TCY,STR,GEN	1
	AMP,TCY,STR	1
NAL,LVX,OFL	AMP,TCY,STR,GEN,SXT	1
	TCY,STR,NIT	1
NAL,CIP,OFL	AMP,TCY,GEN	1

**Tabela 2** Continuação

NAL, ENO	*	7
	AMP, TCY, GEN	2
	AMP, CHL, TCY, STR, SXT, NIT	1
	AMP, TCY, CAZ, STR, GEN	1
	AMP, CHL, TCY, STR, GEN	1
	TCY, SXT	1
NAL, CIP	AMP, CHL, TCY, STR, NIT	1
	TCY, NIT	1
NAL, LVX	NIT	2
NAL, OFL	AMP, TCY, GEN, STR, SXT	1
NAL	*	17
	NIT	14
	STR	3
	AMP, TCY, GEN	2
	TCY, NIT	2
	AMP, CHL, TCY, FOX, CAZ, STR, GEN, SXT	1
	AMP, CHL, TCY, STR, NIT	1
	AMP, TCY, STR, NIT	1
	AMP, TCY, STR, SXT	1
	AMP, TCY, STR, GEN	1
	TCY, STR, GEN, NIT	1
	AMP, STR, SXT	1
	AMP, TCY, SXT	1
	AMP, TCY, STR	1
	FOX, STR	1
AMP, TCY	1	

CIP=Ciprofloxacina, NAL = Ácido Nalidíxico, ENO = Enrofloxacina, LEV = Levofloxacina, OFL = Ofloxacina, AMP= Ampicilina, TCY= Tetraciclina, STR= Streptomicina, GEN= Gentamicina, FOX= Cefoxitina, CHL= Cloranfenicol, NIT= Nitrofurantoina, SXT= Sulfametoxazol-Trimetopim, CAZ= Ceftazidima \* ausência de resistência as outras classes de antimicrobianos testados.

Esta tabela evidencia perfis de resistência às outras classes de antimicrobianos testadas frente aos isolados que apresentaram resistência às quinolonas/fluorquinolonas. Uma expressiva quantidade de isolados com resistência a todas as quinolonas/fluorquinolonas apresentaram ainda resistência a todos os aminoglicosídeos, a tetraciclina, cloranfenicol, sulfametozaxol com trimetopim e ampicilina (21/42).

Vale ressaltar ainda a presença de 34 isolados que apresentaram resistência a 10 ou mais dos 15 antimicrobianos testados sendo que estes foram resistentes a todas as quinolonas e fluorquinolonas testadas. Percebe-se ainda a presença de isolados resistentes não só as quinolonas/fluorquinolonas, mas também à pelo menos um dos fármacos representantes de seis das sete classes de antimicrobianos testadas.

A tabela elucidada a elevada heterogeneidade de diferentes perfis frente aos isolados resistentes apenas ao ácido nalidíxico, ressaltando ainda a presença de um elevado índice de isolados com resistência ao ácido nalidíxico e a nitrofurantoina.

O número de isolados de *Salmonella* spp. multi-resistentes têm aumentado em muitos países desde o relatório de 1990 onde se constatou a presença da cepa multi-resistente *S. Typhimurium* DT104 em todo o mundo (HELMES et al., 2005).

De acordo com o Sistema Nacional de Acompanhamento à Resistência Antimicrobiana (NARM) 4,1% de isolados nos EUA entre 2005-2006 demonstraram diminuição da suscetibilidade às cefalosporinas e 84% tinham fenótipos de resistência a múltiplas drogas (SJÖLUND-KARLSSON, et al., 2010). Dados do NARM do período de 1996-2007 mostraram também que NTS invasoras eram mais propensas a ser resistentes a múltiplas drogas, mas mais importante, ele informou que os isolados começaram a mostrar resistência ao ácido nalidíxico (2,7%) e ceftriaxona (2,5%), aumentando assim a preocupação sobre o manejo clínico, vigilância e prevenção da saúde pública (CRUMP et al., 2011).

Um estudo europeu no período de 2000 à 2004 em 135.000 isolados de *Salmonella* spp. reportou um aumento de 57-66% de resistência, incluindo resistência a múltiplas drogas de 15-18% e resistência ao ácido nalidíxico de 14-20% durante o mesmo período (MEAKINS et al., 2008). Países africanos e asiáticos têm aumentado o número de cepas de resistência a ciprofloxacina, e relatos de resistência às cefalosporinas de espectro estendido associados a produção de beta-lactamase (KRUGER et al., 2004; AKINYEMI et al., 2007; JABEEN et al., 2010; RAN et al., 2011).

No Brasil, Fernandes e colaboradores (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 ceftazidima, 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, Estado do Rio de Janeiro, mostrou que 63,9% das cepas eram susceptíveis à ampicilina, cefalotina, ciprofloxacina, ceftriaxona, gentamicina, ácido nalidíxico, nitrofurantoina e trimetoprim-sulfametoxazol. A resistência ao ácido nalidíxico foi constatada em 13,2% e à nitrofurantoina em 10,5% das cepas (RODRIGUES, 2001).

Ribeiro e colaboradores (2006) ao analisarem 22 cepas de *S. Hadar* isoladas de carcaças de frango no Rio Grande do Sul observaram 100% de resistência à estreptomicina, tetraciclina e sulfamatoxazol-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, enrofloxacin.

No Estado do Paraná, Delicato e colaboradores (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 à gentamicina, entretanto, duas cepas do sorovar *Typhimurium* foram resistentes a 11

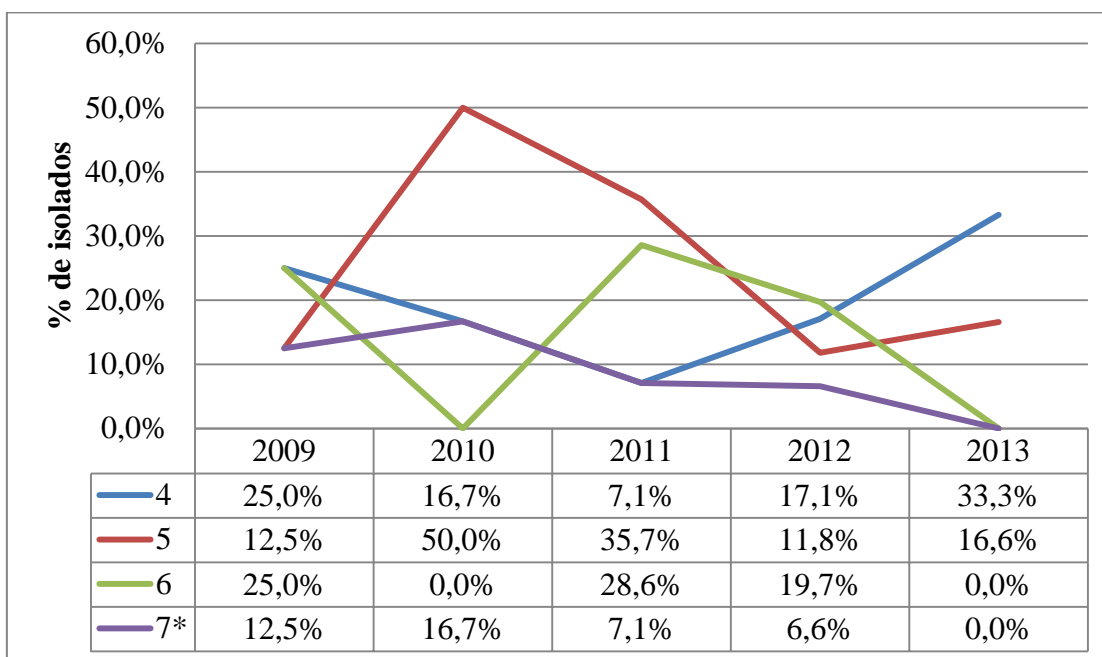


antimicrobianos. Quanto à sensibilidade, todas as cepas testadas foram sensíveis a amicacina, pefloxacina, imipenen e ciprofloxacina.

Estes dados apontados na literatura indicam o constante crescimento de resistência ao longo do tempo no Brasil sendo, observado uma mudança no paradigma no que tange a eficácia de antimicrobianos de eleição empregados no tratamento de infecções humanas.

O perfil de suscetibilidade apresentado na tabela 2 permitiu identificar que 60,9% dos isolados que apresentaram resistência às quinolonas/fluorquinolonas testadas, demonstraram um perfil de multirresistência (MDR), com resistência a mais de três classes de antimicrobianos.

O gráfico 5 apresenta o percentual de isolados com perfil de resistência a múltiplas classes de antimicrobianos (incluindo as quinolonas) relacionando a quantidade de classes resistentes com o período avaliado.



**Gráfico 5** Percentual de isolados multiresistentes por período avaliado.\*Quantidade de classes de antimicrobianos com resistência incluindo as quinolonas

Verifica-se por este gráfico um elevado percentual de multirresistência a 5 classes distintas principalmente entre os anos de 2010 e 2011.

No que diz respeito ao ano de 2012 um expressivo percentual de resistência a seis classes diferentes foi evidenciado. Fato que se repetiu nos períodos de 2011 e 2009.

Embora o percentual de isolados com perfil de multirresistência a 7 das classes avaliadas não tenha sido tão elevado entre o período avaliado este fato merece uma atenção especial visto que reflete a presença de isolados resistentes a quase todas as classes de antimicrobianos testadas. Vale dar atenção especial aos percentuais encontrados nos anos de 2009 e 2010.

O gráfico ainda ilustra o declínio nas curvas de multiresistência a 5, 6 e 7 classes, significando uma provável diminuição na circulação de isolados multiresistentes, o que pode estar relacionado ao aumento no controle da comercialização de antimicrobianos tanto na medicina humana quanto na veterinária.

Na Espanha, Carramiñana e colaboradores (2004) reconhecem que fenótipos multiresistentes (MDR) tem sido bastante documentado em amostras clínicas e na produção de alimentos de origem animal, incluindo o ciclo de produção avícola e suína, além de

alimentos derivados. Recentemente, Corona e colaboradores (2012), apontam que 9,5% dos isolados de animais nos Estados Unidos foram resistentes a uma única droga e um percentual variando entre 11% a 20% entre o período de 1997-2003, apresentaram resistência superior a 5 classes de antimicrobianos.

Nos EUA as taxas de multirresistência apresentam tendência de declive desde de 1996 (NARMS, 2009).

Neste trabalho, observa-se que a taxa de multirresistência foi bem elevada em comparação com os resultados detectados nos EUA (9,5% em 2009) e na Nova Zelândia (6,8% em 2007) (NARMS, 2009; BROUGHTON et al., 2010), porém Lo e colaboradores (2012) detectaram um percentual elevado de multirresistência (36,2%) em isolados resistentes as quinolonas corroborando com os dados detectados no presente estudo.

A característica de multirresistência aos antibióticos no gênero *Salmonella* spp. é uma tendência mundial (JUNIOR et al., 2010) e apresenta conformidade com o presente trabalho, já que a maioria dos isolados demonstrou esse perfil.

A tabela 3 apresenta o perfil de multirresistência dos isolados resistentes às quinolonas/fluorquinolonas avaliados neste trabalho relacionados à sua origem de isolamento e quantidade de classes antimicrobianas que apresentam resistência.

**Tabela 3** Perfil de Sorovares multirresistentes por fonte de isolamento

Qtde classe	Fonte de isolamento				total
	Humano	Alimento	Animal	Ambiente	
4	Typhimurium(9)	Typhimurium(2)	Schwarzengrund(1)	Typhimurium(1)	19
	Muenchen(1)	Muenchen(1)		Agona(1)	
	Enteritidis(1)	Heidelberg(1)		Bredeney(1)	
5	Typhimurium(9)	Typhimurium(4)		Typhimurium(1)	17
	Muenchen(1)	Muenchen(1)			
6		Give(1)			24
	Typhimurium(10)	Typhimurium(9)	Typhimurium(2)	Typhimurium(2)	
7			Agona(1)		7
	Typhimurium(3)	Typhimurium(2)	Saintpaul(1)	Orion(1)	
Total	35	21	5	6	67

( ) número de isolados do respectivo sorovar

Esta tabela evidencia a grande circulação de isolados MDR em amostras de origem humana e alimentar. O sorovar com maior incidência foi o Typhimurium com 80,6% (54/67) distribuídos pelas diferentes fontes avaliadas. Ressalta-se ainda a presença de 46,3% isolados com resistência a mais que cinco classes distintas de antimicrobianos (31/67).

As fontes animal e ambiental embora tenham apresentado um baixo índice de circulantes multirresistentes não deve ser negligenciada uma vez que ambas demonstram a presença de isolados com resistência a 6 e 7 classes distintas de antimicrobianos.

Neste estudo foi evidenciado um número elevado de resistência a múltiplas drogas no sorovar *S. Typhimurium* corroborando com trabalho realizado por Lo e colaboradores (2012) na China.

Apenas um isolado do sorovar Enteritidis apresentou multirresistência, porém cabe destacar que tal resistência foi evidenciada frente a 4 classes de antimicrobianos, fato pouco comum, sendo observada a detecção de resistência a apenas uma ou duas classes de antimicrobianos no sorovar Enteritidis (SOLER et al., 2006).

As elevadas taxas de resistência em amostras humanas do sorovar *Typhimurium* tem sido observada em todo mundo, com resistência combinada a mais de quatro compostos, ressaltando a necessidade de traçar uma estratégia terapêutica baseada nos resultados do antibiograma frente a infecções decorrentes deste sorovar (BIENDO et al., 2005; SPILIOPOULOU et al., 2007).

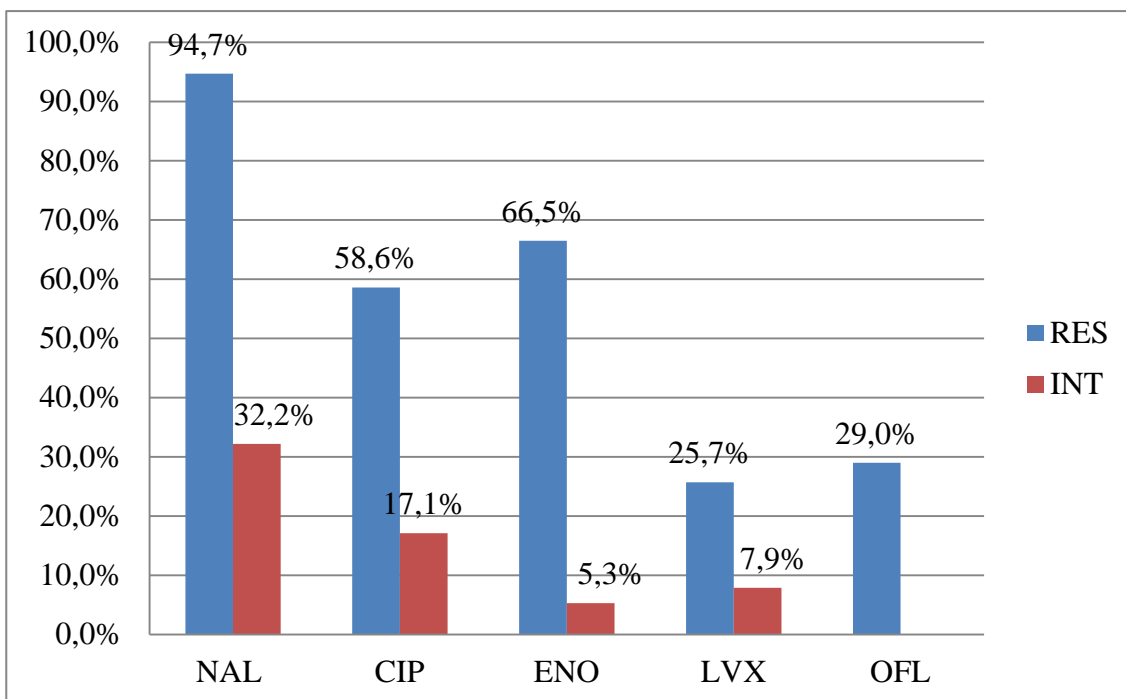
Thai e colaboradores (2012), em avaliação realizada no período de 2007-2009 no Norte do Vietnã, indicaram a resistência frente a uma diversidade de antimicrobianos, distribuída de forma generalizada entre os diferentes sorovares.

A associação de resistência antimicrobiana com sorovares específicos já vem sendo reportada na literatura (LARKIN et al., 2004; PARVEEN et al., 2007). Durante as últimas décadas o número de clones de *Salmonella Typhimurium* multirresistentes tem emergido (BUTAYE et al., 2006). Um destes clones de *S. Typhimurium* é tipicamente resistente a ampicilina, cloranfenicol, streptomina/spectomicina, sulfonamidas e tetraciclina (ACSSuT), é amplamente distribuído e foi evidenciado em amostras clínicas, animais de produção e alimentos em muitos países. Estes clones estão associados a elevados índices de virulência, estando ainda associados a resistência à outras classes de antimicrobianos como as quinolonas (ANTUNES et al., 2011; DANMAP, 2012, 2013).

A alta frequência de microrganismos potencialmente patogênicos em isolados humanos e em produtos de origem animal, assim como o aumento de sua resistência aos antimicrobianos utilizados como suplementos alimentares, levam a questionar seu uso indiscriminado como aditivos em rações animais, dando sustentação às recomendações relacionadas ao seu uso como promotores de crescimento (PALERMO NETO; ALMEIDA, 2006; ARAÚJO et al., 2007).

Com a finalidade de se obter a CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi realizado a prova de microdiluição com os antimicrobianos ácido nalidixico, ciprofloxacina, enrofloxacina, levofloxacina e ofloxacina levando em consideração os parâmetros estipulados pelo CLSI (2013).

O gráfico 6 apresenta o percentual de resistência e de suscetibilidade intermediária obtido a partir do teste de suscetibilidade antimicrobiana por microdiluição em caldo dos isolados avaliados.



**Gráfico 6** Percentual de resistência e suscetibilidade intermediária às quinolonas dos isolados de *Salmonella* spp., pelo teste de microdiluição em caldo, sendo CIP=Ciprofloxacina, NAL = Ácido Nalidíxico, ENO = Enrofloxacin, LEV = Levofloxacin, OFL = Ofloxacin. RES = Resistente, INT = Intermediário.

O teste de microdiluição em caldo (MC) demonstra a menor eficácia do ácido nalidíxico, seguido da ciprofloxacina e enrofloxacin. Os antimicrobianos de maior eficácia pelo teste de microdiluição em caldo foram a levofloxacin e ofloxacin. Resultados similares foram detectados no teste de difusão em disco (DD).

O elevado grau de suscetibilidade intermediária detectado pela avaliação da CIM da ciprofloxacina está relacionado à mudança nos critérios interpretativos do CLSI (2013) com a diminuição dos pontos de corte.

O EUCAST, foi pioneiro na diminuição do ponto de corte para CIP para cobrir o espectro emergente de isolados que apresentavam suscetibilidade reduzida com falhas terapêuticas (AARESTRUP et al., 2003). Essas diretrizes também foram adotadas pelo Clinical and Laboratory Standard Institute (HUMPHRIES et al., 2012). Existem cada vez mais evidências de falha terapêutica associada a infecções causadas por microrganismos resistentes a CIP, em que MIC entre 0,06 e 2 mg/mL justifica o uso de um ponto de interrupção inferior para determinar a sensibilidade dos isolados de *Salmonella* spp. (AARESTRUP et al., 2003; ESCRIBANO et al., 2004; MARIMON et al., 2004).

Uma possível explicação para os elevados índices de resistência ao Ácido Nalidíxico pode ser atribuída à resistência cruzada entre o antimalárico cloroquina, utilizado principalmente entre as comunidades indígenas no tratamento e prevenção de malária.

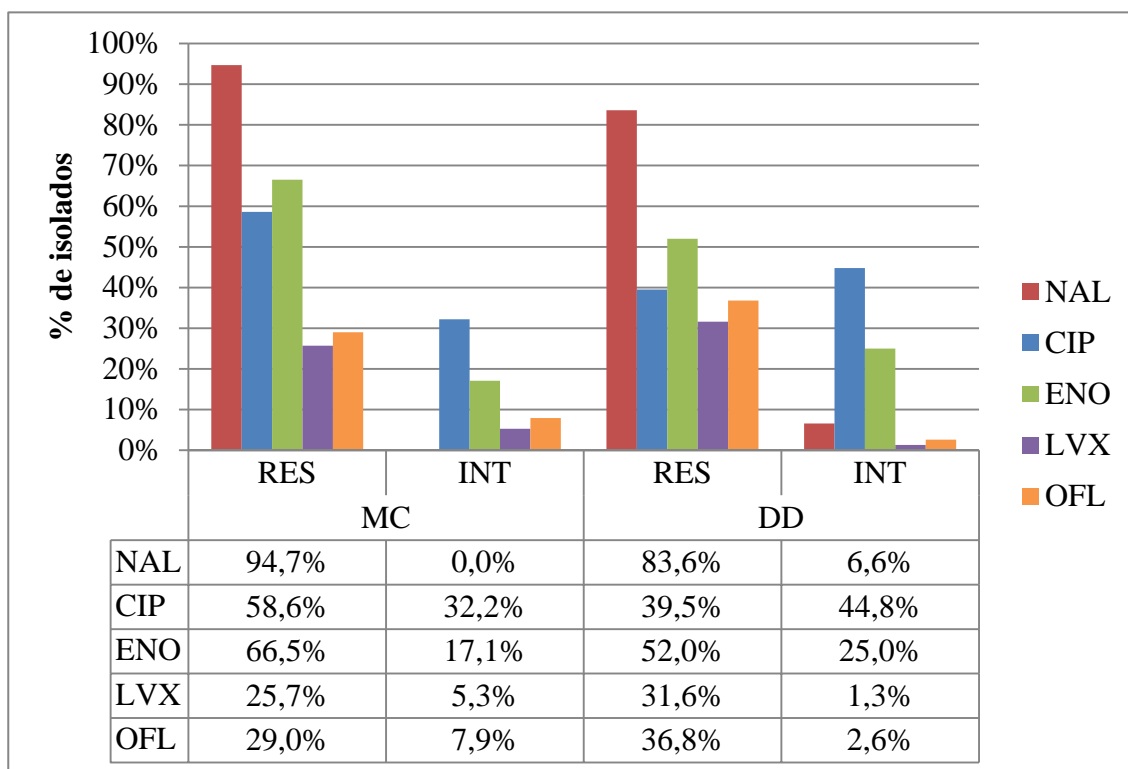
A cloroquina, 7-cloro-4- (4-dietilamino-1-metilbutyl) -quinolona, foi o antimalárico primário mais importante em todo o mundo devido à sua eficácia e custo sendo extensamente utilizado em todos os trópicos pela sua atividade contra as formas de *Plasmodium* eritrocitários, até o surgimento da resistência na década de 1970 (WELLEMS; PLOWE, 2001). Na maior parte dos países com malária (como o Brasil), a cloroquina ainda é um componente importante no tratamento de *P. vivax* (THIELMAN; GUERRANT, 2004; JAMISON, 2006) e apesar da resistência em *P. falciparum* (JAMISON, 2006), o tratamento empírico recorrente com cloroquina várias vezes por ano é difundido nos trópicos

(MONEDERO; CAMINERO, 2009). A cloroquina é também utilizada no mundo desenvolvido no tratamento de artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico (DAVIDSON et al., 2008), tendo ainda fracas propriedades antibacterianas contra *Salmonella* spp. e *Bacillus subtilis* (SÁ et al., 2009).

Múltiplos alelos de um gene de resistência à cloroquina transportador, *pfcr1*, e um gene do transportador de resistência a múltiplas drogas, *pfmdr1*, estão associadas com resistência à cloroquina em *Plasmodium falciparum*. Haplótipos de *P. falciparum* resistentes que predominam na África subsaariana parecem possuir uma desvantagem, sugerindo que eles são mantidos por pressão seletiva de cloroquina, que ainda é muito utilizado (KUBLIN et al., 2003; SÁ et al., 2009). Davidson e colaboradores (2008) propôs que, além da pressão seletiva para plasmódios resistentes, a cloroquina confere uma vantagem seletiva em isolados bacterianos pela sua fraca atividade antibacteriana, comprovado pelo surgimento de isolados de *Escherichia coli* resistentes à quinolonas e fluorquinolonas na Guiana rural onde não ocorria o uso de quinolonas (HENRY et al., 2006).

O ácido nalidíxico foi originalmente derivado a partir de um subproduto da síntese de cloroquina apresentando características estruturais similares, com semelhanças no núcleo dos fármacos (LESHER et al., 1962). O Ácido nalidíxico e as fluoroquinolonas, foram raramente utilizados em África antes do final de 1990 por causa de seu alto custo. Mais recentemente, a resistência bacteriana aos antibacterianos mais baratos exigiu o uso generalizado fluoroquinolona. Tendo em vista este fato à detecção de resistência às quinolonas e fluorquinolonas nestas regiões pode ser explicada pela resistência adquirida com o uso da cloroquina (MONEDERO; CAMINERO, 2009; VON GOTTBORG et al., 2008).

O gráfico 7 aponta as divergências de resultados entre os testes de microdiluição em caldo e difusão em disco simples.



**Gráfico 7** Percentual de resistência e suscetibilidade intermediária dos testes de microdiluição em caldo (MC) e difusão em disco simples (DD), sendo, CIP=Ciprofloxacina, NAL = Ácido Nalidíxico, ENO = Enrofloxacina, LEV = Levofloxacina, OFL = Ofloxacina. RES = Resistente, INT = Intermediário.

A diferença percentual, no que tange à resistência e suscetibilidade intermediária, entre todas as quinolonas/fluoroquinolonas testadas indica as divergências entre estes dois testes de suscetibilidade antimicrobiana demonstrando que, embora a difusão em disco seja um teste de triagem eficaz este não é capaz de identificar com exatidão todos os perfis de resistência.

Vale ressaltar que enquanto o teste de difusão em disco simples apresentava valores percentuais reduzidos para ciprofloxacina, enrofloxacin e ácido nalidíxico (indicando a não detecção de isolados resistentes), os antimicrobianos levofloxacina e ofloxacina relataram resultados contrários onde o percentual de resistência pelo teste de difusão em disco simples apresentou resultados superiores em relação à resistência quando comparados ao teste de MC (o que representa a detecção de isolados falso resistentes levando em consideração a microdiluição em caldo como teste padrão).

A diferença de suscetibilidade intermediária entre os testes no ácido nalidíxico se deve a ausência de pontos de corte representantes desta classificação pelo CLSI (2013).

Vale ressaltar a detecção de 29 isolados com perfil de suscetibilidade intermediária à ciprofloxacina sendo resistentes no teste de microdiluição em caldo e 4 isolados sensíveis que se apresentaram resistentes também. Ainda 9 isolados com suscetibilidade intermediária e 10 sensíveis ao ácido nalidíxico no teste de DD foram resistentes no MC.

No que diz respeito à enrofloxacin 12 isolados que foram intermediários e 2 sensíveis no teste de difusão em disco simples apresentaram resistência no teste de microdiluição em caldo.

O teste de microdiluição em caldo é padronizado pelo CLSI (2013) para detectar a concentração de antimicrobiano que iniba o crescimento bacteriano. Este teste é o mais utilizado atualmente por ser capaz de detectar não só os isolados resistentes como também aqueles que apresentam suscetibilidade intermediária.

**Tabela 4** Resultado de acurácia entre os testes de difusão em disco simples e microdiluição em caldo para as quinolonas/fluoroquinolonas.

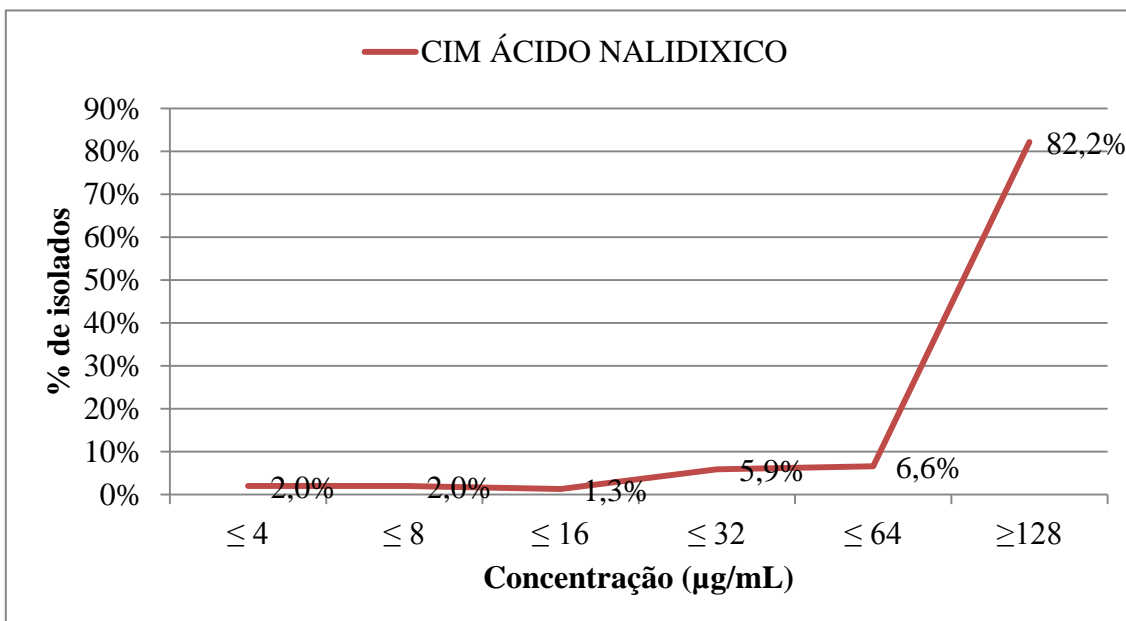
QUINOLONAS	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
Ciprofloxacina	92,5	89,3	97,7	68,5
Ácido Nalidixico	94,3	93,8	99,3	65,2
Enrofloxacin	92,1	86,2	96,7	71,4
Levofloxacina	100	96,2	92,2	100
Ofloxacina	100	95,8	93,4	100

S=sensibilidade; E=especificidade; VPP=valor preditivo positivo; VPN= valor preditivo negativo.

Embora diferenças significativas entre os testes de difusão em disco e microdiluição em caldo tenham sido encontradas o teste de disco difusão ainda demonstra ser uma importante ferramenta de monitoramento de resistência.

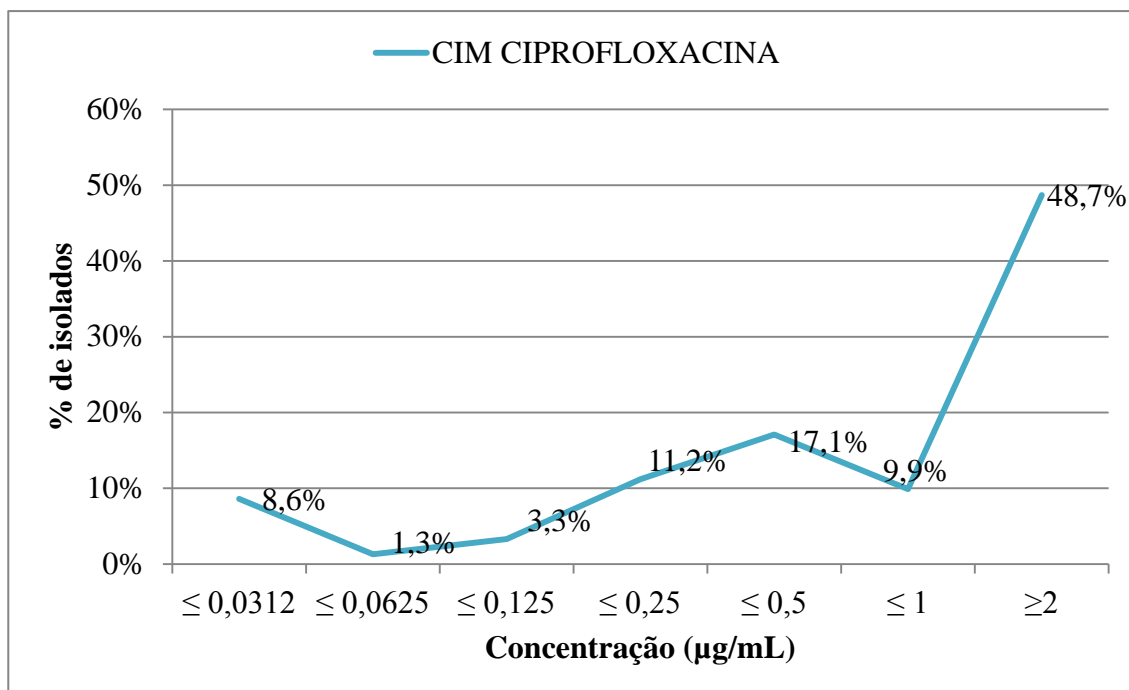
O teste de difusão em disco demonstrou discrepâncias entre todos os representantes das quinolonas avaliadas neste trabalho. Porém se mostrou mais eficaz em relação à levofloxacina e ofloxacina respectivamente. A enrofloxacin foi o antimicrobiano com menor acurácia frente ao teste de microdiluição em caldo.

Os gráficos 8, 9, 10, 11 e 12 apontam o percentual de isolados detectados nas concentrações inibitórias mínimas obtidas pelo teste de microdiluição em caldo para ciprofloxacina, ácido nalidíxico, enrofloxacina, levofloxacina e ofloxacina respectivamente.



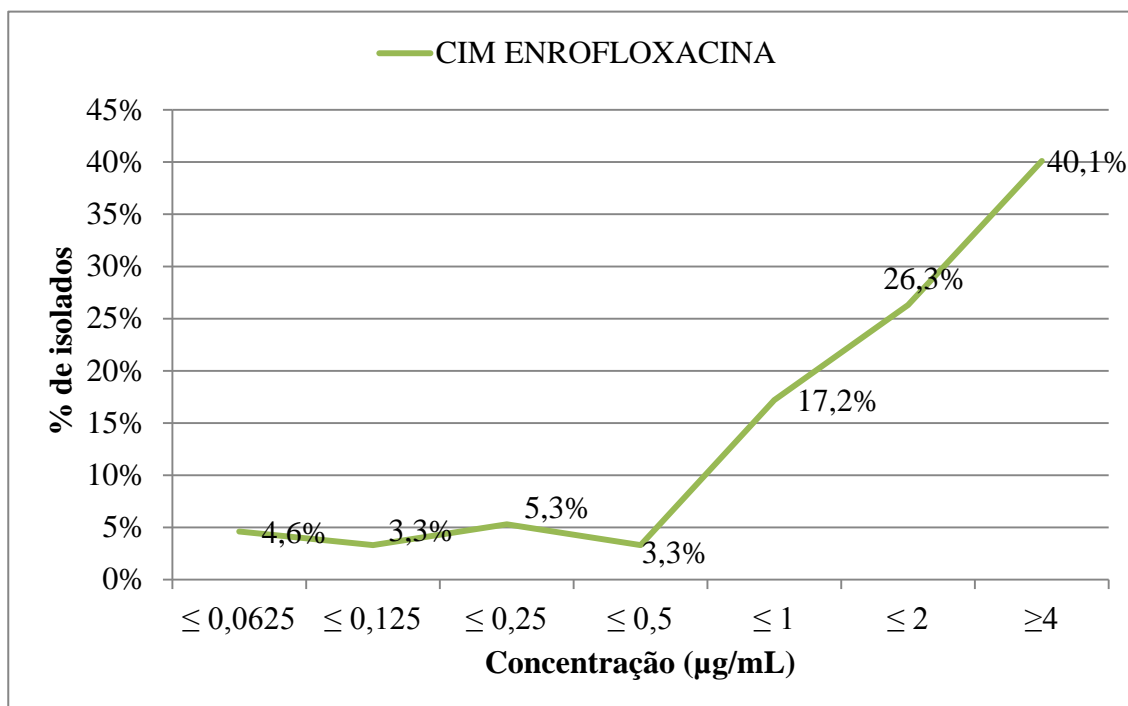
**Gráfico 8** Percentual de isolados de *Salmonella* spp. em relação a CIM detectada ao ácido nalidíxico.

Observa-se que 82,3% dos isolados apresentaram resistência ao ácido nalidíxico, com a maior CIM testada neste trabalho, sendo este o mais ineficaz dos antimicrobianos testados pelo teste de microdiluição em caldo.



**Gráfico 9** Percentual de isolados de *Salmonella* spp. em relação à CIM detectada a ciprofloxacina.

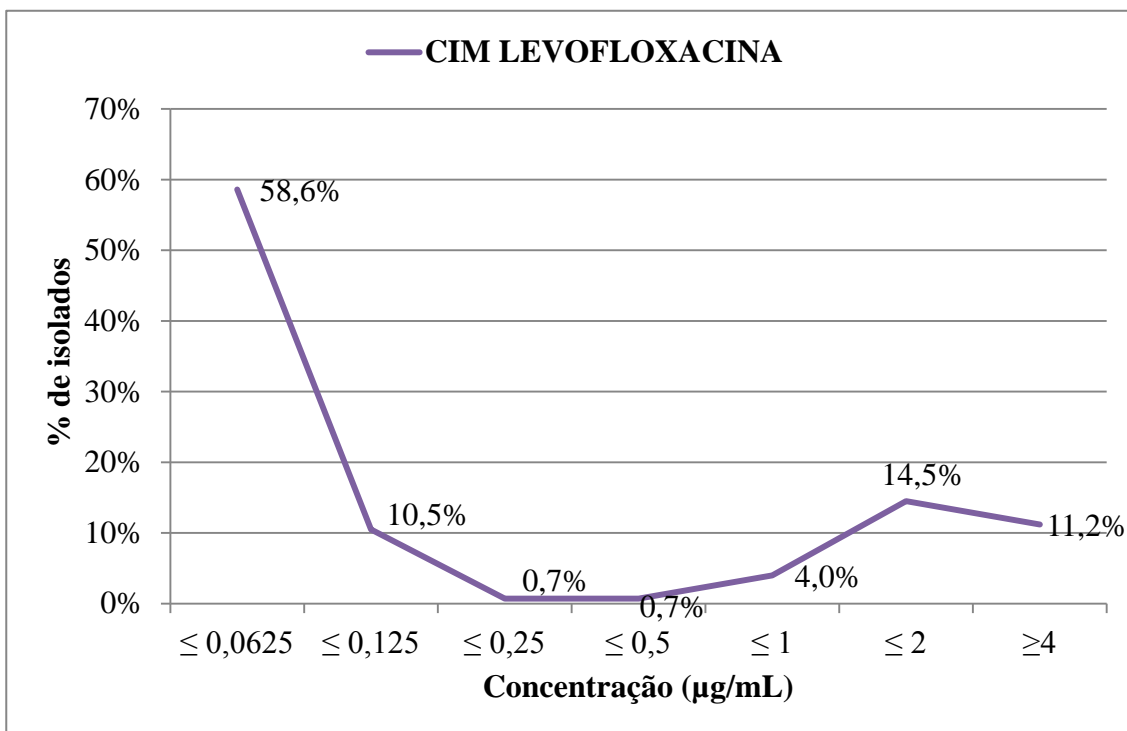
O gráfico 9 aponta um elevado percentual de isolados com CIM maior do que o valor limite (2 µg/mL), indicando a adaptação de isolados de *Salmonella* spp. na presença de concentrações elevadas de ciprofloxacina, indicando as possíveis falhas terapêuticas na aplicação destes fármacos.



**Gráfico 10** Percentual de isolados de *Salmonella* spp. em relação à CIM detectada da enrofloxacinina.

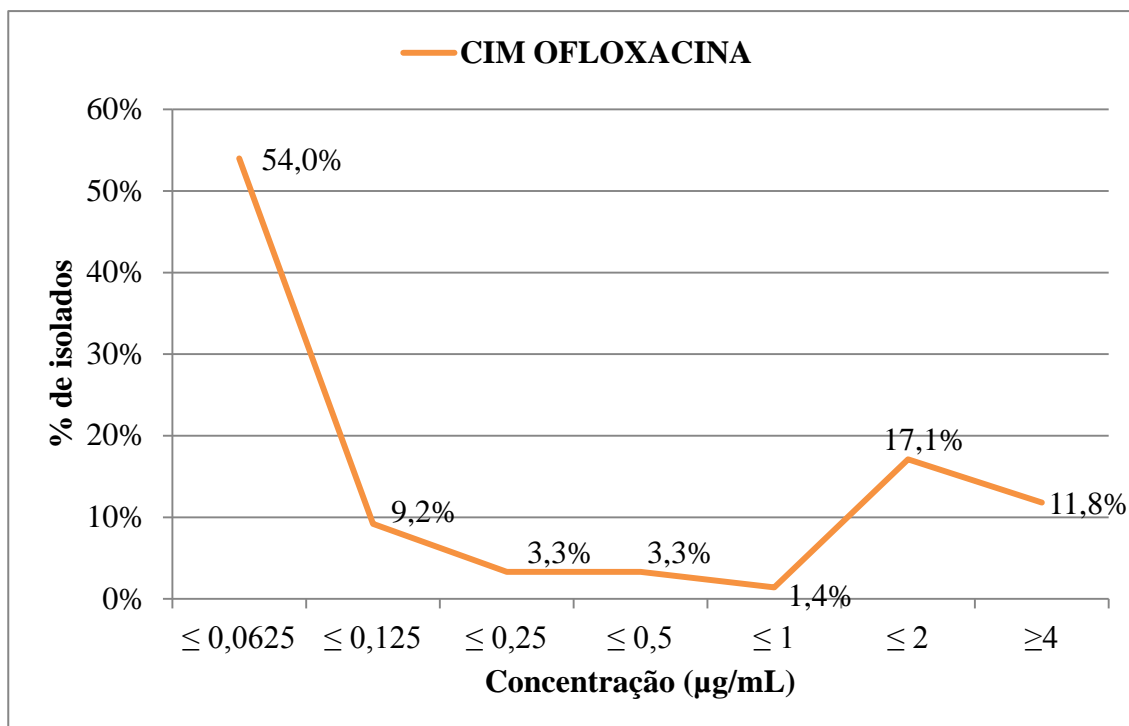


Foram detectados 61 (40,1%) isolados com CIM maior ou igual a 4µg/mL (maior concentração do fármaco testada), ressaltando ainda o elevado índice de resistência atribuído à concentração de CIM menor ou igual 2µg/mL com 40 isolados (26,3%). Há ainda uma grande quantidade de isolados na concentração de CIM menor ou igual 1µg/mL (17,2%) representando uma parcela significativa destes com a maior concentração classificada como suscetibilidade intermediária (próximo a um perfil de resistência).



**Gráfico 11** Percentual de isolados de *Salmonella* spp. em relação a CIM detectada da levofloxacina

Os elevados percentuais obtidos pelo teste de microdiluição em caldo na faixa de sensibilidade (58,5% à 0,0625 µg/mL e 10,5% à 0,125µg/mL) indicam a elevada eficácia desta fluoroquinolona de terceira geração frente aos isolados testados. Porém vale ressaltar o significativo percentual detectado na zona de resistência a este antimicrobiano (14,5 % 2µg/mL e 11,2% 4µg/mL) assim como o elevado percentual encontrado na maior concentração avaliada.



**Gráfico 12** Percentual de isolados de *Salmonella* spp. em relação à CIM detectada da ofloxacina

Em relação ao antimicrobiano ofloxacina percebe-se um padrão similar ao da levofloxacina onde o maior percentual de CIM foi detectado entre a menor concentração deste antimicrobiano utilizada ( $\leq 0,6025 \mu\text{g/mL}$ ).

A variação nas taxas de sensibilidade das diferentes quinolonas pode ser explicada pelo mecanismo de resistência, onde o nível de resistência depende da enzima-alvo afetada e do número de mutações acumuladas. Além disso, há uma relação entre o nível de resistência e a potência específica de cada fármaco, principalmente para as quinolonas mais novas (SANDERS, 2001; RUIZ et al., 2012).

A Resistência às quinolonas entre isolados do gênero *Salmonella* spp. permaneceu baixa até meados dos anos 90 em todo o mundo, quando começou a aumentar, atingindo níveis semelhantes aos encontrados neste trabalho, com elevados índices de resistência ao NAL ou CIP (ESCRIBANO et al., 2004; MARIMON et al., 2004; HOPKINS et al., 2005; BIEDENBACH et al., 2006; KE et al., 2014). Esse alto nível de resistência só foi detectado por *Salmonella* Enteritidis no Reino Unido em 2009, quando a resistência à CIP atingiram 30,5% (EFSA; ECDC, 2011).

Cepas com MIC elevado para fluoroquinolonas têm sido associadas às mutações de ponto na região determinante de resistência a quinolonas (QRDR) da enzima DNA-girase, que é alvo primário de ação das fluoroquinolonas (GIRAUD et al., 2006; ALDRED, et al., 2013). 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 (EAVES et al., 2004; HOPKINS et al., 2005). Sabe-se ainda, que a redução do acúmulo do antimicrobiano no interior da célula devido à hiperexpressão no sistema de bombas de efluxo contribui em *Salmonella* spp. para o aumento da MIC de quinolonas, porém é insuficiente para gerar elevados níveis de resistência a fluoroquinolonas (SOTO et al., 2003; BIEDENBACH et al., 2006).

Soto e colaboradores (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 MIC da CIP das cepas, relacionada à hiperexpressão no sistema de efluxo.

Os perfis de suscetibilidade as quinolonas obtidos pelo teste de microdiluição em caldo estão apresentados na tabela 5.

**Tabela 5** Perfis de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas testados por microdiluição em caldo

ANTIBIÓTIPOS	PERFIL DE RESISTENCIA	CEPAS (Nº)
1	NAL, CIP, ENO	46
2	NAL	38
3	NAL, CIP, ENO, LEV, OFL	37
4	NAL, ENO	14
5	_*	8
6	NAL, CIP, ENO, OFL	4
7	NAL, LEV, OFL	2
8	NAL, CIP	2
9	NAL, OFL	1

\*Antibiótipo de sensibilidade a todos os antimicrobianos testados

Foram identificados 9 perfis distintos de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas testadas.

O elevado percentual de resistência a todos os antimicrobianos testados (terceiro perfil mais prevalente) pelo teste de microdiluição em caldo indica a ineficácia terapêutica das quinolonas/fluoroquinolonas frente a uma gama relevante de isolados de *Salmonella* spp.

A maioria dos isolados apresentou o perfil de resistência ao ácido nalidíxico, ciprofloxacina e enrofloxacin que indica resistência às quinolonas de primeira e segunda geração testadas. Este perfil provavelmente se deve ao uso indiscriminado destes tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária. Cabe ressaltar que a enrofloxacin é um antimicrobiano análogo da ciprofloxacina com uso exclusivo na medicina veterinária.

O segundo perfil mais prevalente (de resistência ao ácido nalidíxico) já era esperado visto que o ácido nalidíxico é uma quinolona de primeira geração de baixa eficácia terapêutica, demonstrando um raio de ação significativo das fluoroquinolonas em relação a estes isolados.

O perfil de sensibilidade a todas as quinolonas/fluoroquinolonas testadas foi detectado em 8 isolados. Destes, apenas 1 isolado apresentou o perfil de suscetibilidade intermediária a ciprofloxacina. Este perfil de sensibilidade a todas as quinolonas analisadas indica a provável perda de elementos móveis carreadores de genes de resistência às quinolonas e ou fluoroquinolonas devido ao processo de estocagem (estoques realizados em Agar tamponado).

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).

Apesar das diferenças de potência entre as quinolonas, a detecção de um quantitativo relativamente alto de resistência a todas as quinolonas pode ser o indício de um possível mecanismo de resistência cruzada entre as quinolonas explicando índices de resistência semelhantes para fármacos com diferentes potências da mesma classe, já que um evento mutacional confere elevação na CIM, em 4 a 8 vezes, conferindo alto nível de resistência para

as quinolonas mais antigas (menos potentes), como o NAL, e baixo nível de resistência às fluoroquinolonas, percebido apenas pela elevação da CIM (HERNÁNDEZ et al., 2011).

Importa referir que a comparação dos resultados obtidos em matéria de resistência utilizando o teste de microdiluição em caldo com os dados descritos na literatura é difícil, visto que os trabalhos existentes podem se utilizar de critérios interpretativos de suscetibilidade diferentes: por vezes, há diferenças na norma considerada (CLSI, EUCAST, entre outros); Ou mesmo com a aplicação da mesma norma, são utilizados critérios interpretativos diferentes (epidemiológicos ou clínicos). Outras disparidades tais como a escolha de amostras, o número de amostras e a metodologia laboratorial podem também existir (DE JONG et al., 2009). Por esse motivo, no que respeita à comparação de percentagens de resistência entre diferentes estudos publicados, recomenda-se que os autores assegurem que as mesmas metodologias e os mesmos critérios interpretativos sejam usados (SCHWARZ et al., 2010).

O alto nível de resistência ao ácido nalidíxico demonstra a importância da vigilância contínua na detecção e prevenção da propagação de cepas resistentes. A resistência ao ácido nalidíxico envolve uma única mutação do gene DNA-girase, sendo esta uma etapa inicial para o desenvolvimento de resistência a ciprofloxacina que é geralmente associada com duas ou mais mutações na DNA girase (CRUMP et al., 2011).

A tabela 6 apresenta o percentual de prevalência dos 5 antibiótipos de maior relevância obtidos (Tabela 5) em relação à origem das amostras selecionadas.

**Tabela 6** Percentual dos antibiótipos prevalentes relacionados à origem de isolamento

Antibiótipos	Fontes de Isolamento			
	Animal	Alimento	Ambiente	Humano
1	42,9%	10,7%	10,7%	35,7%
2	8,7%	30,4%	8,7%	52,2%
3	8,1%	32,4%	10,8%	48,7%
4	14,3%	35,7%	7,1%	42,9%
5	16,7%	27,8%	27,8%	27,8%

Vale à pena ressaltar a presença de um alto percentual de isolados de *Salmonella* spp. de origem humana apresentando o antibiótipo 3 (de resistência a todos os antimicrobianos testados), demonstrando a circulação de cepas resistentes às quinolonas/fluoroquinolonas na população. O percentual de isolados que apresentaram o antibiótipo 3 oriundo de fonte alimentar reforça a provável inter-relação entre isolados de origem alimentar e humana.

O elevado percentual de resistência de isolados de origem animal no antibiótipo 1 se deve ao uso exclusivo e exacerbado da enrofloxacina como promotor de crescimento e para uso terapêutico por médicos veterinários no ambiente de criação animal. Encontrasse também um percentual significativo de isolados de origem humana neste perfil. A presença de resistência à enrofloxacina e ciprofloxacina juntos se deve a similaridade molecular entre estes dois antimicrobianos.

O antibiótipo 4, assim como os isolados com resistência apenas ao ácido nalidíxico (antibiótipo 2) foram detectados principalmente em amostras humanas e alimentares reforçando a ideia da interrelação entre fontes alimentares e humanas na veiculação de resistência.

Pode-se notar ainda que a presença de isolados sensíveis a todas as quinolonas/fluoroquinolonas testadas é similar entre as diferentes fontes testadas.

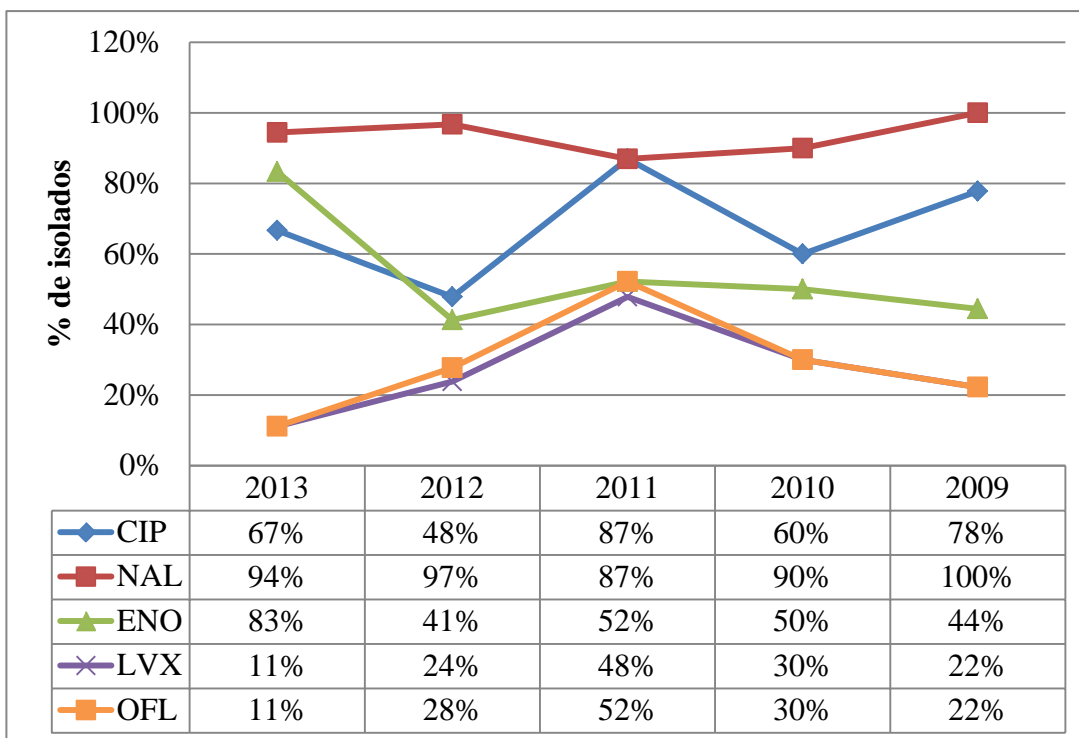
A maior parte das cepas com característica de resistência às quinolonas surgiu inicialmente em animais expostos a fluoroquinolonas. Posteriormente, essas cepas foram transmitidas aos seres humanos via cadeia alimentar (EAVES et al., 2004; ESCRIBANO, et al., 2004).

Embora alguns estudos sobre isolados humanos indiquem que a resistência clínica não seja tão evidenciada (JEONG et al., 2011; KOZODEROVIC et al., 2012; RUSHDY et al., 2013), fato não observado neste estudo, os relatórios sobre os mecanismos de resistência encontrados em *Salmonella* spp. isolada do ambiente, animais e alimentos (CHIU et al., de 2002; CAVACO et al., 2008, AKIYAMA; KHAN, 2012; KIM et al., 2013; PALOMO et al., 2013) tem que ser considerado como um alerta para saúde pública.

Percebesse que os animais e os produtos alimentares de origem animal, e o ambiente de produção constituem um armazém de bactérias resistentes, não-patogênicas (comensais), que podem ser transferidas a humanos (contato direto ou via alimentação) ou a partir dos quais os determinantes de resistência podem ser transferidos (transferência horizontal) a outras bactérias zoonóticas ou comensais (EFSA, 2009; ALESSIANI et al., 2009).

Estes microrganismos funcionam como reserva de genes de resistência, operando como mediadores na transmissão e disseminação desses genes, através de mecanismos de transferência variáveis, pelos vários ecossistemas, para bactérias patogênicas ou comensais, alheios a quaisquer barreiras ecológicas, geográficas ou mesmo filogenéticas (ALESSIANI et al., 2009; ISHIDA et al., 2010).

O gráfico 13 representa a evolução temporal (2009 a fevereiro de 2013) da resistência aos antimicrobianos testados levando em consideração o teste de microdiluição em caldo.



**Gráfico 13** Percentual de isolados de *Salmonella* spp. resistentes aos antimicrobianos testados em relação ao período (ano) do estudo em questão. CIP=Ciprofloxacina, NAL = Ácido Nalidíxico, ENO = Enrofloxacin, LEV = Levofloxacin, OFL = Ofloxacin.

Vale ressaltar que no ano de 2013 foram trabalhadas apenas as amostras enviadas nos meses de janeiro e fevereiro.

O antimicrobiano ácido nalidíxico apresentou uma curva de crescimento constante entre os períodos avaliados.

O ano de 2011 apresentou um aumento no índice de resistência entre os antimicrobianos ciprofloxacina, levofloxacin e ofloxacin.

Os antimicrobianos levofloxacin e ofloxacin apresentaram uma curva de crescimento similar com diferenças pouco significantes apenas no período de 2011 e 2012.

Quanto à enrofloxacin fica evidenciado o expressivo aumento de resistência no ano de 2013.

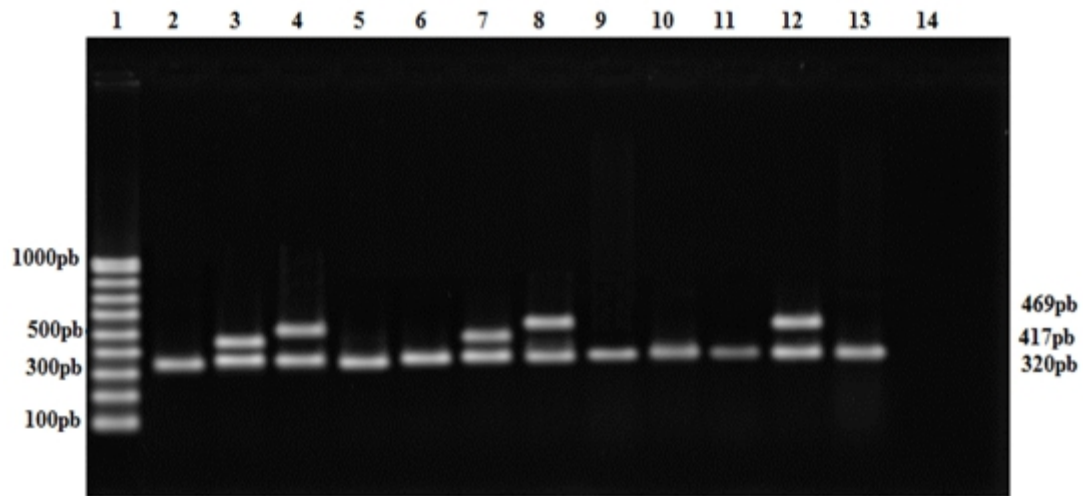
Com exceção do ácido nalidíxico foi observado um crescimento da curva de resistência em relação aos períodos de 2009, 2010 e 2011 com uma leve queda entre os anos de 2011 e 2012. Os antimicrobianos enrofloxacin e ciprofloxacina obtiveram ainda um aumento substancial entre os anos 2012 e 2013.

No Reino Unido o percentual de resistência para fluorquinolonas subiu de 6% em 2001 para 20% em 2006 e manteve-se em cerca de 17% no restante da década (LIVERMORE et al., 2013). Aumentos significantes podem ser observados na Itália onde o percentual de resistência as fluorquinolonas passou de 11% em 2005 para 50% em 2011 (GAGLIOTTI et al., 2011).

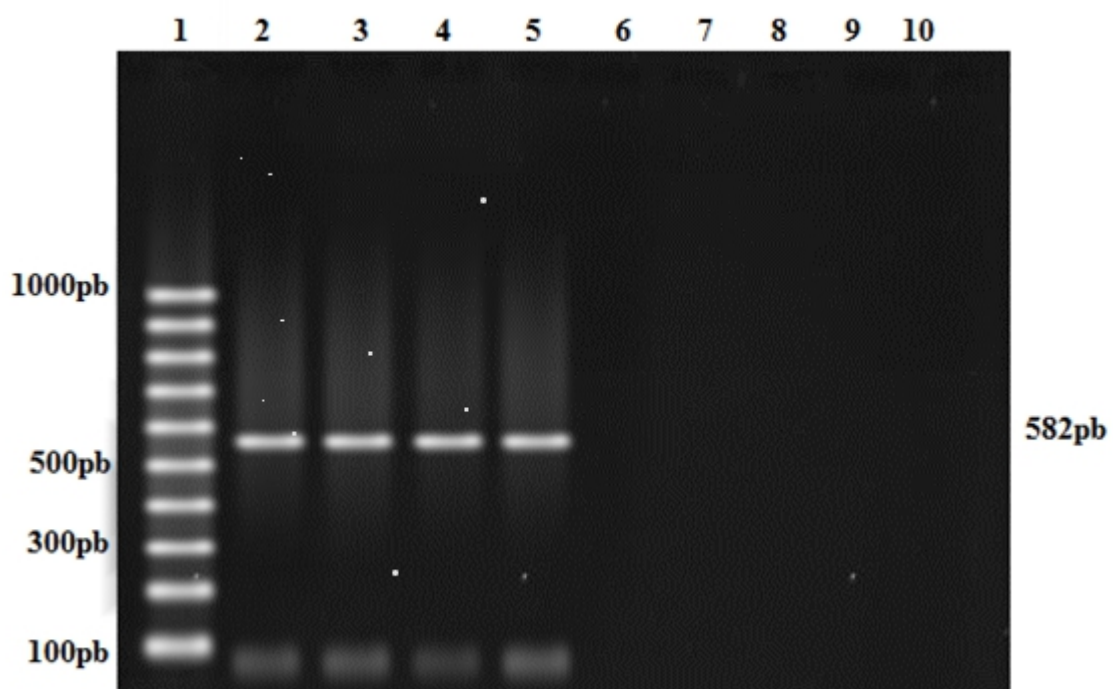
Em estudo realizado em Hong Kong durante um período de seis anos foi evidenciado um aumento na resistência de 30 para 56% ao ácido nalidíxico e 31,5 para 55,7% a ciprofloxacina (LO et al., 2012).

Com o intuito de avaliar o papel dos mecanismos gênicos de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas mediados por elementos móveis, os isolados foram submetidos a provas de reação em cadeia de polimerase para identificar a presença ou não dos genes codificadores das proteínas Qnr e Aac 6'(Ib). A pesquisa do gene codificador da Integrase

também foi verificada para avaliar a presença de elementos carregados por integrons nos isolados (figuras 6, 7, 8, 9,10 e 11 respectivamente).

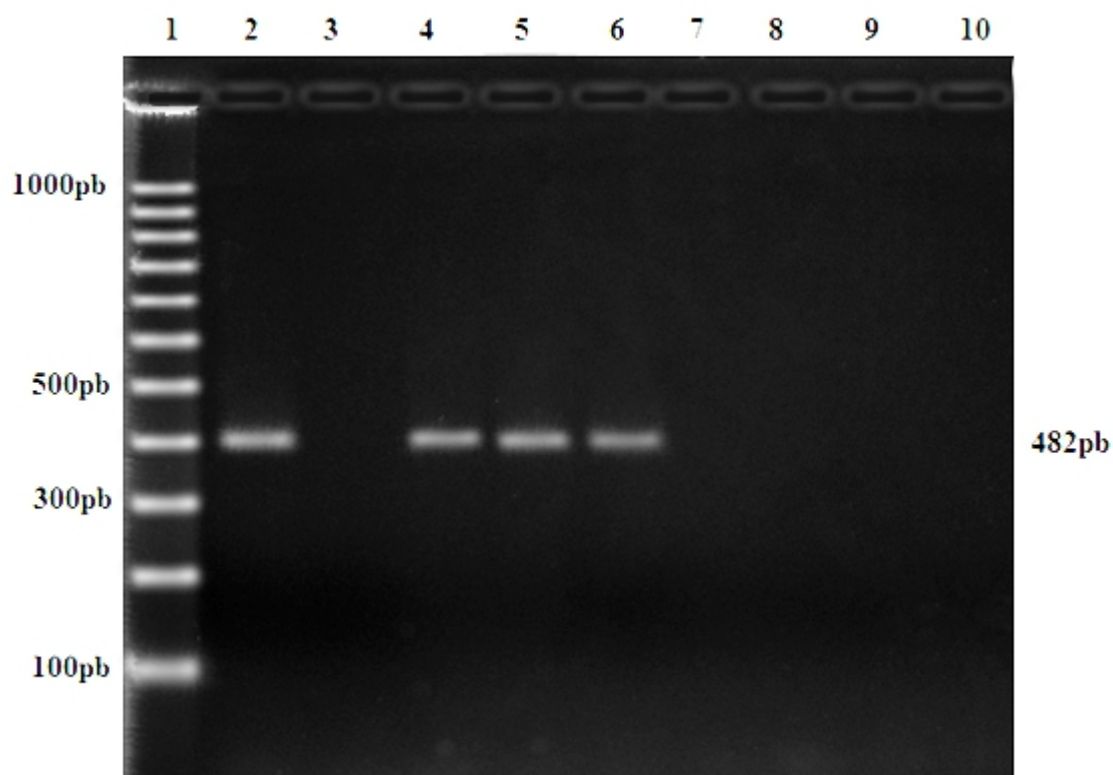


**Figura 6** Produto da amplificação dos genes *QnrB* e *QnrS* obtidos através da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) – Multiplex em *Salmonella* spp. 1 – Marcador de peso molecular; 2 – Controle negativo; 3- Controle positivo *QnrB*; 4-Controle positivo *QnrS*; **Reação positiva *QnrS*** (417pb): 7- *Salmonella* ser. Typhimurium; **Reação positiva *QnrB*** (469pb): 8- *Salmonella* ser. Typhimurium; 12- *Salmonella* ser. Enteritidis **Reação negativa**: 5- *Salmonella* ser. Enteritidis, 6- *Salmonella* ser. Corvallis, 9- *Salmonella* ser. Typhimurium, 10- *Salmonella* ser. Panama; 11- *Salmonella* ser. Rissen e 13- *Salmonella* ser. Typhimurium; 14- branco.

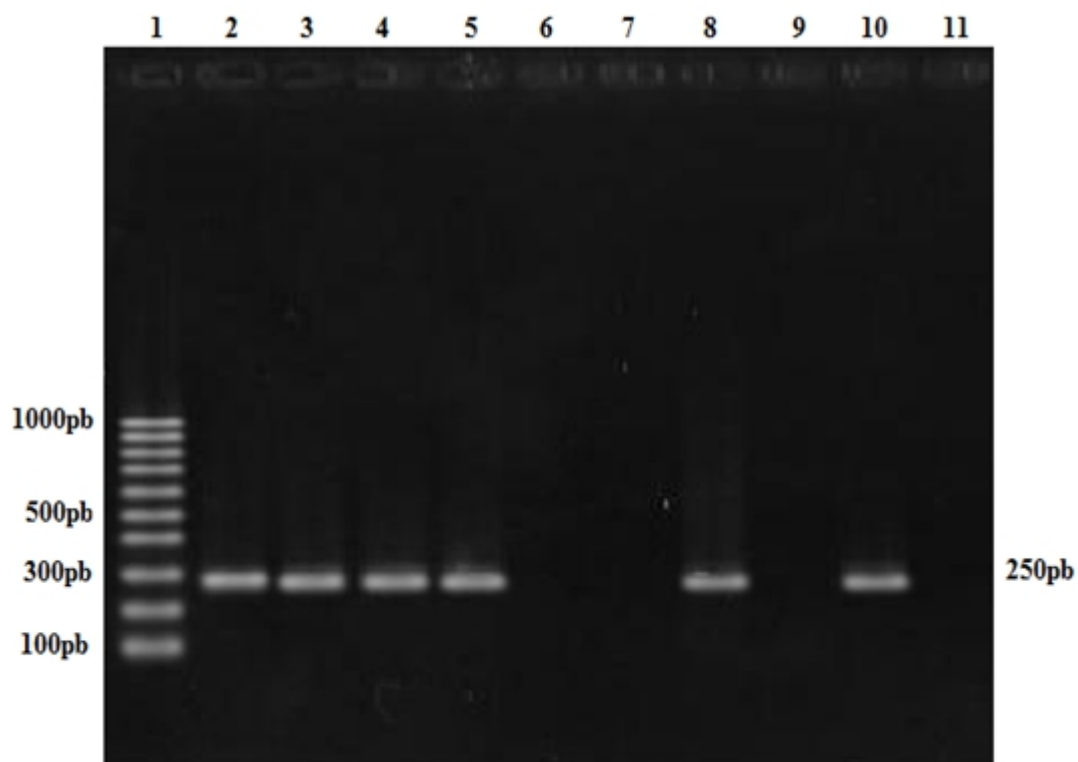


**Figura 7** Produto da amplificação do gene *QnrD* obtido através da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella* spp. 1 – Marcador de peso molecular; 2 – Controle positivo; **Reação positiva:** 3 – *Salmonella* ser. Typhimurium, 4- *Salmonella* ser. Livingstone, 5- *Salmonella* ser. Typhimurium. **Reação negativa:** 6- *Salmonella* ser. Enteritidis, 7- *Salmonella* ser. Typhimurium, 8- *Salmonella* ser. Brandenburg; 9- *Salmonella* ser. Heidelberg; 10 – Controle negativo

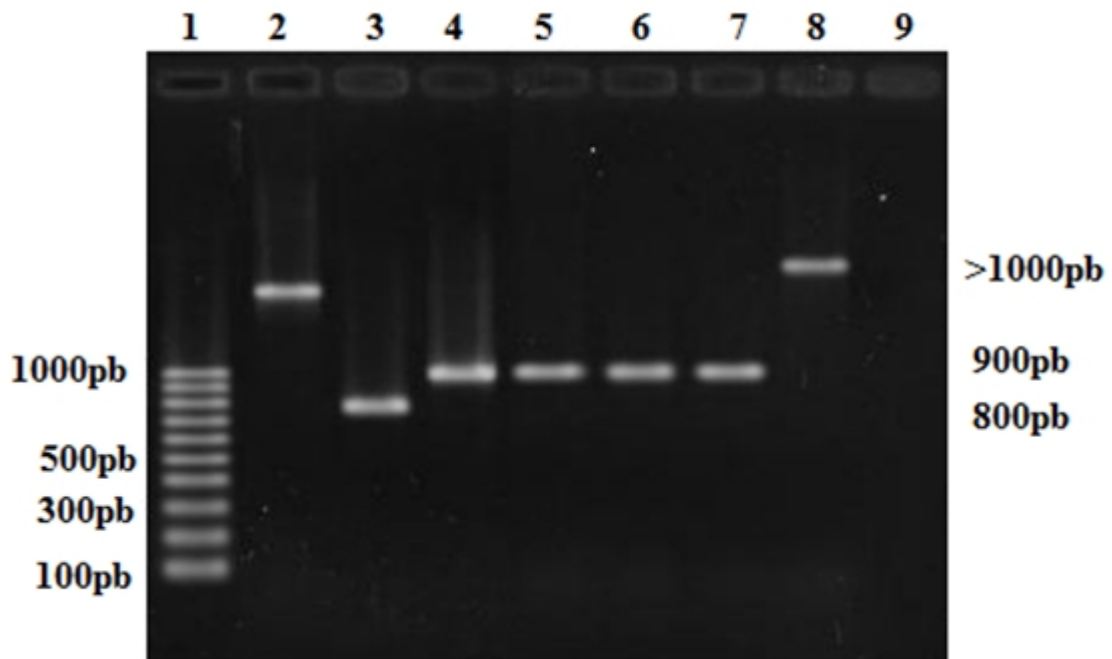




**Figura 8** Produto da amplificação do gene *aac(6')-Ib* através da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella* spp. 1 – Marcador de peso molecular; 2 – Controle positivo; **Reação positiva:** 4 - *Salmonella* ser. Enteritidis, 5- *Salmonella* ser. Hadar, 6- *Salmonella* ser. Typhimurium, **Reação negativa:** 3- *Salmonella* ser. Enteritidis, 7- *Salmonella* ser. Typhimurium, 8- *Salmonella* ser. Brandenburg; 9- *Salmonella* ser. Enteritidis; 10 – Controle negativo.

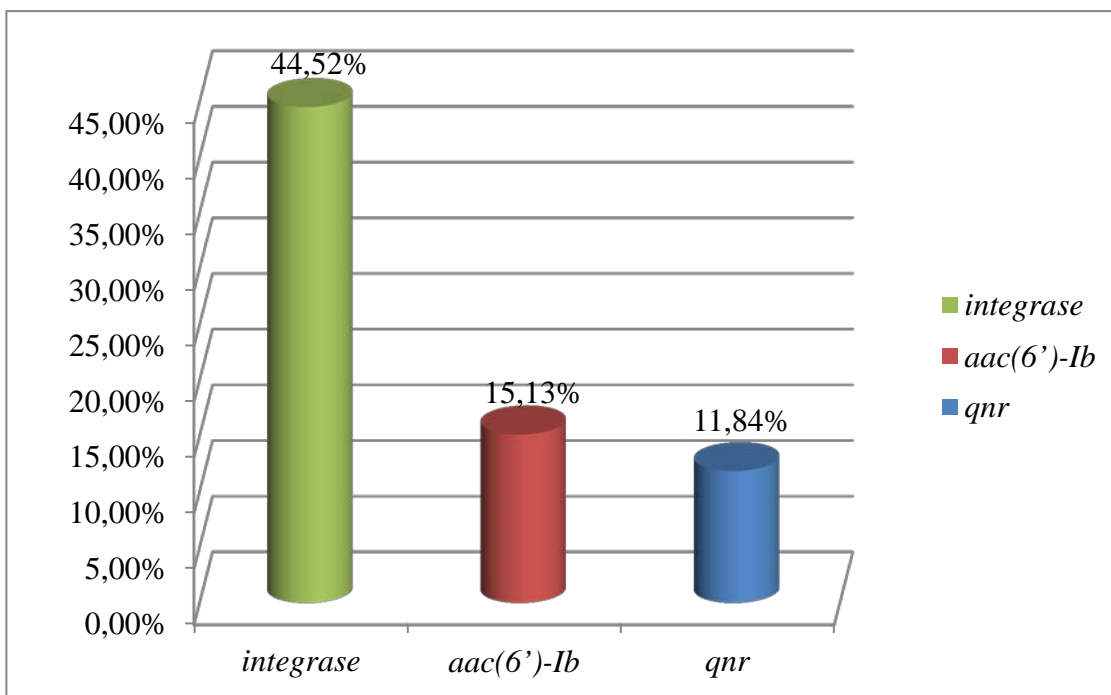


**Figura 9** Produto da amplificação da região conservada do Integron através da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella* spp. 1 – Marcador de peso molecular; 2 – Controle positivo; **Reação positiva:** 3 - *Salmonella* ser. Enteritidis, 4- *Salmonella* ser. Saintpaul, 5- *Salmonella* ser. Typhimurium, 8- *Salmonella* ser. Agona, 10- *Salmonella* ser. Heidelberg, **Reação negativa:** 6- *Salmonella* ser. Enteritidis, 7- *Salmonella* ser. Typhimurium, 9- *Salmonella* ser. Brandenburg; 11 – Controle negativo.



**Figura 10** Produto da amplificação da região variável do Integron através da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella* spp. 1 – Marcador de peso molecular; **Bandas com +/- 900pb**: 4- *Salmonella* ser. Saintpaul, 5- *Salmonella* ser. Typhimurium, 6- *Salmonella* ser. Typhimurium, 7- *Salmonella* ser. Agona; **Bandas com +/- 800pb**: 3- *Salmonella* ser. Schwarzengrund; **Bandas >1000pb**: 2- *Salmonella* ser. Typhimurium, 8- *Salmonella* ser. Typhimurium; 9 – Controle negativo

O gráfico 14 aponta os percentuais dos genes associados a elementos móveis identificados neste trabalho.



**Gráfico 14** Frequência dos genes associados a elementos móveis em *Salmonella* spp.

A *integrase* foi o gene mais detectado entre os isolados com 44,5% (67/152) seguido do gene *aac(6')-Ib* com 15,1% (23/152). Os representantes da síntese proteínas Qnr foram menos frequentes com 11,8% (18/152) de isolados.

A incidência de PMQR tem sido mundialmente relatada (CHEUNG et al., 2005; ROBICSEK et al., 2006a; CATTOIR et al., 2007a; CUI et al., 2009; WANG et al., 2009; TAGUCHI et al., 2009).

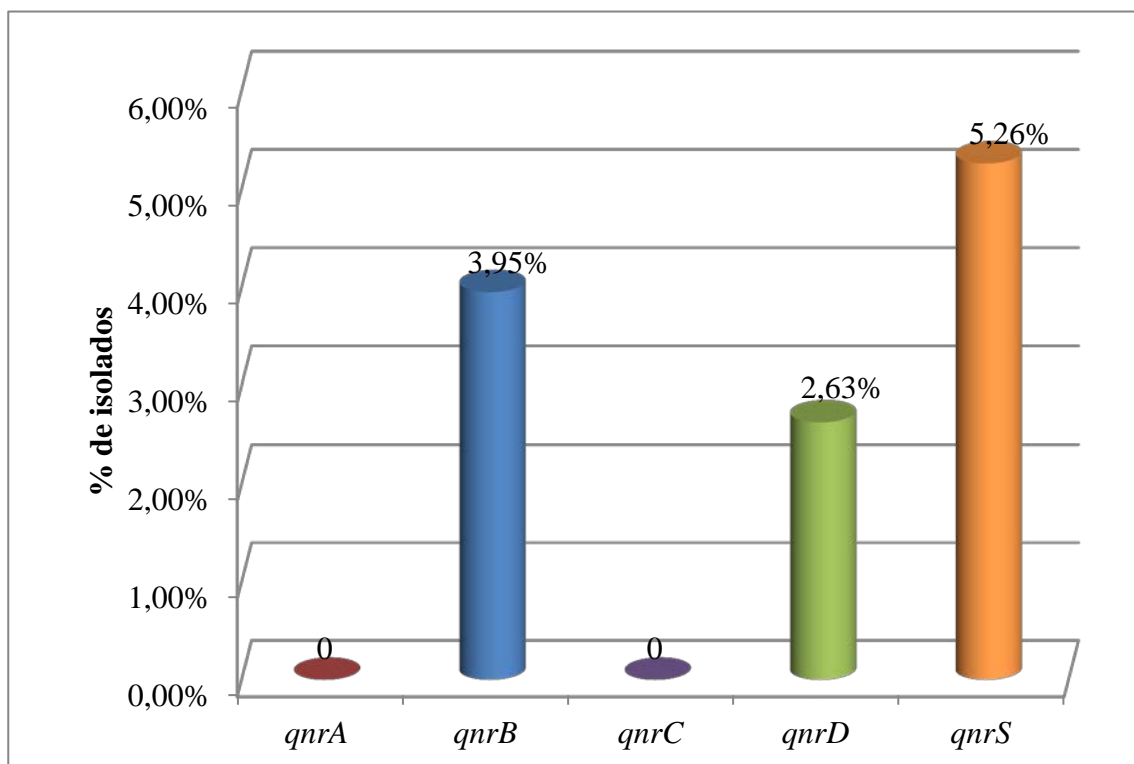
No que concerne a prevalência dos genes *qnr* observada (11,8%), parece estar de acordo com o reportado na literatura até então. Estudos efetuados em isolados clínicos de origem humana descrevem prevalências similares desde 0% em 741 isolados de enterobactérias de origem hospitalar (YAMANE et al., 2008); 2,3% em 257 isolados de enterobactérias de pacientes de ambulatórios (MINARINI et al., 2008); 3,2% em 446 isolados de *Salmonella* spp. de origem humana (WU et al., 2008a); 3,9% em 514 isoaldos clínicos de *Escherichia coli* (ZHOU et al., 2011), 4% revisão com dados mundiais (ROBICSEK et al., 2006b), 4,1% em 101 isolados de *Enterobacter cloacae* de origem alimentar e hospitalar (ZHAO et al., 2010), 5,8% em 274 isolados de Gram negativos em águas de fazendas no Egito (ISHIDA et al., 2010), 8,3% em isolados de enterobactérias de 65 animais de produção e 36 animais de companhia (MA et al., 2009) e 10% em 113 isolados de enterobactérias de origem hospitalar com resistência a ciprofloxacina (VASILAKI et al., 2008). Já Liu e colaboradores (2008) detectaram 20,9% de genes *qnr* em 225 isolados de *Salmonella* spp. de origem suína.

Desde seu primeiro relato em 2003 em Xangai na China, o gene *aac(6')-Ib-cr* tem aparecido em países da Ásia, America do Norte e na Europa entre várias enterobactérias (STRAHILEVITZ et al., 2009).

A prevalência média mundial do gene *aac(6')-Ib-cr* é de cerca de 10,8% transformando este gene no mais prevalente mundialmente (STRAHILEVITZ et al., 2009).

Apesar deste ter sido relatado em todo o mundo, acredita-se que os países dos continentes Asiático e Americano sejam seus principais reservatórios, nos quais alguns estudos descrevem prevalências entre 50 à 90% (PARK et al., 2006; CATTOIR et al., 2007b; CORVEC et al., 2009; KIM et al., 2009b).

O gráfico 15 aponta o percentual de variantes Qnr avaliadas pelo PCR.



**Gráfico 15** Percentual dos diferentes genes *qnrs* avaliados

Dentre os genes codificantes das proteínas Qnr o gene *qnrS* foi o mais encontrado seguido do gene *qnrB* e *qnrD*. Nenhum dos isolados apresentou os genes *qnrA* e *qnrC*.

Strahilevitz e colaboradores (2009) compilando informações relatadas em todo o mundo até o final de 2008, verificaram que os genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* foram detectados em todos os continentes e numa vasta variedade de plasmídeos e de espécies bacterianas.

No Brasil, a real prevalência de genes *qnr* é pouco conhecida. Relatos de isolamento dos genes *qnrA1*, *qnrB2*, *qnrB8*, *qnrVC1*, *qnrVC2* em *Vibrio cholerae* O1, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram reportados (CASTANHEIRA et al., 2007; PEREIRA et al., 2007; FONSECA et al., 2008; MINARINI et al., 2008).

A ausência de detecção do gene *qnrA* é condizente com o que foi reportado recentemente em estudos que detectaram prevalências de 0% relativamente ao gene (CATTOIR et al., 2007a; JONES et al., 2008; KANJ et al., 2008; MINARINI et al., 2008; PITOUT et al., 2008; SHIN et al., 2008; VASILAKI et al. 2008; YAMANE et al., 2008; BAUDRY et al., 2009; MORGAN-LINNELL et al., 2009; PALLECCHI et al., 2009; XIA et al., 2010; NAMBOODIRI et al., 2011). Porém cabe ressaltar a detecção destes isolados em países como o Reino Unido onde o gene *qnrA* foi detectado em 32% dos 47 isolados de enterobactérias de origem hospitalar (CORKILL et al., 2005), nos Estados Unidos onde foram detectados em 10% dos 78 isolados de *Klebsiella pneumoniae* de origem hospitalar (WANG et al. 2004).

O gene *qnrC* é ainda pouco pesquisado devido a sua recente descoberta. A detecção destes genes também não foi reportada nos estudos de Zhao e colaboradores (2010), na análise de isolados de *E. coli* de origem humana, animal e ambiental, Zhou e colaboradores (2011) e Nasik e colaboradores (2011), também não detectaram a presença do gene em isolados de *E. coli* de origem humana.

A frequência do gene *qnrB* condiz com o que foi apontado na literatura (MINARINI et al., 2008; WU et al., 2008b). Vários estudos parecem evidenciar o gene *qnrB* como o mais frequente em *Enterobacteriaceae*, das cinco famílias conhecidas (KIM et al., 2009b; STRAHILEVITZ et al., 2009; JEONG et al., 2011; VETTING et al., 2011). Porém vale ressaltar a presença de detecção isolada deste gene (CATTOIR et al., 2007a; VELDMAN, et al., 2008; WU et al., 2007).

O percentual de detecção do gene *qnrS* também demonstra similaridade com o relatado na literatura (LAVILLA et al., 2008; VASILAKI et al., 2008; WU et al., 2008b; JEONG et al., 2011; LAMIKANRA et al., 2011; NAMBOODIRI et al. 2011; ZHOU et al., 2011).

Antunes e colaboradores (2011), descreveram a presença de *QnrS* em *Salmonella* ser. Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ainda por inquéritos realizados em alguns países, onde a taxa de resistência a quinolonas é elevada e associada aos mecanismos por PMQR como na Espanha, França, Itália, Suécia e Reino Unido (LAVILLA et al., 2008; KARAH et al., 2010, HERRERA-LÉON et al., 2011; RODRIGUEZ-MÁRTINEZ et al., 2011b).

Ressalta-se a elevada prevalência para o gene *qnrD* em relação à bibliografia existente, possivelmente devido à ter sido identificado pela primeira vez mais recentemente, por Cavaco e colaboradores (2009).

A tabela 7 apresenta o perfil de suscetibilidade pelo teste de microdiluição em caldo atribuído aos isolados com a presença dos genes *qnr* demonstrando ainda genes de resistência correlacionados e a sua fonte de isolamento.

**Tabela 7** Perfil de suscetibilidade as quinolonas dos isolados *qnr* positivos, por sorovar, fonte de isolamento, região e associação a outros genes de resistência

Sorovar	Fonte	Região	<i>qnr</i> variante	Outros pmqrs	MC (µg/ml)				
					Cip	Nal	Eno	Lvx	Ofl
<i>S. Typhimurium</i>	HU	RS	<i>qnrB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	≥2R	≥128R	≥4R	≥2R	≥4R
<i>S. Typhimurium</i>	HU	RS	<i>qnrB</i>	<i>aac(6')-Ib</i> <i>int.+/-900pb</i>	≥2R	≥128R	≥4R	≤0,06S	≤0,25
<i>S. Typhimurium</i>	HU	RS	<i>qnrB</i>	-	≥2R	≥128R	≥4R	≥2R	≥4R
<i>S. Typhimurium</i>	HU	BA	<i>qnrB</i>	<i>int.&gt;1000pb</i>	≤0,5I	≥128R	≤1I	≤0,06S	≤0,06S
<i>S. Typhimurium</i>	AL	PR	<i>qnrS</i>	-	≤0,5I	≥64R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S
<i>S. Typhimurium</i>	AL	PR	<i>qnrD</i>	-	≤0,03S	≤32R	≤0,06S	≤0,06S	≤0,06S
<i>S. Typhimurium</i>	HU	SC	<i>qnrD</i>	-	≤1R	≥128R	≥4R	≥4R	≥4R
<i>S. Saintpaul</i>	AN	SP	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i> <i>int.+/-900pb</i>	≤0,5I	≥128R	≤0,5I	≤0,06S	≤0,06S
<i>S. Saintpaul</i>	HU	MA	<i>qnrS</i>	-	≤0,5I	≥128R	≥4R	≤0,06S	≤0,12S
<i>S. Muenchen(2)</i>	HU	PR	<i>qnrS</i>	-	≤0,5I	≤32R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S
<i>S. Livingstone</i>	AL	PR	<i>qnrS</i>	-	≤0,5I	≥128R	≥4R	≤0,06S	≤0,06S
<i>S. Livingstone</i>	AL	PR	<i>qnrD</i>	-	≤0,5I	≤32R	≤1I	≤0,06S	≤0,06S
<i>S. Orion</i>	AB	RS	<i>qnrS</i>	-	≤0,5I	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S
<i>S. Panama</i>	HU	PR	<i>qnrS</i>	-	≤1R	≤64R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S
<i>S. Infantis</i>	HU	BA	<i>qnrD</i>	-	≤1R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S
<i>S. Enteritidis</i>	HU	BA	<i>qnrB</i>	<i>int+/-800pb</i>	0,25I	≥128R	≤1I	≤0,06S	≤0,06S
<i>S. ent. subsp ent.</i>	HU	RS	<i>qnrB</i>	<i>int.&gt;1000pb</i>	≤1R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,25

(0) numero de isolados detectados. HU=humano, AL= alimento, AB= ambiente, AN= animal. CIP= ciprofloxacina, NAL= ácido nalidixico, ENO= enrofloxacina, LVX= levofloxacina e OFL= ofloxacina. R= resistente, I= intermediário e S= sensível. MC= microdiluição em caldo. *Int*=*integrase*

Dos seis isolados positivos para o gene *qnrB*, dois demonstraram um padrão de resistência a todas as quinolonas/fluoroquinolonas testadas com CIMs iguais ou superiores as maiores concentrações testadas sendo que um destes com a presença conjunta do gene *aac(6')-Ib*. Três isolados também positivos para este gene apresentaram o gene *integrase* com um perfil de suscetibilidade apenas ao ácido nalidixico. Um isolado *qnrB* e *aac(6')-Ib* positivo apresentou o perfil de resistência a ciprofloxacina ácido nalidixico e enrofloxacina.

De um total de oito isolados *qnrS* positivos, sete foram resistentes apenas a enrofloxacina e ácido nalidixico, sem associação com qualquer outro gene de resistência. Um isolado apresentou ainda os genes *aac(6')-Ib* e *integrase* e resistência apenas ao ácido nalidixico.

Dos isolados *qnrD* positivos nenhum apresentou associação com os outros genes de resistência avaliados. Destes, um apresentou resistência à todas as quinolonas testadas com

CIMs iguais ou superiores a maior concentração testada (com exceção da ciprofloxacina que apresentou concentração  $\leq 1\mu\text{g/ml}$ ) dois isolados apresentaram resistência apenas ao ácido nalidíxico e um isolado apresentou resistência ao ácido nalidíxico, ciprofloxacina e enrofloxacina.

A detecção dos genes *qnr* esta associada principalmente a isolados de origem humana (12/18), porém aponta-se a relevância dos isolados de origem alimentar (4/18), animal (1/18) e ambiental (1/18).

Chong e colaboradores (2010) relataram que o aumento da resistência resultante as fluorquinolonas a partir da presença de genes *qnr* poderia reduzir a eficácia clínica desta classe de antibióticos. No entanto, de acordo Jacoby e colaboradores (2009), o nível exato do envolvimento de genes plasmidiais na resistência às fluorquinolonas ainda é mal compreendido quando comparado a outros mecanismos de resistência.

Souza e colaboradores (2010) admitem que esses genes encontram-se localizados em diferentes tipos de elementos genéticos móveis, como plasmídeos conjugativos, transposons compostos, sequências de inserção, cassetes gênicos ou integrons alojados em plasmídeos conjugativos/transposons, o que torna este mecanismo de resistência facilmente e rapidamente disseminável entre diferentes espécies.

O gene *qnr* já foi encontrado em cepas de *Salmonella* spp. com diferentes níveis de suscetibilidade as fluorquinolonas, sempre sendo relacionado com os genes plasmidiais de resistência às quinolonas em *Enterobacteriaceae* (HOPKINS et al, 2005; GARCIA-FERNANDEZ et al, 2009). No entanto, neste trabalho a presença de plasmídeos nas estirpes não foi avaliada.

A detecção de genes *qnr* associados à produção de alimentos de origem animal representa um sério problema, não só pela facilidade de disseminação entre animais que cohabitam espaços confinados, mas também devido à possibilidade da sua disseminação dos animais para o homem, quer por contato direto, meio ambiente ou através da cadeia alimentar (BUTAYE et al., 2006).

Esta assertiva coaduna com as constatações evidenciadas por Asai e colaboradores (2010) que ao demonstrarem a emergência e disseminação de PMQR em *Salmonella* spp. isoladas de animais de produção intensiva, como suínos, aves e bovinos, concluíram que estes animais constituem um importante reservatório de genes de resistência adquirida a quinolonas e um possível vetor de transmissão para o ambiente circundante e para o homem.

A correlação encontrada entre genes *qnr* e gene *aac(6')-Ib* já tinha sido descrita em trabalhos anteriores (MA et al., 2009; GIBSON et al., 2010).

A associação de *qnr* e *aac(6')-Ib* foi ainda reportada por Park e colaboradores (2006) nos Estados Unidos; Xiong e colaboradores (2011) que investigam genes *qnr* e *aac(6')-Ib* em *Enterobacter cloacae* isolados na Província de Anhui na China e Kim e colaboradores (2013) em enterobactérias isoladas de amostras clínicas na Coréia.

Este baixo índice de resistência as fluorquinolonas de segunda e terceira gerações associado à presença dos genes *qnr* já era esperada, visto que os estudos anteriormente publicados indicam que a presença destes genes confere baixos níveis de resistência às quinolonas podendo levar a elevação dos valores de CIM insuficientes para que os isolados sejam classificados como resistentes ao antimicrobiano segundo os padrões estipulados pelo CLSI (SZABÓ et al., 2008; FANG et al., 2009). Deve-se levar em consideração que a presença do gene não garante à sua expressão como observado em pesquisas recentes (LIU et al., 2008; LAVILLA et al., 2008; ZHAO et al. 2010).

Os genes *qnr* podem estar relacionados à resistência ao ácido nalidíxico detectada neste estudo, uma vez que a literatura aponta para a presença de isolados que apresentaram apenas os genes *qnr* com CIM característico de resistência a este antimicrobiano de acordo



com o CLSI (NORDMANN; POIREL, 2005; SÁNCHEZ-CÉSPEDES et al., 2007; CATTOIR et al., 2009; CORVEC et al., 2009; REDGRAVE et al., 2014).

A presença dos isolados *qnr* positivos com elevados índices de resistência pode estar associada à presença de outros mecanismos de resistência às quinolonas, como por exemplo, as alterações por mutações pontuais em genes cromossômicos alvo das quinolonas, como pode ser observado em trabalhos anteriores (SÁNCHEZ-CÉSPEDES et al., 2007; CÉSPEDES, 2008; MINARINI et al., 2008; CATTOIR et al., 2009; REDGRAVE et al., 2014).

Mutações pontuais em genes cromossômicos como *gyrA* e *parC*, ou mutações em genes cromossômicos codificantes de proteínas associadas a bombas de efluxo transmembranais podem ser responsáveis pela presença de resistência às quinolonas (MINARINI et al., 2008; CATTOIR et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011b; LASTOURS et al. 2010).

A presença de mutações nos genes que codificam para os canais de porinas ou a presença de bombas de efluxo como OqxAB e QepA (não analisadas neste estudo) podem estar associadas à resistência as fluorquinolonas, porém, não se pode justificar a resistência ao ácido nalidíxico por esta via uma vez que este antimicrobiano tem características hidrofóbicas, não justificando a presença de resistência nestes casos. Portanto a existência de resistência a todas as quinolonas testadas pode estar relacionada à presença de várias mutações nos genes cromossômicos condizentes com este perfil (VILA et al., 2004; CAVACO et al., 2008; REDGRAVE et al., 2014).

Acredita-se ainda que a presença dos genes *qnr* possa induzir às mutações nos genes *gyrA* e *parC* uma vez que a presença das proteínas Qnr pode ser um pré-requisito para que as gerações seguintes adquiram mutações nos genes alvo atingindo assim elevados índices de resistência as fluorquinolonas. Esta explanação esta respaldada na possibilidade de genes que codifiquem proteínas RQMP oferecem para os isolados a possibilidade de sobrevivência na presença de baixas concentrações de quinolonas induzindo assim as mutações pontuais (ZHAO et al. 2010; REDGRAVE et al., 2014).

O gene *qnr* tem sido apontado como responsável pela seleção de mutações nas topoisomerases pela interação das proteínas Qnr com as subunidades da enzima DNA *girase* no quadrante QRDR levando a alterações aminoacídicas no local de ligação, impedindo depois a ligação da quinolona por redução de afinidade com esta subunidade. De acordo com estudos anteriores (CASTANHEIRA et al., 2007; MINARINI et al., 2008.; ZHAO et al., 2008 CAVACO; AARESTRUP 2009), a presença deste gene confere um baixo nível de resistência as fluorquinolonas e também facilita o desenvolvimento de mutações no QRDR do gene *gyrA*.

Estas mutações aminoacídicas provocadas pela presença dos genes que codificam para RQMP podem ser posteriormente transmitidas à descendência durante a replicação celular passando assim a fazer parte integrante do seu cromossomo sendo naturalmente selecionadas durante a exposição a estes antimicrobianos (ZHAO et al., 2010).

A tabela 8 relaciona os isolados *aac(6')-Ib* positivos de acordo com seu perfil de suscetibilidade pelo teste de microdiluição em caldo e com perfil de suscetibilidade aos aminoglicosídeos testados pelo teste de difusão em disco simples, com relação à sua fonte de isolamento incluindo ainda a presença ou não do gene *integrase*.

**Tabela 8** Perfil de suscetibilidade as quinolonas e aminoglicosídeos dos isolados *aac(6')-Ib* positivos, por sorovar, fonte de isolamento, região e associação ao integron

Sorovar	Fonte	Região	Int. pb	MC (µg/ml)					DD	
				Cip	Nal	Eno	Lvx	Ofl	Est	Gen
<i>S. Typhimurium</i> (2)	HU	RS	-	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	R	R
<i>S. Typhimurium</i> (3)	AL	MG	-	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	R	R
<i>S. Typhimurium</i>	AB	PR	+/-900	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	R	R
<i>S. Typhimurium</i>	AN	SP	+/-900	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	R	R
<i>S. Typhimurium</i>	HU	RS	+/-900	≥2R	≥128R	≥4R	≥4R	≥4R	R	R
<i>S. Typhimurium</i>	AL	SC	-	≥2R	≥128R	≥4R	≥4R	≥4R	R	R
<i>S. Typhimurium</i>	HU	RS	-	≥2R	≥128R	≥4R	≥2R	≥4R	R	R
<i>S. Typhimurium</i>	HU	RS	+/-900	≥2R	≥128R	≥4R	≤0,06S	≤0,25S	R	R
<i>S. Typhimurium</i>	AL	SC	+/-900	≥2R	≥128R	≥4R	≤1I	≤1I	R	R
<i>S. Typhimurium</i>	HU	RS	+/-800	≤1R	≥128R	≥4R	≥4R	≤2R	R	R
<i>S. Typhimurium</i>	HU	RS	>1000	≤0,25I	≥128R	≤0,25S	≤0,12S	≤0,12S	R	R
<i>S. Enteritidis</i>	HU	SE	-	≤0,5I	≥128R	≤2R	≤0,12S	≤0,12S	I	S
<i>S. Enteritidis</i>	HU	MG	+/-800	≥2R	≥128R	≤4R	≤1I	≤1I	R	S
<i>S. Give</i>	HU	RS	-	≥2R	≤64R	≤4R	≤1R	≤2R	R	R
<i>S. Hadar</i>	AL	PR	-	≤0,5I	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	I	S
<i>S. Infantis</i>	AB	PR	-	≤0,03S	≤8S	≤0,06S	≤0,06	≤0,06S	I	S
<i>S. Muenchen</i>	AL	PR	+/-600	≤0,5I	≤32R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	R	R
<i>S. Montevideo</i>	AB	PR	-	≤0,5I	≤32R	≤1I	≤0,06S	≤0,06S	I	S
<i>S. Saintpaul</i> (2)	AN	SP	+/-900	≤0,5I	≥128R	≤1I	≤0,06S	≤0,06S	R	R

HU=humano, AL= alimento, AB= ambiente, AN= animal. CIP= ciprofloxacina, NAL= ácido nalidixico, ENO= enrofloxacina, LVX= levofloxacina, OFL= ofloxacina, STR= streptomina e GEN= gentamicina. R= resistente, I= intermediário e S= sensível. MC= microdiluição em caldo e DD= disco difusão.

Observa-se nesta tabela que todas as cepas que apresentaram o gene *aac(6')-Ib* foram resistentes ou com suscetibilidade intermediária a estreptomina (antimicrobiano com padrão fenotípico relacionado a presença do gen).

O maior percentual de cepas 60,9% (14/23) com a presença do gene são pertencentes ao sorovar Typhimurium demonstrando a importância deste na circulação e disseminação do gene.

Em relação à fonte de isolamento o gene foi detectado de forma mais expressiva em amostras humanas com 43,5% das cepas (10/23), seguido de amostras de origem alimentar com 30,4% de cepas (7/23).

O total de 52,2% de cepas (12/23) apresentaram resistência a todas as quinolonas/fluorquinolonas testadas pelo teste de microdiluição em caldo, sendo que destes

duas cepas do sorovar *S. Typhimurium* apresentaram CIM na maior concentração testada para todos os antimicrobianos.

A associação do gene *aac(6')-Ib* com a *integrase* foi detectada em dez isolados.

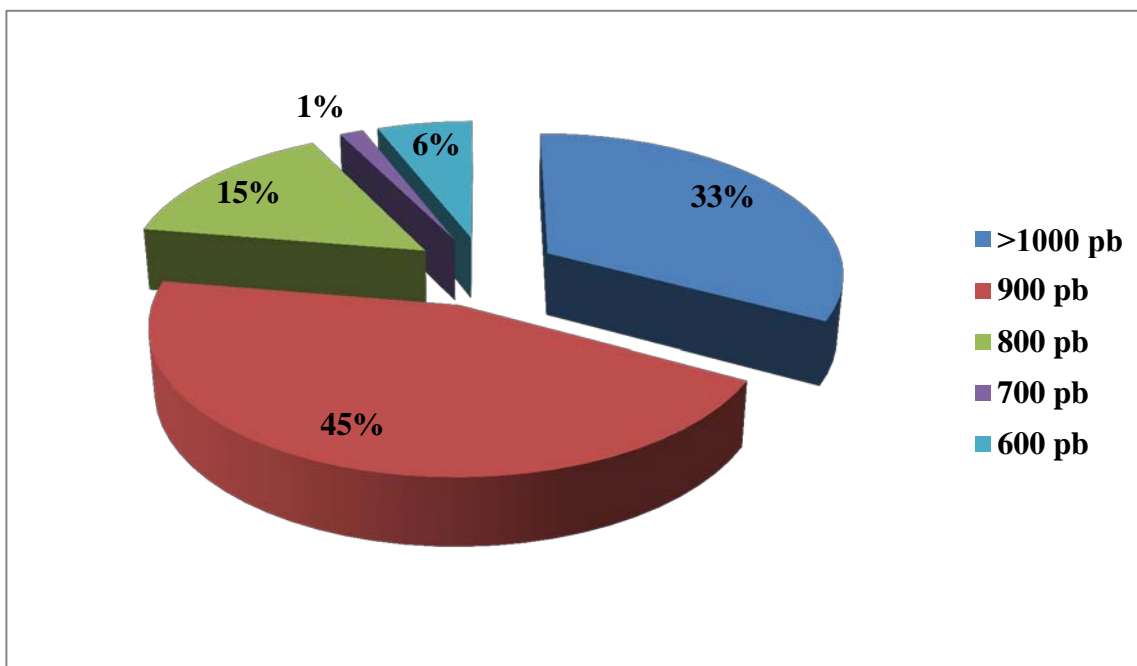
Dos isolados que apresentaram o gene *aac(6')-Ib*, 21 apresentaram o perfil de resistência ou suscetibilidade intermediária a ciprofloxacina e ou enrofloxacina, sendo estes resistentes ao ácido nalidíxico.

Desde a vinculação da inativação enzimática das fluorquinolonas em bactérias no período de 2006 associadas à presença da variante *aac(6')-Ib-cr* este vem sendo um mecanismo frequentemente reportado, sendo esta variante capaz de conferir um grau de resistência de baixo nível à algumas fluorquinolonas (ciprofloxacino, norfloxacina e enrofloxacina) sem prejudicar sua capacidade de inativação de aminoglicosídeos (VETTING et al., 2011).

Os resultados deste estudo estão de acordo com o encontrado na literatura, com exceção das cepas resistentes a todas as quinolonas estudadas (estes devem apresentar outros mecanismos relacionados à presença de resistência). Isto se deve a grande detecção de resistência e suscetibilidade intermediária a ciprofloxacina e a enrofloxacina uma vez que o mecanismo referente as mutações em *aac(6')-Ib* estão relacionados à N-acetilação da cadeia lateral de amida piperazynil presente apenas nestes representantes da classe das quinolonas (ROBICSEK et al., 2006a; LUZARRO, 2008; VETTING et al., 2011; REDGRAVE et al., 2014).

Embora alguns autores reconheçam que a localização do gene *aac(6')-Ib* é majoritariamente em integrons de classe 1, não podemos considerar esta assertiva em função da ausência deste gene em todas as cepas analisadas (CATTOIR; NORDMAN, 2009; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2011a; KIM et al., 2013).

Entre as 67 cepas que apresentaram a região conservada do integron, realizou-se a PCR para a caracterização dos genes da região variável, sendo possível reconhecer a amplificação de regiões que variaram entre +/- 600 a >1000pb (grafico16).



**Gráfico 16** Percentual de isolados atribuído a regiões variáveis do integron. **Pb**= pares de bases

Quanto à pesquisa de integron classe 1 o maior percentual detectado foi o de +/- 900pb (30/67) seguido de >1000pb (22/67). Baixos percentuais foram atribuídos a detecção de integrons com peso molecular menor que 800pb (5/67).

Integrans são definidos como unidades genéticas que possuem um sistema de recombinação sítio-específico por meio da reorganização dos ORF's (*Open Reading Frames*) presentes em cassetes gênicos, convertendo-os em genes funcionais (CAMBRAY et al., 2010). Geralmente os integrons possuem o gene *intI* responsável por codificar integrase além de um sítio de recombinação denominado *attI* em que são inseridos os cassetes gênicos (PARTRIDGE et al., 2009). Vários cassetes podem ser capturados em conjunto pelo mesmo integron, e sua inserção ou excisão é determinada por meio da recombinação realizada pela integrase entre *attI* e/ou qualquer outro sítio-específico (PARTRIDGE et al., 2009).

Integrans têm a capacidade de capturar os genes de resistência a antibióticos e, portanto, contribuir na transferência lateral genética através de transposons e plasmídeos conjugativos (RODRIGUEZ et al., 2006; SAN MARTIN et al., 2008; KIM et al., 2011).

Firoozeh e colaboradores (2012) reconheceram cinco matrizes distintas variando entre 750 a 1.300Kb, quando avaliaram a região variável do integron de classe 1 em cepas de *Enteritidis* isoladas de fonte humana e aviária. Segundo a literatura, a diversidade de cassetes gênicos deliberados pelo integron de classe 1 contribuiu para resistência concomitante aos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e anti-folatos (FIROOZEH et al., 2012).

A tabela 9 apresenta a distribuição dos sorovares de *Salmonella enterica* subsp *enterica* e suas fontes de isolamento em relação às diferentes regiões variáveis de integron detectadas e o perfil de suscetibilidade as quinolonas pelo teste de MC.

**TABELA 9** Distribuição dos Sorovares positivos para o gene *integrase*, de acordo com seu perfil de suscetibilidade e fonte de isolamento.

ISOLADOS	QTDE	FONTES	REGIÃO VARIÁVEL	PERFIL DE MC
Typhimurium	1	HU	>1000 pb	CIP,NAL, ENO, LVX,OFL
Typhimurium	4	HU	>1000 pb	CIP,NAL,ENO
Typhimurium	5	HU	>1000 pb	NAL
Typhimurium	1	HU	>1000 pb	NAL, OFL
Enteritidis	3	HU	>1000 pb	CIP,NAL,ENO
Enteritidis	2	HU	>1000 pb	NAL, ENO
Enteritidis	1	HU	>1000 pb	NAL
<i>ent. subsp. ent.</i>	1	HU	>1000 pb	CIP, NAL,ENO
Tennessee	1	AL	>1000 pb	NAL
Livingstone	1	AL	>1000 pb	NAL
Bredeney	1	AL	>1000 pb	CIP, NAL,ENO
Agona	1	AB	>1000 pb	CIP, NAL, ENO, LVX,OFL
Typhimurium	10	HU	+/-900 pb	CIP, NAL, ENO, LVX,OFL
Typhimurium	2	HU	+/-900 pb	CIP, NAL, ENO,OFL
Typhimurium	2	HU	+/-900 pb	CIP, NAL,ENO
Typhimurium	2	AN	+/-900 pb	CIP, NAL, ENO, LVX,OFL
Typhimurium	6	AL	+/-900 pb	CIP, NAL, ENO, LVX,OFL
Typhimurium	2	AB	+/-900 pb	CIP, NAL, ENO, LVX,OFL
Typhimurium	1	AB	+/-900 pb	CIP, NAL,ENO
Typhimurium	1	AL	+/-900 pb	CIP, NAL,ENO
Saintpaul	1	AN	+/-900 pb	NAL
Bredeney	1	AL	+/-900 pb	CIP, NAL,ENO
Heidelberg	1	AB	+/-900 pb	CIP, NAL,ENO
Agona	1	AN	+/-900 pb	CIP, NAL, ENO, LVX,OFL
Enteritidis	2	HU	+/-800 pb	NAL
Enteritidis	2	HU	+/-800pb	CIP, NAL,ENO
Heidelberg	1	AL	+/-800 pb	CIP, NAL,ENO
Orion	1	AN	+/-800 pb	NAL
Saintpaul	1	AB	+/-800 pb	NAL, ENO
Schwarzengrund	1	AN	+/-800 pb	CIP, NAL,ENO
Muenchen	1	AL	+/-800 pb	CIP, NAL, ENO,OFL
Anatum	1	AB	+/-800 pb	NAL
Thyphimurium	1	HU	+/-700 pb	CIP, NAL, ENO, LVX,OFL
Thyphimurium	1	AL	+/-600 pb	CIP, NAL,ENO
Enteritidis	1	HU	+/-600 pb	CIP, NAL,ENO
Montevideo	1	AB	+/-600 pb	-
Muenchen	1	AL	+/-600 pb	NAL, ENO

HU=humano, AL= alimento, AB= ambiente, AN= animal. CIP= ciprofloxacina, NAL= ácido nalidixico, ENO= enrofloxacina, LVX= levofloxacina, OFL= ofloxacina. MC= microdiluição em caldo, pb= pares de bases

O sorovar Typhimurium foi o mais detectado (39/67) apresentando a região conservada do integron de classe 1, sendo as regiões variáveis entre >1000pb e +/- 900pb as mais observadas.

A fonte de isolamento mais marcante em relação à detecção de integron foi a humana (38/67) seguida da alimentar (15/67).

Do total de isolados avaliados 7 apresentaram resistência à todos os antimicrobianos testados, sendo que destes 4 apresentaram região variável de +/- 900pb, 2 região variável >1000pb e 1 com região de +/- 600pb.

O perfil de resistência mais associado à presença dos integrons foi o de resistência à ciprofloxacina, enrofloxacina e ácido nalidíxico, sendo distribuído entre os diferentes tamanhos de regiões variáveis detectados.

Este tipo de integron de classe 1 está difundida em diferentes hospedeiros em várias regiões do mundo (ANTUNES et al., 2006; KRAULAND et al., 2009; KIM et al., 2011).

Cepas de *Salmonella* spp. a partir de fontes humanas e animais de várias regiões foram encontrados contendo integrons, especialmente da classe 1 (ANTUNES et al., 2006; KRAULAND et al., 2009, 2010; NAGHONI et al., 2010; POVILONIS et al., 2010).

Em estudo realizado no Vietnã, Tailândia e Malásia, foram detectados em isolados de *Salmonella* spp. de diferentes sorovares contendo a classe 1 integrons com regiões variáveis que compreendem tamanhos de 0,2 a 2,3 kb sendo que alguns isolados continham de 2 à 3 integrons diferentes que transportam cassetes gênicos distintos (KHEMTONG; CHUANCHUEN, 2008; MATHEW et al., 2009; BENACER et al., 2010; CHUANCHUEN et al., 2010; VO et al., 2010; WANNAPRASAT et al., 2011).

Peirano e colaboradores (2006) admitem que dentre os elementos gênicos móveis existentes, as bactérias do gênero *Salmonella* spp. fazem uso de integrons, particularmente os de classe 1. Frequentemente, a presença desse componente em cepas multirresistentes está associada ao cromossomo ou plasmídeos conjugativos.

Diversos estudos encontraram os integrons localizados em plasmídeos que podem ser transferidos entre outras cepas através da conjugação (KHEMTONG; CHUANCHUEN, 2008; VO et al., 2010).

Krauland e colaboradores (2009), determinando a presença de Integron em uma coleção de *Salmonella enterica* multirresistentes, reconheceram que a expansão clonal e a transferência de genes horizontal podem contribuir para a difusão da resistência antimicrobiana. Neste estudo, o fenótipo ACSSuT determinado pela *Salmonella* ser. Typhimurium DT104 foi evidenciado em isolados geneticamente não relacionados em 8 países distintos, incluindo *Salmonella enterica* sorovares Uganda, Schwarzengrund, Bredeney, Isangi e Typhimurium PT19.

Vários estudos apontam para a frequente presença de integrons de classe 1 em diferentes sorotipos de *Salmonella* que apresentam fenótipos multirresistentes. WANG e colaboradores (2010) avaliaram 187 cepas de *Salmonella enterica* sorovar Schwarzengrund coletadas de aves e suínos abatidos em Taiwan. Os resultados mostraram que 84.49% apresentaram integrons de classe 1.

De forma similar, outro estudo conduzido em Taiwan analisou 93 cepas de *Salmonella enterica* sorovar Choleraesuis, provenientes de humanos e suínos. Investigou-se a presença de integrons de classe 1, 2 e 3, onde somente integrons de classe 1 foram encontrados em 71 cepas: 78.3% (humanos) e 74.5% (suínos) estavam contidos em plasmídeos conjugativos (LEE et al., 2009).

ANTUNES e colaboradores (2006) investigaram 200 cepas de *Salmonella* resistentes a sulfonamida em Portugal provenientes de animais, humanos, alimentos e meio ambiente, encontrando 75% dos isolados contendo integrons de classe 1 e 3% contendo integrons de classe 1 e 2. O gene mais frequentemente detectado foi o *sul1* (76% dos isolados), porém também foi encontrado os genes *sul2* e *sul3*. Os resultados parecem ser o reflexo da intensa utilização de sulfonamida na produção de animais destinados ao consumo humano em Portugal, principalmente na suinocultura.

Um estudo conduzido por AJIBOYE e colaboradores (2009) nos Estados Unidos, objetivou avaliar a dispersão de elementos genéticos móveis responsáveis pela codificação de resistência aos antibióticos em *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Detectou-se a presença de integron de classe 1 em 28% das cepas de *E.coli* isoladas de animais; 72% das cepas de

*Salmonella* isoladas de humanos e animais e 49% das cepas de *E.coli* isoladas de mulheres com infecção no trato urinário, onde a maioria abrigava cassetes gênicos.

No Brasil, a ocorrência de genes de resistência a antimicrobianos e o papel de integrons em *Salmonella enterica* oriundas de fonte humana e animal foi determinada por Peirano e colaboradores (2006). Este estudo possibilitou a caracterização de integrons de classe 1 em 55 cepas entre 17 sorovares mais incidentes circulantes no país, sendo possível detectar genes não relacionados entre cepas multirresistentes.

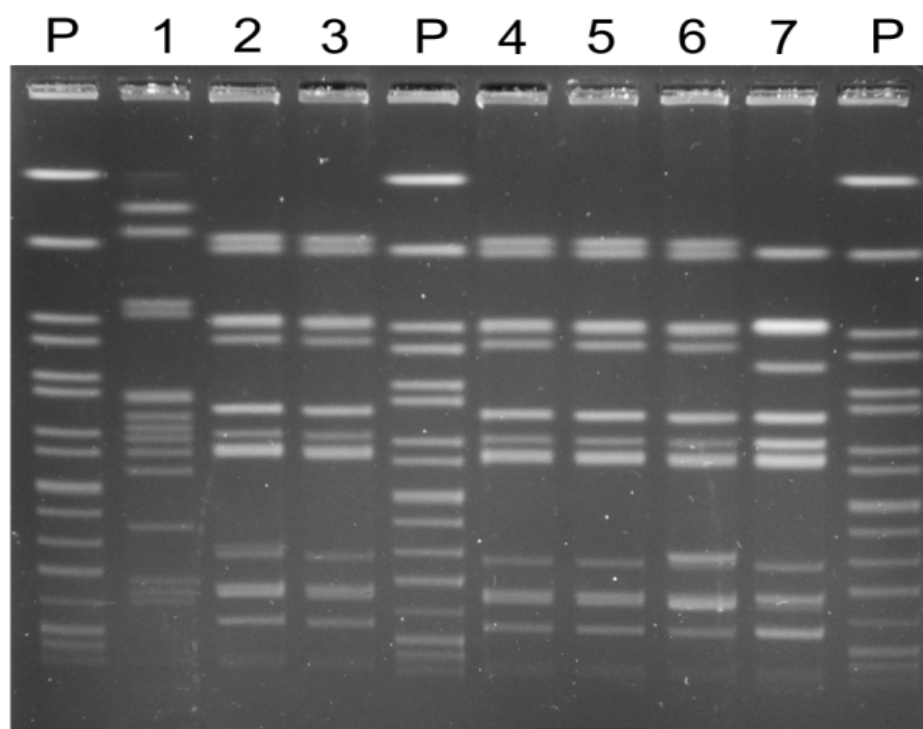
Thong e Modarressi (2011) reconhecem a necessidade de monitoramento e compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos na dispersão de resistência a antibióticos entre patógenos de origem alimentar, tendo em vista que em *Salmonella* spp. isoladas de carne de aves e bovinos cruas comercializadas em supermercados e feiras livres, bem como alimentos prontos derivados de aves e bovinos em restaurantes na Malásia, detectaram diversos genes localizados em integrons presentes em plasmídeos conjugativos.

Os resultados demonstram uma situação preocupante no qual a dispersão de resistência a antibióticos ocorre entre animais e humanos em todo o mundo, não somente pela presença de cepas resistentes mas também por troca de genes entre elas, pertencentes a espécies e gêneros diferentes. Além disso, provavelmente os animais de produção destinados ao consumo humano são a principal fonte de integrons resistentes disseminados graças ao comércio de alimentos por todo o mundo (AJIBONE et al., 2009).

A ocorrência de integrons com diferentes organizações de cassetes gênicos sugere a evolução genética via recombinação de diferentes eventos e demonstra o papel fundamental dos integrons na disseminação de resistência aos antimicrobianos em toda comunidade microbiana (CHUANHUEN et al., 2008; KRAULAND et al., 2010).

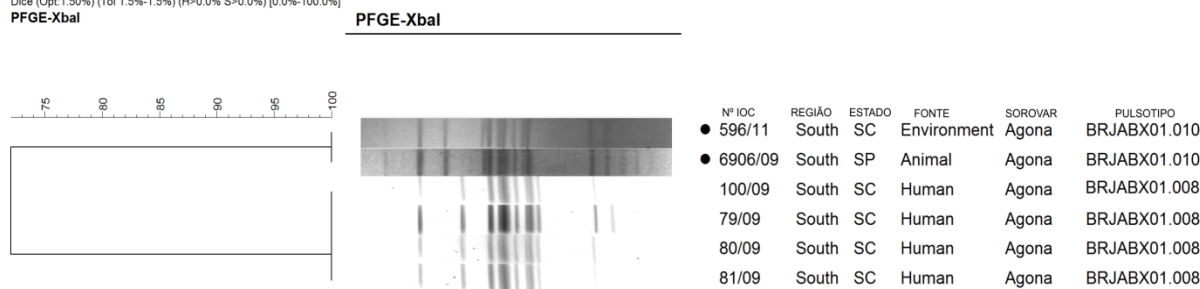
Com o intuito de avaliar a relação clonal entre os sorovares de maior prevalência que apresentam resistência as diferentes classes de quinolonas os isolados foram submetidos ao método de tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado, onde foi utilizada a digestão pela enzima XbaI (figura 11), sendo os padrões calculados pelo coeficiente de Dice.

As cepas resistentes as quinolonas/fluorquinolonas durante o período proposto pelo trabalho tiveram ainda seu perfil clonal comparado a outras cepas sensíveis a esta classe. Porém alguns sorovares apresentaram a necessidade pela busca de isolados não pertencentes ao período referido com o intuito de se obter uma análise comparativa mais eficaz. Após sua identificação os isolados receberam uma numeração, correspondente a ordem de chegada do material ao laboratório e o ano, sendo esta classificação baseada de acordo com os critérios estipulados no protocolo operacional padrão para identificação das cepas proposto pelo controle de qualidade do LRNEB (vide ANEXO). Este teste permite avaliar a quantidade e o padrão de clones relacionados a resistência às quinolonas e ainda fornece parâmetros sobre sua dispersão em relação a origem de isolamento e região do país. Os resultados obtidos para cada sorovar estão elucidados nas figuras 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 e 32.



**Figura 11** Gel de agarose à 1% com o perfil de macrorestrição obtidos através da eletroforese em campo pulsado após a digestão com a enzima Xba I. **Amostras:** P – *Salmonella* ser. Braenderup (padrão), 1 - *Salmonella* ser. Panama, 2- *Salmonella* ser. Typhimurium, 3 - *Salmonella* ser. Typhimurium, 4- *Salmonella* ser. Typhimurium, 5- *Salmonella* ser. Typhimurium, 6- *Salmonella* ser. Typhimurium e 7 – *Salmonella* ser. Typhimurium

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
PFGE-XbaI



**Figura 12** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Agona avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima XbaI, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice ● Isolados resistentes as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

Foram detectados 2 pulsotipos distintos do sorovar Agona. Os isolados com resistência às quinolonas apresentaram o mesmo pulsotipo, mesmo sendo isolados em períodos distintos de diferentes regiões e origens. A tabela 10 apresenta as diferenças no perfil de resistência.

Percebe-se ainda que a maioria dos isolados deste sorovar tem um perfil de similaridade gênica significativo, embora sejam isolados em períodos distintos, com o percentual de similaridade maior que 70 %.

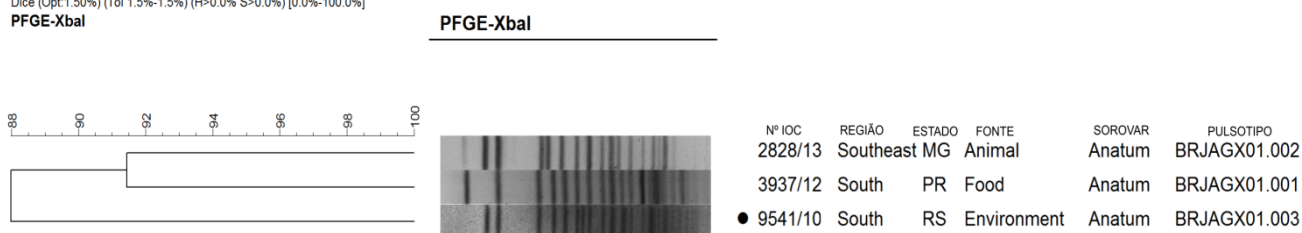


**Tabela 10** Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar *S. Agona*

N <sup>o</sup> IOC	CIM (µg/ml)					Genes detectados
	CIP	NAL	ENO	LVX	OFL	
596/11	≥2R	≥128R	≥4R	≥4R	≥4R	<i>int.</i> (>1000pb)
6906/09	≥2R	≥128R	≥4R	≥4R	≤2R	<i>int.</i> (900pb)

Observa-se que o perfil de resistência é bastante similar entre estes isolados assim como a detecção do integron.

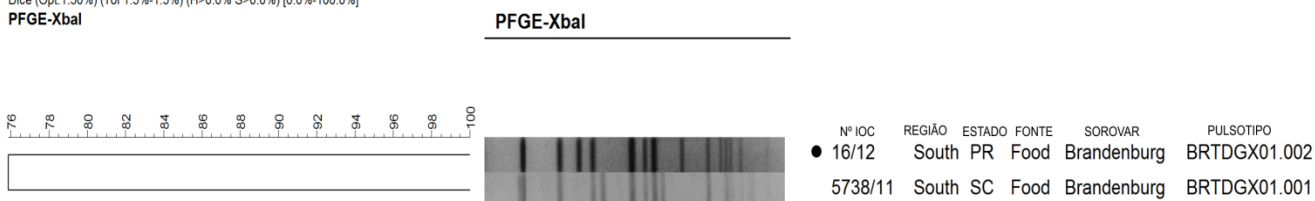
Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
PFGE-XbaI



**Figura 13** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Anatum avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolado resistente as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

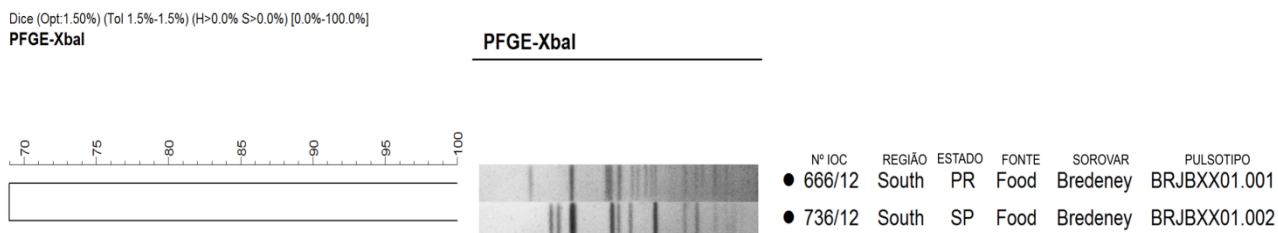
O isolado 9541/10 com perfil de resistência às quinolonas apresentou 88% de similaridade gênica com outros dois isolados do mesmo sorovar embora sejam isolados de origens diferentes e períodos diferentes.

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
PFGE-XbaI



**Figura 14** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Brandenburg avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolados resistentes as quinolonas/fluorquinolonas testadas.

O isolado resistente a quinolona pertencente ao sorovar Brandenburg apresentou um baixo índice de similaridade (76%), mesmo com as amostras tendo a origem e região de isolamento similares.



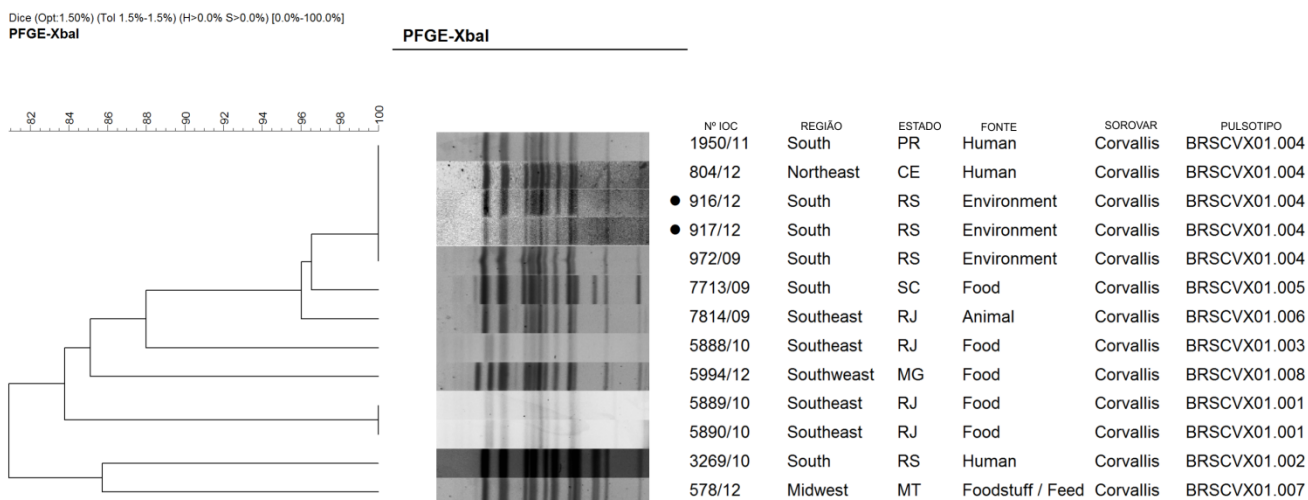
**Figura 15** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Bredeney avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolados resistentes as quinolonas/fluorquinolonas testadas.

Os isolados do sorovar Bredeney apresentaram baixo percentual de similaridade entre eles, mesmo estes sendo isolados no mesmo período e da mesma origem. O perfil de resistência às quinolonas foi comparado na tabela 11.

**Tabela 11** Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar *S. Bredeney*

Nº IOC	CIM (µg/ml)					Genes detectados
	CIP	NAL	ENO	LVX	OFL	
666/12	≥2R	≤64R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	<i>int.</i> (>1000pb)
736/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤0,06S	≤0,06S	<i>int.</i> (900pb)

Percebesse que embora o perfil clonal não seja significativamente alto estes isolados apresentam tanto o perfil de resistência quanto à presença de genes semelhantes, indicando que esta diferença clonal não esta relacionada ao padrão que denota resistência às quinolonas.



**Figura 16** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Corvallis avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolados resistentes as quinolonas/fluorquinolonas testadas.

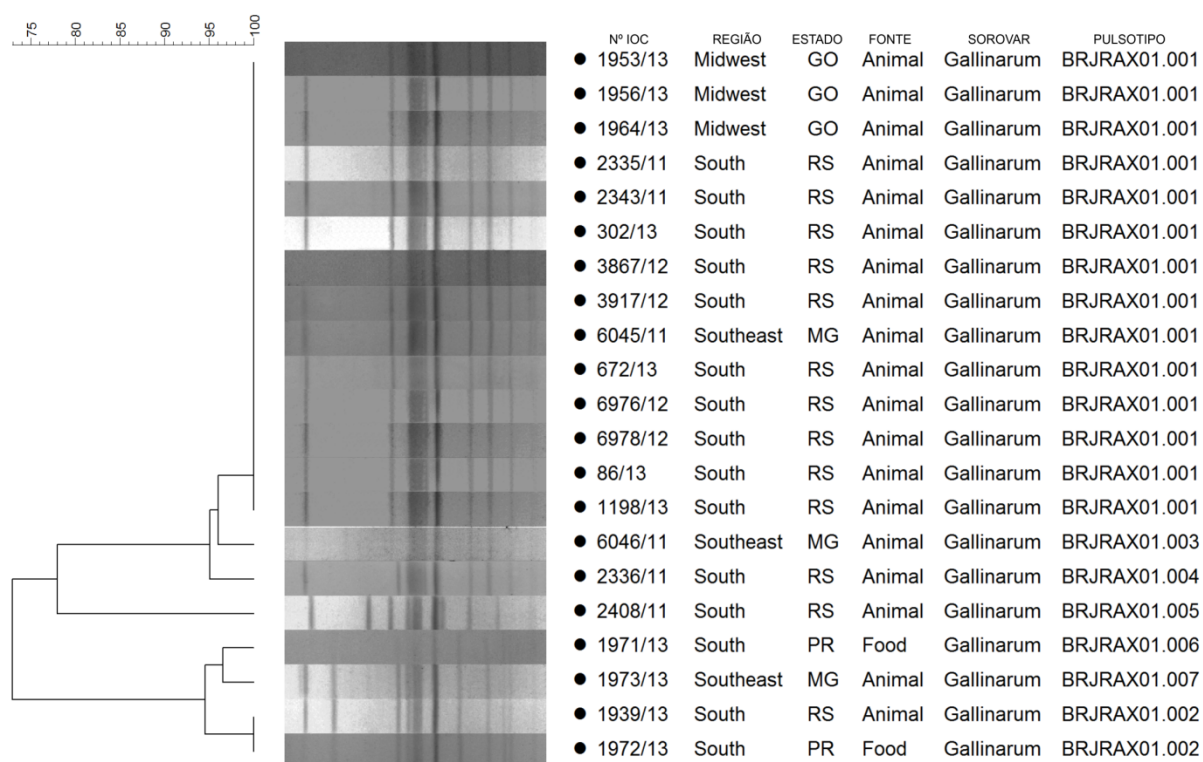
Dos 13 isolados referentes ao sorovar Corvallis avaliados no período de 2009 a 2013, 8 pulsotipos foram detectados apresentando um percentual de similaridade gênica menor que 82% entre eles. Os isolados resistentes as quinolonas foram encontrados no mesmo pulsotipo (P1) junto a outros dois isolados sensíveis as quinolonas (tabela 12).

**Tabela 12** Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar *S. Corvallis*

Nº IOC	CIM (µg/ml)					Genes detectados
	CIP	NAL	ENO	LVX	OFL	
916/12	≤1R	≤64R	≥4R	≤0,06S	≤0,06S	-
917/12	≤1R	≤32R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-

Os resultados encontrados evidenciam que os isolados podem advir de uma mesma origem clonal.

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
PFGE-XbaI



**Figura 17** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Gallinarum avaliados através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice.  
● Isolado resistente as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

A figura 17 demonstra um percentual de similaridade considerável apesar do quantitativo de amostras relacionadas a este sorovar. Um número elevado de cepas apresentaram um perfil de 100% de similaridade gênica, podendo estes ser relacionados à mesma origem clonal, mesmo este sendo isolados em diferentes estados e diferentes períodos.

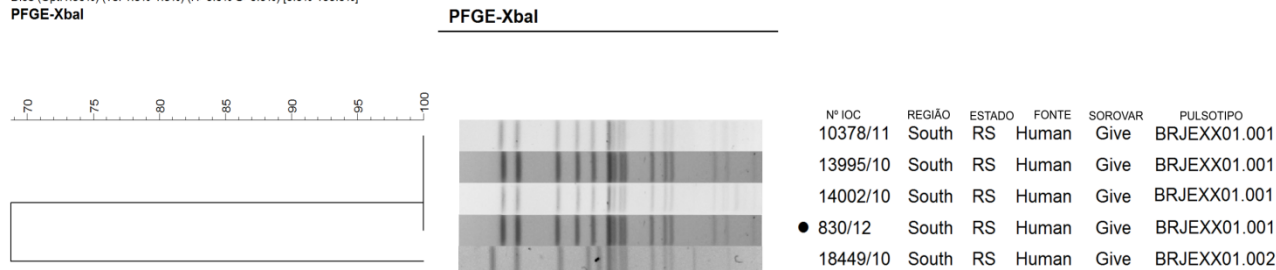
Foram detectados 7 pulsotipos distintos sendo que o pulsotipo (BRJRAX01.001) com 14 isolados foi o pulsotipo com maior número de isolados relacionados. A maioria das cepas que pertencem a este pulsotipo são provenientes da região Sul, com algumas na região Centro Oeste e Sudeste. A tabela 13 apresenta o perfil de resistência destas cepas.

**Tabela 13** Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar *S. Gallinarum*

N <sup>o</sup> IOC	CIM (µg/ml)					Genes Detectados
	CIP	NAL	ENO	LVX	OFL	
1953/13	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
1956/13	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
1964/13	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
2335/11	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
2343/11	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
302/13	≤0,25I	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
3867/12	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
3917/12	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
6045/11	≤0,03S	≤4S	≤0,06S	≤0,06S	≤0,06S	-
672/13	≤0,25I	≥128R	≤0,25S	≤0,06S	≤0,06S	-
6976/12	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
6978/12	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
86/13	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
1198/13	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
6046/11	≤0,03S	≤16S	≤0,06S	≤0,06S	≤0,06S	-
2336/11	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
2408/11	≥1R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
1971/13	≤1R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
1973/13	≤0,12S	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
1939/13	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
1972/13	≤0,03S	≤64R	≤0,25S	≤0,06S	≤0,06S	-

Verificasse que a maioria dos isolados que pertencem ao pulsotipo BRJRAX01.001 apresentaram um perfil de resistência similar com a mesma CIM para todos os antimicrobianos testados com exceção dos isolados 302/13 que apresentou suscetibilidade intermediária a ciprofloxacina, o isolado 6045/11 sensível a todos os antimicrobianos testados e o isolado 302/12 com suscetibilidade a ciprofloxacina e a enrofloxacin. Ressaltasse a circulação de clones de origem animal circulantes resistentes as quinolonas no qual não foram detectados genes de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos.

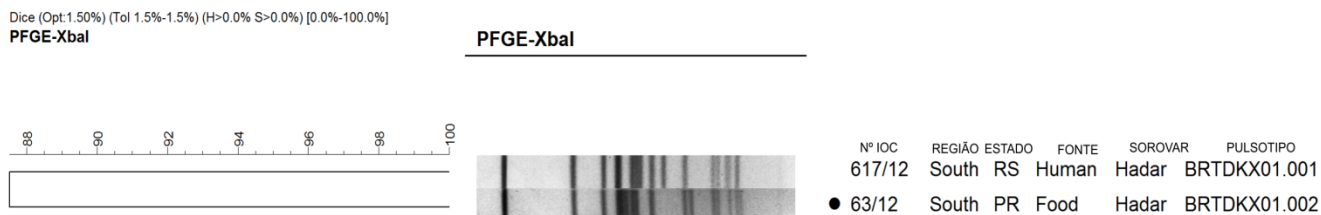
Dice (Opt:1.50%) (Tol:1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) (D:0.0%-100.0%)  
PFGE-XbaI



**Figura 18** Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Give avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolado resistente as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

Dois pulsotipos distintos foram encontrados no sorovar *S. Give* sendo que o único isolado resistente pertence ao pulsotipo BRJEXX01.001 (onde outros três isolados sensíveis foram encontrados). Apenas um isolado avaliado obteve uma variação elevada. Percebesse

que todos os isolados avaliados pertencem ao mesmo estado e foram isolados da mesma fonte embora em períodos diferentes. A pequena variação clonal pode estar relacionada à aquisição de resistência.



**Figura 19** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Hadar avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolados resistentes as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

Os dois isolados do sorovar Hadar analisados (ambos da mesma região e período) apresentaram um perfil de similaridade gênica de aproximadamente 87% o que indica uma pequena variação gênica.



**Figura 20** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Heidelberg avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolados resistentes as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

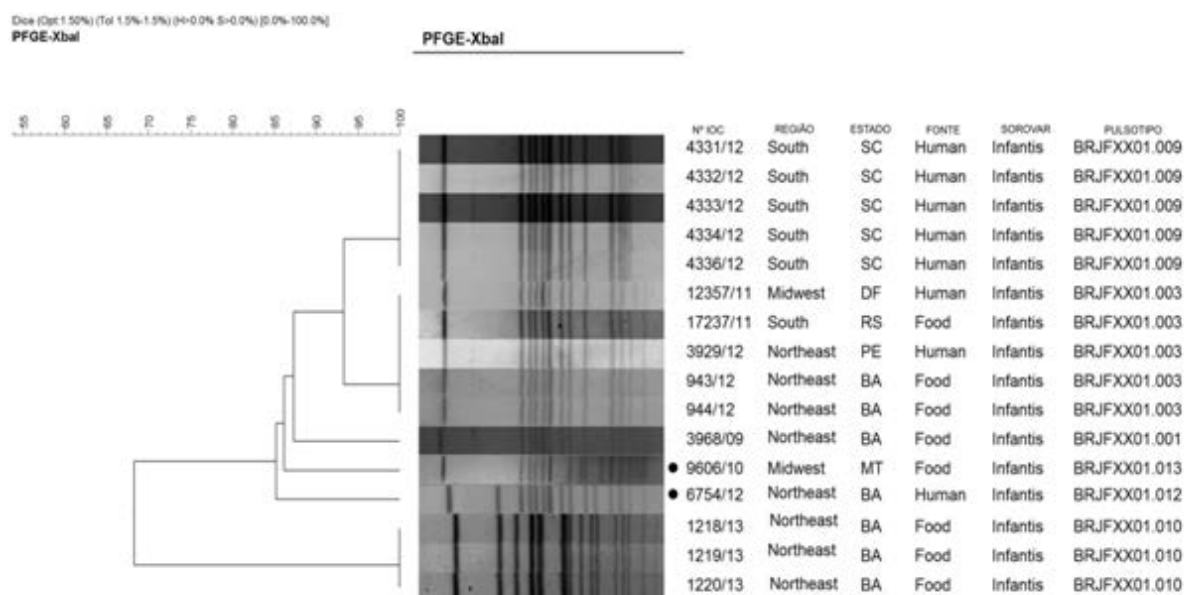
Oito pulsotipos diferentes foram encontrados para o sorovar *S. Heidelberg*. Os isolados resistentes do sorovar Heidelberg demonstraram ter uma expressiva relação clonal entre eles (100% de similaridade entre os isolados 5/12 e 19/12 e aproximadamente 94 % entre estes e o isolado 11394/11). Percebesse que dentre todos os isolados avaliados (sensíveis e resistentes) eles apresentam baixa diversidade clonal (aproximadamente 90%). O isolado 11394/11 apresenta-se no pulsotipo BRJF6X01.004 onde foram detectados 13 isolados sensíveis as quinolonas sendo este oriundo de fonte ambiental na região Sul. Vale ressaltar

que os isolados 5/12 e 19/12 pertencentes ao mesmo pulsotipo são isolados de origem alimentar também da região Sul. A tabela 14 mostra o perfil de resistência às quinolonas dos isolados.

**Tabela 14** Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar *S. Heidelberg*

Nº IOC	CIM (µg/ml)					Genes detectados
	CIP	NAL	ENO	LVX	OFL	
19/12	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	<i>int.</i> (700pb)
5/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤0,06S	≤0,06S	-
11394/11	≥2R	≥128R	≥4R	≤0,06S	≤0,5I	<i>int.</i> (900pb)

Os três isolados demonstraram perfis de resistência similares com pequenas variações. Vale à pena ressaltar a presença de um integron com região variável de +/-700pb no isolado 19/12, que não foi observado no isolado 5/12 que apresenta o mesmo perfil gênico. Este pode estar inserido em um plasmídeo não sendo detectável via PFGE. O isolado 11394/11 apresentou o gene integron com região variável de 900 pb.



**Figura 21** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Infantis avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolados resistentes as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

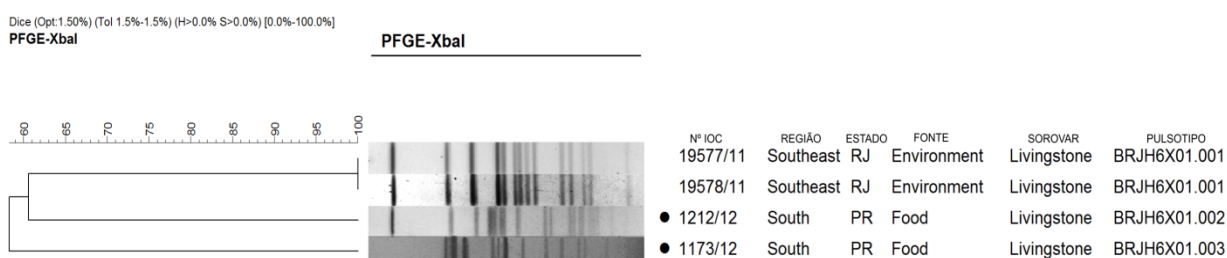
Foram detectados seis pulsotipos distintos referentes ao sorovar *S. Infantis*, sendo que os isolados com resistência às quinolonas se encontram em dois pulsotipos distintos (pulsotipo BRJFXX01.13 e BRJFXX01.12), com um perfil de similaridade gênica de aproximadamente 85% entre eles. O percentual de similaridade gênica entre os isolados foi baixo (< 70%). Os isolados com resistência às quinolonas foram obtidos de distintas fontes, região e período. A tabela 15 apresenta o percentual de resistência destes isolados.



**Tabela 15** Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar *S. Infantis*

N <sup>o</sup> IOC	CIM (µg/ml)					Genes detectados
	CIP	NAL	ENO	LVX	OFL	
6754/12	≤1R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	<i>QnrD</i>
9606/10	≤0,03S	≥128R	≤0,5S	≤0,06S	≤0,06S	-

O perfil de resistência às quinolonas também sofreu variações como pode ser observado na tabela 15. O isolado 6754/12 com resistência a ciprofloxacina, ácido nalidíxico e enrofloxacin ainda com a presença do gene *qnrD* e o isolado 9606/10 com resistência apenas ao ácido nalidíxico sem a detecção de genes.



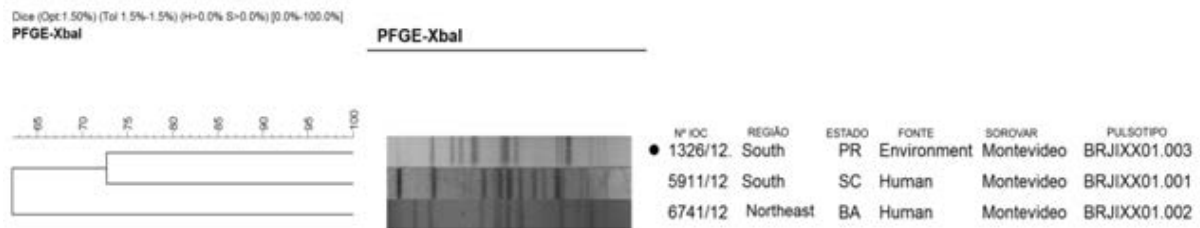
**Figura 22** Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Livingstone avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolados resistentes às quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

Dentre os três pulsotipos detectados relacionados ao sorovar *S. Livingstone* o coeficiente de Dice dos isolados com resistência às quinolonas apresentou um baixo percentual de similaridade (60%), embora sejam isolados da mesma origem, do mesmo período e do mesmo estado. Também não foi detectada relação com as outras amostras trabalhadas sem perfil de resistência às quinolonas. A tabela 16 aponta o perfil de resistência a quinolona de ambos.

**Tabela 16** Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar *S. Livingstone*

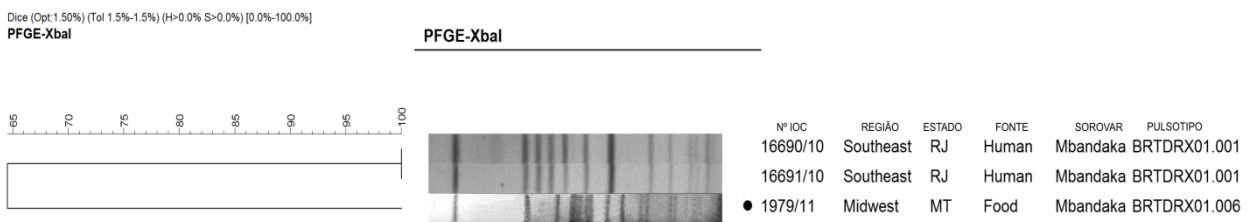
N <sup>o</sup> IOC	CIM (µg/ml)					Genes detectados
	CIP	NAL	ENO	LVX	OFL	
1212/12	≤0,5I	≥128R	≥4R	≤0,06S	≤0,06S	<i>qnrS</i>
1173/12	≤0,5I	≤32R	≤1I	≤0,06S	≤0,06S	<i>qnrD/int.</i> (>1000pb)

Foram observadas variações no perfil de resistência, assim como variações gênicas detectadas pela técnica de PCR entre os isolados.



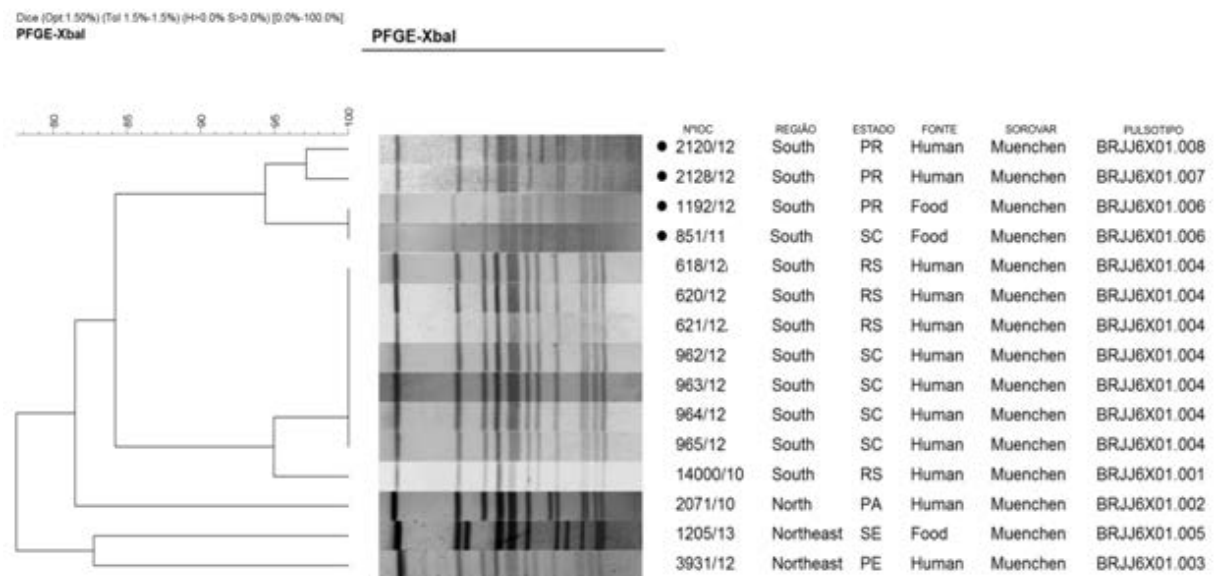
**Figura 23** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Tennessee avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolado resistente as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

Os isolados do sorovar Montevideo apresentaram tres pulsotipos distintos demonstrando um baixo percentual de similaridade gênica entre si (menor que 65%).



**Figura 24** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Mbandaka avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolado resistente as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

Dos dois pulsotipos detectados referentes ao período de estudo o sorovar Mbandaka apresentou um perfil de similaridade gênica baixo (65%) o que indica uma grande diversidade gênica entre os isolados sensíveis e o isolado com resistência às quinolonas avaliado. Percebesse que estes foram isolados em regiões distintas em diferentes períodos e fontes.



**Figura 25** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Muenchen avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolados resistentes as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.



A figura demonstra que embora o sorovar Muenchen tenha apresentado uma ampla variedade gênica (com 9 pulsotipos detectados) os isolados com perfil de resistência às quinolonas (Pulsotipos BRJJ6X01008, BRJJ6X01007e BRJJ6X01006) demonstraram 88% de similaridade gênica.

Dentre os 4 isolados resistentes 2 são de origem humana e dois de origem alimentar. Percebe-se uma elevada similaridade (aproximadamente 97%) entre os isolados de origem humana. Em relação aos isolados de origem alimentar estes são de mesma origem clonal mesmo sendo de diferentes períodos e estados.

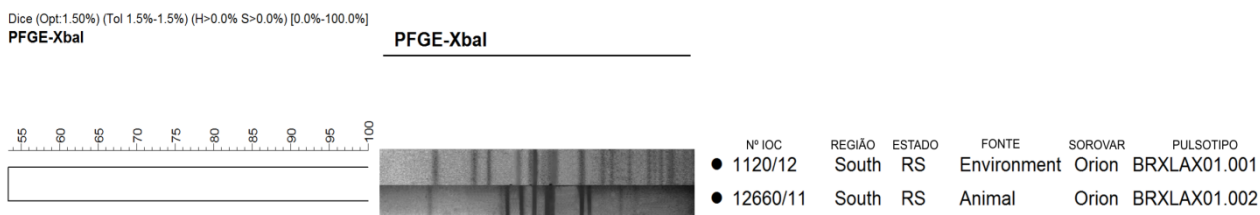
A tabela 17 apresenta os resultados referentes ao perfil de resistência, assim como os genes de resistência obtidos na análise de resistência às quinolonas.

**Tabela 17** Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar *S. Muenchen*

Nº IOC	CIM (µg/ml)					Genes detectados
	CIP	NAL	ENO	LVX	OFL	
2120/12	≤0,5I	≤32R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	<i>qnrS</i>
2128/12	≤0,5I	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	<i>qnrS</i>
1192/12	≤0,5I	≤32R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	<i>aac(6')-Ib/int.</i> (600pb)
851/11	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,12S	≥4R	<i>int.</i> (700pb)

Os isolados 2128/12, 2120/12 e 1192/12 têm o perfil de resistência a quinolonas similares. O isolado 851/11 porem tem um perfil de ressitencia singular com ressitencia a ciprofloxacina e ofloxacina como diferencial.

Os isolados 2120/12 e 2128/12 alem de apresentarem perfil de resistência similares ambos apresentaram o gene de resistência *qnrS*.



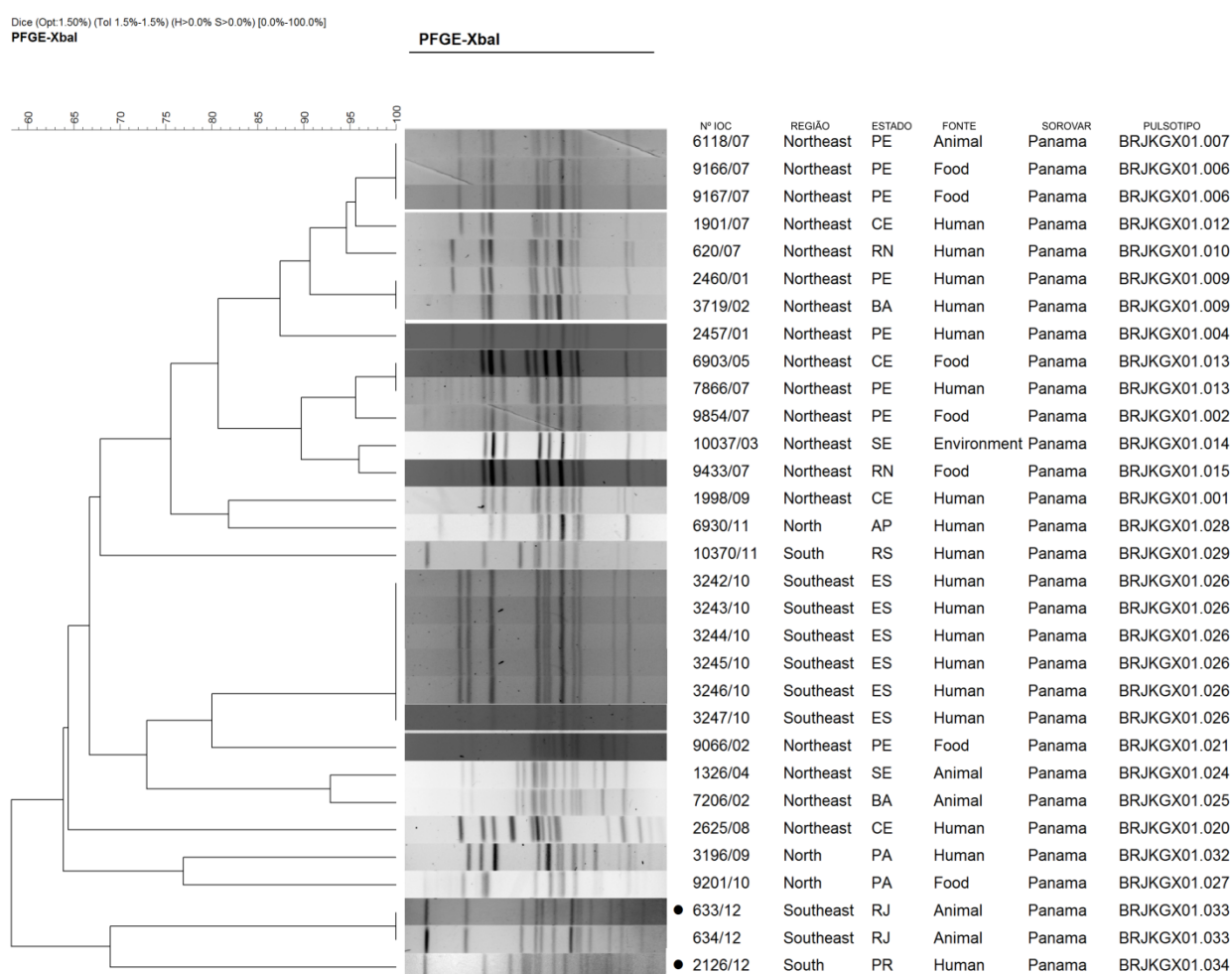
**Figura 26** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Orion avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolados resistentes as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

Os isolados do sorovar Orion apresentam um baixo percentual de similaridade gênica (abaixo de 55%) indicando a falta de relação entre os clones descritos, mesmo ambos sendo isolados no mesmo estado, porém de fontes diferentes e em períodos distintos. Diferenças significativas no perfil de resistência às quinolonas também foram detectadas entre estes isolados conforme tabela 18.

**Tabela 18** Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar *S. Orion*

Nº IOC	CIM (µg/ml)					Genes Detectados
	CIP	NAL	ENO	LVX	OFL	
1120/12	≤0,5I	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	<i>qnrS/int.</i> (800pb)
12660/11	≤0,03S	≤8S	≤0,06S	≤0,06S	≤0,06S	-

Alem das diferenças apresentadas pela técnica de PFGE pode se perceber que os isolados são diferentes quanto ao seu perfil de resistência. Com o isolado 12660/11 apresentando sensibilidade à todos os antimicrobianos testados.



**Figura 27** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Panama avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice ● Isolados resistentes as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

Uma elevada diversidade clonal foi encontrada entre os isolados do sorovar Panama com 22 pulsotipos detectados. Os isolados com resistência às quinolonas apresentaram um baixo percentual de similaridade gênica entre si (aproximadamente 65%). O isolado 633/12 encontrado no pulsotipo BRJKGX01.033 (onde estava inserido o isolado 634/12 com perfil

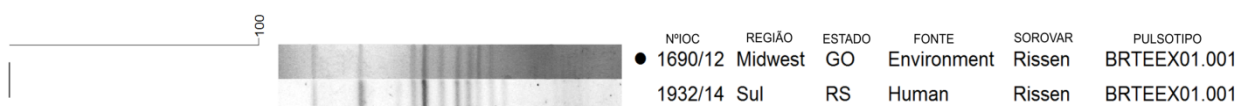
de sensibilidade as quinolonas) tem um perfil de similaridade gênica baixo com o isolado 2126/12 (aproximadamente 65%). A tabela 19 mostra o perfil de resistência entre os isolados.

**Tabela 19** Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar *S.Panama*

N <sup>o</sup> IOC	CIM (µg/ml)					Genes Detectados
	CIP	NAL	ENO	LVX	OFL	
634/12	≤0,12I	≤32R	≤0,25S	≤0,06S	≤0,06S	-
2126/12	≤1R	≤64S	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-

Percebesse a diferença no perfil de resistência entre estes dois isolados, assim como as diferenças encontradas entre o perfil de similaridade gênica.

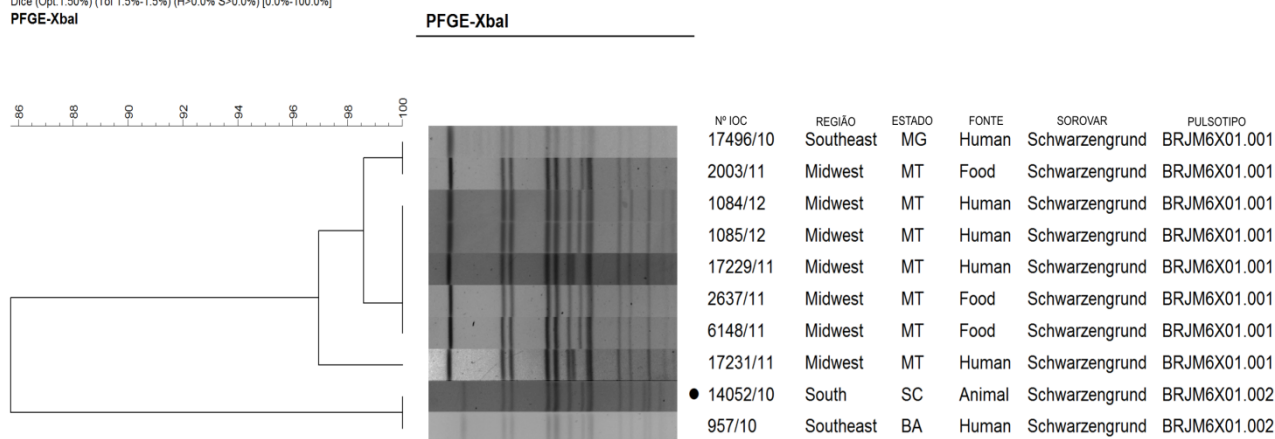
Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
PFGE-XbaI



**Figura 28** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Rissen avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolado resistente as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

Os isolados do sorovar Rissen apresentaram elevado percentual de similaridade gênica (93%). Mesmo com a diferença entre os períodos de isolamento, a distância entre os isolados e as diferentes fontes este alto índice de similaridade indica uma possível relação entre eles.

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
PFGE-XbaI

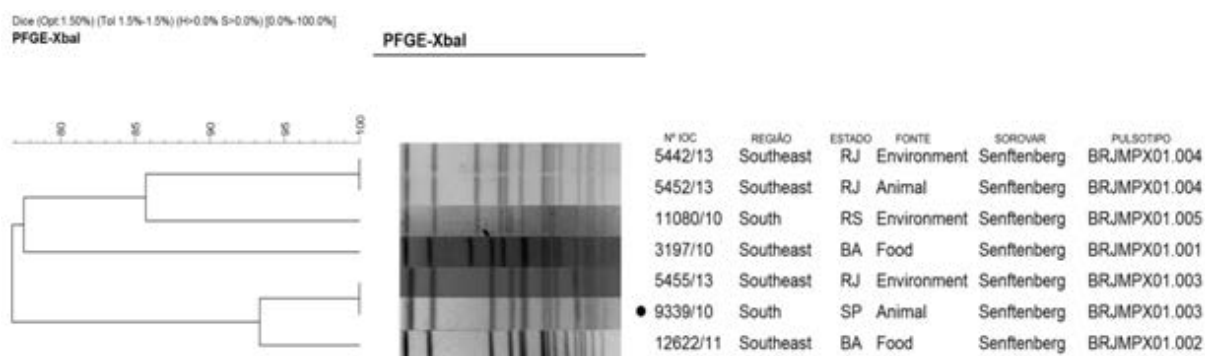


**Figura 29** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Schwarzengrund avaliados através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolado resistente as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

Seis pulsotipos distintos foram detectados no sorovar Schwarzengrund, o isolado resistente as quinolonas foi encontrado no pulsotipo BRJM6X01.002 junto com outro isolado

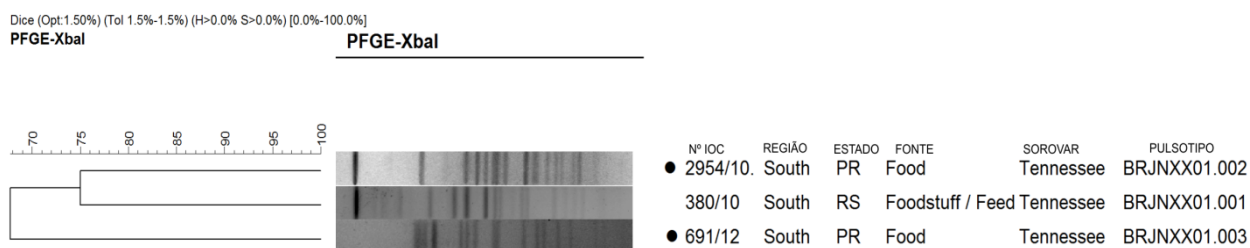
de origem humana oriundo na Bahia no mesmo período com perfil de sensibilidade. Trata-se de um isolado de mesma origem clonal que possivelmente adquiriu resistência às quinolonas.

Este isolado apresentou ainda grande similaridade gênica com isolados de origem humana e alimentar na região Centro-Oeste e com outro isolado de origem humana da região sudeste.



**Figura 30** Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Senftenberg avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolado resistente as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.

O sorovar *S. Senftenberg* apresentou uma variabilidade gênica elevada frente aos sorovares avaliados. Os oito isolados avaliados pertenciam a pulsotipos distintos. O único sorovar com perfil de resistência às quinolonas, porém apresentou uma pequena variabilidade gênica quando comparada a outros sem resistência (de aproximadamente 93% com o isolado 12622/11).



**Figura 31** Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Tennessee avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolados resistentes as quinolonas/fluorquinolonas testadas.

Dos isolados do sorovar *S. Tennessee* avaliados foram detectados três pulsotipos diferentes. Os isolados com resistência às quinolonas apresentaram um índice baixo de similaridade gênica (<70%) demonstrando uma distância gênica bem marcante entre eles. O perfil de resistência esta elucidado na tabela 20.

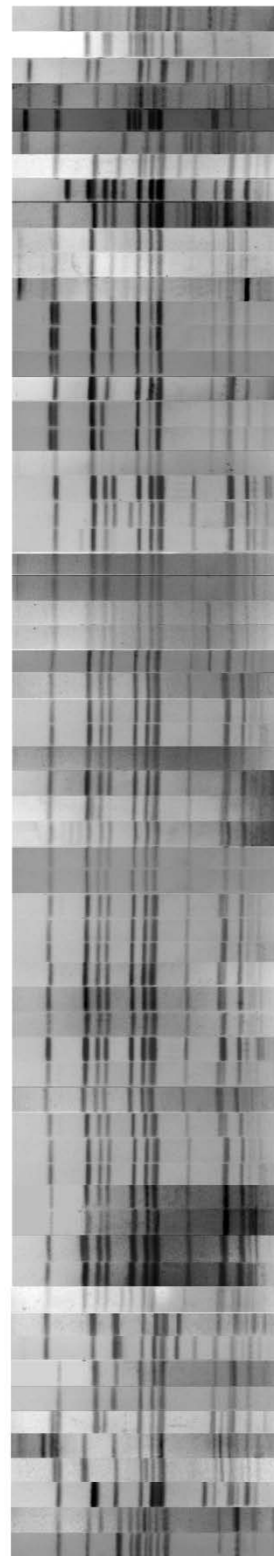
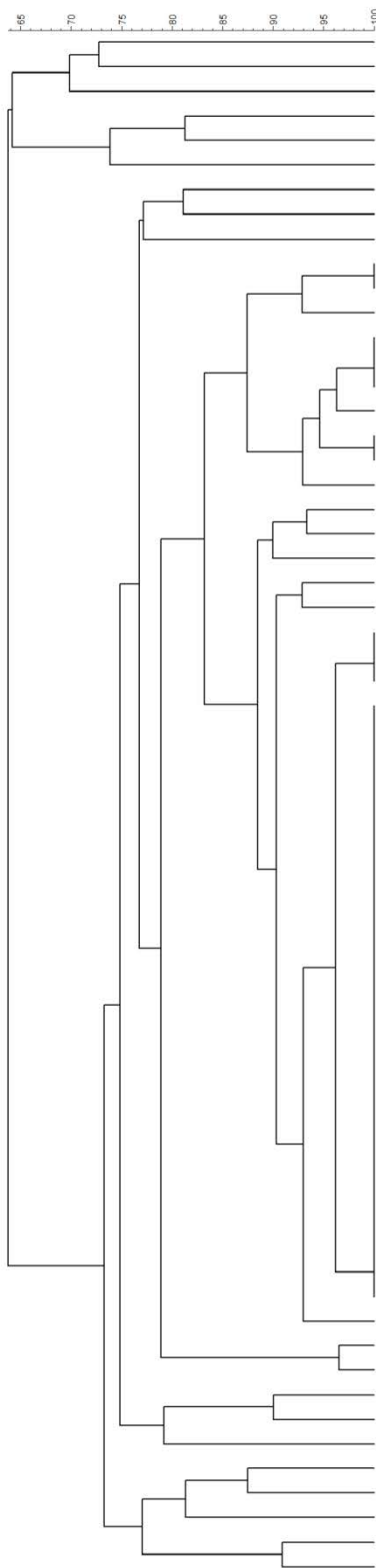
**Tabela 20** Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar *S. Tennessee*

N <sup>o</sup> IOC	CIM (µg/ml)					Genes detectados
	CIP	NAL	ENO	LVX	OFL	
691/12	≤0,12S	≤64R	≤0,25S	≤0,12S	≤0,12S	<i>int.</i> (>1000pb)
2954/10	≥0,5I	≤64R	≤0,25S	≤0,06S	≤0,06S	-

Embora o perfil de resistência seja similar entre os isolados avaliados percebe-se a presença de um integron de região variável >1000pb indicando diferenças gênicas entre estes isolados possivelmente atribuídas a presença de genes de resistência.

Dice (Opt.1.50%) (Tot.1.5%-2.0%) (H-0.0% S-0.0%) [0.0%-100.0%]  
**PFGE-XbaI**

**PFGE-XbaI**



Nº IOC	REGIÃO	ESTADO	FONTE	SOROVAR	PULSOTIPO
● 1618/12	Southeast	MG	Food	Typhimurium	BRJPXX01.095
● 5971/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.091
● 1310/12	South	PR	Food	Typhimurium	BRJPXX01.093
● 6744/12	Southeast	BA	Human	Typhimurium	BRJPXX01.089
● 711/12	South	PR	Food	Typhimurium	BRJPXX01.094
● 505/09	South	SC	Environment	Typhimurium	BRJPXX01.092
● 2263/12	South	SC	Food	Typhimurium	BRJPXX01.096
● 2629/12	South	SP	Animal	Typhimurium	BRJPXX01.097
● 14488/10	Midwest	MT	Food	Typhimurium	BRJPXX01.098
● 3307/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.080
● 833/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.080
● 434/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.081
● 456/12	Midwest	MT	Food	Typhimurium	BRJPXX01.078
● 5974/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.078
● 5977/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.078
● 1622/12	Southeast	MG	Food	Typhimurium	BRJPXX01.077
● 43/12	South	PR	Food	Typhimurium	BRJPXX01.076
● 5973/12	South	SC	Environment	Typhimurium	BRJPXX01.076
● 792/09	North	PA	Human	Typhimurium	BRJPXX01.103
● 12720/11	South	SC	Environment	Typhimurium	BRJPXX01.104
● 5417/10	Midwest	MT	Food	Typhimurium	BRJPXX01.105
● 17343/09	South	PR	Human	Typhimurium	BRJPXX01.101
● 2490/11	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.102
● 6627/11	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.089
● 19754/11	Midwest	GO	Human	Typhimurium	BRJPXX01.099
● 6161/11	Midwest	MT	Food	Typhimurium	BRJPXX01.099
● 744/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.099
● 1099/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 12362/11	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 12722/11	South	SC	Environment	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 129/12	South	PR	Food	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 13873/11	North	PA	Human	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 13874/11	North	PA	Human	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 14119/11	South	SC	Food	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 1615/12	Southeast	MG	Food	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 16238/09	South	MS	Food	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 17242/11	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 2130/12	South	PR	Human	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 2178/12	South	SC	Food	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 2179/12	South	SC	Food	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 2316/12	South	SC	Food	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 320/12	South	PR	Environment	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 3309/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 5179/10	South	PR	Food	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 591/12	Midwest	MT	Food	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 5972/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 667/12	South	PR	Food	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 6822/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 778/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 8796/10	Midwest	MT	Food	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 8891/10	Southeast	MG	Animal	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 994/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.090
● 5970/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.100
● 63/13	South	SC	Human	Typhimurium	BRJPXX01.027
● 6826/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.082
● 55/13	South	SC	Human	Typhimurium	BRJPXX01.073
● 5968/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.083
● 6827/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.084
● 431/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.086
● 5906/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.042
● 1199/09	South	RS	Food	Typhimurium	BRJPXX01.075
● 5976/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.087
● 777/12	South	RS	Human	Typhimurium	BRJPXX01.088

**Figura 32** Distribuição dos grupos filogeneticos de *Salmonella* ser. Typhimurium avaliados através de PFGE digeridos pela enzima *XbaI*, e padrões calculados pelo coeficiente de Dice. ● Isolados resistentes as quinolonas e/ou fluorquinolonas testadas.



Dos 63 isolados do sorovar *S. Typhimurium* resistentes às quinolonas/fluoroquinolonas avaliados foram detectados 33 pulsotipos distintos com similaridade gênica menor de 65% entre eles. Isto indica que diferentes clones de *S. Typhimurium* com resistência às quinolonas e estes estão circulantes por todo território nacional. Percebe-se ainda que o maior pulsotipo evidenciado (BRJPXX01.090) alberga principalmente amostras oriundas da região Sul sendo sua maioria relacionada a alimentos e humanos. Foram ainda detectados dois isolados da região Norte, dois da região Centro Oeste e dois da região Sudeste indicando que embora este pulsotipo seja prevalente no Sul ele também é evidenciado em outras regiões do país. A maioria dos isolados da região Sul são provenientes do estado do Rio Grande do Sul (8/19) porém foram também evidenciados no estado de Santa Catarina (5/19), Paraná (5/19) e Mato Grosso do Sul (1/19), ou seja sendo detectados em quase todos os estados do Sul. A detecção de 11 isolados de origem alimentar e 11 isolados de origem humana reforça a possível interrelação entre estas origens de isolamento na veiculação de cepas ou mecanismos de resistência. A tabela 21 evidencia os perfis de resistência às quinolonas apresentados por estes isolados.

**Tabela 21** Perfil de resistência às quinolonas dos isolados do sorovar *S. Typhimurium*.  
Continua

N <sup>o</sup> IOC	CIM (µg/ml)					Genes Detectados
	CIP	NAL	ENO	LVX	OFL	
1618/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	<i>aac(6')-Ib</i>
5971/12	≤0,25I	≥128R	≤0,5I	≤0,12S	≤0,12S	<i>aac(6')-Ib/int.</i> (1000pb)
1310/12	≤0,5I	≤64R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	<i>QnrS</i>
6744/12	≤0,5	128R	≤1I	≤0,06S	≤0,06S	<i>qnrB/int.</i> (1000p)
711/12	≤0,03S	≤32R	≤0,06S	≤0,06S	≤0,06S	<i>QnrD</i>
505/09	≥2R	≥128R	≥4R	≤0,06S	≤0,06S	<i>int.</i> (900pb)
2263/12	≥2R	≥128R	≥4R	≥4R	≥4R	-
2629/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	<i>aac(6')-Ib/int.</i> (900pb)
14488/10	≥2R	≥128R	≥4R	≤1I	≤1I	<i>int.</i> (900pb)
3307/12	≥2R	64R	2R	≤0,06S	≤0,06S	<i>int.</i> (1000pb)
833/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤0,06S	≤0,12S	-
434/12	≤1R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
456/12	≤0,5I	≥128R	≤1I	≤0,06S	≤0,06S	<i>int.</i> (1000pb)
5974/12	≤0,5I	≥128R	≤1I	≤0,12S	≤2R	<i>int.</i> (1000pb)
5977/12	≤1R	≥128R	≥4R	≤0,12S	≤2R	<i>int.</i> (900pb)
1622/12	≤0,5I	≥128R	≥4R	≤0,06S	≤0,06S	-
43/12	≤0,25I	≥128R	≤1I	≤0,06S	≤0,06S	-
5973/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤0,12S	≤0,12S	<i>int.</i> (1000pb)
792/09	≥2R	≥128R	≤1I	≤0,12S	≤0,12S	<i>int.</i> (900pb)
12720/11	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≥4R	<i>int.</i> (900pb)
5417/10	≥2R	≥128R	≥4R	≥4R	≤2R	<i>int.</i> (900pb)
17343/09	≥2R	≥128R	≥4R	≤0,5I	≤0,5I	<i>int.</i> (1000pb)
2490/11	≥2R	≥128R	≥4R	≥4R	≤2R	<i>int.</i> (900pb)
6627/11	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≥4R	<i>int.</i> (900pb)
19754/11	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	-
6161/11	≥2R	≥128R	≥4R	≥4R	≥4R	-
744/12	≥2R	≥128R	≥4R	≥4R	≥4R	<i>int.</i> (900pb)
1099/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	<i>int.</i> (1000pb)
12362/11	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≥4R	<i>int.</i> (900pb)
12722/11	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≥4R	-
129/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	<i>aac(6')-Ib</i>



**Tabela 21** continuação

13873/11	≥2R	≥128R	≥4R	≥4R	≤2R	<i>int.</i> (900pb)
13874/11	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	<i>int.</i> (900pb)
14119/11	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	<i>int.</i> (900pb)
1615/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	-
16238/09	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	<i>int.</i> (900pb)
17242/11	≥2R	≥128R	≥4R	≥4R	≥4R	<i>int.</i> (900pb)
2130/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	<i>aac(6')-Ib</i>
2178/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	<i>aac(6')-Ib</i>
2179/12	≥2R	≥128R	≥4R	≥4R	≥4R	<i>aac(6')-Ib</i>
2316/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	<i>int.</i> (900pb)
320/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	<i>aac(6')-Ib/int.</i> (900pb)
3309/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤0,12S	≤0,25S	<i>qnrB/aac(6')-Ib/int.</i> (900pb)
5179/10	≤1R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	-
591/12	≤0,03S	≤32R	≤0,06S	≤0,06S	≤0,06S	<i>int.</i> (900pb)
5972/12	≥2R	≥128R	≥4R	≥4R	≥4R	<i>aac(6')-Ib/int.</i> (900pb)
667/12	≥2R	≥128R	≤1I	≤0,12S	≤0,12S	-
6822/12	≥2R	≥128R	≥4R	≥4R	≥4R	<i>int.</i> (900pb)
778/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≥4R	<i>QnrB</i>
8796/10	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	<i>int.</i> (900pb)
8891/10	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	<i>int.</i> (900pb)
994/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤1I	≤2R	<i>int.</i> (900pb)
5970/12	≥2R	≥128R	≥4R	≤2R	≤2R	<i>aac(6')-Ib</i>
63/13	≥2R	≥128R	≥4R	≤0,06S	≤0,25I	<i>int.</i> (1000pb)
6826/12	≤0,5I	≥128R	≤1I	≤0,12S	≤0,12S	<i>int.</i> (1000pb)
55/13	≤1R	≥128R	≥4R	≥4R	≥4R	<i>QnrD</i>
5968/12	≤0,5I	≥128R	≤1I	≤0,06S	≤0,5I	<i>int.</i> (1000pb)
6827/12	≤0,5I	≥128R	≤1I	≤0,06S	≤0,5I	<i>int.</i> (1000pb)
431/12	≤0,06S	≤4S	≤0,12S	≤0,06S	≤0,06S	-
5906/12	≤0,03S	≥128R	≤0,25S	≤0,12S	≤0,12S	-
1199/09	≥2R	≥128R	≤2R	≤0,06S	≤0,06S	<i>int.</i> (600pb)
5976/12	≤1R	128R	≥4R	≥4R	≤2R	<i>aac(6')-Ib/int.</i> (700pb)
777/12	≥2R	128R	≥4R	≤2R	≥4R	<i>qnrB/aac(6')-Ib</i>

Verificasse que os isolados do pulsotipo BRJXX01.090 apresentaram quase que a sua totalidade o mesmo perfil de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas (com exceção dos isolados 3309/11, 5179/10, 591/12 e 667/12), demonstrando um perfil de resistência à todas as quinolonas/fluoroquinolonas testadas. Os isolados 3309/11 e 5179/10 apresentaram sensibilidade a levofloxacina e ofloxacina, o isolado 591/12 com resistência apenas ao ácido nalidíxico e o isolado 667/12 com sensibilidade a levofloxacina, ofloxacina e suscetibilidade intermediária a enrofloxacina. Assim como seu perfil clonal, pequenas variações foram detectadas quanto à suscetibilidade destes isolados. Ressaltasse que estes apresentaram resistência a todas as quinolonas/fluoroquinolonas testadas. Quanto à detecção de genes de resistência dos 25 isolados pertencentes a este pulsotipo, apenas 4 isolados não apresentaram genes de resistência. Foram detectados 12 isolados com a presença do integrom com região variável de 900 pb, 1 isolado com integron com >1000 pb, 1 isolado com o gene *qnrB*, 4 isolados com o gene *aac(6')-Ib*. Ainda foi possível observar a presença de dois isolados que apresentaram os genes integron com região variável de 900pb e o gene *aac(6')-Ib* e um isolado com os genes *qnrB*, *acc(6')-Ib* e o integron com 900 bp.

Os isolados do sorovar Enteritidis não foram avaliados pela técnica de PFGE, visto que estes apresentam uma baixa diversidade clonal segundo aponta a literatura (SPILIOPOULOU, et al., 2007).

Os perfis encontrados pela análise do PFGE permitiram evidenciar uma diversidade relativamente alta em todos os sorovares, indicando que os casos de resistência às quinolonas foram provavelmente esporádicos. Esta interpretação esta de acordo com a literatura (FEASEY et al., 2012).

Os Padrões de resistência às quinolonas encontrados em cada padrão de PFGE predominante também diferiram entre si. Portanto os isolados talvez tenham diferentes linhagens clonais. seria de importância crucial determinar o genótipo (com os testes MLST ou MLVA) de ligação a possível via de transmissão de cada sorotipo predominante em estudos futuros (FEASEY et al., 2012).

No cômputo geral, não foi detectado correlação entre o perfil de resistência às quinolonas e os resultados de similaridade gênica obtidos pela técnica de PFGE, uma vez que em um mesmo perfil clonal eram relatados ambos os padrões, de resistência e de sensibilidade, com diferenças marcantes na MIC destes isolados. Sendo a técnica de PFGE considerada incapaz de distinguir as diferenças gênicas referentes ao perfil de suscetibilidade (SPILIOPOULOU, et al., 2007).

Outros métodos como MLST ou MLVA, têm sido usados para tipificar *Salmonella* spp. (IKUMAPAYI, et al., 2007; HARADA et al., 2011), porém o MLST demonstrou não ser tão bom quanto o PFGE devido a falta de diversidade de genes assim como o MLVA. Um estudo realizado no Japão utilizando as enzimas XbaI e BlnI obtiveram resultados mais satisfatórios na discriminação de isolados do sorovar *S. Montevideo* (HARADA et al., 2011).

Diferenças na sensibilidade a antimicrobianos podem ser causadas por eventos como a aquisição de plasmídeos, os quais não necessariamente irão alterar o genótipo (CARDINALE et al., 2005). Do mesmo modo, diferenças na pressão seletiva podem estimular a emergência de linhagens resistentes, as quais podem ser utilizadas para a caracterização das amostras (ARBEIT, 2001 apud VAZ, 2010).

Kim e colaboradores (2011) ao analisar isolados de *Salmonella* spp. de origem alimentar com elevados índices ao ácido nalidíxico detectaram duas amostras do sorotipo Haardt que apresentaram um perfil idêntico em PFGE, mas o fenótipo de resistente ao fármaco foi ligeiramente diferente. Além disso, os níveis MIC para ambas as linhagens de levofloxacina eram diferentes. Por outro lado, outros isolados apresentaram o mesmo fenótipo de resistência aos medicamentos, mas o perfil de similaridade gênica estava próximo a 83%. Esta observação foi realizado nas estirpes de Enteritidis que, por exemplo, tinha mesmo

fenótipo de resistência a antimicrobianos (resistente somente ao ácido nalidíxico) e mesmo ponto de mutação em QRDR (Asp87Tyr em gyrA), mas a identidade genômica com base no padrão de PFGE era apenas 43%.

Os resultados apontados na literatura sugerem que as mutações de ponto no QRDR e os sistemas de bombas efluxo envolvidos na resistência aos antimicrobianos são efeitos independentes sobre droga-resistência, independentemente da variação genômica bacteriana (KIM et al., 2011; KE et al., 2014).

## 6 CONCLUSÕES

- Das 152 cepas de *Salomonella* spp. resistentes as quinolonas avaliadas os sorovares *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis* e *S. Gallinarum* representaram os sorovares prevalentes na totalidade das cepas avaliadas com resistência às quinolonas.
- A prevalência de isolados resistentes às quinolonas/fluoroquinolonas foi mais evidente nas fontes humanas e alimentares entre os sorovares mais detectados.
- O ano de 2012 foi o que apresentou o maior percentual de isolados em relação ao período avaliado.
- As diferenças reportadas relacionadas as diferentes regiões do país pode ser indício de discrepâncias na eficácia de monitoramento dos quadros de surtos de origem alimentar pelas distintas regiões.
- As tetraciclinas, beta-lactâmicos e aminoglicosídeos apresentaram elevadas taxas de resistência associadas à resistência às quinolonas/fluoroquinolonas, demonstrando uma dificuldade adicional em se traçar uma estratégia terapêutica frente a estes perfis.
- A detecção de isolados com perfil de multirresistência a 7 das classes avaliadas merece uma atenção especial visto que reflete a presença de isolados resistentes a quase todas as classes de antimicrobianos testadas.
- As elevadas taxas de multirresistência em amostras humanas do sorovar Typhimurium detectadas neste estudo tem sido observada em todo mundo, o que ressalta a necessidade de traçar uma estratégia terapêutica baseada nos resultados do antibiograma frente a infecções decorrentes deste sorovar, assim como o monitoramento da circulação de clones multirresistentes à nível mundial.
- A detecção de isolados que apresentaram CIM maiores que as concentrações limites testadas em todas as gerações, ressalta a importância de um estudo mais aprofundado para a compreensão dos mecanismos de resistência atribuídos a classes das quinolonas.
- Um total de 24,3% (37/152) de isolados apresentaram resistência a todas às quinolonas testadas sendo possível distinguir 9 perfis distintos.
- A presença dos genes *qnr* em 11,8% isolados (8 *qnrS*, 6 *qnrB* e 4 *qnrD*) assim como a presença de 15,3% de isolados *aac(6')-Ib* indicam a necessidade de monitoramento constante e análises apuradas para melhor compreensão do envolvimento dos PMQRs na aquisição de resistência às quinolonas.
- A detecção de 44,5% de isolados apresentando a região conservada do integron de classe I aponta para possível relação deste com a dispersão de elementos genéticos móveis de resistência às quinolonas.
- A presença de clones com 100% de similaridade gênica que apresentaram perfis de resistência às quinolonas isolados de diferentes fontes de origem e regiões geográficas distintas indica elevada dispersão da resistência.
- Foram detectados 33 pulsotipos distintos no sorovar *S. Typhimurium* resistentes as quinolonas/fluoroquinolonas, indicando a presença de diferentes clones de *S. Typhimurium* responsáveis pela disseminação de resistência em todo o território nacional. Ainda em relação a este sorovar foi identificado um pulsotipo específico onde foram encontrados apenas os isolados com resistência às quinolonas (maior pulsotipo evidenciado), relacionado principalmente a fonte alimentar e humana, podendo representar a presença de um clone relacionado a resistência a esta classe de antimicrobianos, sendo mais evidenciado na região Sul do país.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M.; WIUFF, C.; MOLBAK, K.; THRELFALL, E. J. Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for salmonella spp.? **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.47, p. 827-829, 2003.
- ABDELLAH, C.; FOUZIA, R.F.; ABDELKADER, C.; RACHIDA, S.B.; MOULOUD, Z. Prevalence and anti-microbial susceptibility of Salmonella isolates from chicken carcasses and giblets in Meknès, Morocco. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, p. 215–219, 2009.
- ARBEIT, R.D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganism. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7.ed. Washington, ASM Press. p.116-137. 1999
- AJIBOYE, R.M.O.D.; SOLBERG, B.M.; LEE, E.; RAPHAEL, C.; DEBROY, L.W.; RILEY, L.W. Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquire infections. **Clinical Infections Diseases**. v.49, p. 365-371, 2009.
- AKINYEMI, K. O.; BAMIRO, B. S.; COKER, A. O. Salmonellosis in Lagos, Nigeria: incidence of Plasmodium falciparum-associated coinfection, patterns of antimicrobial resistance, and emergence of reduced susceptibility to fluoroquinolones. **Journal of Health Populary Nutricion**, v. 25, n. 3, p. 351-358, 2007.
- AKIYAMA, T.; KHAN, A.A. Molecular characterization of strains of fluoroquinolone-resistant Salmonella enterica serovar Schwarzen-grund carrying multidrug resistance isolated from imported foods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 101–110, 2012.
- ALDRED, K. J.; SCHWANZ, H. A.; LI, G.; MCPHERSON, S. A.; TURNBOUGH, C. L.; JR. KERN, R. J.; OSHEROFF, N. Overcoming target-mediated quinolone resistance in topoisomerase IV by introducing metal-ion-independent drug-enzyme interactions. **ACS Chemistry Biology**, v. 8, p. 2660–2668, 2013.
- ALESSIANI, A.; DI GIANNATALE, E.; PERILLI, M.; FORCELLA, C.; AMICOSANTE, G.; ZILLI, K. Preliminary investigations into fluoroquinolone resistance in Escherichia coli strains resistant to nalidixic acid isolated from animal faeces. **Veterinaria Italiana**, v. 45, n. 4, p. 521-527, 2009.
- ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E.; ALONSO-CALLEJA, C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, C.; CAPITA, R. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 281–287, 2012.
- ALVES, L. M. C.; COSTA, N. F.; SILVA, M. S.; SALES, S. S.; CORREIA, M.R. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis: relato de um surto ocorrido em São Luís-MA. **Higiene Alimentar**, São Paulo. v. 15, p. 57-58, 2001.
- ANDRIOLE, V.T. The quinolones. New York : **Academic Press**, v. 2, p.417-419, 1998.

ANTUNES, P.; RÉU, C.; SOUSA, J.C.; PEIXE, L.; PESTANA, N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, n.2, p.97-103, 2003.

ANTUNES, P.; MACHADO, J.; PEIXE, L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 58, p. 297-304, 2006.

ANTUNES, P.; MOURÃO, J.; MACHADO J.; PEIXE L. First description of *qnrS1*-IncN plasmid in ST11 *Salmonella* Enteritidis clinical isolate from Portugal. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 69, n. 4, p. 463-465, 2011.

APPELBAUM, P. C.; HUNTER, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, n. 1, p. 5-15, 2000.

ARAÚJO, J. A.; DA SILVA, J. H. V.; AMÂNCIO, A. L. L.; LIMA, M. R.; LIMA, C. B. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 1, n.3, p. 69-77, 2007.

ARSLAN, S.; EYI, A. Occurrence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* species in retail meat products. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 1613–1617, 2010.

ASAI, T.; SATO, C.; MASANI, K.; USUI, M.; OZAWA, M.; OGINO, T.; HIROSHI, A.; SAWADA, T.; IZUMIYA, H.; WATANABE, H. Epidemiology of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enteric* serovar Typhimurium isolates from food-producing animals in Japan. **Guts Pathogens**, v. 2, n.1, p. 17, 2010.

ASSEVA, G.; PETROV, P.; IVANOV, I.; KANTARDJIEV, T. Vigilância das salmoneloses humana na Bulgária, 1999-2004: evolução, mudanças e resistência aos antibióticos. **Euro. Surveill.** v.11, n.5, p.624, 2006.

AVGUSTIN, J. A.; KEBER, R.; ZERJAVIC, K.; ORAZEM, T.; GRABNAR, M. Emergence of the quinolone resistance-mediating gene *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p. 4171-4173, 2007.

BABU, U. S.; GAINES, D. W.; LILLEHOJ, H.; RAYBOURNE, R. B. Differential reactive oxygen and nitrogen production and clearance of *Salmonella* serovars by chicken and mouse macrophages. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 30, n. 10, p. 942-953, 2006.

BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n.1, p. 17-24, 2000.

BAILEY, A. M.; IVENS, A.; KINGSLEY, R.; COTTELL, J. L.; WAIN, J.; PIDDOCK, L.V. RamA, a Member of the AraC/XylS Family, Influences Both Virulence and Efflux in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 1607–1616, 2010.

BARROW, P. A. *Salmonella* – present, past and future. **Avian Pathology**. v. 22, p. 651-669, 1993.

BARROW, P. A. Salmonella infections in poultry-problems and new troughts on the possibilities of control. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.1, p.9-16, 1999.

BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de Salmonella em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 303-307, 2001.

BAUDRY, P.J.; NICHOL, K.; DECORBY, M.; LAGACE-WIENS, P.; OLIVIER, E.; BOYD, D.; MULVEY, M.R.; HOBAN, D.J.; ZHANEL, G.G. Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from Canadian intensive care units: the 1st report of *qepA* in North America. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 63, n. 3, p. 319–326, 2009.

BEGUM, K. REZA, T. A.; HAQUE, M.; HOSSAIN, A.; HASSAN, F. M. K. HASSAN, S. N.; AKHTER, N. ; AHMED, A.; BARUA, U. Isolation, identification and antibiotic resistance pattern of *Salmonella* spp. From chicken eggs, intestines and environmental samples. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**, v. 13, n. 1, p. 23-27, 2010.

BENACER, D.; THONG, K.L.; WATANABE, H.; PUTHUCHEARY, S.D. Characterization of drug resistant Salmonella enterica serotype Typhimurium by antibiograms, plasmids, integrons, resistance genes and PFGE. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 1042–1052, 2010.

BIEDENBACH, D.; TOLEMAN, M.; WALSH, T.; JONES, R. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance ProGram (1197-2004). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 54, p. 13-21, 2006.

BIENDO, M.; LAURANS, G.; THOMAS, D.; CANARELLI, B.; HAMDAD-DAOUDI, F.; ROUSSEAU, F.; CASTELAIN, S.; EB, F. Molecular characterization and mechanisms of resistance of multidrug-resistant human Salmonella enteric serovar Typhimurium isolated in Amiens (France). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 219–229, 2005.

BOYEN, F.; HAESBROUCK, F.; MAES, D.; VAN IMMERSEEL, F.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F. Non-typhoidal Salmonella infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. **Veterinary Microbiology**, v. 130, p. 1–19, 2008.

BONOMO, R. A.; TOMALSKY, M. **Enzyme-mediated resistance to antibiotics-mechanisms, dissemination and prospects for inhibition**. Washington, Editora: American Society for Microbiology, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004**. Boletim Eletrônico Epidemiológico, 6:1-7. Atualizado em 28.12.2005. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol\\_epi\\_6\\_2005\\_corrigido.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf)> Acesso em: 01 agosto 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos – VE-DTA 2000-2014**. Boletim Eletrônico Epidemiológico. Atualizado em 01.08.2014. Disponível em:

<[http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3\\_PAINEL\\_1\\_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Aosto\\_2014\\_PDF.pdf](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Aosto_2014_PDF.pdf)> Acesso em: 01 dezembro 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Atualizado em 04.09.2009. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analiseep\\_surtos\\_dtabrasil.2009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analiseep_surtos_dtabrasil.2009.pdf)> Acesso em: 01 agosto 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde- SVS. **Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas Por Alimentos**. 2010. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_dta.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_dta.pdf)> Acesso em: 01 agosto 2013.

BROUGHTON, E. I.; IP, M.; COLES, C. L.; WALKER, D. G. Higher hospital costs and lengths of stay associated with quinolone-resistant *Salmonella enterica* infections in Hong Kong. **Journal of Public Health**, v. 32, n.2, p.165-172, 2010.

BRYSKIER, A.; CHANTOT, J.F. Classification and Structure activity relationships of fluoroquinolones. **Drugs**. New Zeland, v. 49, n. 2, p. 16-28, 1995.

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**, v. 8, n. 7, p. 1-7, 2006.

CAFFER, M.I.; TERRAGNO, R. **Manual de procedimientos para la caracterizacion de Salmonella**. Ministerio de Salud. Subsecretaría de Investigación y Tecnología- ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”- Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas 102 (departamento Bacteriología – Serviço Enterobacterias, Buenos Aires, Argentina, 2001.

CAGNACCI, S.; GUALCO, L.; DEBBIA, E.; SCHITO, G. C.; MARCHESE, A. European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2605-2612, 2008.

CAMBRAY G.; GUEROUT, A. M.; MAZEL, D. Integrons. **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 141–166, 2010.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; PRIETO, M. Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses from slaughterhouses in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1366–1375, 2007.

CARATTOLI, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. **Veterinary Research**, v.32, p. 243-259, 2001.

CARDINALE, E.; PERRIER GROSCLAUDE, J.D.; TALL, F.; CISSÉ, M.; GUÈYE, E.F.; SALVAT, G. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Senegal. **Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v. 56, p. 13–16, 2005.



CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, A.M.I.; GAMA, N.M.S.Q. Pesquisa de *Salmonella* spp. em ovos comerciais, analisados no Laboratório de Patologia avícola de Descalvado, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo. v. 16, p. 76-79, 2002.

CARDOSO, T.G.; CARVALHO, V.M. Foodborne disease caused by *Salmonella* spp. **Revista Instituto Ciência e Saúde**, v.24, n. 2. p. 95-101, 2006.

CARMO, G. M. I., OLIVEIRA, A. A.; DIMECH, C. P.; SANTOS, D. A.; ALMEIDA, M. G.; BERTO, L. H.; ALVES, M. S.; CARMO, E. H. BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v. 5, n. 6, 2005.

CARVALHO, W.A. Quinolonas. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 5, p. 123-145, 1998.

CASTANHEIRA, M.; PEREIRA, A. S.; NICOLLET, A. G.; PIGNATARI, A. C.; BARTH, A. L.; GALES, A. C. First report of plasmid-mediated *qnrA1* in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1527-1529, 2007.

CASTILLA, K. S.; FERREIRA, C. S. A.; MORENO, A. M.; NUNES, I. A.; FERREIRA, A. J. F. Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* e *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p.135-139, 2006.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; ROTIMI, V.; SOUSSY, C. J.; NORDMANN, P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 394–397, 2007a.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrB4* identified in France in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate coexpressing a *qnrS1* determinant. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2652–2653, 2007b.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 52, p. 3801–3804, 2008.

CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance in Gram-negative bacterial species: an update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n.8, p. 1028-1046, 2009.

CAVACO, L.M.; KORSGAARD, H.; SORENSEN, G.; AARESTRUP, F.M. Plasmid-mediated quinolone resistance due to *qnrB5* and *qnrS1* genes in *Salmonella enterica* serovars Newport, Hadar and Saintpaul isolated from turkey meat in Denmark. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 632– 634, 2008.

CAVACO L. M.; AARESTRUP F. M. Evaluation of quinolones for use in detection of determinants of acquired quinolone resistance, including the new transmissible Resistance mechanisms *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, and *aac(6')ib-cr*, in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and determinations of wildtype distributions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p.2751-2758, 2009.

CAVACO, L.M.; HASMAN, H.; XIA, S.; AARESTRUP, F.M. *qnrD*, a novel gene Conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enteric* serovar Kentucky and *bovis morbificans* strains of human origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n 2, p. 603-608, 2009.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella* surveillance: outbreaks involving *Salmonella*, 2012. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Service. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>> Acessado em: 15 fev de 2013.

CETINKAYA, F.; CIBIK, R.; SOYUTEMIZ, G.E.; OZAKIN, C.; KAYALI, R.; LEVENT, B. Shigella and Salmonella contamination in various foodstuffs in Turkey. **Food Control**, v. 19, p. 1059–1063, 2008.

CÉSPEDES, J. **Implicación de diversos mecanismos de resistência a quinolonas em bacilos Gram-negativos: diseño de uma nueva flourquinolona**. 145p. (tesis doutoral), Universidad de Barcelona-Facultad de Medicina, Barcelona, 2008.

CHAU, T. T.; CAMPBELL, J. I.; GALINDO, C. M.; VAN MINH HOANG, N.; DIEP T. S.; NGA, T. T.; VAN VINH CHAU, N.; TUAN, P. Q.; PAGE, A. L.; OCHIAI R. L.; SCHULTSZ, C.; WAIN, J.; BHUTTA, Z. A.; PARRY, C. M.; BHATTACHARYA, S. K.; DUTTA, S.; AGTINI, M.; DONG, B.; HONGHUI, Y.; ANH, D. D.; CANH DO, G.; NAHEED, A.; ALBERT, M. J.; PHETSOUVANH, R.; NEWTON, P. N.; BASNYAT, B.; ARJYAL, A.; LA T. T.; RANG, N. N.; PHUONG LE, T.; VAN BE BAY, P.; VON SEIDLEIN, L.; DOUGAN, G.; CLEMENS, J. D.; VINH, H.; HIEN T. T.; CHINH, N. T.; ACOSTA, C. J.; FARRAR, J.; DOLECEK, C. Antimicrobial drug resistance of *Salmonella enteric* serovar Typhi in Asia and molecular mechanism of reduced susceptibility to the fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 12, p. 4315–4323, 2007.

CHEUNG, T. K.; CHU, Y. W.; CHU, M.Y.; MA, C. H.; YUNG, R. W.; KAM, K. M. Plasmid mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 586–592, 2005.

CHIU, C.H.; WU, T.L.; SU, L.H.; CHU, C.; CHIA, J.H.; KUO, A.J.; CHIEN, M.S.; LIN, T.Y. The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis. **New England Journal Medical**, v. 346, p. 413–419, 2002.

CHONG, Y. P.; CHOI, S. H.; KIM, E. S.; SONG, E. H.; LEE, E. J.; PARK, K. H.; CHO, O. H.; KIM, S. H.; LEE, S. O.; KIM, M. N.; JEONG, J. Y.; WOO, J. H.; KIM, Y. S. Bloodstream infections caused by *qnr*-positive enterobacteriaceae: Clinical and microbiologic characteristics and outcomes. **Diagnosis Microbiology Infection Diseases**, v.67, p. 70-77, 2010.

CHUANCHUEN, R.; KOOWATANANUKUL, C.; KHEMTONG, S. Characterization of class 1 integrons with unusual 3' conserved region from *Salmonella enterica* isolates. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 39, p. 419–424, 2008.

CHUANCHUEN, R.; AJARIYAKHAJORN, K.; KOOWATANANUKUL, C.; WANNAPRASAT, W.; KHEMTONG, S.; SAMNGAMNIM, S. Antimicrobial resistance and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from dairy cows. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 63–69, 2010.

CLARK, G.M.; KAUFMANN, A.F.; GANGAROSA, E.J. Epidemiology of an international outbreak of *Salmonella agona*. **Lancet**, **II**, v.7827, p. 490-493, 1973.

CLARKE, R. C.; GYLES, C. L. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; CHARLES, O. T. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**, 2 ed. Ames: Iowa State University, 1993. p. 133-153.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. CLSI document M2-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. CLSI document M2-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa, 2013.

COOK, A.; REID-SMITH, R.; IRWIN, R.; MCEWEN, S.A.; VALDIVIESO-GARCÍA, A.; RIBBLE, C. Antimicrobial resistance in *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* isolated from retail turkey meat from Southern Ontario, Canadá. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 473–481, 2009.

CORDEIRO, N. F.; ROBINO, L.; MEDINA, J.; SEIJA, V.; BADO, I.; GARCIA, V.; BERRO, M.; PONTET, J.; LÓPEZ, L.; BAZET, C.; RIEPPI, G.; GUTKIND, G.; AYALA, J. A.; VIGNOLI, R. Ciprofloxacin-resistant enterobacteria harboring the *aac(6')-Ib-cr* variant isolated from feces of inpatients in na ICU, Uruguay. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 52, p. 806-807, 2008.

CORKILL, J.E.; ANSON, J.J.; HART, C.A. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 1115–1117, 2005.

CORONA, M. S. R.; GRANDA, A. E.; BONACHEA, L. F. H. Resistência antimicrobiana en cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* aisladas en carnes de aves importadas. **Revista de Salud Animal**, La Habana. v. 34, n. 2, p. 120-126, 2012.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C. M. Paratífos em geral. Rio de Janeiro-RJ: **MEDSI**, v.2, p. 167-174, 1992.

CORTEZ, A.L.L.; CARVALHO, A.C.F.B.; IKUNO, A.A. et al. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.73, p.157-163, 2006.

CORVEC, S.; CRÉMETA, L.; REYNAUDA, A.; LEPELLETIERA, D.; CAROFFA, N. Vitek 2 System: a reliable tool to detect *qnr* determinants in *Enterobacteriaceae* without quinolone

resistance-determining region modifications. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.64, n. 4, p. 455-457, 2009.

COSTA, G. A.; HOFER, E. **Isolamento e identificação de enterobactérias. Rio de Janeiro. 1972.** 120p. [Monografia] - Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, 1972.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 a 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.342-346, 2002.

COYEN, S.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 947-993, 2011.

CRUMP, J. A.; MEDALLA, F. M.; JOYCE, K. W.; KRUEGER, A. L.; HOEKSTRA, R. M.; WHICHARD, J. M. Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella* enteric isolates in the United States: national antimicrobial resistance monitoring system, 1996 e 2007. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 55, p. 1148-1154, 2011.

CUI, S.; JINGYUN, L.; ZIYONG, S. Characterization of *Salmonella enterica* isolates from infants and toddlers in Wuhan, China Shenghui. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 87-94, 2009.

D'AOUST, J. Y.; MAURER, J. *Salmonella* species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. **Food Microbiology**. 3.ed. Washington:ASM Press, 2007. cap. 10, p. 187-219.

DE JONG, A.; BYWATER, R.; BUTTY, P.; DEROOVER, E.; GODINHO, K.; KLEIN, C.; MARION, H.; SIMJEE, S.; SMETS, K.; THOMAS, V.; VALLE, M.; WHEADON, A. Pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p.733–744, 2009.

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**, v .47, n. 2, p. 193-197, 2004.

DANMAP 2012, 2013. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. ISSN:1600-2032.

DAVIDSON, R. J.; DAVIS, I.; WILLEY, B. M.; RIZG, K.; BOLOTIN, S.; PORTER, V.; POLSKY, J.; DANEMAN, N.; MCGEER, A.; YANG, P. Antimalarial therapy selection for quinolone resistance among *Escherichia coli* in the absence of quinolone exposure, in tropical South America. **PLoS One**, v. 3; n. 7; p. 2727, 2008.

DOGRU, A.K.; AYAZ, N.D.; GENÇAY, Y.E. Serotype identification and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* spp. isolated from chicken carcasses. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, p. 893–897, 2010.

DOUGHERTY, J. T.; BEAULIEU, D.; BARRETT, J. F. New quinolones and the impact on resistance. **Drug Discovery Today**, v. 6, n. 10, p. 529-536, 2001.

DOYLE, M.P.; CLIVER, D.O. **Salmonella**. In: CLIVER, D.O. (Ed.). Foodborne Diseases. London: Academic Press, 1990. p.185-201.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 61, n. 3, p. 377-392, 1997.

DRLICA, K. Mechanism of fluoroquinolone action. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n.5, p. 504–508, 1999.

EAVES, D. J.; RANDALL, L.; GRAY, D. T.; BUCKLEY, A.; WOODWARD, M. J.; WHITE, A. P.; PIDDOCK, L. J. 2004. Prevalence of mutations within the quinolone resistance determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica*. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.48, p. 4012-4015, 2004.

ECDC-European Centre for Disease Prevention and Control. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network-**Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009**, Stockholm, ECDC, 2010.

EFSA; ECDC- European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. European Medicines Agency & Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. The EFSA Journal, v. 7, n. 11, p. 1372, 2009.

EFSA; ECDC- European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. **Shiga toxin/verotoxin-producing Escherichia coli in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC O104**. Stockholm, ECDC, 2011.

ESCRIBANO, I.; RODRIGUEZ, J. C.; ROYO, G. Mutations in the *gyrA* gene in *Salmonella enterica* clinical isolates with decreased ciprofloxacin susceptibility.**International Journal of Antimicrobial Agents**, v.24, p. 300-303, 2004.

FANG, H.; HUANG, H.; SHI, Y.; HEDIN, G.; NORD, C. E.; ULLBERG, M. Prevalence of *qnr* determinants among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-positive *Enterobacteriaceae* clinical isolates in southern Stockholm, Sweden. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 3, p. 268-270, 2009.

FEASEY N. A., DOUGAN G., KINGSLEY R. A., HEYDERMAN R. S., GORDON M.A. Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. **Lancet**.v. 379, n. 9835, p. 2489–2499, 2012.

FERNANDES, S. A.; GHILARDI, A. C.; TAVECHIO, A. T.; MACHADO, A. M. O.; PIGNATARI, A. C. C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 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, Brasil, 1996-2003. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 48, p. 179-184, 2006.

FERREIRA, E. O, CAMPOS, L.C. Salmonella. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. cap. 43, p. 329-338

FIROOZEH, F.; ZAHRAEI, T.; SHAHCHERAGHI, F.; KARIMI, V.; ASLANI, M.M. Characterization of class I integrons among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from humans and poultry. **FEMS Immunology Medicine of Microbiology**, v. 64. p. 237-243, 2012.

FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M.; NAYAK, R. Salmonella challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 149–162, 2008.

FONSECA E. L.; SANTOS F. F.; VIEIRA V. V. New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholera* O1. **Emergency of Infection Diseases**, v. 14, p. 1129–1131, 2008.

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

FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. Salmonella contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue Scientific technology Off International Epizzootic**, v. 25, n. 2, p. 541-554, 2006.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Editora Artmed., 2002.

FORSYTHE S. J. **Microbiology of Safe Food**. 2 ed. Oxford: Editora Blackwell Publishing Ltd, 2010.

FUKUDA, H.; KISHII, R.; TAKEI, M.; HOSAKA, M. Contributions of the 8-methoxy group of gatifloxacin to resistance selectivity, target preference, and antibacterial activity against *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.45, p. 1649-1653, 2001.

GAGLIOTTI, C.; BALODE, A.; BAQUERO, F.; DEGENER, J.; GRUNDMANN, H.; GUR, D.; JARLIER, V.; KAHLMETER, G.; MONEN, J.; MONNET, D.L.; ROSSOLINI, G.M.; SUETENS, C.; WEIST, K.; HEUER, O. Escherichia coli and Staphylococcus aureus: bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS), 2002 to 2009. **Euro Surveillance: European communicable disease bulletin**, v. 16, n. 11, p. 19819, 2011.

GARCIA-FERNANDEZ, A.; FORTINI, D.; VELDMAN, K.; MEVIUS, D.; CARATTOLIA. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, p. 274-281, 2009.

GAY, K.; ROBICSEK, A.; STRAHILLEVITZ, J.; PARK, C. H.; JACOBY, G.; BARRETT, T. J.; MEDALLA, F.; CHILLER, T. M.; HOOPER, D. C. Plasmid-Mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 3, p. 297-304, 2006.

GEIMBA, M.P.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from foods involved in human foodborne outbreaks that occurred in the south of Brazil, 1999 – 2000. **Jornal of Food Safety**, v.25, p. 173-182, 2005.

GENTRY, A. C.; OSHEROFF, N. DNA topoisomerases: Type II. **Encyclopedia of Biological Chemistry**, p 163–168, Elsevier Inc., Amsterdam, 2013.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. Barueri, SP: Manole. p. 317-323, 2008.

GERNER-SMIDT, P.; WHICHARD, J. M. Foodborne disease trends and reports. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.4, n.1, p. 1-4, 2007.

GIBSON, J.S.; COBBOLD, R.N.; HEISIG, P.; SIDJABAT, H.E.; KYAW-TANNER, M.T.; TROTT, D.J. Identification of Qnr and AAC(6')-1b-cr plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in multidrug-resistant *Enterobacter* spp. isolated from extraintestinal infections in companion animals. **Veterinary Microbiology**, v. 143 n.2-4, p. 329–336, 2010.

GIRAUD, E.; BAUCHERON, S.; CLOECKAERT, A. Resistance to fluoroquinolones in salmonella: Emerging mechanisms and resistance prevention strategies. **Microbes Infection**, v.8, p. 1937-1944, 2006.

GONZÁLES, G.R.; MELLA, S.M; ZEMELMAN, R.Z.; BELLO, H.T.; DOMÍNGUEZ, M.Y. Integrones y cassettes genéticos de Resistência: estructura y rol frente a los antibacterianos. **Revista Médica de Chile**, v.132, n.5, p.619-626, 2004.

GUERIN, P. J.; VOLD, L. A. A.; VILTSLAND P. Communicable disease control in a migrant seasonal workers population: a case study in Norway. **Eurosurveillance**, v. 10, n. 3, p. 48-50, 2005.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p. 77- 87, 2009.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. **Taxonomy of the genus *Salmonella***. In: ***Salmonella in Domestic Animals***. Wray, C. & Wray, A. Editora: CABI Publishing, USA. 2000. p.1-17.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F.X. **Antigenic formulae of *Salmonella* serovars**. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 9<sup>th</sup> edition. France: Institute Pasteur, 2007. 167 p.

HALL, R. M.; BROOKES, D. E.; STOKES, H. W. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. **Molecular Microbiology**, v.5, p.1941-1959, 1991.

HANAGE, W. P.; FRASER, C.; SPRATT, B. G. The impact of homologous recombination on the generation of diversity in bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, Londres, v. 239, p. 210–219, 2006.

HANSEN, L.; JENSEN, L. B.; SORENSEN, H. I.; SORENSEN, S. J. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 145-147, 2007.

HARADA, T.; SAKATA, J.; KANKI, M.; SETO, K.; TAGUCHI, M.; KUMEDA, Y. Molecular epidemiological investigation of a diffuse outbreak caused by *Salmonella* enteric serovar Montevideo isolates in Osaka Prefecture, Japan. **Foodborne Pathogenesis Diseases**, v. 8, p.1535-1541, 2011.

HEEB, S.; FLETCHER, M. P.; CHHABRA, S.; STEPHEN, R.; DIGGLE, P.; WILLIAMS, P.; C'AMARA M. Quinolones: from antibiotics to autoinducers. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 247–274, 2011.

HELMS, M.; ETHELBERG, S.; MOLBAK, K. International *Salmonella* Typhimurium DT104 Infections, 1992–2001. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n. 6, p. 859-867 , 2005.

HENRY, M.; ALIBERT, S.; ORLANDI-PRADINES, E.; BOGREAU, H.; FUSAI, T.; ROGIER, C.; BARBE, J.; PRADINES, B. Chloroquine resistance reversal agents as promising antimalarial drugs. **Current Drugs Targets**, v.7; n. 8; p. 935-948, 2006.

HERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ, M. B.; MARTÍNEZ, J. L. Quinolone resistance. Much more than predicted. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 22, p. 1-6, 2011.

HERRERA-LEÓN, S. GONZÁLEZ-SANZ, R.; HERRERA-LEÓN, L.; ECHEITA, M. A. Characterization of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* carrying plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 2, p. 287-290, 2011.

HERRERO, A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, R.; RODICIO, M. R. Characterization of pUO-StVR2, a virulence-resistance plasmid evolved from the pSLT virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.58, p. 4514-4517, 2009.

HIROSE, K.; HASHIMOTO, A.; TAMURA, K.; KAWAMURA, Y.; EZAKI, T.; SAGARA, H.; WATANABE, H. DNA sequence analysis of DNA gyrase and DNA topoisomerase IV quinolone resistance-determining regions of *Salmonella enteric* serovar Typhi and serovar Paratyphi A. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, p.3249–3252, 2002.

HOOPER, D. C. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Drugs Resistance Update**, v.2, n.1, p. 38-55, 1999.

HOOPER, D. C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Emergency of Infection Diseases**, v.7, p. 337-341, 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**, v. 25, p. 358-373, 2005.

HOPKINS, K. L.; KIRCHNER, M.; GUERRA, B.; GRANIER, S. A.; LUCARELLI, C.; PORRERO, M. C.; JAKUCZAK, A.; THRELFALL, E. J.; MEVIUS, D. J. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4, [5], 12:i:- in Europe: a new pandemic strain? **Eurosurveillance**, Stockholm, v. 15, p. 22, 2010.

HUEHN, S.; LA RAGIONE, R. M.; ANJUM, M.; SAUNDERS, M.; WOODWARD, M. J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R.; HAUSER, E.; GUERRA, B.; BEUTLICH, J.; BRISABOIS, A.; PETERS, T.; SVENSSON, L.; MADAJCZAK, G.; LITRUP, E.; IMRE, A.; HERRERA-LEON, S.; MEVIUS, D.; NEWELL, D. G.; MALORNY B. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enteric* serovars relevant to human health in Europe. **Foodborne pathogenic Diseases**, v. 7, n. 5, p. 523-535, 2010.

HUGHES, C.; GILLESPIE, I. A.; O'BRIEN, S.J. Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Food Control**, v.18, n.7, p. 766-772, 2007.

HUMPHREY, T. J. Public health implications of the infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. **World's Poultry Science Journal**. v. 46, p. 5-13, 1990.

HUMPHREY, T. J. Public-health aspects of *Salmonella* infection. In: **Salmonella in Domestic animals**. Wray, C. & Wray, A. (Eds.). CABI Publishing, New York, USA, 2000. 463p. p.245-263.

HUMPHRIES, R. M.; FANG, F. C.; AARESTRUP, F. M.; HINDLER, J. A. In vitro susceptibility testing of fluoroquinolone activity against *Salmonella*: recent changes to CLSI standards. **Clinical of Infection Diseases**, v.55, p. 1107-1113, 2012.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research Internatinal**, v.45, p. 819-830, 2012.

IKUMAPAYI, U. N.; ANTONIO, M.; SONNE-HANSEN, J.; BINEY, E.; ENWERE, G.; OKOKO, B. Molecular epidemiology of community-acquired invasive non-typhoidal *Salmonella* among children aged 2 and 29 months in rural Gambia and discovery of a new serovar, *Salmonella enteric* Dingiri. **Journal of Medicine Microbiology**, v. 56, p. 1479-1484, 2007.

ISSENHUTH-JEANJEAN S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL, F. Supplement 2008-2010 (n° 48) to the White-kauffmann-Le Minor scheme, **Researche in Microbiology**, v. 161, p. 26-29, 2014.

ISHIDA, Y.; AHMED, A.M.; MAHFOUZ, N.B.; KIMURA, T.; EL-KHODERY, S.A.; MOAWAD, A.A.; SHIMAMOTO, T. Molecular analysis of antimicrobial resistance in Gram negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 6, p. 727-734, 2010.

ITO, C.A.S.; GALES, A.C.; TOGNIM, M.C.B.; MUNERATO, P.; COSTA, L.M.D. quinolone resistant *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 5-9, 2008.

JABEEN, K.; ZAFAR, A.; IRFAN, S.; KHAN, E.; MEHRAJ, V.; HASAN, R. Increase in isolation of extended spectrum beta lactamase producing multidrug resistant non typhoidal Salmonellae in Pakistan. **BMC Infection Diseases**, v. 10, p. 101, 2010.

JACOBY, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clinical and Infection Disease**. v. 41, n. 2, p. 120–126, 2005.

JACOBY, G.; CATTOIR, V.; HOOPER, D.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; NORDMANN, P.; PASCUAL, A.; POIREL, L.; WANG, M. Qnr gene nomenclature. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 52, p. 2297-2299, 2008.

JACOBY, G. A.; GACHARNA N.; BLACK T. A.; MILLER, G.H.; HOOPER, D. C. Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 53, p. 1665-1666, 2009.

JAMISON, D. T. World Bank, Disease Control Priorities Project. **Disease control priorities in developing countries**. 2nd edition. New York Washington, DC: Oxford University Press; World Bank; 2006.

JEONG, H. S.; BAE, K.; SHIN, J. H.; JUNG, H. J.; KIM, S. H.; LEE, J. Y.; OH, S. H.; KIM, H. R.; CHANG, C. L.; KHO, W.-G.; LEE, J.N. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and its association with extended-spectrum beta-lactamase and AmpC betalactamase in *Enterobacteriaceae*. **The Korean Journal of Laboratory Medicine**, v. 31, n. 4, p. 257-264, 2011.

JONES, G.L.; WARREN, R.E.; SKIDMORE, S.J.; DAVIES, V.A.; GIBREEL, T.; UPTON, M. Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended spectrum  $\beta$ -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, n. 6, p. 1245–1251, 2008.

JUNIOR, A.M.P.; BRUNO, D.G.; TIBA, S.; FUJII, R. Uso de Aditivos Antimicrobianos na Alimentação Animal - Controle, Restrição e Tendências. Palestra apresentada durante o AVISULAT, em São Bento, RS, 2010. Disponível em: <<http://www.nftalliance.com.br/uso-de-aditivos-antimicrobianos-na-alimenta-o-animal-controle-restri-o-e-tend-ncias/>> Acesso em: 18 dez de 2013.

KANJ, S.S.; CORKILL, J.E.; KANAFANI, J.A.; ARAJ, G.F.; HART, C.A.; JAAFAR, R.; MATAR, G.M. Molecular characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolates at a tertiary-care centre in Lebanon. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 5, p. 501–504, 2008.

KARAH, N.; POIREL, L.; BENGTSSON, S.; SUNDQVIST, M.; KAHLMETER, G.; NORDMANN, P.; SUNDSFJORD, A.; SAMUELSEN, O. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. From Norway and Sweden. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 66, n. 4, p. 425-431, 2010.

KAUFFMAN – WHITE SCHEME. Antigenic Formulae of the *Salmonella*. WHO BD/72. rev.8, 2004.

KE, B.; SUN, J.; HE, D.; LI, X.; LIANG, Z.; KE, C. Serovar distribution, antimicrobial resistance profiles, and PFGE typing of *Salmonella enterica* strains isolated from 2007–2012 in Guangdong, China. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p.1-10, 2014.

KHEMTONG, S.; CHUANCHUEN, R. Class 1 integrons and *Salmonella* genomic island 1 among *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. **Microbial Drug Resistance**, v.14, p. 65–70, 2008.

KIESSLING, C.R.; CUTTING, J.H.; LOFTIS, M.; KIESSLING, W.M.; DATTA, A.R.; SOFOS, J.N. Antimicrobial resistance of food-related *Salmonella* isolates 1999-2000. **Journal of Food Protection**, v.65, p. 603-608, 2002.

KIM, E.S.; JEONG, J.Y.; CHOI, S.H.; LEE, S.O.; KIM, S.H.; KIM M.N.; WOO, J.H.; KIM, Y.S. Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene, *qepA*, in *Escherichia coli* clinical isolates in Korea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 65, n.3, p. 335-338, 2009a.

KIM, H.B.; WANG, M.; PARK, C.H.; KIM, E. -C.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3582–3584, 2009b.

KIM, S.; KIM, S.H.; KIM, J.; SHIN, J.H.; LEE, B.K.; PARK, M.S. Occurrence and distribution of various genetic structures of class 1 and class 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from foodborne disease patients in Korea for 16 years. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 319–324, 2011.

KIM, J.H.; CHO, J.K.; KIM, K.S. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Salmonella* isolated from poultry in Korea. **Avian Pathology**, v. 42, p. 221–229, 2013.

KINGSLEY, R. A.; MSEFULA, C. L.; THOMSON, N. R.; KARIUKI, S.; HOLT, K. E.; MELITA, A.; GORDON, M. A.; HARRIS, D.; CLARKE, L.; WHITEHEAD, S.; SANGAL, V.; MARSH, K.; ACHTMAN, M.; MOLYNEUX, M. M.; CORMICAN, M.; PARKHILL, J.; MACLENNAN, C. A.; HEYDERMAN, R. S.; DOUGAN, G. Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. **Genome Research**, v. 19, p. 2279-2287, 2009.

KOHANSKI, M.A.; DEPRISTO, M.A.; COLLINS, J.J.; The Fast Track to Multidrug Resistance. **Molecular Cell**, v. 37, p. 311–320, 2010.

KOZODEROVIC, G.; VELHNER, M.; JELESIC, Z.; GOLIC, N.; LOZO, J.; KEHRENBERG, C. Prevalence of quinolone resistance and mutations in the topoisomerase genes in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from Serbia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 455–457, 2012.

KRAULAND, G.M.; MARSH, J.W.; PATERSON, D.L.; HARRISON, L.H. Integron-mediated Multidrug Resistance in a Global Collection of Nontyphoidal *Salmonella enterica* Isolates. **Emergency Infection Diseases**, v.15, n.3, p.388–396, 2009.

KRAULAND, M.; HARRISON, L.; PATERSON, D.; MARSH, J. Novel integron gene cassette arrays identified in a global collection of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella enterica*. **Current Microbiology**, v. 60, p. 217–223, 2010.

KRUGER, T.; SZABO, D.; KEDDY, K. H.; DEELEY, K.; MARSH, J. W.; HUJER, A. M. Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4263-4270, 2004.

KUBLIN, J. G.; CORTESE, J. F.; NJUNJU, E. M.; MUKADAM RA; WIRIMA, J. J.; AZEMBE, P. N.; DJIMDE, A. A.; KOURIBA, B.; TAYLOR, T. E.; PLOWE, C. V. Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. **Journal of Infection Diseases**, v. 187, n.12, p. 1870-1875, 2003.

KUBOTA, K.; IWASAKI, E.; INAGAKI, S.; NOBUKO, T.; SAKURAI, Y.; KOMATSU, M.; TOYOFUKU, H.; KASUGA, F.; ANGULO, F. J.; MORIKAWA, K. The human health burden of food borne infections caused by *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Vibrio parahaemolyticus* in Miyage Prefecture, Japan. **Foodborne Pathogens and diseases**, v.5, n.5, p. 641-648, 2008.

KUMAGAI, Y.; KATO, J. I.; HOSHINO, K.; AKASAKA; SATO, K; IKEDA, H. Quinolone-resistance mutants of *Escherichia coli* DNAtopoisomerase IV *parC* gene. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.40, p. 710-714, 1996.

LAMIKANRA, A.; CROWE, J.L.; LIJEK, R.S.; ODETOYIN, B.W.; WAIN, J.; ABODERIN, A.O.; OKEKE, I.N. Rapid evolution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in Nigeria is temporally associated with fluoroquinolone use. **BMC Infectious Diseases**, v.11, n. 1, p. 312, 2011.

LARKIN, C.; POPPE, C.; MCNAB, B.; MCEWEN, B.; MAHDI, A.; ODOMERU, J. Antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from hog, beef, and chicken carcass samples from provincially inspected abattoirs in Ontario. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 448–455, 2004.

LASTOURS, V.; FANTIN, B. Resistance aux Fluoroquinolones en 2010: quell impact pour la prescription en reanimation? **Réanimation**, v.19, n.4, p. 347-353, 2010.

LAVILLA, S.; GONZALEZ-LOPEZ, J.J.; SABATE, M.; GARCIA-FERNANDEZ, A.; LARROSA, M.N.; BARTOLOME, R.M.; CARATTOLI, A.; PRATS, G. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 291–295, 2008.

LE MINOR, L.; VERÓN, M.; POPOFF, M.Y. Proposition pour une nomenclature des *Salmonella*. **Annual Microbiology**, v. 133, p.245-254, 1982.

LE MINOR, L. Genus III. *Salmonella* Lignières 1900. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.). Williams & Wilkins Co., Baltimore, v.1, 1984. p.427-458.

LE MINOR, L.; POPOFF, M. Y.; LAURENT, B.; HERMANT, D. Individualisation d'une septième sous-espèce de *Salmonella*: *S.choleraesuis* subsp. *Indica* subsp. nov. **Annales de l'Institut Pasteur**, v.137, p. 211-217, 1986.

LEE, H.Y.; SU, L.H.; TSAI, M.H.; KIM, S.W.; CHANG, H.H.; JUNG, S.I.; PARK, K.H.; PERERA, J.; CARLOS, C.; TAN, B.H.; KUMARASINGHE, G.; SO, T.; CHONGTHALEONG, A.; HSUEH, P.R.; LIU, J.W.; SONG, J.H.; CHIU, C.H. High rate of reduced susceptibility to ciprofloxacin and ceftriaxone among nontyphoid *Salmonella* clinical isolates in Asia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 2696–2699, 2009.

LESHER, G. Y.; GRUETT, M. D.; FROELICH, E. J. 1,8-Naphthyridine Derivates- A new class of chemotherapeutic agents. **Journal of Medical Pharmacology Chemosphere**, v. 5, p. 1063, 1962.

LINS, Z.C. Studies on enteric bacteria in the lower Amazon region: I. Serotypes of *Salmonella* isolated from wild forest animals in Pará State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, p. 439-443, 1970.

LINS, Z.C. Studies on enteric bacteria in the lower Amazon region: II. *Salmonella* types isolated from wild reptiles in Pará State, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 2, p.165-169, 1971a.

LIVERMORE, D. M.; HOPE, D. M.; REYNOLDS, R.; BLACKBURN, R.; JOHNSON, A. P.; WOODFORD, N. Declining cephalosporin and fluoroquinolone non-susceptibility among bloodstream Enterobacteriaceae from the UK: links to prescribing change?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v, 13, p. 1-8, 2013.

LIU, J.-H.; DENG, Y.-T; ZENG, Z.-L.; GAO, J.-H.; CHEN, L.; ARAKAWA, Y.; CHEN, Z.-L. Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qepA*, *qnr*, and *aac(6')-Ib-cr* among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2992–2993, 2008.

LIU, W.; ZHU, X. N.; YU, S.; SHI, X. M. Diversity of *Salmonella* isolates using serotyping and multilocus sequence typing. **Food Microbiology**, Londres, v. 28, n. 6, p. 1182-1189, 2011.

LO, N.W.S.; CHU, M.T.; LING, J.M. Increasing quinolone resistance and multidrug resistant isolates among *Salmonella enterica* in Hong Kong. **Journal of Infection**, v. 65, p. 528-540, 2012.

LOUREIRO, E.C.B. Ocorrência do gênero *Salmonella* em animais silvestres da ordem Edentata, na região Amazônica, norte do Estado do Pará, Brasil. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 27, p. 31-34, 1985.

LUZZARO, F. Fluoroquinoloni e gram-negativi: differenze di attività e nuove evidenze sui meccanismi di resistenza. **Le Infezioni in Medicina**, v. 16, n.2, p. 5-11, 2008.

MA, J.; ZENG, Z.; CHEN, Z.; XU, X.; WANG, X.; DENG, Y.; LÜ, D.; HUANG, L.; ZHANG, Y.; LIU, J.; WANG, M. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 519–524, 2009.

MARIMON, J. M.; GOMARIZ, M.; ZIGORRAGA, C.; CILLA, G.; PEREZ-TRALLERO, E. Increasing prevalence of quinolone resistance in human nontyphoid salmonella enterica isolates obtained in Spain from 1981 to 2003. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 48, p. 3789-3793, 2004.

MARTÍNEZ, E.V.; VARELA, M.C.; CEVALLOS, C.; HERNÁNDEZ-PEZZI, G.; TORRES, A.; ORDÓÑEZ, P. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2004–2007 (excluye brotes hídricos). **Boletín Epidemiológico Semanal**, v. 16, p. 241–252, 2008.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; GARCIA, I.; BALLESTA, S.; BENEDI, V. J.; HERNANDEZ-ALLES, S.; PASCUAL, A. Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *klebsiella pneumoniae* strains. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.42, p. 1850-1852, 1998.

MCEWEN, S.A.; FEDORKA-CRAY, P.J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical of Infection Diseases**, v.34, p. 93-106, 2002.

MEAKINS, S.; FISHER, I. S. T.; BERGHOLD, C.; GERNER-SMIDT, P.; TSCHAPE, H.; CORMICAN, M. Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal Salmonella isolates in Europe 2000e2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network. **Microbial Drugs Resistance**, v.14, n. 1, p. 31-35, 2008.

MERCHANT, L. A.; PARCKER, R. A. Bacteriologia e Virologia Veterinária. Zaragoza. **Acribia**, v.3, p. 299-322, 1980.

MÉRENS, A.; SERVONNET, A. Mécanismes et épidémiologie de La résistance aux fluorquinolones em 2010. **IREvue Francophone des Laboratoires**, v. 422, p. 33-41, 2010.

MATHEW, A.G.; LIAMTHONG, S.; LIN, J.; HONG, Y. Evidence of class 1 integron transfer between *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. on livestock farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, p. 959–964, 2009.

MICHAEL, G. B.; BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes Infection**, v.8, p. 1898-1914, 2006.

MINARINI, L. A.; POIREL, L.; CATTOIR, V.; DARINI, A. L.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 474-478, 2008.

MONEDERO, I.; CAMINERO, J. A. MDR-/XDR-TB management: what it was, current standards and what is ahead. **Expert Review Respiratory Medicine**, v. 3, n. 2, p. 133-145, 2009.

MORGAN-LINNELL, S.K.; BOYD, L.B.; STEFFEN, D.; ZECHIEDRICH, L. Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 235–241, 2009.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MUCH, P.; PICHLER, J.; KASPER, S.S.; ALLERBERGER, F. Foodborne outbreaks, Austria 2007. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 121, n.3/4, p. 77-85, 2009.

MUNRO, D.S.; GIRWOOD, R.W.A.; REILLY, W.J. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Scotland. In: SAEED, A. M. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals – epidemiology, pathogenesis and control. 1.ed. Ames: Iowa State University Press, p. 27-31, 1999.

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**, v. 32, n. 1, p. 47-51, 2004.

NAGHONI, A.; RANJBAR, R.; TABARAIE, B.; FARSHAD, S.; OWLIA, P.; SAFIRI, Z.; MAMMINA, C. High prevalence of integron-mediated resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica*. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 63, p. 417–421, 2010.

NAMBOODIRI, S.S.; OPINTAN, J.A.; LIJEK, R.S.; NEWMAN, M.J.; OKEKE, I.N. Quinolone resistance in *Escherichia coli* from Accra, Ghana. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 1-9, 2011.

NARMS (NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING SYSTEM), **Antimicrobial Tested, Concentration Ranges and Breakpoints**. Disponível em: <<http://ars.usda.gov/main/docs.htm.docid=6750&page3>> Acesso em: 25 de setembro de 2013.

NASIK, H.; BEKTÖRE, B.; ÖNGEN, B.; ILKTAÇ, M.; ÖZYURT, M.; KUVAT, N.; BAYLAN, O.; KEKÜLLÜOĞLU, H.; HAZNEDAROĞLU, T.; KELESOĞLU, F.M. Plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* urinary isolates from two teaching hospitals in Turkey: coexistence of TEM, SHV, CTX-M and VEB-1 Type  $\beta$ -lactamases. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 3, p. 325-334, 2011.

NELSON M. L. Modulation of Antibiotic Efflux in Bacteria. **Current Medical Chem-Anti-Infective Agents**, v. 1, p. 35-54, 2002.

NYACHUBA, D. G. foodborne illness: is it on the rise? **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 5, p. 257-269, 2010.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 463-469, 2005.

NORDMANN, P.; MAMMERI, H. Resistance plasmidique aux quinolones. **Microbiologie**, v. 9, p. 246-253, 2007.

OIE/WHO. Organization International des Epizooties (World Organization for Animal Health. **Foodborne disease: World Health Organization, and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012.** Disponível em: <[http://www.who.int/foodborne\\_disease/resistance/en/index.html](http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/en/index.html)>. Acesso em: 12 junho 2013.

OLIVEIRA, F.A. **Caracterização por susceptibilidade a antimicrobianos, PCR-Ribotipificação e RAPD de *Salmonella* Enteritidis envolvidas em surtos de doenças veiculadas por alimentos ocorridas no Rio Grande do Sul, nos anos de 2001 e 2002.** 2005. 85 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

OLSEN, S. J.; BISHOP, R.; BRENNER, F. W.; ROELS, T. H.; BEAN, N.; TAUXE, R. V.; SLUTSKER, L. The Changing Epidemiology of *Salmonella*: Trends in Serotypes Isolates from Human in the States, 1987-1997. **Journal of Infection Diseases**, v.183, p.753-761, 2001.

ORMAN, B.E.; PIÑEIRO, S.A.; ARDUINO, S.; GALAS, M.; MELANO, R.; CAFFER, M.I.; SORDELLI, D.O.; CENTRÓN, D. Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.46, n.12, p. 3963- 3970, 2002.

PALERMO NETO, J.; ALMEIDA, R. T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção . In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária** , 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara KOOGAN, 2006. P. 640-658.

PALLECCHI, L.; RICCOBONO, E.; MANTELLA, A.; BARTALESI, F.; SENNATI, S.; GAMBOA, H.; GOTUZZO, E.; BARTOLONI, A.; ROSSOLINI, G.M. High prevalence of *qnr* genes in commensal enterobacteria from healthy children in Peru and Bolivia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2632–2635, 2009.

PALLO-ZIMMERMAN, L.M.; BYREN, J. K.; GRAVES, T. K. Fluoroquinolones: Then and now. Compendium: **Continuing Education for Veterinarian**, Vetlearn.com. CE articles, 2010.

PALOMO, G.; CAMPOS, M.J.; UGARTE, M.; PORRERO, M.C.; ALONSO, J.M.; BORGE, C.; VADILLO, S.; DOMINGUEZ, L.; QUESADA, A.; PIRIZ, S. Dissemination of antimicrobial-resistant clones of *Salmonella enterica* among domestic animals, wild animals, and humans. **Foodborne Pathogen Diseases**, v. 10, p. 171– 176, 2013.

PARK, C. H.; ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A.; SAHM, D.; HOOPER, D. C. Prevalence of *aac(6′)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 3953-3955, 2006.

PARRY, C. M.; VINH, H.; CHINH, N. T.; WAIN, J.; CAMPBELL, J. I.; HIEN, T. T.; FARRAR, J. J.; BAKER, S. The influence of reduced susceptibility to fluoroquinolones in



*Salmonella enteric* serovar Typhi on the clinical response to ofloxacin therapy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 5, n.6, p. e1163. 2011.

PARTRIDGE, S. R.; TSAFNAT, G.; COIERA E.; IREDELL, J. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. **FEMS Microbiology Review**, v. 33, p. 757–784, 2009.

PARVEEN, S.; TAABODI, M.; SCHWARZ, J.G.; OSCAR, T.P.; HARTE-DENNIS, J.; WHITE, D.G. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from processed poultry. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 2466–2472, 2007.

PEIRANO, G.; AGERSO, Y.; AARESTRUP, F.M.; DOS REIS, E.M.; RODRIGUES, D.P. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brasil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, n. 2, p. 305-309, 2006.

PEREIRA, A. S.; ANDRADE, S. S.; MONTEIRO, J.; SADER, H. S.; PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C. Evaluation of Susceptibility profiles, genetic similarity and presence of *qnr* gene in *Escherichia coli* resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.11, p. 40-43, 2007.

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. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 477-483, 1998.

PÉRICHON, B.; COURVALIN, P.; GALIMAND, M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S Rna *qnr* to hydrophilic fluoroquinolones by *qepA*-mediated efflux in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n. 7, p. 2464-2469, 2007.

PHILLIPS, I. M.; CASEWELL, T.; COX, B.; DE GROOT, C.; FRIIS, R.; JONES, C.; NIGHTINGALE, R.; PRESTON, J.; WADDELL. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 28-52, 2004.

PITOUT, J.D.D.; WEI, Y.; CHURCH, D.L.; GREGSON, D.B. Surveillance for plasmid mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of *aac(6')-Ib-cr*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 999–1002, 2008.

PLYM-FORSHELL, L.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue Scientifique et Technique**. v. 25, p. 541–554, 2006.

POVILONIS, J.; SEPUTIENE, V.; RUZAUSKAS, M.; SIUGZDINIENE, R.; VIRGAILIS, M.; PAVILONIS, A.; SUZIEDELIENE, E. Transferable class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates of human and animal origin in Lithuania. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 1185–1192, 2010.

POPOFF, M.Y. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars**. 8<sup>th</sup> edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France. 2001. 146p.

POPOFF, M.Y., BOCKEMÜHL, J., GHEESLING, L.L. Supplement 2002 (n° 46) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 568-570, 2004.

QUIROGA, P.; ANDRES, P.; PETRONI, A.; SOLER-BISTUE, A.; GUERRIERO, L.; JORDA VARGAS, L.; ZORREGUIETA, A.; TOKUMOTO, M.; QUIROGA, C.; TOLMASKY, M.; GALAS, M.; CENTROM, D. Complex class 1 integrons with diverse variable regions including *aac(6')-Ib-cr* and a novel allele *qnrB10* associated to ISCR1 in clinical *Enterobacteria* from Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 4466-4470, 2007.

RABSCH, W.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R.M.; KINGSLEY, R.A.; HINZ, K.-H.; TSCHÄPE, H.; BÄUMLER, A.J. Competitive exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella Gallinarum* in poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, p. 443-448, 2000.

RAN, L.; WU, S.; GAO, Y.; ZHANG, X.; FENG, Z.; WANG, Z. Laboratory-based surveillance of nontyphoidal *Salmonella* infections in China. **Foodborne Pathogen Diseases**, v. 8, n. 8, p. 921-927, 2011.

RECCHIA, G. D., STOKES, H. W., HALL, R. M. Characterization of specific and secondary recombination sites recognized by the integron DNA integrase. **Nucleic Acids Res.** v. 22, p. 2071-2078, 1994.

REDGRAVE, L. S.; SUTTON, S. B.; WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends in Microbiology**, v. 12, p. 1-8, 2014.

REIS, E.M.F. **Análise de marcadores epidemiológicos de *Salmonella* Enteritidis oriundos de diferentes fontes de infecção e de regiões do país**. 1994. 84p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, 1994.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; FITTÉL, A. P.; NASCIMENTO, V.P.L. Resistência Antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo. v. 73, p. 357-360, 2006.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolated. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 296-299, 2007.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1259-1262, 2008.

ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 629-640, 2006a.

ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; SAHM, D.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2872–2874, 2006b.

RODRIGUES, D. P. **Reporte de la Vigilancia de La resistencia antimicrobiana de aislados de Salmonella, Shigella y Vibrio cholerae**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Oswaldo Cruz, 2001. Disponível em: <<http://www.paho.org/spanish/hcp/hct/arm-resultados-bra.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2012.

RODRIGUES, D.P.; REIS, E.M.F.; ARAUJO, M.S.; MARQUES, G.C.M.; GOMES, E.D.T.; SANTOS, A.F.M; SILVA, E.O.; SILVA, G.A.; COSTA, R.G.; FESTIVO, M.L.. PEREIRA, C.S; LAZARO, N.S.; BERTO, L.H. Laboratory based surveillance of *Salmonella* spp. isolated in Brazil from 2000-2009 National Reference Laboratory for Enteric Disease – Oswaldo Cruz Institute-FIOCRUZ. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM SALMONELLA AND SALMONELLOSIS**, Saint Malo, France, Proceedings. 2010.p. 377-378.

RODRIGUEZ-AVIAL, I. C.; RODRIGUEZ-AVIAL, O.; LOPEZ, J. ; PICAZO, J. Trends in nalidixic acid resistance in nontyphoidal *Salmonella* isolated from 1999 to 2002: decreased susceptibility to 6 fluoroquinolones. **Diagnostic Microbiology Infection Diseases**, v. 52, p. 261-264, 2005.

RODRIGUEZ, I.; MARTIN, M.C.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Class 1 and class 2 integrons in non-prevalent serovars of *Salmonella enterica*: structure and association with transposons and plasmids. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, V.58, p. 1124–1132, 2006.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J.M.; BRIALES, A.; VELASCO, C.; CONEJO, M.C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL A. Mutational analysis of quinolone resistance in the plasmid-encoded pentapeptide repeat proteins QnrA, QnrB and QnrS. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 6, p. 1128-1134, 2009.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J.M.; BRIALES, A.; VELASCO, C.; DE ALBA, P.D.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A. Discrepancies in fluoroquinolones clinical categories between the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and CLSI for *Escherichia coli* harbouring *qnr* genes and mutations in *gyrA* and *parC*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 6, p. 1405-1407, 2011a.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J.M.; CANO, M.E.; VELASCO, C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PACUAL, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.17, n. 2, p. 149-182, 2011b.

RUSHDY, A.A.; MABROUK, M.I.; ABU-SEF, F.A.-H.; KHEIRALLA, Z.H.; ALL, S.M.A.; SALEH, N.M. Contribution of different mechanisms to the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Salmonella enterica*. **Brazilian Journal Infection Diseases**, v.17, p. 431–437, 2013.

RUIZ, J.; PONS M. J.; GOMES, C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 196– 203, 2012.

SÁ, J. M.; TWU, O.; HAYTON, K.; REYES, S.; FAY, M. P.; RINGWALD, P.; WELLEMS, T. E. Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 45, p. 18883-18889, 2009.

SADER, H. Quinolonas: avanços e conquistas clinicamente relevantes. **Jornal Quinolonas**, 1999. Disponível em: <<http://www.bristol.com.br/medicos/infocientifica/0/jornalquinolonas1.pdf>>. Acesso em: 1 agosto 2013.

SAN MARTIN, B.; LAPIERRE, L.; CORNEJO, J.; BUCAREY, S. Characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and 2 integrons in strains of *Salmonella* spp. Isolated from swine. **Canadian Journal of Microbiology**, v.54, p. 569–576, 2008.

SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J.; VILA, J. Partial characterisation of the *acrAB* locus in two *Citrobacter freundii* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.30, n. 3, p. 259-263, 2007.

SANDERS, C. C. Mechanisms Responsible for Cross-Resistance and Dichotomous Resistance among the Quinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n.1, p. 51-58, 2001.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, S.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília. v. 20, p. 39-42, 2000.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; FLORES, M. L.; ROSEK H.; D'ANDREA A.; ALBUQUERQUE M.C.; RAMPANELLI Y.; MACHADO N.P.; RIOS S.; FERNANDES S.A. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clinicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**. v. 16, p. 93-99, 2002.

SARWARI, A.R.; MAGDER, L.S.; LEVINE, P.; MCNAMARA, A.M.; KNOWER, S.; ARMSTRONG, G.L.; ETZEL, R.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS, J.G. Serotype distribution of *Salmonella* isolates from food animals after slaughter differs from that of isolates found in humans. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 1295–1299, 2001.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON M-A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States: major pathogens. **Emergency of Infection Diseases**, v. 17, p. 7-15, 2011.

SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. R. I. Sobrevivência e perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* spp. isoladas em sistema de tratamento de dejetos de suínos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 881-888, 2003.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A.P.; GAASTRA, W. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 601-604, 2010.

SHIN, J.H.; JUNG, H.J.; LEE, J.Y.; KIM, H.R.; LEE, J.N.; CHANG, C.L. High rates of plasmid-mediated quinolone resistance *qnrB* variants among ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* from urinary tract infections in Korea. **Microbiology Drug Resistance**, v. 14, n. 3, p. 221–226, 2008.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-sanitário em Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1995.

SILVA, P.P. Quinolonas, In P.P. Silva, **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 1085-1091, 2002.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis in poultry: retrospective in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 4, p. 85-100, 2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. Salmonella. In: **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. cap. 19, p. 253-285.

SILVA-SANCHEZ, J.; CRUZ-TRUJILLO, E.; BARRIOS, H.; REYNA-FLORES, F.; SÁNCHEZ-PÉREZ, A. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae pediatric clinical isolates in Mexico. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1-10, 2013.

SINGH, R.; SWICK, M. C.; LEDESMA, K. R.; YANG, Z.; HU, M.; ZECHIEDRICH, L.; TAM, V. H. Temporal interplay between efflux pumps and target mutations in development of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 56, p. 1680– 1685, 2012.

SJOLUND-KARLSSON, M.; HOWIE, R.; RICKERT, R.; KRUEGER, A.; TRAN, T.T.; ZHAO, S.; BALL, T.; HARO, J.; PECIC, G.; JOYCE, K.; FEDORKA-CRAY, P.J.; WHICHARD, J.M.; MCDERMOTT, P.F. Plasmid mediated quinolone resistance among non-Typhi *Salmonella enterica* isolates, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 1789–1791, 2010.

SKERMAN, V.B.D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A. Approved list of bacterial names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 30, p. 225-420, 1980.

SNOEYENBOS G.H.; WILLIAMS J.E. **Salmonellosis**, p. 73-86. In: B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid & H.W. Yoder (ed.) *Diseases of Poultry*. 9th ed. Iowa State University Press, Ames. 1991.

SOLARI, C.A.; REIS, E.M.; DIAS, J.C.; HOFER, E. Resistência antimicrobiana de *Salmonella agona* oriundas de várias regiões do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 81, p. 7-14, 1986.

SOLER, P.; GONZALEZ-SANZ, R.; BLEDA, M. J.; HERNANDEZ, G.; ECHEITA, A.; USERA, M. A. Antimicrobial resistance in non-typhoidal *Salmonella* from human sources, Spain, 2001 e 2003. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p. 310-314, 2006.

SOTO, S. M.; GONZALEZ-HEVIA, M. A.; MENDOZA, M. C. Antimicrobial resistance in clinical isolates of salmonella enterica serotype enteritidis: Relationships between mutations conferring quinolone resistance, integrons, plasmids and genetic types. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1287-1291, 2003.

SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A.; ALMEIDA, M. V. D.; CARDOSO, S. H. Fluoroquinolones: An Important Class of Antibiotics Against Tuberculosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 455-463, 2006.

SOUZA, R. B.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA T. C. M. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. **Ciências Agrárias, Londrina**, v. 31, n. 2, p. 413-428, 2010.

SPILIOPOULOU, I.; ZOGRAFOU, S.; GOULA, A.; DIMITRACOPOULOS, G.; CHRISTOFIDOU, M. Molecular epidemiology and antibiotic resistance patterns of *Salmonella enterica* from outhwestern Greece. **Chemotherapy**, v.53, p.392-396, 2007.

STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C.; ROBICSEK, A. Plasmid- mediated quinolone resistance: a multifaceted theat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n.4, p. 664-689, 2009.

SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE). **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp.** Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolpho Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 60p.

SZABÓ, D.; KOCSIS, B.; RÓKUSZ, L.; SZENTANDRÁSSY, J.; KATONA, K.; KRISTÓF, K. First detection of plasmid-medated, quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, *qmrS* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in Budapest, Hungary. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 630-632, 2008.

TAGUCHI, M.; KAWAHARA, R.; SETO, K.; INOUE, K.; HAYASHI, A.; YAMAGATA, N.; KAMAKURA, K.; KASHIWAGI, E. Plasmid-mediated quinolone resistance in salmonella isolated from patients with overseas travelers' diarrhea in japan. **Jpn Journal Infection Diseases**, v.62, p. 312-314, 2009.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 31 – 41, 2002.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1996.

TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C. R.; PERESI, J. T. M.; FUZIHARA, T. O.; YONAMINE, E. K.; JAKABI, M.; FERNANDEZ, S. A. *Salmonella* serotypes isolated from nohuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 65, p. 1041-1044, 2002.

TEO, J.W.; NG, K.Y.; LIN, R.T. Detection and genetic characterization of *qnrB* in hospital isolates of *Klebsiella pneumonia* in Singapore. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 2, p. 177–180, 2009.

TESSMANN, C.; ZOCHE, F.; LIMA, A. S.; BASSANI, M.; LOPES, G. V.; SILVA, P. Ocorrência e Perfil de sensibilidade a antibióticos de *Salmonella* spp. isolada em cortes de carne suína comercializados em feiras livres de Pelotas (RS). **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 26, n.2, p. 307-313, 2008.

THAI, T. H.; HIRAJ, T.; NGUYEN, T. L.; YAMAGUCHI, R. Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serovars isolated from retail pork and chicken meat in North Vietnam. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 147-151.

THONG, K. L.; MODARRESSI, S. Antimicrobial resistant genes associated with *Salmonella* from retail meats and street foods. **Food Resistance International**, v. 44, p. 2641-2646, 2011.

TRAN, J. H.; JACOBY, A. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. **PNAS**, v. 99, p. 5638-5642, 2002.

TRETTNER, E. M.; BERGER, J. M. Mechanisms for defining supercoiling set point of DNA gyrase orthologs: I. A nonconserved acidic C-terminal tail modulates *Escherichia coli* gyrase activity. **Journal of Biology Chemistry**, v. 287, p. 18636–18644, 2012.

XIA, L.N.; LI, L.; WU, C.M.; TAO, X.Q.; QI, Y.H.; LU, L.M.; SHEN, J.Z. A survey of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes from *Escherichia coli* isolates and their dissemination in Shandong, China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 2, p. 207-215, 2010.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrência/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p.1139-1145, 2006.

VASILAKI, O.; NTOKOU, E.; IKONOMIDIS, A.; SOFIANOU, D.; FRANTZIDOU, F.; ALEXIOU-DANIEL, S.; MANIATIS, A.N.; POURNARAS, S. Emergence of the plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* in *Escherichia coli* isolates in Greece. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2996-2997, 2008.

VAZ, C.S.L.; STRECK, A. F.; MICHAEL, G.B.; MARKS, F.S.; RODRIGUES, D.P.; DOS REIS, E.M.; CARDOSO, M.R.; CANAL, C.W. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis from human outbreaks and poultry in southern Brazil. **Poultry Science**, v.89, p. 1530-1536, 2010.

VELASCO, L.; SOBRINO, L.; GARCÍA, M.; SOLER, P.; MARTÍNEZ, L. Infecciones por *Salmonella* no tifoidea de origen humano en España. Sistema de Información Microbiológica. Años 2000–2008. **Boletín Epidemiológico Semanal**, v. 17, n. 193–204, 2009.

VELDMAN, K.; VAN PELT, W.; MEVIUS, D. First report of *qnr* genes in salmonella in the Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, p. 452-453, 2008.

VELGE, P.; CLOECKAERT A.; BARROW, P. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Veterinary Research**, v. 36, p. 267-288, 2005.

VETTING, M.W.; HEGDE, S.S.; WANG, M.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C.; BLANCHARD, J.S. Structure of *qnrB1*, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 28, p. 25265-25273, 2011.

VILA, J.; SANCHEZ-CÉSPEDez, J.; SIERRA, J. M.; PIQUERAS, M.; NICOLAS, E.; FREIXAS, J.; GIRALT, E. Sistemes d'expulsió activa i llur relació amb la Resistència als agents antibacterians. **Antmicrobians**, v. 55, p. 49-60, 2004.

VO, A.T.; VAN DUIJKEREN, E.; GAASTRA, W.; FLUIT, A.C. Antimicrobial resistance, class 1 integrons, and genomic island 1 in *Salmonella* isolates from Vietnam. **PLoS One**, v. 5, p.9440, 2010.

VON GOTTBURG, A.; KLUGMAN, K. P.; COHEN, C.; WOLTER, N.; DE GOUVEIA, L.; DU PLESSIS, M.; MPEMBE, R.; QUAN, V.; WHITELAW, A.; HOFFMANN, R. Emergence of levofloxacin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* and treatment for multidrug-resistant tuberculosis in children in South Africa: a cohort observational surveillance study. **The Lancet**, v. 371, n. 9618, p. 1108-1113, 2008.

YAMANE, K.; WACHINO, J.; SUZUKI, S.; KIMURA, K.; SHIBATA, N.; KATO, H.; SHIBAYAMA, K.; KONDA, T.; ARAKAWA, Y. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* Clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 3354-3360, 2007.

YAMANE, K.; WACHINO, J.; SUZUKI, S.; ARAKAWA, Y. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1564-1566, 2008.

YILDIRIM, Y.; GONULALAN, Z.; PAMUK, S.; ERTAS, N. Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. on raw chicken carcasses. **Food Research International**, v. 44, p.725-728, 2011.

WANNAPRASAT, W.; PADUNGTOD, P.; CHUANHUEN, R. Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 457-461, 2011.

WANG, M.; TRAN, J.H.; JACOBY, G.A.; ZHANG, Y.; WANG, F.; HOOPER, D.C. Plasmid mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 7, p. 2242-2248, 2003.

WANG, M.; SAHM, D.F.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1295-1299, 2004.

WANG, M.; GUO, Q.; XU, X.; WANG, X.; YE, X.; WU, S.; HOOPER, D. C. New



plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.53, p. 1892-1897, 2009.

WANG, Y. C.; CHANG, Y. C.; CHUANG, H. L.; CHIU, C. C.; YEH, K. S.; CHANG, C. C.; HSUAN, S. L.; CHEN, T. H. Antibiotic resistance, integrons and *Salmonella* genomic island 1 among *Salmonella* Schwarzengrund in broiler chicken and pig. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 9, p. 677-681, 2010.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p. 9-11, 2003.

WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n.1, p. 44-48, 2010.

WELLEMS, T. E.; PLOWE, C. V. Chloroquine-resistant malaria. **Journal of Infection Diseases**, v. 184, n. 6, p. 770-776, 2001.

World Organisation for Animal Health. **OIE International Standards on Antimicrobial Resistance**. Paris: OIE, 2003.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION Critically important antibacterial agents for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to nonhuman use. Report of the second WHO Expert Meeting, Copenhagen, 29–31, 2007. Geneva: WHO, 2007. Disponível em <[http://www.who.int/foodborne\\_disease/resistance/antimicrobials\\_human.pdf](http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf). > Acessado em dezembro 2013.

World Health Organization Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine**. Switzerland: WHO, 2009.

WU, J.-J.; KO, W.-C.; TSAI, S.-H.; YAN, J.-J. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1223–1227, 2007.

WU, J.J.; KO, W.C.; WU, H.M.; YAN, J.J. Prevalence of *qnr* determinants among bloodstream isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a Taiwanese hospital, 1999–2005. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1234–1239, 2008a.

WU, J.J.; KO, W.C.; WU, H.M.; YAN, J.J. Prevalence of *qnr* determinants among bloodstream isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a Taiwanese hospital, 1999–2005. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1234–1239, 2008b.

XIA, L. N.; LI, L.; WU, C. M.; LIU, Y. Q.; TAO, X. Q.; DAI, L. A survey of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes from *Escherichia coli* isolates and their dissemination in Shandong, China. **Foodborne Pathogenic Diseases**, v. 7, p. 207–215, 2010.

XIONG, X.; BROMLEY, E. H.; OELSCHLAEGER, P.; WOOLFSON, D. N.; SPENCER, J. Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: Conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a Gram-negative bacterium. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 3917–3927, 2011.

ZHAO, X.; XU, X.; ZHU, D.; YE, X.; WANG, M. Decreased quinolone susceptibility in high percentage of *Enterobacter cloacae* clinical isolates caused only by *qnr* determinants. **Diagnostic of Microbiology Infection Diseases**, v. 67, p. 110-113, 2010.

ZHOU, T-L.; CHEN, X-J.; ZHOU, M-M.; ZHAO, Y-J.; LUO, X-H.; BAO, Q-Y. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates in Wenzhou, Southern China, 2002-2008. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 64, n. 1, p. 55-57, 2011.

## ANEXO

<b>NºIOC/ANO</b>	<b>Região</b>	<b>Fonte de isolamento</b>	<b>Fonte</b>	<b>Resultado</b>	<b>Sorovar</b>
05/12	PR	CMS	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Heidelberg
16/12	PR	Suíno (Miúdo congelado língua)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Brandenburg
19/12	PR	Suíno (Barriga congelada)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Heidelberg
43/12	PR	Suíno (Orelha)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
63/12	PR	CMS	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Hadar
129/12	PR	Suíno (Carne salgada-Costela)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
320/12	PR	Swab Arrasto	AB	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
350/12	PR	Swab Arrasto	AB	<i>Salmonella</i> ser.	Infantis
357/12	PR	Swab Arrasto	AB	<i>Salmonella</i> ser.	Montevideo
431/12	RS	Sangue	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
434/12	RS	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
456/12	MT	Suíno (Carne congelada)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
591/12	MT	Suíno (Carne)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
638/12	MS	Fezes (Surto)	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
644/12	RS	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
648/12	ES	Humano	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
655/12	ES	Humano	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
666/12	PR	Suíno (Envoltórios naturais tripa semi cozida)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Bredeney
667/12	PR	CMS	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
691/12	PR	BACON	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Tennessee
711/12	PR	Suíno (Corte barriga congelada)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
736/12	SP	Suíno (Linguiça frescal)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Bredeney
744/12	RS	Fezes	HU	<i>Salmonella</i>	Typhimurium

				ser.	
747/12	RS	Carne assada	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
777/12	RS	Isolado Bacteriano	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
778/12	RS	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
779/12	RS	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
780/12	RS	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
781/12	RS	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
795/12	BA	Hemocultura	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
796/12	BA	Hemocultura	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
797/12	BA	Hemocultura	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
830/12	RS	Secreção Ferida	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Give
833/12	RS	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
916/12	RS	S. Arrasto	AB	<i>Salmonella</i> ser.	Corvallis
917/12	RS	S. Arrasto	AB	<i>Salmonella</i> ser.	Corvallis
994/12	RS	Fezes (Humana)	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
1075/12	SP	Potro	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Saintpaul
1076/12	SP	Potro	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Saintpaul
1099/12	RS	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
1120/12	RS	Swab Arrasto Ambiente (Matriz)	AB	<i>Salmonella</i> ser.	Orion
1173/12	PR	Aves (CMS)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Livingstone
1188/12	PR	Bovino (Carne)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Panama
1192/12	PR	Frango (Corte resfriado)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Muenchen
1212/12	PR	Matriz (CMS)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Livingstone
1310/12	PR	Frango (Carcaça resfriada)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
1326/12	PR	-	AB	<i>Salmonella</i> ser.	Montevideo
1615/12	MG	Músculo Paleta	AL	<i>Salmonella</i>	Typhimurium

				ser.	
1618/12	MG	Sobrepaleta	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
1622/12	MG	Recorte paleta	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
1690/12	GO	Aves (Ambiente)	AB	<i>Salmonella</i> ser.	Rissen
2120/12	PR	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Muenchen
2126/12	PR	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Panama
2128/12	PR	Secreção	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Muenchen
2130/12	PR	Sangue	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
2178/12	SC	Suíno (Corte)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
2179/12	SC	Suíno (Corte)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
2263/12	SC	Chifonnette (Sup. Carcaça)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
2316/12	SC	CMS	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
2629/12	SP	Suíno	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
3307/12	RS	Urina	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
3309/12	RS	Urina	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
3567/12	MA	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Saintpaul
3867/12	RS	Órgãos	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
3917/12	RS	Galinha (Baço)	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
4379/12	RS	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
5315/12	MG	Swab	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
5316/12	MG	Swab	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
5318/12	MG	Swab	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
5906/12	SC	Fezes (Surto)	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
5968/12	RS	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
5970/12	RS	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
5971/12	RS	-	HU	<i>Salmonella</i>	Typhimurium

5972/12	RS	-	HU	ser. <i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
5973/12	RS	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
5974/12	RS	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
5976/12	RS	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
5977/12	RS	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
6092/12	SE	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
6333/12	RS	Urina	HU	<i>Salmonella</i> ser.	enterica subsp. Enterica
6744/12	BA	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
6745/12	BA	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
6754/12	BA	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Infantis
6761/12	BA	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
6821/12	RS	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
6822/12	RS	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
6826/12	RS	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
6827/12	RS	Sangue	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
6952/12	MG	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
6958/12	MG	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
6976/12	RS	Órgãos	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
6978/12	RS	Órgãos	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
55/13	SC	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
56/13	SC	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
63/13	SC	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
64/13	SC	Sangue Frango	HU	<i>Salmonella</i> ser.	enterica subsp. Enterica (O:4,5:i:-)
86/13	RS		AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum

134/13	RS	Frango	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Enteritidis
302/13	RS	Frango	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
672/13	RS	Frango	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
1198/13	RS	Frango	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
1939/13	RS	Frango	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
1940/13	RS	Frango	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
1953/13	GO	Frango	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
1956/13	GO	Frango	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
1964/13	GO	Frango	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
1971/13		Frango	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
1972/13		Frango	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
1973/13		Frango	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
596/11	SC	Ambiente	AB	<i>Salmonella</i> ser.	Agona
851/11	SC	Aves	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Muenchen
1979/11	MT	Frango	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Mbandaka
2335/11	RS	Órgãos	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
2336/11	RS	Órgãos	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
2343/11	RS	Órgãos	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
2408/11	RS	Órgãos	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
2490/11	RS	Isolado Bacteriano	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
6045/11	MG	Aves	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
6046/11	MG	Aves	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Gallinarum
6161/11	MT	Suíno (Carne)	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
6627/11	RS	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
11394/11	SC		AB	<i>Salmonella</i> ser.	Heidelberg

12362/11	RS	Fezes	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
12660/11	RS	Fezes (Frescas)	AN	<i>Salmonella</i> ser.	Orion
12720/11	SC	-	AB	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
12722/11	SC	-	AB	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
13873/11	MA	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
13874/11	MA	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
14119/11	SC	-	AL	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
17242/11	RS	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
19723/11	RS	-	AN	<i>Salmonella</i> ser.	gallinarum
19754/11	GO	-	HU	<i>Salmonella</i> ser.	Typhimurium
2954/10	PR	Frango (Carcaça Resfriada)	AL	<i>Salmonella</i>	Tennessee
5179/10	PR	Aves (Carcaça Resfriada)	AL	<i>Salmonella</i>	Typhimurium
5417/10	MT	Lingüiça	AL	<i>Salmonella</i>	Typhimurium
8796/10	MT	Carne	AL	<i>Salmonella</i>	Typhimurium
8891/10	MG	Suíno (Matriz)	AN	<i>Salmonella</i>	Typhimurium
9339/10	SP	Osso	AN	<i>Salmonella</i>	Senftenberg
9541/10	RS	Ambiente	AB	<i>Salmonella</i>	Anatum
9606/10	MT	Maminha da Alcatra	AL	<i>Salmonella</i>	Infantis
14052/10	SC	Peru (Corte)	AN	<i>Salmonella</i>	Schwarzengrund
14488/10	MT	Carne Suína	AL	<i>Salmonella</i>	Typhimurium
505/09	SC	Peru Matriz	AB	<i>Salmonella</i>	Typhimurium
792/09	PA	Secreção	HU	<i>Salmonella</i>	Typhimurium
888/09	SP	Carcaça de Frango Resfriado	AN	<i>Salmonella</i>	Newport
1199/09	RS	Recorte	AL	<i>Salmonella</i>	Typhimurium
2002/09	CE	Urina	HU	<i>Salmonella</i>	Enteritidis
3580/09	MT	Frango (Resfriado)	AL	<i>Salmonella</i>	Worthington
6960/09	SP	Não relacionada	AN	<i>Salmonella</i>	Agona
16238/09	MS	-	AL	<i>Salmonella</i>	Typhimurium
17343/09	PR	Fezes	HU	<i>Salmonella</i>	Typhimurium