



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAFAELA GOMES FERRARI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS MECANISMOS DE
RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS DE ISOLADOS DE
Salmonella spp. ASSOCIADOS A SURTOS OCORRIDOS NO
PARANÁ.**

Londrina
2010

RAFAELA GOMES FERRARI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS MECANISMOS DE
RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS DE ISOLADOS DE
Salmonella spp. ASSOCIADOS A SURTOS OCORRIDOS NO
PARANÁ.**

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de doutor.

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

Londrina
2010

Catálogo na publicação elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F375c Ferrari, Rafaela Gomes.

Caracterização molecular dos mecanismos de resistência às quinolonas de isolados de *Salmonella* spp. associados a surtos ocorridos no Paraná / Rafaela Gomes Ferrari – Londrina, 2010. 66 f.

Orientador: Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira
Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2010.
Inclui bibliografia.

1. Alimentos \x Microbiologia – Teses. 2. *Salmonella* – Teses. 3. Ciprofloxacina – Teses. 4. Mutação (Biologia) – Teses. I. Oliveira, Tereza Cristina Rocha Moreira de. II. Universidade Estadual de Londrina. \b Centro de Ciências Agrárias. \b Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641:579

RAFAELA GOMES FERRARI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS MECANISMOS DE
RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS DE ISOLADOS DE *Salmonella* spp.
ASSOCIADOS A SURTOS OCORRIDOS NO PARANÁ.**

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de doutor.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de
Oliveira
UEL – Londrina - PR

Profa Dra Libera Maria Dalla Costa
UFPR – Londrina – PR

Profa Dra Lourdes Botelho Garcia
UEL – Londrina - PR

Profa Dra Floristher Elaine Carrara Marrone
UEL – Londrina - PR

Profa Dra Eliana Carolina Vespero
UEL – Londrina - PR

Londrina, 20 de setembro de 2010.

À minha família, por todo apoio, incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus sempre, acima de tudo e em primeiro lugar. Obrigada, Senhor de meus dias e Pai que me leva pela mão.

À Professora Dra. Tereza C. R. M. de Oliveira pela dedicação, pelo incentivo, pelo

profissionalismo e pela competência. Pela paciência que demonstrou ter tanto em minhas ausências quanto no não cumprimento dos prazos estabelecidos. Obrigada mestra, por tudo.

À Professora Dra. Maria Cristina B. Tognim, por toda dedicação, por todo conhecimento em resistencia bacteriana, pelas brilhantes idéias, pelo todo carinho e amizade a mim concedidos.

Ao CNPq e Capes, pelo suporte financeiro que permitiu o desenvolvimento desta tese.

Ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela

oportunidade e aprendizado.

À Sandra Rezende que nunca mediu esforços para sanar minhas dúvidas, ou prestar-me auxílio sempre que precisei.

A mi amigo, maestro, compañero de cine y confidente, Juan Carlos. Tú eres un ejemplo de profesionalismo sin que la ternura sea ignorada. Me has enseñado que las dos pueden y deben caminar juntas. Eso voy a llevarlo por toda mi vida. Ejemplo de maestro, de persona y, sobre todo, de competencia. Te llevo dentro de mí, con cariño, morriña y gratitud. A ti, maestro querido, agradezco toda confianza, toda seguridad depositada en mí. Gracias por lãs cervecitas, por las películas raras que me presentaste, por los partidos de fútbol, en fin, por tu amistad. No hay palabras para describir cuanto te admiro. Ahora solo puedo decirte: volveremos a vernos, PRONTO!

A Profesora doctora Gloria Royo, por haberme aceptado en su laboratorio. Por brindarme sus conocimientos en microbiología, por las sugerencias en mi investigación, por la persona y profesional que es. Gracias por todo.

Ahora, a un grupo de personas que las llevo en mi corazón. No puedo separarlos para que no haya celos. Algunos estuvieron más presentes, otros, a la distancia, pero siempre me apoyaron. Gracias a Sophia, David, Leda, Rosa, Laura, Antonio y Ceci. Vosotros fueron amigos a quienes no imaginé conocer.

Leda, tu me recibiste en tu casa. Una brasileña que ni sabía lo que era un conejo. Tuviste valor! No es cualquiera que abre la puerta de su casa a una persona extraña, y aún más, a una brasileña atípica. Yo no pude enseñarte a sambar, pero tú tampoco me enseñaste El flamenco y a torear. Estamos empatadas! Amiga, te quiero, para siempre.

Rosa, gracias por tus clases de castellano y por el catalán que me hiciste engullir a fuerza!. Gracias por las mañanas en que íbamos a 'drogarnos' con café. Gracias por los viajes, por tu presencia, por tu fuerza, disciplina, capacidad, agilidad y paciencia con mi pobre léxico.

Sophi, David y Laura, vosotros volvieron los días más agradables. Me enseñaron La playa, la que yo insistía en no conocerla. Os agradezco por todo cariño, atención y amistad. Antonio, que puedo decir de un personaje como tú? Tú me conquistaste por tu forma rara de ser. Por tu bata siempre abierta, tu pelo raro. Gracias por las clases sin las cuales no hubiera podido sobrevivir: las clases de castellano de LA CALLE; las clases teóricas y prácticas sobre la cultura gitana; las películas, vocalizadas frase a frase, como si yo no entendiera nada de castellano. Gracias por todo tu conocimiento compartido conmigo y por las cosas que, aquí, no alcanzaría a decirlas. Antonio, no te olvides: nos veremos en la próxima vez, ya sabes donde. Está todo coordinado. Hasta pronto, amigo querido!

Ceci, mi hermanita mayor. La peruana que con paciencia y humor me enseñó su forma de pensar. Intentamos, juntas, cambiar los dolores del Mundo. No fue en esta vez, pero te digo, amiga mía, seguiremos intentando. Quien sabe, en un próximo viaje, en una próxima ocasión lograremos resolver los problemas de la humanidad. Gracias por permitirme quedarme siempre a tu lado. Quejándome,

llorando dolores que tampoco yo sabia explicarlos. Gracias, Ceci, por todo. Te extraño y te llevo en mis recuerdos.

A você, amigo, Marcelo Moreschi, minhas palavras não seriam suficientes para te dizer o quanto te amo. Portanto, escrevo aqui, palavras que não foram por mim concebidas, mas que traduzem bem o que sinto por você. *“De resto, o que costumamos chamar de amigos e amizades são apenas contactos e convivências entabulados devido a alguma circunstância ou conveniência por meio da qual nossas almas se mantêm juntas. Na amizade de que falo, elas se mesclam e se confundem uma na outra, numa fusão tão total que apagam e não mais encontram a costura que as uniu. Se me pressionarem para dizer por que o amava, sinto que isso só pode ser expresso respondendo: ‘Porque era ele, porque era eu’”*. [Michel de Montaigne, Ensaaios, Volume 1, Capítulo 28]. Mo, te amo sem costuras!

À minha amiga Marci agradeço o carinho, atenção e ajuda na redação dos textos, mas, acima de tudo, agradeço a sua compreensão. Sei que fui e sou ausente. Mas perdoe essa sua amiga que ainda tenta se encontrar. Te adoro, amiga. Sei que, quando uma amizade é verdadeira, é para sempre. Obrigada por tudo.

FERRARI, R. G. **Caracterização molecular dos mecanismos de resistência à quinolonas de isolados de *salmonella* spp. Associados a surtos ocorridos no paraná.** 2010. 66 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

Considerando a importância de se conhecer as concentra es de ciprofloxacina que podem prevenir muta es (MPC) em *Salmonella* spp., assim como os mecanismos envolvidos na resistência às quinolonas, o presente estudo determinou a MPC de ciprofloxacina para 312 cepas epidêmicas e aviárias de *Salmonella* spp. Foram analisadas também as regiões QRDR dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* e presença de PMQR em 126 cepas epidêmicas e não epidêmicas. Por fim, se estudou genotipicamente as proteínas envolvidas no mecanismo de efluxo ativo de 14 cepas resistentes ao ácido nalidíxico (NAL), sendo estas, metade mutantes e metade não mutantes em *gyrA*. A CipMPC para cepas sensíveis ao NAL variou entre 0,002 – 4 µg/ml, já para as cepas resistentes, este valor variou de 0,004 - 16 µg/ml. A rela o MPC/MIC para as cepas resistentes esse antibiótico foi superior às cepas sensíveis. Ficou demonstrado, a partir dos resultados obtidos, a importância da MPC para se determinar a dosagem correta de ciprofloxacina no tratamento de *Salmonella* spp. Em rela o   análise de muta es nas regiões QRDRs dos genes das topoisomerases, a sensibilidade ao NAL demonstrou ser um bom método fenotípico de separa o de cepas com e sem muta o nas QRDR, servindo como método de triagem rápido e eficaz entre cepas mutadas e não mutadas. Outro relevante fato foi a presença de dupla muta o no gene *gyrA* em treze cepas resistentes ao NAL que não apresentavam resistência à ciprofloxacina. Tal resultado sugere que a presença de dupla muta o não foi um fator determinante na resistência a este antibiótico. Quando se analisou a presença de PMQR, notou-se que estes genes, por si, não geraram resistência à ciprofloxacina. Ao se avaliar o nível de expressão das proteínas ligadas à bomba de efluxo, notou-se que as cepas resistentes ao NAL, não possuidoras de muta o em *gyrA*, apresentaram, provavelmente, como forma de resistência primária a esta droga, a expressão de genes ligados   bomba de efluxo. Também notou-se que, a expressão desses genes parecem ocorrer independentemente de muta es em *gyrA*. Da mesma forma, sugere-se que, a partir dos resultados aqui observados, o mecanismo de efluxo ativo pode desempenhar uma pr -sele o de cepas menos sensíveis, para posterior surgimento de cepas mutantes e mais resistentes. Observou-se que *marA* atuou como ativador do operon *marRAB*, sugerindo-nos que, *marA* possa ser um potencial alvo para futuras estratégias na luta contra a resistência microbiana. Portanto, a partir dos resultados aqui obtidos, faz-se necessário enfatizar o uso responsável de todos os agentes antimicrobianos, para maximizar a eficácia das fluoroquinolonas e reduzir ao mínimo a resistência. E por último, porém não menos importante,   necessidade de um estudo contínuo dos mecanismos de resistência e o monitoramento do perfil de resistência de microrganismos de interesse epidemiológico.

Palavras-chave: *Salmonella* spp. MPC. Ciprofloxacina. Muta o. Topoisomerases. PMQR. Bomba de efluxo.

FERRARI, R. G. **Molecular characterisation of resistance mechanisms of quinolones in isolates of *salmonella* spp. Associated with outbreaks in parana.** 2010. 66 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

Considering the importance of the concentrations of ciprofloxacin that can prevent mutations in *Salmonella* spp., as well as, the mechanisms involved in quinolone resistance, this study determined the MPC of ciprofloxacin for 312 epidemic and avian strains of *Salmonella* spp. We also evaluate the QRDR regions of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes and presence of PMQR in 126 epidemic and not epidemic strains. Finally, we studied genotypical proteins involved in the mechanism of active efflux of 14 strains NAL resistant, which are half mutant and half not *gyrA* mutants. The MPC of ciprofloxacin (CipMPC) was evaluated for 312 *Salmonella* enterica strains of epidemic and poultry origin susceptible and resistant to nalidixic acid (NAL). The CipMPC for NAL susceptible strains were in the range from 0.002 to 4 µg/ml and for NAL-resistant strains, it ranged from 0.004 to 16 µg/ml. The average MPC/MIC ratio for NAL-resistant strains was higher than NAL-susceptible. The results show the importance of MPC to determinate the correct dosage of ciprofloxacin in treatment of *Salmonella* spp. The analysis of mutations in regions of the QRDRs of topoisomerase genes, the NAL sensibility has been proved to be a good phenotypic method of separation of strains with and without mutations in the QRDR. The presence of double mutation in *gyrA* gene in thirteen ciprofloxacin sensitive strains suggest that the presence of double mutation was not a factor in resistance to this antibiotic. When we analysed the presence of PMQR, it was noted that these genes, by itself, did not generate resistance to ciprofloxacin. When we studied the level of expression of proteins related to efflux pump, it has been noted that, the strains NAL-resistant and without *gyrA* mutation, probably presents as a form of primary resistance to this drug the expression of genes related to efflux. Also, has been noted that the expression of these genes appear to occur independently of mutations in *gyrA*. In relationship to *marA*, has been demonstrated that this gene served as an activator of operon *marRAB*, suggesting that *marA* could be a potential target for future strategies to combat antimicrobial resistance. Therefore, from the results obtained here, it is necessary to emphasise the responsible use of all antimicrobials, to maximise the effectiveness of fluoroquinolones and minimise resistance. And last but not least, is the need to continued study of resistance mechanisms and to monitor the microbial resistance profile of epidemiological strains.

Keywords: *Salmonella* spp. MPC. Ciprofloxacin. Mutation. Topoisomerases. PMQR Efflux pump.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
Bibliografia.....	15
2 OBJETIVOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
MECHANISMS OF RESISTANCE TO FLUOROQUINOLONES IN <i>Salmonella</i> spp	19
1.0) GENUS <i>Salmonella</i>	20
2.0) Mechanisms of action of fluoroquinolones	20
2.1) Mechanism of resistance to fluoroquinolones	20
2.2) Alterations in topoisomerases	21
2.3) Efflux pump mechanisms	21
2.4) Plasmid Mediated Resistance (PMQR).....	22
Conclusion.....	23
References	23
4 ARTIGO	28
Mutant prevention concentration (MPC) of ciprofloxacin against <i>Salmonella</i> <i>enterica</i> . of epidemic and poultry origin.....	28
Introduction.....	29
Material and methods.....	30
<i>Salmonella</i> spp. <i>Strains</i>	30
<i>Determination of MPC for ciprofloxacin and MPC/MIC ratio</i>	30
References	35
5 ARTIGO II	38
Mutações nos genes das topoisomerases e resistência mediada por plasmídeos (pmrq) em cepas brasileiras de <i>salmonella</i> spp. Epidêmicas e de origem avícola	38
Introdução	38
Materiais e métodos	40

Resultados e discussão	41
Susceptibilidade às quinolonas e estudo das mutações nos genes das topoisomerasas	41
PMQR	46
Bibliografia.....	48
6 ARTIGO III	53
Expressão dos genes <i>marA</i> , <i>soxS</i> , <i>acrB</i> e <i>ramA</i> da bomba de efluxo AcrAB/TolC em cepas	53
<i>Salmonella enterica</i> com e sem mutações na QRDR dos gene <i>gyrA</i>	53
Introdução	53
Material E Métodos	55
Resultados	57
Discussão.....	59
Bibliografia.....	63

INTRODUÇÃO

O nome do gênero *Salmonella*, foi criado em 1885 pelo patologista Lignières em honra a Daniel Salmon. Tal gênero pertence à família *Enterobacteriaceae* (Popoff, *et al.*, 2003) e, atualmente, é composto por três espécies: *S. enterica*, *S. bongori*, *S. subterranea* (Shelobolina, *et al.*, 2004).

Geralmente, esse microrganismo causa gastroenterite auto-limitada, e muitas vezes não requer tratamento. Contudo, essa enfermidade pode ser grave em crianças, idosos e pacientes imunodeprimidos (WHO, 2005; Butaye, *et al.*, 2006, F and Wierup, 2006). Em vários casos, também pode haver acometimento extra-intestinal, necessitando de tratamento antibiótico prolongado (Cui, *et al.*, 2009, Jacoby, 2005, Xu, *et al.*, 2009).

Quando o tratamento é necessário, como no caso de infecções extra-intestinais, as fluoroquinolonas (FQ) são as drogas de escolha (WHO, 2005; Marimon, *et al.*, 2004, Stephen, *et al.*, 2003). Entretanto, mesmo sendo essa classe de drogas a mais utilizada nos quadros infecciosos graves, vários estudos relatam a existência de isolados de *Salmonella* spp. com susceptibilidade reduzida, e em raros casos, podendo até mesmo serem resistentes (Giraud, *et al.*, 2006, Hakanen, *et al.*, 1999). De fato, vários casos de falhas terapêuticas têm sido descritos quando há o envolvimento de cepas resistentes ao NAL (ácido nalidíxico) e com sensibilidade reduzida à ciprofloxacina (Aarestrup, *et al.*, 2003; Escribano, *et al.*, 2004, Zhang, *et al.*, 2002). Esses estudos indicam que as FQs são ineficazes em debelar infecções em seres humanos quando as MICs para as fluoroquinolonas estiverem entre 0,06 - 2 µg/ml (Aarestrup, *et al.*, 2003).

O mecanismo de ação dessa classe de antimicrobianos se baseia em atravessar a parede celular e membrana externa de bactérias Gram-negativas e atingir a DNA-girase e topoisomerase IV (Hooper, 2000). Essas drogas tem como finalidade a inibição desses dois grupos de enzimas, causando conseqüentemente a morte celular (Blondeau, 2004). Em *Salmonella* spp. quatro topoisomerases foram identificadas e classificadas em dois grupos de acordo com seu mecanismo de ação. Topoisomerases I e III, as quais fazem parte do grupo I; e topoisomerase II (chamado DNA-girase) e topoisomerase IV pertencentes ao grupo II (Blondeau, 2004).

A região QRDR (Quinolone Resistance-Determining Regions) do gene *gyrA* de *Salmonella* spp. corresponde aos aminoácidos que vão de Ala 67 a Gln 106, sendo

os códons Ser 83 e Asp 87 freqüentemente os mais mutados. Caso a mutação ocorra apenas em um dos dois aminoácidos, o microrganismo torna-se resistente ao ácido nalidíxico, apresentando, então, diminuição da sensibilidade às fluoroquinolonas (Hopkins, *et al.*, 2007, Hopkins, *et al.*, 2005, Jacoby, 2005).

Mutações no códon Ser 83 podem resultar em mudanças por Tyr, Phe e Ala, enquanto mutações em Asp 87 podem implicar em mudanças por Asn, Gly, Tyr ou Lys. Outras substituições menos freqüentes ocorrem em Gly 81, Ala 82, Ala 67 (Giraud, *et al.*, 2006). Eaves, *et al.*, (2004) relataram mutação em Ala 119, porém esta se apresenta fora da região QRDR, sendo provável, neste caso, que o mecanismo de resistência conferida por esta mutação seja diferente da que é produzida por mutações que estão dentro da QRDR (Walker, *et al.*, 2001). A este respeito, diversos estudos apontam para a ampliação da região QRDR do gene *gyrA*, já que outras mutações envolvidas com resistência às quinolonas estão sendo descritas fora do domínio atualmente estudado (Aarestrup, *et al.*, 2003, Capoor, *et al.*, 2009, Crump, *et al.*, 2003, Friedman, *et al.*, 2001).

Cepas com substituições nos códons 83 e/ou 87 apresentam diferentes níveis de redução na susceptibilidade às quinolonas. Hopkins, *et al.*, (2005) e Giraud, *et al.*, (2006) consideram que isto pode se dar, em parte, devido a diferentes mecanismos adicionais de resistência, assim como, os diferentes tipos de substituições no mesmo códon, as quais podem alterar a ligação das quinolonas ao complexo DNA-girase.

Em relação à mutações em *parC* em *Salmonella* spp., diferente do ocorrido em *E. coli*, estas não são tão comuns. Estudos sugerem que essas mutações não possuem um papel tão importante na resistência às quinolonas, sugerindo serem necessárias somente para atingir-se um alto nível de resistência (Pidcock, *et al.*, 1998). Em geral, as mutações em *parC* são detectadas apenas em cepas de *Salmonella* spp. que têm pelo menos duas mutações em *gyrA*, enquanto que em cepas de *E. coli* já se detectou a presença com uma única mutação em *gyrA* (Hopkins, *et al.*, 2005). Tais mutações, quando presentes, ocorrem em Ser 80, ou, em menor freqüência, em Glu 84, os quais são homólogos, respectivamente, aos códons Ser 83 e Asp 87 da DNA-girase (Giraud, *et al.*, 2006).

Além de mutações na região QRDR dos genes das topoisomerasas, outros mecanismos de resistência podem estar presentes. Entre eles estão: a presença de PMQR (plasmid-mediated quinolone resistance) *qnr* (quinolone resistance), *qep* (quinolone efflux pump), *oqxAB* e *aac(6')-Ib*; alteração da permeabilidade de porina;

e, bomba de efluxo. Esses mecanismos podem estar presentes de forma isolada ou associados (Jacoby, 2005, Robicsek, *et al.*, 2006).

Desde que foi confirmado em 1998 um novo mecanismo de resistência às quinolonas em *Klebsiella pneumoniae*, a resistência mediada por plasmídeos tem sido descrita em muitos outros gêneros da família *Enterobacteriaceae* (Poirel, *et al.*, 2005). Em *Salmonella* spp., a presença destes genes tem sido relatada com frequência em diversas partes do mundo (Avsaroglu, *et al.*, 2007, Cattoir, *et al.*, 2007, Cavaco, *et al.*, 2009, Cui, *et al.*, 2009, Gay, *et al.*, 2006, Hopkins, *et al.*, 2007, Veldman, *et al.*, 2008).

Até o momento, seis variantes *qnrA* foram identificados em todo o mundo. Além disso, outros plasmídeos Qnr-like, como de QnrB (20 variantes: QnrB1-QnrB20) e QnrS (3 variantes: QnrS1-QnrS3) foram identificados, possuindo cerca de 40% e 59% de similaridade com QnrA1, respectivamente (Jacoby, *et al.*, 2008). Recentemente, três novas variantes foram identificadas *qnr*: *qnrVC*, *qnrC*, *qnrD* (Cavaco and Aarestrup, 2009, Fonseca, *et al.*, 2008, Wang, *et al.*, 2009). A presença destes genes confere baixo nível de resistência ao ácido nalidíxico e às fluoroquinolonas, entretanto, mutações adicionais nestes genes podem gerar um aumento no nível de resistência (Martinez-Martinez, *et al.*, 1998).

Em 2004, um novo mecanismo de resistência transmitido por plasmídeos foi descrito em *K. pneumoniae*. Esse novo mecanismo torna mais resistentes as bactérias às fluoroquinolonas através de um tipo específico de enzima conhecida como aminoglicosidase acetiltransferase (*aac(6')-Ib*). Duas substituições no códon 102 e 179 sem mutação no alelo *aac(6')-Ib* permitem ao gene acetilar e assim reduzir a atividade de algumas fluoroquinolonas, incluindo norfloxacin e ciprofloxacina (Robicsek, *et al.*, 2006). Este mecanismo tem sido encontrado em diferentes gêneros da família *Enterobacteriaceae*, mas ainda não foi descrito em cepas de *Salmonella* spp. resistentes às fluoroquinolonas (Cui, *et al.*, 2009, Kehrenberg, *et al.*, 2007).

Outro mecanismo de resistência à essa classe de antimicrobianos são as bombas de fluxo. Tais bombas são proteínas de transporte que expõem substratos tóxicos (incluindo antibióticos) de dentro das células para o ambiente externo (Webber and Piddock, 2003). Elas podem ser específicas a um substrato ou podem transportar uma grande variedade de compostos estruturalmente semelhantes. No reino procarioto existem cinco grandes famílias de bombas de efluxo: MF (facilitador principal), MATE (multirresistência), RND (resistência-nodulação-divisão), SMR

(multirresistência de pequena dimensão) e ABC (ligador de ATP). Todos esses sistemas utilizam a força motriz dos prótons como fonte de energia, com exceção da família ABC que utiliza a hidrólise de ATP para exportar substratos (Webber and Piddock, 2003).

Em organismos Gram-negativos a RND é o tipo mais importante de efluxo em conferir resistência. Estruturalmente, a bomba RND consiste em uma proteína de membrana periplasmática (MFP) que está funcionalmente ligada a uma proteína localizada fora da membrana (OMF). O complexo RND-MFP-OMP é representada pela bomba tripartida AcrRAB-TolC, que já está completamente caracterizada em *E. coli* e em muitos outros membros da família *Enterobacteriaceae* (Giraud, et al., 2006, Poole, 2004). Em *Salmonella* spp., a super-expressão do sistema AcrAB-TolC é o principal mecanismo de resistência às quinolonas (Giraud, et al., 2006, Olliver, et al., 2005). Entretanto, a super-expressão da bomba de efluxo em si, não confere resistência a antibióticos em níveis clinicamente significativos, porém, bactérias que possuem tais bombas super-expressas apresentam uma maior capacidade de resistir à pressão exercida pelos antibióticos e, posteriormente, desenvolver mutações nos genes que codificam os sítios de ação dos antibióticos (Webber and Piddock, 2003).

Bactérias mutantes resistentes podem surgir naturalmente, mesmo antes da exposição a um antimicrobiano. Entretanto, estas mutações espontâneas ocorrem em uma frequência muito baixa e, na maioria das vezes, o próprio sistema imune do paciente é capaz de eliminá-las. Porém, em condições que favorecem a seleção e a multiplicação de mutantes, como infecções prévias, imunossupressão, exposição prévia a antimicrobianos ou falhas terapêuticas, este equilíbrio é rompido e a frequência de mutações pode aumentar (BLONDEAU et al., 2004; DRLICA, 2001; ZHAO & DRLICA, 2001).

Tendo como finalidade limitar a evolução da resistência aos antimicrobianos, uma forma de se prevenir o surgimento de bactérias mutantes que surgem com uma frequência de aproximadamente 10^{-6} a 10^{-9} /unidades formadoras de colônia (UFC), é a utilização de ferramentas que visam impedir a multiplicação destes indivíduos. Uma técnica que vem sendo estudada e utilizada há tempos se baseia em evitar o surgimento destas populações através da avaliação da menor concentração do antimicrobiano que previne o surgimento de bactérias mutantes resistentes, conhecida como mutant prevention concentration (MPC) (HAWKEY, 2003; HOOPER, 2001).

A determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de um antimicrobiano é baseada na aplicação, em diversas concentrações, de inóculos contendo 10^4 - 10^5 UFC/ml, o qual é muito baixo para conter subpopulações de mutantes resistentes que podem estar presentes no sítio da infecção. Entretanto, na avaliação da MPC, um inóculo suficientemente $\geq 10^{10}$ UFC/ml, é testado. A MPC também é definida como a MIC das bactérias mais resistentes, ou seja, aquelas com maior probabilidade de serem mutantes resistentes. A janela de seleção de mutantes (MSW) é definida como o intervalo das concentrações da MIC e MPC, e é onde, supostamente, as populações mutantes são selecionadas. Dessa forma, os valores da MPC e MSW fornecem a identificação *in vitro* das concentrações antimicrobianas mais susceptíveis à seleção de mutantes resistentes (DRLICA, 2003).

Considerando a importância de se conhecer as concentrações de ciprofloxacina que podem prevenir mutações em *Salmonella* spp., assim como os mecanismos envolvidos na resistência às quinolonas, o objetivo do presente estudo foi, em primeira fase, determinar a MPC de ciprofloxacina para 312 cepas epidêmicas e aviárias de *Salmonella* spp. Posteriormente, foram analisadas as regiões QRDR dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* e presença de PMQR em 126 cepas epidêmicas e não epidêmicas. Como última etapa, se estudou genotipicamente as proteínas envolvidas no mecanismo de efluxo ativo de 14 cepas resistentes ao NAL, sendo estas, metade mutantes e metade não mutantes em *gyrA*.

Bibliografia

- Aarestrup, F. M., Lertworapreecha, M., Evans, M. C., Bangtrakulnonth, A., Chalermchaikit, T., Hendriksen, R. S., and Wegener, H. C. 2003. Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among salmonella enterica serovar weltevreden from different countries. *J Antimicrob Chemother.* 52, 715-718.
- Aarestrup, F. M., Wiuff, C., Molbak, K., and Threlfall, E. J. 2003. Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for salmonella spp.? *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 827-829.
- Avsaroglu, M. D., Helmuth, R., Junker, E., Hertwig, S., Schroeter, A., Akcelik, M., Bozoglu, F., and Guerra, B. 2007. Plasmid-mediated quinolone resistance conferred by qnrS1 in salmonella enterica serovar virchow isolated from turkish food of avian origin. *J Antimicrob Chemother.* 60, 1146-1150.
- Blondeau, J. M. 2004. Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv Ophthalmol.* 49 Suppl 2, S73-78.
- Butaye, P., Michael, G. B., Schwarz, S., Barrett, T. J., Brisabois, A., and White, D. G. 2006. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi salmonella serotypes. *Microbes Infect.* 8, 1891-1897.
- Capoor, M. R., Nair, D., Walia, N. S., Routela, R. S., Grover, S. S., Deb, M., Aggarwal, P., Pillai, P. K., and Bifani, P. J. 2009. Molecular analysis of high-level ciprofloxacin resistance in salmonella enterica serovar typhi and s. Paratyphi a: Need to expand the qdr region? *Epidemiol Infect.* 137, 871-878.
- Cattoir, V., Weill, F. X., Poirel, L., Fabre, L., Soussy, C. J., and Nordmann, P. 2007. Prevalence of qnr genes in salmonella in france. *J Antimicrob Chemother.* 59, 751-754.
- Cavaco, L. M. and Aarestrup, F. M. 2009. Evaluation of quinolones for use in detection of determinants of acquired quinolone resistance, including the new transmissible resistance mechanisms qnra, qnrb, qnrs, and aac(6')ib-cr, in escherichia coli and salmonella enterica and determinations of wild-type distributions. *J Clin Microbiol.* 47, 2751-2758.
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S., and Aarestrup, F. M. 2009. Qnrd, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in salmonella enterica serovar kentucky and bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, 603-608.
- Crump, J. A., Barrett, T. J., Nelson, J. T., and Angulo, F. J. 2003. Reevaluating fluoroquinolone breakpoints for salmonella enterica serotype typhi and for non-typhi salmonellae. *Clin Infect Dis.* 37, 75-81.
- Cui, S., Li, J., Sun, Z., Hu, C., Jin, S., Li, F., Guo, Y., Ran, L., and Ma, Y. 2009. Characterization of salmonella enterica isolates from infants and toddlers in wuhan, china. *J Antimicrob Chemother.* 63, 87-94.
- Eaves, D. J., Randall, L., Gray, D. T., Buckley, A., Woodward, M. J., White, A. P., and 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. *Antimicrob Agents Chemother.* 48, 4012-4015.
- Escribano, I., Rodriguez, J. C., and Royo, G. 2004. Mutations in the gyra gene in salmonella enterica clinical isolates with decreased ciprofloxacin susceptibility. *Int J Antimicrob Agents.* 24, 300-303.
- F, L. P. and Wierup, M. 2006. Salmonella contamination: A significant challenge to

- the global marketing of animal food products. *Rev Sci Tech.* 25, 541-554.
- Fonseca, E. L., Dos Santos Freitas, F., Vieira, V. V., and Vicente, A. C. 2008. New qnr gene cassettes associated with superintegron repeats in vibrio cholerae o1. *Emerg Infect Dis.* 14, 1129-1131.
- Friedman, S. M., Lu, T., and Drlica, K. 2001. Mutation in the DNA gyrase a gene of escherichia coli that expands the quinolone resistance-determining region. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 2378-2380.
- Gay, K., Robicsek, A., Strahilevitz, J., Park, C. H., Jacoby, G., Barrett, T. J., Medalla, F., Chiller, T. M., and Hooper, D. C. 2006. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-typhi serotypes of salmonella enterica. *Clin Infect Dis.* 43, 297-304.
- Giraud, E., Baucheron, S., and Cloeckeaert, A. 2006. Resistance to fluoroquinolones in salmonella: Emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes Infect.* 8, 1937-1944.
- Hakanen, A., Siitonen, A., Kotilainen, P., and Huovinen, P. 1999. Increasing fluoroquinolone resistance in salmonella serotypes in finland during 1995-1997. *J Antimicrob Chemother.* 43, 145-148.
- Hooper, D. C. 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 31 Suppl 2, S24-28.
- Hopkins, K. L., Batchelor, M. J., Anjum, M., Davies, R. H., and Threlfall, E. J. 2007. Comparison of antimicrobial resistance genes in nontyphoidal salmonellae of serotypes enteritidis, hadar, and virchow from humans and food-producing animals in england and wales. *Microb Drug Resist.* 13, 281-288.
- Hopkins, K. L., Davies, R. H., and Threlfall, E. J. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in escherichia coli and salmonella: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* 25, 358-373.
- Hopkins, K. L., Wootton, L., Day, M. R., and Threlfall, E. J. 2007. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrs1 found in salmonella enterica strains isolated in the uk. *J Antimicrob Chemother.* 59, 1071-1075.
- Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martinez-Martinez, L., Nordmann, P., Pascual, A., Poirel, L., and Wang, M. 2008. Qnr gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 52, 2297-2299.
- Jacoby, G. A. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis.* 41 Suppl 2, S120-126.
- Kehrenberg, C., Hopkins, K. L., Threlfall, E. J., and Schwarz, S. 2007. Complete nucleotide sequence of a small qnrs1-carrying plasmid from salmonella enterica subsp. Enterica typhimurium dt193. *J Antimicrob Chemother.* 60, 903-905.
- Marimon, J. M., Gomariz, M., Zigorraga, C., Cilla, G., and Perez-Trallero, E. 2004. Increasing prevalence of quinolone resistance in human nontyphoid salmonella enterica isolates obtained in spain from 1981 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 48, 3789-3793.
- Martinez-Martinez, L., Garcia, I., Ballesta, S., Benedi, V. J., Hernandez-Alles, S., and Pascual, A. 1998. Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant klebsiella pneumoniae strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 42, 1850-1852.
- Olliver, A., Valle, M., Chaslus-Dancla, E., and Cloeckeaert, A. 2005. Overexpression of the multidrug efflux operon acrf by insertional activation with is1 or is10 elements in salmonella enterica serovar typhimurium dt204 acrb mutants selected with fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, 289-301.

- Piddock, L. J., Ricci, V., McLaren, I., and Griggs, D. J. 1998. Role of mutation in the gyra and parc genes of nalidixic-acid-resistant salmonella serotypes isolated from animals in the united kingdom. *J Antimicrob Chemother.* 41, 635-641.
- Poirel, L., Liard, A., Rodriguez-Martinez, J. M., and Nordmann, P. 2005. Vibrionaceae as a possible source of qnr-like quinolone resistance determinants. *J Antimicrob Chemother.* 56, 1118-1121.
- Poole, K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 10, 12-26.
- Popoff, M. Y., Bockemuhl, J., and Gheesling, L. L. 2003. Supplement 2001 (no. 45) to the kauffmann-white scheme. *Res Microbiol.* 154, 173-174.
- Robicsek, A., Jacoby, G. A., and Hooper, D. C. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.* 6, 629-640.
- Shelobolina, E. S., Sullivan, S. A., O'Neill, K. R., Nevin, K. P., and Lovley, D. R. 2004. Isolation, characterization, and u(vi)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-ph, nitrate- and u(vi)-contaminated subsurface sediment and description of salmonella subterranea sp. Nov. *Appl Environ Microbiol.* 70, 2959-2965.
- Stephen, J. M., Toleman, M. A., Walsh, T. R., and Jones, R. N. 2003. Salmonella bloodstream infections: Report from the sentry antimicrobial surveillance program (1997-2001). *Int J Antimicrob Agents.* 22, 395-405.
- Veldman, K., van Pelt, W., and Mevius, D. 2008. First report of qnr genes in salmonella in the netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 61, 452-453.
- Walker, R. A., Saunders, N., Lawson, A. J., Lindsay, E. A., Dassama, M., Ward, L. R., Woodward, M. J., Davies, R. H., Liebana, E., and Threlfall, E. J. 2001. Use of a lightcycler gyra mutation assay for rapid identification of mutations conferring decreased susceptibility to ciprofloxacin in multiresistant salmonella enterica serotype typhimurium dt104 isolates. *J Clin Microbiol.* 39, 1443-1448.
- Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., and Hooper, D. C. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrc, found in a clinical isolate of proteus mirabilis. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, 1892-1897.
- Webber, M. A. and Piddock, L. J. 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother.* 51, 9-11.
- Xu, X. B., Yuan, Z. A., Jin, H. M., Xiao, W. J., Gu, B. K., Chen, M., Ran, L., Diao, B. W., Cui, Z. G., Hu, Q. H., and Kan, B. 2009. [study on the epidemiological characteristics and molecular typing of salmonella enterica subsp. Enterica serovar senftenberg in shanghai]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 30, 933-937.
- Zhang, W., Wu, Y., Yin, W., and Yu, M. 2002. Study of isolation of fluoroquinolone-resistant ureaplasma urealyticum and identification of mutant sites. *Chin Med J (Engl).* 115, 1573-1575.

2 OBJETIVOS

2.1 Determinar as MPCs para ciprofloxacina de 312 cepas epidêmicas e aviárias de *Salmonella* spp.;

2.2 Analisar a regiões QRDR da DNA-girase e topoisomerase IV de 126 cepas epidêmicas e aviárias de *Salmonella* spp.;

2.3 Investigar a presença de PMQR das mesmas 126 cepas anteriormente avaliadas quanto à presença de mutações nas regiões QRDRs. Os genes pesquisados foram: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *aac(6')-Ib*;

2.4 Estudar genotipicamente as proteínas envolvidas no mecanismo de efluxo ativo de 14 cepas resistentes ao NAL, sendo estas, metade mutantes e metade não mutantes em *gyrA*.

3 REVISÃO DE LITERATURA.

Enviada para publicação à revista Current Drug Therapy.

TITLE

MECHANISMS OF RESISTANCE TO FLUOROQUINOLONES IN *Salmonella* spp.

AUTHORS

Rafaela Ferrari¹, Rosa Cremades², Antonio Galiana², Tereza Oiveira¹, Juan Carlos Rodríguez*².

¹Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

²Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario de Elche. Universidad Miguel Hernández. Camino de La Almazara nº 11, 03203 Elche, Spain.

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE AND REPRINTS

*Juan Carlos Rodríguez

Servicio de Microbiología.

Hospital General Universitario de Elche.

Camino de La Almazara nº 11, 03203 Elche (Alicante), Spain.

Tel: +34 966679047

FAX: +34-96-6679108

E-mail address: rodriguez_juadia@gva.es

SUMMARY

Salmonella spp. generally causes self-limiting gastroenteritis, which often requires no treatment, but may be severe in young people, the elderly and patients with weakened immunity, and in this cases, the infection may be much more severe, present at extraintestinal sites and require prolonged antibiotic treatment. One of the treatments of choice is the fluoroquinolones. The main mechanisms of resistance to quinolones are mutations in the genes encoding topoisomerase II and topoisomerase IV in the QRDR region (Quinolone Resistance-Determining Region), but additional mechanisms may be present, such as change in permeability of the membrane, efflux pumps, and PMQR (plasmid-mediated quinolone resistance). These mechanisms may be present individually or in combination but mutations in the gen *gyrA* is the most frequent and important mechanism in Gram-negative bacteria.

KEY WORDS

Salmonella, fluoroquinolones, mechanisms of resistance.

1.0) GENUS *Salmonella*

The name genus *Salmonella* was coined in 1885 by the pathologist Lignières in honour of Daniel Salmón. It belongs to the family *Enterobacteriaceae* [1], and at present, the genus consists of three species: *S. enterica*, *S. bongori* and *S. subterranea* [2].

The *S. enterica* species is divided into six sub-species: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, and *S. enterica* subsp. *indica* [3-5].

Over 2,500 serotypes or serovars have been described [1, 5, 6] which are differentiated by the combination of somatic (O) and flagellar antigens (H) [7, 8].

This microorganism generally causes self-limiting gastroenteritis, which often requires no treatment, but may be severe in young people, the elderly and patients with weakened immunity [5, 6, 9]. In some cases infection may be much more severe, present at extraintestinal sites and require prolonged antibiotic treatment. Fluoroquinolones are one of the treatments of choice.

2.0) Mechanisms of action of fluoroquinolones

Fluoroquinolones penetrate the cell wall and external membrane of Gram-negative bacteria to reach DNA-gyrase and topoisomerase IV [10]. They act by inhibiting these enzymes [11].

During DNA synthesis, 50,000 base pairs are synthesized per minute for each of the DNA strands. In order to achieve efficient replication, topological problems of the DNA, such as separating DNA strands and eliminating positive supercoiling, are solved by topoisomerases since they have the ability to modify the DNA topology by breaking and moving DNA bands [12].

In *Salmonella* four topoisomerases have been identified and classified in two groups according to their mechanism of action. Topoisomerases I and III belong to group I, and topoisomerases II (known as DNA-gyrases) and topoisomerases IV belong to group II [13].

2.1) Mechanism of resistance to fluoroquinolones

Salmonella spp. is rarely resistant to these compounds if the guidelines provided by the CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute [14] are followed, but the number of clinical isolates with reduced susceptibility to these compounds has increased in recent years [15-19].

In order to exercise a cytotoxic effect the quinolones need to penetrate through the cytoplasmic membrane and act on topoisomerase II (DNA-gyrase) or topoisomerase IV, inducing cell death. Therefore, the mechanisms of resistance to quinolones are:

- a- Mutations in the genes encoding topoisomerase II and topoisomerase IV in the QRDR region (Quinolone Resistance-Determining Region).
- b- Change in permeability of the membrane. The decrease in intracellular penetration of the antimicrobial agent is produced by a mechanism in which porins intervene.
- c- Efflux pumps which help to reduce the accumulation of quinolones in the cells [20].
- d- PMQR (plasmid-mediated quinolone resistance): plasmids that encode a family of pentapeptides that interfere in the action of quinolones on the DNA-gyrase and topoisomerase IV of the bacteria, producing low level resistance [21].

These mechanisms may be present individually or in combination but mutations in the gen *gyrA* is the most frequent and important mechanism in Gram-negative bacteria [22-26].

2.2) Alterations in topoisomerases

In *S. enterica* the QRDR region of the gen *gyrA* corresponds to amino acids between Ala67-Gln106. The amino acids Ser83 and Asp87 are the ones that most frequently present mutations. If the mutation is produced in only one of the two amino acids, the strain becomes resistant to nalidixic acid and has reduced susceptibility to fluoroquinolones. However, if there is a mutation in both amino acids, the strain becomes totally resistant to all fluoroquinolones [27].

Mutations in the amino acid Ser83 may give rise to Tyr, Phe or Ala, whereas mutations in amino acid Asp87 may imply changes in Asn, Gly, Tyr or Lys. Strains with these substitutions at codons 83 and/or 87 have different degrees of reduced susceptibility to quinolones [28]. Other less frequent codons found substituted in strains resistant to nalidixic acid are Gly81, Ala82, Ala67, Ala119. It is notable that the mutation in Ala119 is outside the QRDR region [28], and so the resistance mechanism due to these mutations is likely to be different to that produced by mutations within QRDR [29].

Mutations in *parC* of *Salmonella* are not as frequent as in *E. coli*. Studies suggest that these mutations do not play an important role in quinolone resistance and may only be necessary to achieve a high level of resistance [30]. In general, mutations in *parC* have only been detected in *Salmonella* strains that have at least two mutations in *gyrA*, whereas in *E. coli* they are detected in strains with only a single mutation in *gyrA* [27]. They are produced at codon Ser80 or, less frequently, at codon Glu84, which are homologues of codons Ser83 and Asp87, respectively, of DNA-gyrase [31].

The emergence of *Salmonella* strains with a high level of fluoroquinolone resistance is relatively recent and still rare compared with the case of other genera of Gram-negative bacteria. Recent studies suggest that high levels of resistance are currently emerging in serovars Typhimurium, Choleraesuis and Schwarzengrund in various parts of the world [32].

2.3) Efflux pump mechanisms

Efflux pumps are transporter proteins that expel toxic substrates (including antibiotics) from inside cells to the outside [32, 33].

The pumps may be specific to a substrate or transport a variety of compounds of similar structure. In the Procariota kingdom there are five superfamilies: MF (main facilitator), MATE (multidrug and toxic extrusion), RND (resistance-nodulation-division), SMR (small multidrug resistance) and ABC (ATP binding cassette). All these systems use the driving force of protons as the source of energy, with the exception of the ABC family that makes use of hydrolysis of ATP to export the substrates [32].

In Gram-negative organisms, RND is the type of efflux that plays the most important role in conferring resistance. Structurally, the RND pump is made up of a periplasmic membrane protein (MFP), which is functionally bonded to a protein located outside the membrane (OMF). The complex RND-MFP-OMP is represented by the tripartite pump AcrRAB-TolC extensively characterized in *E. coli* and many other members of the family *Enterobacteriaceae* [31, 34].

It was discovered that overexpression of the AcrAB system, which uses the external membrane protein TolC as an expulsion channel, is the key to quinolone resistance in *Salmonella* [31]. Overexpression of AcrAB has been shown to produce a decrease in susceptibility of *S. Typhimurium* to fusidic acid, chloramphenicol, tetracycline, norfloxacin and penicillin-G [35]. Recent studies have shown that AcrEF, another efflux system, may be necessary to generate fluoroquinolone resistance if the AcrAB is not functional [31].

Overexpression of efflux pumps may be the result of mutations in genes that repress or activate a transcriptional regulator such as *marA*, *soxS* or *ramA*. Frequently, overexpression of a pump produces resistance to more than one class of antibiotic. Cross-resistance is also a problem because exposure to any agent that has the profile of a substrate of the pump may

favour expression of this pump and, therefore, cross resistance to all other substrates of the pump. These may include clinically relevant antibiotics.

Overexpression of the pump does not, on its own, confer resistance to antibiotics at clinically significant levels; however, these bacteria are better prepared to survive the pressure of antibiotics and subsequently develop mutations in the genes encoding the sites of action of antibiotics [32].

Giraud *et al.* [31] developed an experimental model that demonstrated the importance of this resistance mechanism in mutations obtained following exposure to fluoroquinolones, and suggested that this mechanism may act before the emergence of mutations in *gyrA*.

With regard to inhibitors of the efflux pumps, it was found that certain of these substances may be used to reduce the intrinsic resistance, revert the acquired resistance and reduce the frequency of emergence of mutants resistant to fluorquinolones [17]. Their use is being evaluated in order to improve and increase antibiotic activity [36].

2.4) Plasmid Mediated Resistance (PMQR)

Since a new mechanism of resistance to quinolones was confirmed in 1998 in *Klebsiella pneumoniae*, plasmid mediated resistance has been described in many other genera of the family *Enterobacteriaceae* [37].

The first protein identified, Qnr (later called QnrA), was found in a plasmid (pMG252) of a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae* [38]. This gene encodes a pentapeptide (PRP-pentapeptide repeat proteins) which protects type 11 topoisomerases. This pentapeptide has 218 amino acids with repeated domains of 11 and 28 base pairs, one after the other, separated by a single glycine with a consensus sequence of A/C, D/N, L/F, X y X, where X is any amino acid [39].

To date six variants of QnrA have been identified worldwide. In addition other Qnr-like plasmids, such as QnrB (20 variants: QnrB1-QnrB20) and QnrS (3 variants: QnrS1-QnrS3) have been identified, and these exhibit around 40% and 59% similarity, respectively, with QnrA1 [40]. Recently, three new variants of *qnr* were identified: *qnrVC*, *qnrC*, *qnrD* [41-43].

The gene *qnrB* was found in clinical isolates of *K. pneumoniae*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae* and *E. coli* in India and the United States [44], and *qnrS* was found in *Shigella flexneri* 2b strains in an outbreak of food intoxication in Japan [45]. Most *Enterobacteriaceae* species in which these plasmids are detected are commonly found in human flora; hence diffusion of this resistance mechanism among the different bacterial species may occur in the human intestine. Moreover, this transmission may also occur in the intestinal tract of animals. Therefore the use of quinolones in veterinary practice should also be monitored in order to control propagation of the bacteria with this plasmid [46].

The gene *qnr* confers a low level of resistance to nalidixic acid and fluoroquinolones (ciprofloxacin, for instance). Additional mutations in these genes may generate an increase in the level of resistance [38]. In *Salmonella*, *qnr* genes have frequently been described. Cavaco *et al.* [42], Avsaroglu *et al.* [47] and Cui *et al.* [48] identified the gene *qnrD* in isolates of *Salmonella* Kentucky and Bovismorbificans, but the strains that presented this plasmid had barely reduced susceptibility to ciprofloxacin. In China, *qnrS2*, *qnrA* and *qnrB6* were isolated in *Salmonella* spp., and no strain was resistant to ciprofloxacin. Cui *et al.* [48] and Gay *et al.* [49] identified *qnrB2*, *qnrB5*, *qnrS1* and *qnrS2* in *Salmonella* spp. isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin.

In 2004, a new resistance mechanism using plasmids as the vehicle was described in *K. pneumoniae*. This new mechanism uses a specific type of enzyme known as aminoglycoside acetyltransferase (*aac(6')-Ib*) to make bacteria resistant. Two substitutions at codons 102 and 179 with no mutation in the allele *aac(6')-Ib* allow the gene to acetylate and thus reduce the activity of some fluoroquinolones, including norfloxacin and ciprofloxacin

[50]. This mechanism has been found in different genera of the family *Enterobacteriaceae*, but has not yet been described in *Salmonella* spp. isolates resistant to fluoroquinolones [48, 51].

Yamane *et al.* [52] isolated a plasmid-mediated efflux pump (QepA), generating fluoroquinolone resistance, in an *E. coli* strain in Japan. The magnitude of the dissemination of this new vehicle of fluoroquinolone resistance is still not known but a large number of *E. coli* strains that present this plasmid have already been isolated [53, 54].

CONCLUSION

There are many mechanisms of resistance to fluoroquinolones and they may complement each other. Their diffusion is giving rise to an increase in the percentage of strains with reduced fluoroquinolone susceptibility throughout the world and the emergence of some strains that are totally resistant to fluoroquinolones. This suggests that it is necessary to monitor the use of these compounds, both in humans and in veterinary practice, in order to preserve their therapeutic usefulness.

In addition, further studies are necessary to evaluate the usefulness of fluoroquinolones in the treatment of severe infections due to *Salmonella* strains with reduced susceptibility to these drugs, since there are discrepancies between the different organisations as regards the appropriate cut off points for considering a *Salmonella* strain susceptible, especially when it is associated with extraintestinal infections that require prolonged treatment at sites that are difficult for the antibiotic to access, such as in cases of osteomyelitis.

REFERENCES

- [1] Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. Supplement 2001 to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 2003; 154: 153-4.
- [2] Shelobolina ES, Sullivan SA, O’neill KR, Nevin KP, Lovley DR. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 2959-2965.
- [3] Cortez ALL, Carvalho ACFB, Ikuno AA, Burger KP, Vidal-Martins AMC. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. *Res Vet Sci* 2006; 81: 340-344.
- [4] Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. *IJSEM* 2005; 55: 519–520.
- [5] Forshell LP, Wierup M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev sci tech off Int Epiz* 2006; 25: 541-554.
- [6] WHO – Organização Mundial da Saude, 2005. Drug-resistant *Salmonella*, 2005. Access July 2009. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>.
- [7] Popoff, M. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8 ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 2001.
- [8] Tavechio AT, Ghilardi ACR, Fernandes SA. “Multiplex PCR” identification of the atypical and monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 1,4,[5],12:i:- In São

Paulo State, Brazil: Frequency and Antibiotic Resistance Patterns. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2004; 46: 115-117.

[9] Butaye P, Michael GB, Schwarz S, Barrett TJ, Brisabois A, White DG. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. *Microbes Infect* 2006; 8: 1891–1897.

[10] Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates* 1999; 2: 38–55.

[11] Blondeau JM. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv Ophthalmol* 2004; 49: 73–78.

[12] Drlica K, Zhao X. DNA girase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microb Mol Bio Rev* 1997; 61: 377–392.

[13] Pereira AS. Avaliação do perfil de sensibilidade, da similaridade genética e da presença do gene *qnr* em amostras de *Escherichia coli* resistentes à ciprofloxacina isolados em hospitais brasileiros. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal de São Paulo, Brasil – Escola Paulista de Medicina, 2004.

[14] CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, M100-S17, 2007.

[15] Rossiter S, McClellan J, Barrett T, Joyce K, Anderson AD. Emerging fluoroquinolone resistance among non-typhoidal *Salmonella* in the United States: NARMS, 1996-2000. NARMS Working Group. In: Centers for Disease Control and Prevention, ed. International Conference on Emerging Infectious Diseases. Atlanta: American Society for Microbiology Press, 2002.

[16] Escribano I, Rodríguez JC, Cebrian L, Royo G. The importance of active efflux systems in the quinolone resistance of clinical isolates of *Salmonella* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2004; 24: 428–432.

[17] Ercis S, Erdem B, Hascelik G, Gür D. Nalidixic acid resistance in *Salmonella* strains with decreased susceptibility to ciprofloxacin isolated from humans in Turkey. *JJID* 2006; 59: 117-119.

[18] Mushtaq MA. What After Ciprofloxacin and Ceftriaxone in Treatment of *Salmonella* Typhi. *Pak J Med Sci* 2006; 22: 51-54.

[19] Kownhar H, Esaki MS, Ramachandran R, Usha AR. Emergence of nalidixic acid-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi resistant to ciprofloxacin in India. *J Med Microbiol* 2007; 56: 136–137.

[20] Zechini B, Versace I. Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 2009; 4: 37-50.

[21] Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 629–640.

[22] Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: Overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance. *BMJ* 1998; 317: 1029–1030.

- [23] Alós J. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21: 261–268.
- [24] Soto SM, Ruiz J, Mendoza MC, Vila J. In vitro fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: analysis of mechanisms involved in resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2003; 22: 537-540.
- [25] San Martín B, Lapierre L, Toro C, *et al.* Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. from poultry farms. *Vet Microbiol* 2005; 110: 239–244.
- [26] Brugueras MC, García MM, Díaz RS. Actualidad de las quinolonas. *Rev Cubana Farm* 2005; 39.
- [27] Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005; 25: 358–373.
- [28] Eaves DJ, Randall L, Gray DT, *et al.* 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*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; 48: 4012–4015.
- [29] Walker RA, Saunders N, Lawson AJ, *et al.* Use of a LightCycler *gyrA* mutation assay for rapid identification of mutations conferring decreased susceptibility to ciprofloxacin in multiresistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 isolates. *J Clin Microbio* 2001; 39: 1443–1448.
- [30] Piddock LJ, Ricci V, McClaren I, *et al.* Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acid-resistant *Salmonella* serotypes isolated from animals in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 635–641.
- [31] Giraud E, Baucheron S, Cloeckert A. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes Infect* 2006; 8: 1-8.
- [32] Webber MA, Piddock LJV. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 9–11.
- [33] Nelson ML. Modulation of Antibiotic Efflux in Bacteria. *Curr Med Chem–Anti-Infective Agents* 2002; 1: 35-54.
- [34] Poole K. Efflux-mediated multiresistance in gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 12–26.
- [35] Nikaido H, Basina M, Nguyen V, Rosenberg EY. Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella* Typhimurium excretes only those betalactam antibiotics containing lipophilic side chain. *J Bacteriol* 1998; 180: 4686–4692.
- [36] Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, *et al.* Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 105-116.
- [37] Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 463-469.

- [38] Marítnez-Martínez L, Garcia I, Ballesta S, Benedí VJ, Hernández-Allés S, Pascual A. Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1850-1852.
- [39] Tran JH, Jacoby A. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *PNAS* 2002; 99: 5638-5642.
- [40] Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, *et al.* *qnr* gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2297-2299.
- [41] Fonseca EL, Santos FF, Vieira VV, *et al.* New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1129-1131.
- [42] Cavaco LM, Hasman H, Xia S, *et al.* *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 603-608.
- [43] Wang MH, Xu X, Wu S, *et al.* A new plasmid-mediated gene for quinolone resistance *qnrC*. *Clin Microbiol Infect* 2009; 53: 1892-1897.
- [44] Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, *et al.* *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1178-1182.
- [45] Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, *et al.* Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 801-803.
- [46] Cheung TK, Chu YW, Chu MY, Ma CH, Yung RW, Kam KM. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 586-592.
- [47] Avsaroglu MD, Helmuth R, Junker E, *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance conferred by *qnrS1* in *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated from Turkish food of avian origin. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 1146-1150.
- [48] Cui S, Jingyun L, Ziyong S, *et al.* Characterization of *Salmonella enterica* isolates from infants and toddlers in Wuhan, China Shenghui. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 87-94.
- [49] Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, *et al.* Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Non-Typhi Serotypes of *Salmonella enterica*. *Clinical Infectious Diseases* 2003; 43: 297-304.
- [50] Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby G, *et al.* Fluoroquinolone modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; 12: 83-88.
- [51] Kehrenberg C, Jong A, Friederichs S, Cloeckaert A, Schwarz S. Molecular mechanisms of decreased susceptibility to fluoroquinolones in avian *Salmonella* serovars and their mutants selected during the determination of mutant prevention concentrations. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 1-7.
- [52] Yamane K, Wachino J, Suzuki S, *et al.* New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3354-3360.

[53] Perichon BP, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2464–2469.

[54] Liu J, Yu-Ting D, Zhen-Ling Z, Jun-Hua G. 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. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2992–2993.

4 ARTIGO I

Enviado para publicação à Revista **Current Microbiology**.

TITLE

Mutant prevention concentration (MPC) of ciprofloxacin against *Salmonella enterica*. of epidemic and poultry origin

AUTHORS

Rafaela Ferrari¹, Marciane Magnani¹, Roberta B. Souza¹, M^a. C. B. Tognim², Tereza Oiveira¹.

¹Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

³Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá.

Abstract The *Salmonella* isolates resistant or with reduced susceptibility to quinolones increased in recent years. The mutant prevention concentration (MPC) is a new alternative that can prevent the selection and multiplication of resistant *Salmonella* spp. strains. The MPC of ciprofloxacin (CipMPC) was evaluated for 312 *Salmonella enterica* strains of epidemic and poultry origin susceptible and resistant to nalidixic acid (NAL). The CipMPC for NAL susceptible strains were in the range from 0.002 to 4 µg/ml and for NAL-resistant strains, it ranged from 0.004 to 16 µg/ml. A NAL-resistant strain, serovar Corvallis, of poultry origin without mutations showed the highest CipMPC value. The lowest value was observed for epidemic NAL-susceptible strains serovars Typhimurium and London. The average MPC/MIC ratio for NAL-resistant strains was higher than NAL-susceptible. *S. Enteritidis* showed the highest CipMPC and the highest MPC/MIC ratio also for NAL-resistant strains and with mutations in *gyrA*. For serovar Typhimurium 0.5 µg/ml was the highest MPC among NAL-susceptible and the lowest among NAL resistant strains. The average MPC/MIC ratio for strains with mutations in Aspartate 87 was higher than that mutated in Serine 83. The results show the importance of MPC in determining the correct dosage of Cip for treatment of *Salmonella* spp.

Key words: Ciprofloxacin, Mutation prevention concentration (MPC), *Salmonella enterica*.

Introduction

Fluoroquinolones (FQs), especially ciprofloxacin, are the drugs of choice for treatment of invasive human infections caused by *Salmonella enterica* [1]. The resistance to these antibiotics, and the reduction of susceptibility, are a public health concern.

Although various foods have been associated with salmonellosis outbreaks, poultry products are the main sources of infection [25]. Foods containing eggs, meats and by-products were the main foods associated with salmonellosis outbreaks occurred in the State of Parana, Brazil, between 1999 and 2008. The serovar Enteritidis was responsible for approximately 85% of these outbreaks [16].

The number of clinical isolates of *Salmonella* spp. resistant to nalidixic acid and with reduced susceptibility to ciprofloxacin increased in recent years [6, 18] and increased minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin may affect the response to clinical treatment [4, 23].

In *Salmonella* spp., the resistance to quinolones is associated with mutations that occur in quinolone resistance determinant regions (QRDR) of *gyrA* and *parC* genes. Other mechanisms such as alteration of the permeability of porins, plasmids and efflux systems can also be determinative to the effectiveness of antimicrobial agents [13].

Mutant strains appear spontaneously in bacterial populations that have around 10^6 to 10^9 colony-forming units (CFU) and may be present even before exposure to antibiotics [13, 11]. The frequency of mutations may increase in conditions that favor the selection of mutants, such as exposure to antimicrobial agents in inadequate treatment and therapeutic failures [2, 24].

The minimum inhibitory concentration (MIC) of an antimicrobial is determined by inoculum containing from 10^4 to 10^5 CFU/ml, considered low to contain subpopulations of resistant mutants present in an infection site. However, the evaluation of the lowest concentration of an antimicrobial agent that prevents the emergence of resistant mutant bacteria (MPC) is performed with an inoculum greater than or equal to 10^{10} CFU / ml. In a way, the MPC can be defined as the MIC of the most resistant bacteria, i.e., those with the highest probability of being resistant mutants.

Values from the MIC are used as standard in susceptibility tests for decades; however, the *in vitro* response observed in MIC does not have 100% of correlation with the *in vivo* results [12]. The determination of the MPC is an alternative that can prevent the increase of resistance, especially for antimicrobials that are concentration-dependent, such as fluoroquinolones. If the serum concentration for an antibiotic is maintained above the MPC,

resistant bacteria are not selected. The interval between the MIC and MPC concentrations, defined as mutant selection window (MSW), is supposedly the interval in which mutants are selected. Thus, the MPC and MSW values indicate the *in vitro* antimicrobial concentrations that favor the selection of resistant mutants [5].

In this study, the MPC of ciprofloxacin was determined for 312 *Salmonella enterica* strains of poultry origin and isolates from patients and foods involved in salmonellosis outbreaks occurred in the state of Parana, Brazil between 1995 and 2006.

Material and methods

***Salmonella* spp. strains**

The epidemic strains were provided by the Central Laboratory of the State of Parana (LACEN, Curitiba, Parana, Brazil) and those of poultry origin were obtained from Avian Health Laboratory accredited by the Brazilian Ministry of Agriculture (MAPA, Brazil). Serotyping was performed at the Laboratory of Enterobacteria, Department of Bacteriology, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. The strains were previously evaluated for resistance to nalidixic acid (NAL) and MIC for Ciprofloxacin (CipMIC) [21]. NAL-resistant and part of NAL-susceptible strains were tested for the presence of point mutations in the QRDR of the *gyrA* gene (Table 1).

Determination of MPC for ciprofloxacin and MPC/MIC ratio

The strains kept at -15°C in brain heart infusion broth (BHI) (DIFCO®) 15% of glycerol were revitalized for 24 h in BHI broth at 35°C. After revitalization, colonies of *Salmonella* spp. were inoculated in 5 ml of Mueller Hinton broth (MHB) and incubated at 37°C for 2h. The bacterial suspension was homogenized in vortex and with the aid of a sterile swab, the inoculum was spread on the surface of a BHI agar plate. After incubation at 35-37°C for 18 to 24 hours, all the bacterial content was transferred to 1 ml of MHB and homogenized in vortex. An aliquot of 100 µl containing a quantity equal to or greater (\geq) than 10^{10} CFU / ml, was spread onto Mueller-Hinton agar plate (MHA) (DIFCO®), containing a Cip concentration of 1 x 2 x 3 x 4 x 5 x 6 x 7 x MIC according CLSI (2006) [3]. The plates were incubated at 37°C for 48h. The MPC was considered as the Cip concentration in which no mutant resistant colonies was recovered [19]. All MPC determinations were performed in duplicate and the bacterial concentration to determine the MPC was confirmed with count of suspension colonies prepared from decimal dilutions in saline solution of the homogenate prepared in MHB.

The relationship between MPC and MIC of Cip was determined by the division of the

MPC values by the MIC values [19]. The range of Cip concentrations between MIC and MPC was defined as a MSW [5].

Results

The 312 *Salmonella enterica* strains evaluated for the CipMPC in this study presented, showed in a previous study, CipMIC values less than 1 µg/ml. Of the strains analyzed, 112 were resistant to NAL [21].

The CipMPC for NAL-susceptible strains ranged from 0.002 to 4 µg/ml and for NAL-resistant strains from 0.004 to 16 µg/ml. Resistant strains tested were prevalent in highest Cip concentrations (Table 1).

The highest CipMPC value was observed for *S. Corvallis*, a NAL-resistant strain of poultry origin without mutations in the QRDR of the *gyrA* gene. The lowest CipMPC was for NAL-susceptible epidemic strains, serovars Typhimurium and London (Table 1).

The highest CipMPC and MPC/MIC ratio for the serovar Enteritidis, which represented 83% of the strains analyzed, were observed in NAL-resistant strains with mutations in *gyrA* gene (Table 1).

The highest CipMPC value found among strains of *S. Typhimurium* NAL-susceptible without mutation in *gyrA* was equal to the lowest CipMPC of NAL-resistant strains mutated in Serine83 (Ser83) (Table 1).

Among the all strains NAL resistant with mutations in Ser83 or Aspartate87 (Asp87), the highest CipMPC observed was 8 µg/ml, exactly twice the highest CipMCP found among *Salmonella* spp. strains NAL susceptible without mutations.

Considering the susceptibility to NAL, the MPC/MIC ratio of NAL-susceptible strains without mutations ranged from 1 to 64, with an average of 21.8. For NAL-resistant strains, it ranged from 2 to 64, with an average of 25.6. The MPC/MIC ratio ranged from 2 to 64 for the strains with mutation in Ser83 or Asp87. Those strains with mutations in Ser83 had an average of 24.5 and for strains mutated in Asp87 it was 26.6.

Table 1. History of *Salmonella enterica* strains of epidemic and poultry origin analyzed in this study with the respective MIC and MPC values and MPC/MIC ratio for ciprofloxacin observed for different serovars.

Serovar	Number of strains	Strains Origin	NAL susceptibility*	Mutation gyrA*	MICcip* (µg/mL)	MPCcip (µg/mL)	Ratio MPC/MIC
Enteritidis	158	Epidemic (156) Poultry ^{ab} (2)	S	No mutation (n=7) NT (151) Ser 83	0.002 - 0.125	0.0156 - 4	2 - 64
Enteritidis	100	Epidemic (91) Poultry (9)	R	(n=28) Asp87 (n=72)	0.0156 - 0.25	0.0156 - 8	8 - 64
Typhimurium	4	Epidemic	S	No mutation (n=4)	0.002 - 0.0312	0.002 - 0.5	1 - 64
Typhimurium	3	Epidemic	R	Ser 83 (n=3)	0.0078 - 0.125	0.5 - 2	8 - 64
Infantis	6	Epidemic	S	No mutation (n=6)	0.004 - 0.008	0.0624 - 0.5	16 - 64
Infantis	1	Epidemic	R	Asp 87	0.008	0.25	32
Newport	5	Epidemic	S	NT	0.002 - 0.004	0.008 - 0.25	4 - 64
Newport	1	Epidemic	R	Asp 87	0.0624	4	64
London	5	Epidemic	S	NT	0.002 - 0.0624	0.002 - 0.25	1 - 32
Derby	5	Epidemic	S	NT	0.002 - 0.008	0.008 - 0.125	4 - 16
Anatum	5	Epidemic (4) Poultry ^c (1)	S	No mutation (n=1) NT (n=4)	0.002 - 0.004	0.004 - 0.125	2 - 32
Heidelberg	1	Epidemic	S	NT	0.008	0.0624	8
Heidelberg	2	Poultry	R	Asp87 (n=2) Asp 87	0.0626 - 0.5	0.5 - 8	8 - 16
Johannesburg	3	Epidemic	R	(n=2) Ser83 (n=1)	0.002 - 0.0624	0.004 - 1	2 - 16
Agona	2	Epidemic	S	NT	0.0624	0.25	8
Panama	2	Poultry ^b	S	No mutation (n=2)	0.004 - 0.008	0.0624 - 0.5	16 - 64
Pomona	2	Epidemic	S	NT	0.002	0.004	2
Corvallis	1	Poultry	R	No mutation (n=1)	0.5	16	32
Bredeney	1	Poultry	R	No mutation (n=1)	0.125	1	8
Saintpaul	1	Epidemic	S	No mutation (n=1)	0.032	0.5	16
Ohio	1	Poultry ^b	S	No mutation (n=1)	0.008	0.5	64
Oranienburg	1	Epidemic	S	No mutation (n=1)	0.0624	2	32
Mbandaka	1	Epidemic	S	NT	0.032	0.032	1
Tennessee	1	Epidemic	S	NT	0.008	0.5	64

* data observed in a previous study of Souza et al. [21] a = fertilized discarded eggs of poultry; b = cloacae swab organs of chicken hens; c = one day old chicken; NT = not tested, n = number of corresponding strains.

Discussion

In the present study, CipMPC values up to 16 µg/ml were observed for *Salmonella enterica* strains. These values are higher than the MPC up to 2 µg/ml reported in other research [17] with strains of poultry origin, and up to 4 µg/ml observed for *Salmonella* strains isolated in veterinary laboratories [19]. However, the results presented here agree with Kehrenberg et al. [15], who also reported 16 µg/ml as the highest CipMPC value for *Salmonella enterica* strains of poultry origin.

The *S. Corvallis* strain showed the highest CipMPC in this study; however, without mutation in Ser83 or Asp87, which are associated with resistance to quinolones and frequently detected in *gyrA* of resistant *Salmonella* spp. strains [9]. For this strain, none mutation it was observed in the sequencing of the QRDR of the *gyrA* gene (GenBank accession no.GQ358015). Another mechanism of resistance to quinolones, like plasmid or efflux pump seems to be involved, since the CipMIC observed for *S. Corvallis* is characteristic of strains with reduced susceptibility [3] (Table 1). It is known that a high expression of efflux pumps can raise two to four times the MIC of fluoroquinolones in *Salmonella* spp. [7] and that reduced ciprofloxacin susceptibility can be related with to the plasmid-encoded [8].

The results show that NAL-resistant strains can bear Cip concentrations of up to four times higher than NAL-susceptible ones, and that NAL-resistant strains have higher CipMPC values. In *Salmonella* spp. the resistance to NAL is related to reduced susceptibility to Cip [9, 15].

In the present study, resistant *S. Enteritidis* strains with mutation in *gyrA* had MPC greater than those of the same serovar susceptible and without mutation. This serovar, prevalent in Brazil and in the Parana state, showed CipMPC values higher than those observed in previous studies. Kehrenberg et al. [15] tested six different *Salmonella* serovars and observed the lowest MPC values for serovar Enteritidis. In the study of Randall et al. [19] the highest MPC from one Enteritidis strain with mutation in Ser83 was lower than the MPC found in this study for NAL-susceptible strains without mutation, which may be a warning of a possible selection of mutant strains.

The difference in the CipMPC results observed between serovar Typhimurium strains without mutation and with mutation in Ser83, agrees with the results of previous study [19], who reported for *S. Typhimurium*, with mutations in Ser83, CipMPC values up to 16 times greater than the strains without mutation in *gyrA*.

The analysis of the MPC/MIC ratio of NAL-resistant and NAL-susceptible strains in this study shows MSW higher in NAL-resistant strains agreeing with the results observed by

Randall et al. [19]. The highest average MPC/MIC ratio was found for strains with mutations in codon Asp87. Kehrenberg et al. [15] also found a higher MPC/MIC ratio for a *S. Paratyphi* strain mutated in Asp87.

The highest MSW found between *S. Enteritidis* strains was four times higher than the MSW observed by Kehrenberg et al. [15] and eight times higher than that reported by Randall et al. [19] for strains of the same serovar with and without mutation in *gyrA* gene. Considering only strains with mutations in *gyrA*, the lowest MSW observed in this study was twice the highest MSW reported by Randall et al. [19] for *S. Enteritidis* with mutation. These results warning again about possible selection of *S. Enteritidis* mutant strains.

MPC and MSW provide new bases to the pharmacokinetics and pharmacodynamics. As the concept of the MPC, the antimicrobial agent should remain as long as possible at concentrations above the MPC value in the target site and the shortest time as possible at MSW concentrations during treatment [10]. For effectiveness of treatment with Cip, the serum levels achieved in the human body should be considered, since this antimicrobial agent acts in a concentration-dependent manner. Thus, the maximum serum concentration (C_{max}) and area under the curve (AUC) are crucial for its effectiveness, being essential to achieve substantial Cip concentrations at the site of infection [12]

There are reports of Cip C_{max} of 7.5 $\mu\text{g/ml}$ on the fifth day of treatment [20], serum concentrations ranging from 3 to 11.1 $\mu\text{g/ml}$ after one hour of drug administration [14] and serum concentration of 4.8 $\mu\text{g/ml}$ on average after 72h of treatment [22]. From these Cip concentrations the average found was 6.6 $\mu\text{g/ml}$ and this Cip-value would not be enough to suppress the selection of resistant mutants, considering the CipMPC values found for *Salmonella* spp. in the present study. According to Giraud et al. [10], *Salmonella* spp. strains susceptible to Cip with MPC of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ would probably be eradicated *in vivo*. However, for strains with CipMIC of 0.0624 $\mu\text{g/ml}$ and MPC of 8 $\mu\text{g/ml}$, the *in vivo* response would possibly fail. There are reports of treatment failures with FQs in patients infected with *Salmonella* spp. strains presenting CipMIC between 0.06 $\mu\text{g/ml}$ and 2 $\mu\text{g/ml}$ [19].

Some years ago, it was suggested that it could be the time for changes in the breakpoints of FQs for the genus *Salmonella* [1]. The results presented here reinforce this idea and demonstrate the importance of the MPC in preventing the development of FQs resistance to *Salmonella* spp. However pharmacokinetics and pharmacodynamics parameters should be considered to analyze the *in vitro* Cip response, so that the *in vivo* results could actually help in preventing the selection of resistant mutant *Salmonella* spp. strains.

Acknowledgments

The authors would like to thank Central Laboratory of the Parana State, Brazil and the Bacteriology Department of Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro State, Brazil. To CNPq for financial support in the form of doctorate scholarship of FRG and MM.

References

1. Aarestrup FM, Hasman H, Olsen L, G. Sorensen (2004) International spread of bla (CMY-2) mediated cephalosporin resistance in a multiresistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolate stemming from the importation of a boar by Denmark from Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 48(5):1916-1917
2. Blondeau JM (2004) Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv Ophthalmol* 49(2):73-78
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Sixteenth Informational Supplement, Document M100-S16, Wayne PA.
4. Crump JA, Barret TJ, Nelson JT, Angulo FJ (2003) Reevaluating Fluoroquinolone Breakpoints for *Salmonella enterica* Serotype Typhi and for Non-Typhi Salmonellae. *Clin Infectious Dis* 37(1):75-81
5. Drlica K (2003) The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 52:11-17
6. Escribano I, Rodríguez JC, Cebrian L, Royo G (2004) The importance of active efflux systems in the quinolone resistance of clinical isolates of *Salmonella* spp. *Int J Antimicrob Agents* 24(5):428-432
7. Feuerriegel S, Heisig P (2008) Role of Global Regulator Rma for Multidrug Efflux-Mediated Fluoroquinolone Resistance in *Salmonella*. *Microbiol Drug Res* 14(4):259-263
8. Gay F, Robicsek A, Strahilevitz J et al (2006) Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Non-Typhi Serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin Infect Dis* 43:297-304
9. Giraud E, Baucheron S, Cloeckaert A (2006). Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes and Infection* 8: 1937-1944
10. Giraud E, Brisabois A, Martel JL, Chaslus-Dancla E (1999). Comparative studies of mutation in animal isolates and experimental in-vitro and in-vivo selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counter selection of highly fluoroquinolones-resistant strains in the field. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2131-2137

11. Hawkey PM (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemother* 51:29-35
12. Hesje CK, Tillotson GS, Blondeau JM (2007) MICs, MPCs and PK/PDs: a match (sometimes) made in hosts. *Expert Rev Respir Med* 1:7-16
13. Hooper DC (2001) Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 7:337-341
14. Jones EM., McMullin CM, Hedges AJ et al. (1997) The pharmacokinetics of intravenous ciprofloxacin 400 mg 12 hourly in patients with severe sepsis: the effect of renal function and intraabdominal disease. *J Antimicrob Chemother* 40:121-124
15. Kehrenberg C, de Jong A, Friederichs S et al. (2007) Molecular mechanisms of decreased susceptibility to fluoroquinolones in avian *Salmonella* serovars and their mutants selected during the determination of mutant prevention concentrations. *J Antimicrob Chemother* 59(5):886-892.
16. Kottwitz LBM, Oliveira TCRM, Alcocer I et al. (2010) Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum*. DOI: 10.4025/actascihealthsci.v32i1.6340
17. Pasquali F, Manfreda G (2007) Mutant prevention concentration of ciprofloxacin and enrofloxacin against *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Vet Microbiol* 119:304-310
18. Paterson DL (2006) Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Med* 119(6):20-28
19. Randall LP, Cooles SW, Piddock LJ, Woodward MJ (2004) Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin and enrofloxacin for *Salmonella enterica*. *J Antimicrob Chemother* 54:688-691
20. Shah A, Lettieri J, Blum R et al. (1996) Pharmacokinetics of intravenous ciprofloxacin in normal and renally impaired subjects. *J Antimicrob Chemother* 38:103-116.
21. Souza RB, Ferrari RG, Magnani M et al. (2010) Ciprofloxacin susceptibility reduction of *Salmonella* strains isolated from outbreaks. *Braz J Microbiol In press*
22. Varela JE, Cohn SM, Brown M et al. (2000) Pharmacokinetics and burn eschar penetration of intravenous ciprofloxacin in patients with major thermal injuries. *J Antimicrob Chemother* 45:337-342
23. Zhang Q, Sahin O, Mcdermott PF, Payot S (2006) Fitness of antimicrobial-resistant *Campylobacter* and *Salmonella*. *Microbes and Infection* 8:1972-1978
24. Zhao X, Drlica K (2001) Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis* 33:147-56

25.WHO Global Salm-Surv (2006) Progress report (2000-2005): building capacity for laboratory-based foodborne disease surveillance and outbreak detection and response.

5 ARTIGO II

TÍTULO

MUTAÇÕES NOS GENES DAS TOPOISOMERASES E RESISTÊNCIA MEDIADA POR PLASMÍDEOS (PMRQ) EM CEPAS BRASILEIRAS DE *Salmonella* spp. EPIDÊMICAS E DE ORIGEM AVÍCOLA

AUTORES

Rafaela Ferrari¹, Rosa Cremades², Antonio Galiana², Juan Carlos Rodríguez², Marciane Magnani¹, M^a C.B. Tognim³, Tereza C.R.M. Oliveira¹, Gloria Royo².

¹Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

²Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario de Elche. Universidad Miguel Hernández. Camí de l'almàssera, nº 11, 03203 Elche, Spain.

³Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá.

INTRODUÇÃO

As salmoneloses são reconhecidas como causa comum de doenças transmitidas por alimentos (DTA) e representam um grave problema de saúde pública (WHO, 2006). As fluoroquinolonas (FQs), especialmente a ciprofloxacina, são os agentes mais utilizados no tratamento da salmonelose invasiva em humanos e animais. Como se sabe, além do uso das FQs nas medicinas humana e veterinária, elas também são usadas indiscriminadamente na produção animal. Porém, a utilização cada vez mais freqüente das FQs pode facilitar a seleção de estirpes de *Salmonella* spp. resistentes bem como reduzir a susceptibilidade de tal microrganismo a essa classe de antimicrobianos (Cui, et al., 2009). Por isso, é preciso ressaltar que, apesar de dos pontos de corte estabelecidos pelo CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2008) em que a maioria das cepas de *Salmonella* spp. são classificadas como sensíveis às FQs, o número de isolados clínicos com sensibilidade reduzida ou resistentes a esses compostos tem aumentado nos últimos anos (Rossiter et al. 2002; Ercis, et al. 2006, Escribano, et al. 2004, Kownhar, et al. 2007, Mushtaq, et al., 2002).

As FQs atravessam a membrana citoplasmática e agem sobre as topoisomerase II (DNA girase) e topoisomerase IV, induzindo, dessa forma, a morte celular. As mutações na região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) dos genes *gyrA* e *parC* são as responsáveis pela resistência das bactérias Gram-

negativas a essas drogas. A resistência se deve à alteração do sítio de ligação do antibiótico com a DNA-girase, principal alvo de ação das FQs. No caso de *Salmonella* spp., as mutações recém referidas podem gerar resistência ao ácido nalidíxico (NAL) bem como reduzir a sensibilidade às FQs, como a ciprofloxacina.

Especificamente com relação às mutações nas topoisomerasas, as alterações mais comuns na QRDR do gene *gyrA* de *Salmonella* spp. resistentes ao NAL ocorrem nos códons correspondentes a Serina 83 (Ser 83) e Ácido aspártico 87 (Asp 87). Nesses casos, são mais freqüentes as substituições no códon Ser 83→Tir/Phe/Ala e no códon Asp 87→ Gly/Asn/Tyr (Hopkins et al., 2005). Ainda há outras possibilidades desse tipo de resistência, nomeadamente mutações em *gyrB*, *parC* e *parE*. Para *Salmonella* spp., porém, estas últimas mutações ocorrem em menor freqüência do que as mutações em *gyrA* (Hansen e Heisig, 2003).

Além das mutações nas topoisomerasas, outros mecanismos associados à baixa susceptibilidade ou à resistência as FQs podem ocorrer. Tais mecanismos são os seguintes: a super-expressão de bomba de efluxo AcrAB-TolC; a modificação na regulação das porinas; e, finalmente, a presença de genes plasmidiais de resistência (PMQR).

Estudos publicados nas últimas décadas sugerem que o mecanismo PMQR merece especial atenção (Robicsek, et al. 2006). De fato, já são conhecidos ao menos três tipos de transferências gênicas. São elas: *qnr*, aminoglicosídeo acetiltransferase (*aac(6')-Ib-cr*); e QepA (Robicsek, et al. 2006, Yamane, et al., 2007).

O gene *qnrA*, detectado pela primeira vez em *Klebsiella pneumoniae*, codifica uma proteína de 218 aminoácidos. Essa proteína pertence a uma família de pentapeptídeos que protege a DNA-girase e topoisomerase IV da ação das quinolonas, incluindo as FQs (Martinez-Martinez, et al. 1998, Tran, et al., 2005). Até o momento, sabe-se que o gene *qnr* pode codificar as seguintes proteínas: QnrA, com 6 variantes, de QnrA1 a QnrA6; QnrB, com 20 variantes, de QnrB1 a QnrB20; e QnrS, com 3 variantes, de QnrS1 a QnrS3. Também foram identificadas as proteínas QnrVC, QnrC e QnrD, que não têm variantes conhecidas até o momento (Cavaco e Aarestrup, 2009, Fonseca, et al. 2008, Wang, et al., 2009).

Em *K. pneumoniae* ainda foi descrito um outro mecanismo de PMQR. Tal mecanismo usa o aminoglicosídeo acetiltransferase (*aac(6')-Ib-cr*) para induzir o aparecimento de bactérias resistentes. Por meio da variante *cr* de *aac(6')-Ib* se codifica um aminoglicosídeo acetiltransferase que confere susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina por N-acetilação do amino piperazinil. O gene *aac(6')-Ib-cr* possui

substituições nos códons 102 e 179. Essas substituições permitem a acetilação do gene, o que, por sua vez, reduz a atividade das FQs (Robicsek, et al., 2006). Isolado em diferentes gêneros da família *Enterobacteriaceae*, o gene *aac(6')-Ib-cr* ainda não foi descrito em cepas de *Salmonella* spp. com susceptibilidade reduzida ou resistentes às FQs (Cui, et al., 2009).

O objetivo deste estudo foi o de verificar a presença de mutações na QRDR dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, e *parE*, assim como detectar a presença dos genes *qnr* e *aac(6')-Ib-cr* em cepas de *Salmonella* spp. de origem epidêmica e avícola.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas de *Salmonella* spp. Cento e vinte e seis cepas de *Salmonella* spp. de origem epidêmica (alimentar e paciente) e avícola, isoladas entre 1999 e 2007 no estado do Paraná, Brasil foram avaliadas. As cepas foram cedidas pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN, Curitiba, Paraná) sorotipadas pela Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil). A resistência ao NAL e a concentração inibitória mínima para ciprofloxacina (CipMIC) foram previamente avaliados por Souza et al. (2009). Cento e doze cepas (88,8%) foram resistentes ao NAL e 29 (23,01%) apresentaram susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina (MIC 0,125µg/ml a 0,5µg/ml) (Souza et al. 2009).

Quanto à origem, 114 eram epidêmicas e 12 avícolas. As cepas foram mantidas a -15°C em caldo Brain-Heart Infusion (BHI) (Difco ®), com 15% de glicerol. reduzida à ciprofloxacina (MIC 0,125µg/ml a 0,5µg/ml) (Souza et al. 2009).

Isolamento, Amplificação e Seqüenciamento de DNA. As cepas foram cultivadas durante à noite em ágar BHI (DIFCO ®) a 37°C. O isolamento de DNA foi realizado pela utilização de Chelex-100 a 10%. Para identificação de genes PMQR (*qnrA*, *qnrB1*, *qnrB5*, *qnrB19*, *qnrS1*, *qnrC*, *qnrD* alelos e *aac (6')-Ib cr*), o DNA isolado foi amplificado de acordo com o processo descrito por Gay et al., 2006; Cavaco e Aarestrup, 2009; WANG et al., 2009. Por sua vez, a QRDR dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, e *parE* foi amplificada seguindo o método descrito por EAVES et al. (2004). Os produtos de PCR foram seqüenciados pelo laboratório Macrogen (Seoul, Coréia do Sul).

Análise das Seqüências. As seqüências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando o sistema de busca BLAST.

Análise Estatística. Os resultados foram analisados pelo programa SPSS 18.0. A média geométrica (MGM) das CipMICs foram calculadas pela fórmula: $\sqrt[n]{y_1 y_2 y_3 \dots y_n}$, onde y , representa o CipMIC individual de cada cepa, e n , o número de CipMIC utilizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Susceptibilidade às quinolonas e estudo das mutações nos genes das topoisomerasas.

Em *Salmonella* spp., mutações no gene *gyrA*, geralmente no codon 83 e 87 e no gene *parC* são os mecanismos de resistência mais comuns (Cui, et al., 2009, Eaves, et al., 2004, Levy, et al., 2004, Piddock, 2002).

A região QRDR do gene *gyrA* de *Salmonella* spp. corresponde aos códons que vão desde Alanina 67 a Glutamina 106. Cepas resistentes ao NAL possuem maior frequência de mutações nos códons Serina 83 e Ácido aspártico 87. Quando há o envolvimento concomitantemente de mutações nestes dois códons, geralmente as cepas de *Salmonella* spp. apresentam resistência às FQs (Hopkins, et al., 2005, Seminati, et al., 2005).

Dentre as 126 cepas de *Salmonella* spp. analisadas no presente trabalho, 14 (11,1%) foram susceptíveis ao NAL e não apresentaram mutações na QRDR do *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*. Estes resultados sugerem que a sensibilidade ao NAL serve como um bom método fenotípico de separação de cepas com e sem mutação nas QRDR. Recentemente, Cavaco e Aarestrup (2009) também observaram através da determinação da MIC para o NAL uma clara separação entre cepas susceptíveis e cepas com uma ou múltiplas mutações na região QRDR.

Na avaliação das 112 cepas resistentes ao NAL, 60 (53,57%) e 13 (11,60%) cepas apresentaram, respectivamente, uma e duas mutações no *gyrA*. Por outro lado, em 39 (30,9%) cepas não foram observadas mutações nesse gene. Das 13 cepas resistentes ao NAL com duas mutações no *gyrA*, somente uma, pertencente ao sorovar Enteritidis, foi sensível à ciprofloxacina (MIC 0,064 µg/mL). As demais, 11 cepas S. Enteritidis e uma S. Johannesburg, apresentaram susceptibilidade reduzida para esta FQ (MIC ≥ 0,125 µg/mL). Porém, susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina também foi observada em nove das 39 cepas NAL resistentes sem mutação no gene *gyrA*. Resultados semelhantes foram relatados por Cavaco e Aarestrup (2009) que também observaram suscetibilidade reduzida ou resistência a

esse antibiótico em cepas sem mutação no *gyrA*.

A média geométrica (MGM) da CipMIC das 73 cepas com mutação no *gyrA* foi 0,10 µg/mL, mostrando diferença significativa da MGM de 0,06 µg/mL encontrada para as 53 cepas sem mutação.

Embora de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI grande parte dos isolados de *Salmonella* spp. sejam considerados sensíveis às fluoroquinolonas (Dimitrov, *et al.*, Giraud, *et al.*, 2006, Gunell, *et al.*, 2009; SOUZA *et al.* 2010), um crescente aumento da incidência de cepas com a sensibilidade reduzida a esta classe de antimicrobianos tem sido reportada incluindo-se caso de falhas terapêuticas (Aarestrup, *et al.*, 2003, Crump, *et al.*, 2003, Ricci and Piddock, 2009, Vashist, *et al.*, 2009). Em nossos isolados, nenhuma cepa foi considerada resistente pelos critérios estabelecido pelo CLSI para Enterobactérias. Entretanto, comprovamos neste estudo que 73 das 126 cepas estudadas apresentaram ao menos uma mutação, mesmo mostrando-se sensível fenotipicamente. Esse fato mostra que poderia ocorrer falha terapêutica em caso do tratamento de infecções causadas por essas cepas.

Todas as cepas com mutações analisadas neste trabalho apresentaram substituições restritas à QRDR do gene *gyrA*, especificamente nos códons Ser 83, Asp 87 e Gly 131 (Tabela 1), concordando com o relatado em diversos estudos anteriores (Levy, *et al.*, 2004; Giraud, *et al.*, 2006; Cavaco e Aarestrup 2009).

Quarenta e uma cepas apresentaram mutação no códon Ser 83, sendo que em 19 cepas a substituição foi por tirosina (Tyr) e em 22 por fenilalanina (Phe). Em relação às substituições no codon Asp 87, 31 cepas apresentaram substituição por asparagina (Asn), 9 por Tyr e 4 por glicina (Gly). Somente uma cepa apresentou substituição no códon Ala 131 por glicina

Tabela 1. Distribuição das mutações observadas na QRDR do gene *gyrA* de cepas de *Salmonella* epidêmicas e de origem avícola de diferentes sorovares, com CipMIC correspondente e MGM correspondente.

Sorovar	Mutação	n ^o isolados	CipMIC ^a (µg/ml)	MGM ^b (µg/ml)
Enteritidis	Ser 83→Tyr	12	0,064 a 0,500	0,102
	Ser 83→Phe	14	0,064 a 0,250	0,082
	Asp 87→Asn	20	0,032 a 0,064	0,052
	Asp 87→Tyr	4	0,032 a 0,064	0,058
	Asp 87→Gly	2	0,032	0,032
	Ser 83→Thy/Asp 87→Gly	1	0,125	0,125
	Ser 83→Thy/Asp 87→Asn	3	0,125 a 0,250	0,220
	Ser 83→Phe/Asp 87→Asn	4	0,064 a 0,125	0,105
	Ser 83→Phe/Asp 87→Gly	1	0,125	0,125
	Ser 83→Phe/Asp 87→Tyr	2	0,125	0,125
	Ala 131→Gly/Asp 87→Tyr	1	0,125	0,125
Typhimurium	Ser 83→Tyr	1	0,125	0,125
	Asp 87→Asn	1	0,125	0,125
Johannesburg	Asp 87→Tyr	2	0,064	0,064
	Ser 83→Tyr/Asp 87→Asn	1	0,125	0,125
Heidelberg	Ser 83→Tyr	1	0,500	0,500
	Asp 87→Asn	1	0,064	0,064
Infantis	Ser 83→Phe	1	0,064	0,064
Newport	Asp 87→Asn	1	0,064	0,064

^aSouza et al. 2009; ^bmédia geométrica.

As substituições observadas no gene *gyrA* das cepas epidêmicas isoladas de material biológico humano e de alimentos, assim como, as cepas de origem avícola avaliadas (Ser 83→Tyr/Phe; Asp 87→Asn/Tyr/Gly e Ala 131→Gly) já foram descritas anteriormente (Cui, et al., 2009, Eaves, et al., 2004, Levy, et al., 2004). Giraud, et al., (2006) relataram substituições por Tyr, Phe e Ala no códon Ser 83, e Asn, Gly, Tyr ou Lys no códon Asp 87 em cepas de *Salmonella* spp. de origem humana e animal. Ribeiro (2007) estudou cepas de *Salmonella* spp. de origem avícola resistentes ao NAL e encontrou substituições do tipo Gly 81→Asp, Asp 82→Asn, Ser 83→Phe e Asp 87→Tyr/Asn.

Em nossos isolados, tanto cepas epidêmicas, como de origem avícola apresentaram mutações, porém, uma relação direta entre a origem das cepas e o tipo de mutação não pode ser estabelecido. Entretanto, entre as cepas isoladas de alimentos, foi verificado um predomínio da mutação Ser83→Phe e Asp87→Asn, já em relação às cepas isoladas de pacientes, as mutações mais prevalentes foram Ser83→Tyr e Asp87→Asn e para as de origem aviária Ser 83→Tyr e Asp 87→Gly (Figura 1).

A relação entre o tipo de mutação e a origem das cepas tem sido verificada

por vários autores que em sua maioria tentam associar a origem das destas ao tipo de mutação (SEPUTIENE, 2006; Saenz, *et al.* 2003; Walker, *et al.*, 2001; Liebana, *et al.*, 2004; Izumiya, *et al.*, 2005). Entretanto, o que realmente tem sido verificado é apenas uma tendência à associação, como também observamos em nosso estudo.

A esse respeito, uma provável resposta à diversidade de resultados em relação ao tipo de mutação e a origem de isolamento foi sugerida por Levy, *et al.*, (2004). O referido autor sugere que provavelmente essas cepas possuem erros em seus genes MMR (Mismatch Repair). Tal genes codificam proteínas que monitoram o DNA recém formado, identificando e reparando erros que ocorrem aleatoriamente com o crescimento e divisão celular (Gruber & Kohlmann, 2003).

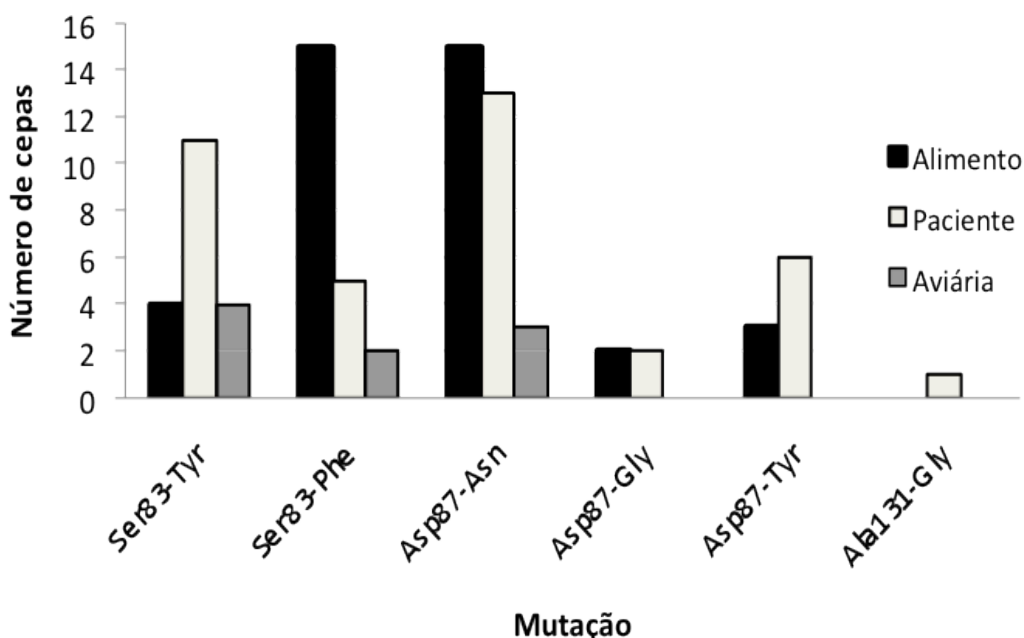


Figura 1. Distribuição das mutações do gene *gyrA* em relação à origem das cepas

Tanto as posições das mutações como o tipo de substituição encontradas neste trabalho diferiram em relação ao sorovar. Mutações Asp 87→Gly e Ala 131→Gly foram encontradas em cinco cepas, apenas no sorovar Enteritidis; Asp 87→Tyr em nove cepas (sete Enteritidis e duas Johannesburg), enquanto que, Asp 87→Asn estiveram presentes em 31 cepas, pertencentes a 5 diferentes sorovars. Para o sorovar Enteritidis, o qual abrangeu 50,8% das cepas analisadas, prevaleceram as mutações em Asp 87. Fato esse em concordância com os resultados reportados por Soto *et al.* (2003), que ao analisarem cepas desse sorovar encontraram maior frequência de mutação no códon Asp 87.

Dados de que mutações nos códons Ser 83 e Asp 87 não são distribuídos igualmente entre sorovares de *Salmonella* já foram relatados por Giraud, *et al.*, (1999). Esses autores observaram maior frequência de mutações no códon Ser 83 para os sorovares Newport, Virchow e Typhimurium, enquanto que a mutação em Asp 87 prevaleceu para sorovares Hadar e Kottbus. Em outro estudo, Ling *et al.* (2003) relataram que *S. Typhimurium* foi o único sorovar com mutações simultâneas em *parC* e *parE*. Contudo este sorovar não apresentou mutação em *parC* do tipo Tyr 57→Ser, sendo esta mutação comum em sorovars como Agona, Derby, Indiana, Panama, Reading, e Stanley. Seminati, *et al.* (2005) encontraram substituições Asp 87→Tyr somente no sorovar Enteritidis (duas cepas), Ser 83→Tyr apenas no sorovar Anatum (três cepas), e no sorovar Virchow Ser 83→Phe (cinco cepas).

A ocorrência de mutações no códon Ser 83 é considerada importante para o desenvolvimento da resistência às FQs (Piddock, *et al.*, 1998, Weigel, *et al.*, 2002, Weigel, *et al.*, 1998). Os resultados do presente trabalho corroboram com essa opinião. As cepas com mutação em Ser 83 apresentam CipMIC mais elevados (MGM = 0,13 µg/mL) quando comparadas as cepas com mutação em Asp 87 (MGM = 0,061 µg/mL). Dados semelhantes de associação entre mutações em Ser 83 e Asp 87 e níveis diferentes de resistência às FQs foram descritos por Ling, *et al.* (2003). Giraud, *et al.* (2006) também observaram diferentes níveis de suscetibilidade às FQs para cepas com mutações nos códons 83 e/ou 87. Esses pesquisadores consideram que a diferença de susceptibilidade pode estar relacionada a mecanismos adicionais de resistência, assim como, a diferentes tipos de substituições no mesmo códon, fato que podem alterar a ligação das quinolonas ao complexo DNA-girase.

Embora demonstrado importante relação entre mutações nos genes das topoisomerasas e resistência às quinolonas, no presente estudo 39 cepas resistentes ao NAL não apresentaram mutação na QRDR dos quatro genes estudados. Supostamente, a resistência ao NAL para estas cepas deve-se a outro mecanismo de resistência bacteriana. Um exemplo disso poderia ser a presença de gene plasmidial *qnr*, alteração da permeabilidade de porina ou efluxo ativo (Giraud, *et al.*, 2006, Randall, *et al.*, 2004, Ricci and Piddock, 2009, Seminati, *et al.*, 2005).

Atualmente sabe-se que a resistência às quinolonas pode também ocorrer na ausência de mutações em *gyrA*. Nath e Maurya (2010) isolaram cepas de *Salmonella* spp. sem mutação no QRDR do *gyrA*, porém resistentes a ciprofloxacina. Da mesma forma que Gunell *et al.* (2009) observaram CipMIC 0,5 µg/mL para uma cepa de *S. Typhimurium* sem mutação na QRDR de *gyrA*. Mais recentemente, uma

cepa de *S. Rissen* com uma mutação no gene *parC*, isolada na China, mostrou resistência à ciprofloxacina sem o envolvimento de outro mecanismo de resistência já descrito para quinolonas (Cui, et al., 2009).

Uma outra questão a ser reavaliada é se o tamanho da região QRDR geralmente analisada cobre todos os códons envolvidos na resistência às quinolonas. Capoor et al. (2009), Crump et al. (2003) e Friedman *et al.* (2001) sugeriram a ampliação da região QRDR do gene *gyrA*, uma vez que mutações em regiões fora do domínio QRDR associadas a resistência à quinolonas já foram observadas.

PMQR

No presente estudo, os genes plasmidiais *qnrA1 qnrB19* foram detectados. O primeiro foi detectado em uma cepa do sorovar Enteritidis com CipMIC 0,062 ug/ml (GenBank número de acesso GU731067), e o segundo em uma cepa do serovar Corvallis, com CipMIC de 0,5 ug/ml (GenBank número de acesso GU731069).

A incidência de PMQR tem sido mundialmente relatada (Cattoir, *et al.*, 2007, Cheung, *et al.*, 2005, Cui, *et al.*, 2008, Robicsek, *et al.*, 2006, Seo, *et al.*, Taguchi, *et al.*, 2009, Wang, *et al.*, 2008). Entretanto, no Brasil, a real prevalência de PMQR é pouco conhecida. Relatos de isolamento dos genes *qnrA1, qnrB2, qnrB8, qnrVC1, qnrVC2* em *Vibrio cholerae* O1, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* têm sido reportados (Castanheira, *et al.*, 2007, Fonseca, *et al.*, 2008, Minarini, *et al.*, 2008, Pereira, *et al.*, 2007). Contudo, essa é a primeira descrição de isolamento do gene *qnrB19* no Brasil.

Existem diversos relatos de genes *qnr* em cepas de *Salmonella* spp. susceptíveis ou com suscetibilidade reduzida a ciprofloxacina. Cavaco et al. 2007 isolaram genes *qnrA* ou *qnrS* em de *Salmonella* spp. resistentes ou com sensibilidade intermediária ao NAL. Entretanto, essas cepas não possuíam quaisquer mutações nas topoisomerasas e apresentavam susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina. Em outro trabalho, Gay *et al.* (2006) identificaram os genes *qnrB2, qnrB5, qnrS1* e *qnrS2* em cepas de *Salmonella* spp. também com suscetibilidade reduzida ciprofloxacina. Recentemente Cui et al., 2009 encontraram genes *qnrS2, qnrA* e *qnrB6* em isolados de *Salmonella* spp. susceptíveis a ciprofloxacina. O gene *qnrB19*, isolado pela primeira vez no Brasil em *Salmonella* spp., foi recentemente identificado na Holanda por Garcia-Fernandez et al. (2009) em duas cepas de *S. Typhimurium* que apresentavam susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina.

Uma das cepas com *qnr* isolada no presente estudo foi sensível a ciprofloxacina (MIC = 0,064 µg/mL) e a outra apresentou susceptibilidade reduzida a esse antimicrobiano (MIC = 0,5 µg/mL) CLSI, (2008). Conforme Cavaco and Aarestrup, (2009), Jacoby, *et al.*, (2003), Li, (2005), Zhao, *et al.* (2010), a presença deste gene confere baixo nível de resistência a ciprofloxacina, porém facilita o desenvolvimento de mutações na região QRDR do gene *gyrA*. Por outro lado, Chong *et al.* (2010) e Jacoby *et al.* (2003) relatam que o aumento da resistência às FQs em consequência de genes *qnr* pode reduzir a utilização clínica desta classe de antimicrobianos. De fato, o nível exato do envolvimento de genes plasmidiais na resistência às FQs ainda é pouco conhecido quando comparado ao conhecimento consolidado de outros mecanismos de resistência (Jacoby, *et al.*, 2009).

No Brasil, este é o primeiro trabalho que relata o isolamento de genes PMQR em *Salmonella* spp. Os resultados demonstram que os genes isolados de PMQR não geraram resistência a ciprofloxacina. Porém, mesmo evidenciando isso, uma das cepas apresentou menor susceptibilidade a esse antibiótico. A sensibilidade ao NAL demonstrou ser um bom método fenotípico de separação de cepas com e sem mutação nas QRDR, servindo como método de triagem rápido e eficaz entre cepas mutadas e não mutadas. Outro relevante fato foi a presença de dupla mutação no gene *gyrA* em treze cepas resistentes ao NAL que não apresentavam resistência à ciprofloxacina. Tal resultado sugere que a presença de dupla mutação não foi um fator determinante na resistência a este antibiótico. Os resultados também alertam para o fato preocupante em relação às mutações no sorovar Enteritidis, o mais prevalente no Brasil. Nota-se a necessidade de uma séria abordagem integrada entre as classes médica e veterinária para que haja um controle efetivo da resistência nesse microrganismo. Portanto, os mecanismos que levam bactérias entéricas zoonóticas, como o caso de *Salmonella* spp., devem continuar a serem monitorados. Somente assim, se conseguirá evitar o aumento do surgimento e seleção de cepas com susceptibilidade reduzida ou resistentes as FQs. Deste modo, será possível a tomada preventiva de decisões corretas para que se continue tendo um efetivo uso terapêutico dessa classe antibiótico.

Agradecimentos

Agradecemos a Dra. Lina Cavaco, pertencente ao *Research Group for Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiology*, de Copenhagen/Dinamarca, pela concessão dos controlos positivos dos genes *qnrA*, *qnrB1*, *qnrB5*, *qnrS1*, *qnrC*, *qnrD* and *aac(6')Ib-cr*. A Marcelo Moreschi, pela revisão, correção e preciosas sugestões referentes ao texto. Ao CNPq e Capes, pelo apoio financeiro concedido às alunas Rafaela Ferrari e Marciani Magnani.

Bibliografia

- Aarestrup, F. M., Wiuff, C., Molbak, K., and Threlfall, E. J. 2003. Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for salmonella spp.? *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 827-829.
- Alós, J. Quinolonas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, v. 21, p. 261 – 268, 2003.
- Angulo, F. J.; Nunnery, J. A.; Bair, H. D. 2004. Antimicrobial resistance in zoonotic enteric pathogens. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, v. 23, n. 2, p. 485 – 496.
- Brugueras, M. C.; García, M. M.; Díaz, R. S. Actualidad de las quinolonas. *Revista Cubana de Farmacología*, v. 39, n. 1, 2005.
- Capoor, M. R., Nair, D., Walia, N. S., Routela, R. S., Grover, S. S., Deb, M., Aggarwal, P., Pillai, P. K., and Bifani, P. J. 2009. Molecular analysis of high-level ciprofloxacin resistance in salmonella enterica serovar typhi and s. Paratyphi a: Need to expand the qdr region? *Epidemiol Infect.* 137, 871-878.
- Castanheira, M., Pereira, A. S., Nicoletti, A. G., Pignatari, A. C., Barth, A. L., and Gales, A. C. 2007. First report of plasmid-mediated qnrA1 in a ciprofloxacin-resistant escherichia coli strain in latin america. *Antimicrob Agents Chemother.* 51, 1527-1529.
- Cattoir, V., Weill, F. X., Poirel, L., Fabre, L., Soussy, C. J., and Nordmann, P. 2007. Prevalence of qnr genes in salmonella in france. *J Antimicrob Chemother.* 59, 751-754.
- Cavaco, L. M. and Aarestrup, F. M. 2009. Evaluation of quinolones for use in detection of determinants of acquired quinolone resistance, including the new transmissible resistance mechanisms qnra, qnrb, qnrs, and aac(6')Ib-cr, in escherichia coli and salmonella enterica and determinations of wild-type distributions. *J Clin Microbiol.* 47, 2751-2758.
- Cavaco, L. M., Hansen, D. S., Friis-Moller, A., Aarestrup, F. M., Hasman, H., and Frimodt-Moller, N. 2007. First detection of plasmid-mediated quinolone resistance (qnra and qnrs) in escherichia coli strains isolated from humans in scandinavia. *J Antimicrob Chemother.* 59, 804-805.
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S., and Aarestrup, F. M. 2009. Qnrd, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in salmonella enterica serovar kentucky and bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, 603-608.
- Cavaco, L. M., Hendriksen, R. S., and Aarestrup, F. M. 2007. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrs1 detected in salmonella enterica serovar corvallis strains isolated in denmark and thailand. *J Antimicrob Chemother.* 60, 704-706.
- Cheung, T. K., Chu, Y. W., Chu, M. Y., Ma, C. H., Yung, R. W., and Kam, K. M. 2005. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of salmonella enterica serotype enteritidis in hong kong. *J Antimicrob*

- Chemother.* 56, 586-589.
- 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., and Kim, Y. S. Bloodstream infections caused by qnr-positive enterobacteriaceae: Clinical and microbiologic characteristics and outcomes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 67, 70-77.
- Crump, J. A., Barrett, T. J., Nelson, J. T., and Angulo, F. J. 2003. Reevaluating fluoroquinolone breakpoints for salmonella enterica serotype typhi and for non-typhi salmonellae. *Clin Infect Dis.* 37, 75-81.
- Cui, S., Li, J., Sun, Z., Hu, C., Jin, S., Guo, Y., Ran, L., and Ma, Y. 2008. Ciprofloxacin-resistant salmonella enterica serotype typhimurium, china. *Emerg Infect Dis.* 14, 493-495.
- Cui, S., Li, J., Sun, Z., Hu, C., Jin, S., Li, F., Guo, Y., Ran, L., and Ma, Y. 2009. Characterization of salmonella enterica isolates from infants and toddlers in wuhan, china. *J Antimicrob Chemother.* 63, 87-94.
- Dimitrov, T., Dashti, A. A., Albaksami, O., and Jadaon, M. M. Detection of mutations in the gyra gene in fluoroquinolone resistance salmonella enterica serotypes typhi and paratyphi a isolated from the infectious diseases hospital, kuwait. *J Clin Pathol.* 63, 83-87.
- Dionisi, A. M., Lucarelli, C., Owczarek, S., Luzzi, I., and Villa, L. 2009. Characterization of the plasmid-borne quinolone resistance gene qnrB19 in salmonella enterica serovar typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, 4019-4021.
- Eaves, D. J., Ricci, V., and Piddock, L. J. 2004. Expression of acrB, acrF, acrD, marA, and soxS in salmonella enterica serovar typhimurium: Role in multiple antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 48, 1145-1150.
- Ercis, S., Erdem, B., Hascelik, G., and Gur, D. 2006. Nalidixic acid resistance in salmonella strains with decreased susceptibility to ciprofloxacin isolated from humans in turkey. *Jpn J Infect Dis.* 59, 117-119.
- Escribano, I., Rodriguez, J. C., and Royo, G. 2004. Mutations in the gyra gene in salmonella enterica clinical isolates with decreased ciprofloxacin susceptibility. *Int J Antimicrob Agents.* 24, 300-303.
- Fonseca, E. L., Dos Santos Freitas, F., Vieira, V. V., and Vicente, A. C. 2008. New qnr gene cassettes associated with superintegron repeats in vibrio cholerae o1. *Emerg Infect Dis.* 14, 1129-1131.
- Friedman, S. M., Lu, T., and Drlica, K. 2001. Mutation in the DNA gyrase a gene of escherichia coli that expands the quinolone resistance-determining region. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 2378-2380.
- Garcia-Fernandez, A., Fortini, D., Veldman, K., Mevius, D., and Carattoli, A. 2009. Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in salmonella. *J Antimicrob Chemother.* 63, 274-281.
- Gay, K., Robicsek, A., Strahilevitz, J., Park, C. H., Jacoby, G., Barrett, T. J., Medalla, F., Chiller, T. M., and Hooper, D. C. 2006. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-typhi serotypes of salmonella enterica. *Clin Infect Dis.* 43, 297-304.
- Giraud, E., Baucheron, S., and Cloeckert, A. 2006. Resistance to fluoroquinolones in salmonella: Emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes Infect.* 8, 1937-1944.
- Giraud, E., Brisabois, A., Martel, J. L., and Chaslus-Dancla, E. 1999. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- and in vivo-selected mutants of salmonella spp. Suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. *Antimicrob Agents Chemother.*

- 43, 2131-2137.
- Giraud, E., Cloeckaert, A., Kerboeuf, D., and Chaslus-Dancla, E. 2000. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in salmonella enterica serovar typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 1223-1228.
- Gruber, S.B., Kohlmann, W. 2003. The genetics of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Nat Comp Cancer Net* 1:137-44.
- Gunell, M., Webber, M. A., Kotilainen, P., Lilly, A. J., Caddick, J. M., Jalava, J., Huovinen, P., Siitonen, A., Hakanen, A. J., and Piddock, L. J. 2009. Mechanisms of resistance in nontyphoidal salmonella enterica strains exhibiting a nonclassical quinolone resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, 3832-3836.
- Hansen, H. and Heisig, P. 2003. Topoisomerase iv mutations in quinolone-resistant salmonellae selected in vitro. *Microb Drug Resist.* 9, 25-32.
- Hopkins, K. L., Davies, R. H., and Threlfall, E. J. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in escherichia coli and salmonella: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* 25, 358-373.
- Hopkins, K. L., Day, M., and Threlfall, E. J. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance in salmonella enterica, united kingdom. *Emerg Infect Dis.* 14, 340-342.
- Izumiya, H., Mori, K., Kurazono, T., Yamaguchi, M., Higashide, M., Konishi, N., Kai, A., Morita, K., Terajima, J., and Watanabe, H. 2005. Characterization of isolates of salmonella enterica serovar typhimurium displaying high-level fluoroquinolone resistance in japan. *J Clin Microbiol.* 43, 5074-5079.
- Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martinez-Martinez, L., Nordmann, P., Pascual, A., Poirel, L., and Wang, M. 2008. Qnr gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 52, 2297-2299.
- Jacoby, G. A., Chow, N., and Waites, K. B. 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 559-562.
- Jacoby, G. A., Gacharna, N., Black, T. A., Miller, G. H., and Hooper, D. C. 2009. Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, 1665-1666.
- Kownhar, H., Shankar, E. M., Rajan, R., and Rao, U. A. 2007. Emergence of nalidixic acid-resistant salmonella enterica serovar typhi resistant to ciprofloxacin in india. *J Med Microbiol.* 56, 136-137.
- Levy, D. D., Sharma, B., and Cebula, T. A. 2004. Single-nucleotide polymorphism mutation spectra and resistance to quinolones in salmonella enterica serovar enteritidis with a mutator phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 48, 2355-2363.
- Li, X. Z. 2005. Quinolone resistance in bacteria: Emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *Int J Antimicrob Agents.* 25, 453-463.
- Liebana, E., Batchelor, M., Clifton-Hadley, F. A., Davies, R. H., Hopkins, K. L., and Threlfall, E. J. 2004. First report of salmonella isolates with the dha-1 ampc beta-lactamase in the united kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* 48, 4492.
- Ling, J. M., Chan, E. W., Lam, A. W., and Cheng, A. F. 2003. Mutations in topoisomerase genes of fluoroquinolone-resistant salmonellae in hong kong. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 3567-3573.
- Martinez-Martinez, L., Garcia, I., Ballesta, S., Benedi, V. J., Hernandez-Alles, S., and Pascual, A. 1998. Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant klebsiella pneumoniae strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 42, 1850-1852.

- Minarini, L. A., Poirel, L., Cattoir, V., Darini, A. L., and Nordmann, P. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 62, 474-478.
- Mushtaq, A., Payton, M., and Sim, E. 2002. The cooh terminus of arylamine n-acetyltransferase from salmonella typhimurium controls enzymic activity. *J Biol Chem.* 277, 12175-12181.
- Nath, G. and Maurya, P. Drug resistance patterns in salmonella enterica subspecies enterica serotype typhi strains isolated over a period of two decades, with special reference to ciprofloxacin and ceftriaxone. *Int J Antimicrob Agents.* 35, 482-485.
- Pereira, A. S., Andrade, S. S., Monteiro, J., Sader, H. S., Pignatari, A. C., and Gales, A. C. 2007. Evaluation of the susceptibility profiles, genetic similarity and presence of qnr gene in escherichia coli resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals. *Braz J Infect Dis.* 11, 40-43.
- Piddock, L. J. 2002. Fluoroquinolone resistance in salmonella serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol Rev.* 26, 3-16.
- Piddock, L. J., Ricci, V., McLaren, I., and Griggs, D. J. 1998. Role of mutation in the gyra and parc genes of nalidixic-acid-resistant salmonella serotypes isolated from animals in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother.* 41, 635-641.
- Randall, L. P., Cooles, S. W., Piddock, L. J., and Woodward, M. J. 2004. Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin and enrofloxacin for salmonella enterica. *J Antimicrob Chemother.* 54, 688-691.
- Ribeiro, A. R. Salmonella enteritidis de origem aviária: determinação de padrões de resistência antimicrobiana, detecção de mutação no gene gyrA de cepas resistentes ao ácido nelidíxico, fagotipagem e ribotipagem./ Aldemir Reginato Ribeiro - Porto Alegre: UFRGS, 2007.
- Ricci, V. and Piddock, L. J. 2009. Ciprofloxacin selects for multidrug resistance in salmonella enterica serovar typhimurium mediated by at least two different pathways. *J Antimicrob Chemother.* 63, 909-916.
- Robicsek, A., Jacoby, G. A., and Hooper, D. C. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.* 6, 629-640.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Sahm, D. F., Jacoby, G. A., and Hooper, D. C. 2006. Qnr prevalence in ceftazidime-resistant enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 50, 2872-2874.
- Rossiter, S.; McClellan, J.; Barrett, T.; Joyce, K.; Anderson, A. D. Emerging fluoroquinolone resistance among non-typhoidal *Salmonella* in the United States: NARMS, 1996-2000. NARMS Working Group. In: Centers for Disease Control and Prevention, ed. International Conference on Emerging Infectious Diseases. Atlanta: American Society for Microbiology Press, 2002.
- Saenz, Y., Zarazaga, M., Brinas, L., Ruiz-Larrea, F., and Torres, C. 2003. Mutations in gyra and parc genes in nalidixic acid-resistant escherichia coli strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother.* 51, 1001-1005.
- Seminati, C., Mejia, W., Mateu, E., and Martin, M. 2005. Mutations in the quinolone-resistance determining region (qrdR) of salmonella strains isolated from pigs in Spain. *Vet Microbiol.* 106, 297-301.
- Seo, M. R., Park, Y. S., and Pai, H. Characteristics of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum cephalosporin-resistant isolates of klebsiella pneumoniae and escherichia coli in Korea. *Chemotherapy.* 56, 46-53.
- Seputiene, V., M. Ruzauskas, P. Zlabys and E. Suziedeliene, 2006. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Lithuanian Escherichia coli isolates. *Biological,* 2: 14-17.

- Soto, S. M., Gonzalez-Hevia, M. A., and Mendoza, M. C. 2003. Antimicrobial resistance in clinical isolates of salmonella enterica serotype enteritidis: Relationships between mutations conferring quinolone resistance, integrons, plasmids and genetic types. *J Antimicrob Chemother.* 51, 1287-1291.
- Souza, R. B., Ferrari, R. G., Magnani M et al. (2010) Ciprofloxacin susceptibility reduction of *Salmonella* strains isolated from outbreaks. *Braz J Microbiol In press*
- Taguchi, M., Kawahara, R., Seto, K., Inoue, K., Hayashi, A., Yamagata, N., Kamakura, K., and Kashiwagi, E. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance in salmonella isolated from patients with overseas travelers' diarrhea in japan. *Jpn J Infect Dis.* 62, 312-314.
- Tran, J. H., Jacoby, G. A., and Hooper, D. C. 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein qnra with escherichia coli topoisomerase iv. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, 3050-3052.
- Vashist, J., Vishvanath, Kapoor, R., Kapil, A., Yennamalli, R., Subbarao, N., and Rajeswari, M. R. 2009. Interaction of nalidixic acid and ciprofloxacin with wild type and mutated quinolone-resistance-determining region of DNA gyrase a. *Indian J Biochem Biophys.* 46, 147-153.
- Veldman, K., Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., van Pelt, W., and Mevius, D. Characterization of multidrug-resistant, qnrb2-positive and extended-spectrum-beta-lactamase-producing salmonella concord and salmonella senftenberg isolates. *J Antimicrob Chemother.* 65, 872-875.
- Walker, R. A., Saunders, N., Lawson, A. J., Lindsay, E. A., Dassama, M., Ward, L. R., Woodward, M. J., Davies, R. H., Liebana, E., and Threlfall, E. J. 2001. Use of a lightcycler gyra mutation assay for rapid identification of mutations conferring decreased susceptibility to ciprofloxacin in multiresistant salmonella enterica serotype typhimurium dt104 isolates. *J Clin Microbiol.* 39, 1443-1448.
- Wang, A., Yang, Y., Lu, Q., Wang, Y., Chen, Y., Deng, L., Ding, H., Deng, Q., Zhang, H., Wang, C., Liu, L., Xu, X., Wang, L., and Shen, X. 2008. Presence of qnr gene in escherichia coli and klebsiella pneumoniae resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in china. *BMC Infect Dis.* 8, 68.
- Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., and Hooper, D. C. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrc, found in a clinical isolate of proteus mirabilis. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, 1892-1897.
- Weigel, L. M., Anderson, G. J., and Tenover, F. C. 2002. DNA gyrase and topoisomerase iv mutations associated with fluoroquinolone resistance in proteus mirabilis. *Antimicrob Agents Chemother.* 46, 2582-2587.
- Weigel, L. M., Steward, C. D., and Tenover, F. C. 1998. Gyra mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 42, 2661-2667.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T., and Arakawa, Y. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, qepa, found in an escherichia coli clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 51, 3354-3360.
- Zhao, X., Xu, X., Zhu, D., Ye, X., and Wang, M. Decreased quinolone susceptibility in high percentage of enterobacter cloacae clinical isolates caused only by qnr determinants. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 67, 110-113.

6 ARTIGO III

TÍTULO

Expressão dos genes *marA*, *soxS*, *acrB* e *ramA* da bomba de efluxo AcrAB/TolC em cepas *Salmonella enterica* com e sem mutações na QRDR dos gene *gyrA*.

AUTORES

Rafaela Ferrari¹, Antonio Galiana², Rosa Cremades², Juan Carlos Rodríguez², Marciane Magnani¹, M.C.B. Tognim³, Tereza C.R.M. Oliveira¹, Gloria Royo².

¹Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

²Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario de Elche. Universidad Miguel Hernández. Camí de l'almàssera, nº 11, 03203 Elche, Spain.

³Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá.

INTRODUÇÃO

A resistência de *Salmonella* spp. às quinolonas é geralmente mediada por mutações nos genes da DNA-girase ou topoisomerase IV. Porém, outros mecanismos como plasmídeos e efluxo ativo podem ser os fatores determinantes de uma baixa susceptibilidade, e até mesmo, resistência a essa classe de antimicrobianos (Giraud, *et al.*, 2000, Eaves, *et al.*, 2004). Dentre esses, as bombas de efluxo desempenham um importante papel na resistência às drogas, especialmente quando fluoroquinolonas estão envolvidas (Baucheron, *et al.*, 2004).

Bombas de efluxo atuam de maneira não específica em decorrência ao estresse bacteriano. Agem através da expressão de proteínas que reduzem o acúmulo de compostos orgânicos ou agentes antimicrobianos no interior da célula. Sua superexpressão também pode ser causada por mutações cromossômicas, resultando em um fenótipo de resistência múltipla aos antibióticos (MAR) (Randall and Woodward, 2002).

A bomba AcrB pertence à super-família RND (resistance-nodulation-cell division) e, por estar associada a outras duas classes de proteínas, desempenha importante papel na produção de multiresistência em bactérias Gram-negativas (Paulsen, *et al.*, 1997). A primeira classe de proteínas envolvida é representada pelo canal de membrana externo (TolC), e integra a família de proteínas conhecida como

fator de membrana externa (OMF). A segunda classe, conhecida por uma proteína periplasmática 'adaptadora', AcrA, é classificada como proteína de fusão de membrana (MFP) (Dinh, *et al.*, 1994).

A bomba AcrAB-TolC é regulada por fatores transcricionais. Os genes responsáveis por essa função são *marA* (Sulavik, *et al.*, 1997), *soxRS* (Amabile-Cuevas and Demple, 1991), *rob* (Barchiesi, *et al.*, 2008) e *ramA* (Bailey, *et al.*, 2008). Esses genes pertencem à família de reguladores transcricionais AraC/XylS (Koutsolioutsou, *et al.*, 2001, Koutsolioutsou, *et al.*, 2005).

No locus *acrRAB* estão localizados os genes reguladores transcricionais *mar* e *sox*; as proteínas MarA e SoxS podem ativar a expressão *acrAB*. O operon *marRAB* é responsável pela produção da proteína repressora MarR e da proteína ativadora da transcrição MarA (Sulavik, *et al.*, 1997). Esse operon confere o fenótipo de MDR (resistência múltipla à drogas) pela produção de MarA, que é sintetizada em decorrência a fatores ambientais, assim como, pela presença de antibióticos. Por sua vez, o operon *soxRS* é ativado em resposta ao estresse oxidativo, em que a proteína SoxS atua como ativadora transcricional (Demple, 1996). Contudo, a superexpressão de *soxRS* também pode contribuir para o aumento de resistência aos antibióticos em bactérias Gram-negativas.

Em relação ao gene *ramA*, regulado por *ramR* (Zheng, *et al.*, 2009), quando super-expresso produz a proteína RamA, homóloga a MarA e SoxS (George, *et al.*, 1995). Em consequência à superexpressão, a bactéria pode apresentar o fenótipo MDR, através da indução de *acrAB* e *tolC* (Bailey, *et al.*, 2008). Cepas de *Salmonella enterica* com o gene *tolC* deletado experimentalmente, mostraram aumento da suscetibilidade a antimicrobianos e compostos químicos (Nishino, *et al.*, 2006). No entanto, o envolvimento do TolC nesse microrganismo não está completamente elucidado. De modo semelhante, quando *ramA* é silenciado, cepas de *S. enterica* expressam um fenótipo de maior susceptibilidade à ciprofloxacina (Ricci, *et al.*, 2006).

Embora diversas pesquisas tenham sido realizadas nos últimos anos com a finalidade de elucidar a estrutura, a função e o significado clínico de AcrB, MarA, SoxS e RamA (Aleksun and Levy, 1997, Miller, *et al.*, 1994, Randall and Woodward, 2001), sua regulação em *S. enterica* não é totalmente conhecida. No presente estudo a expressão de *acrB*, *soxS*, *marA* e *ramA* foi avaliada em quatorze cepas de *S. enterica* com e sem mutação em *gyrA* expostas à ciprofloxacina durante a fase de crescimento exponencial.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas. Foram analisadas 14 cepas de *Salmonella enterica* resistentes ao ácido nalidíxico (NAL), divididas em dois grupos: sete cepas sem mutação na região QRDR (Quinolone Resistance-Determining Regions) dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* e sete cepas com mutação na QRDR do *gyrA* e sem mutação na QRDR dos demais genes. Dentre as cepas com mutação na QRDR do *gyrA*, uma era positiva para o gene plasmidial *qnrB19*. Cada uma das cepas foi cultivada, em duplicata, durante 2h em Caldo Mueller Hinton (MHB). Em um dos cultivos foi adicionado ciprofloxacina na concentração correspondente à metade da sua concentração inibitória mínima (CipMIC), determinada por E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden). Após 30 minutos de exposição ao antibiótico, a 37°C, o material foi cetrifugado para posterior extração do RNA.

Isolamento de RNA. O isolamento de RNA foi realizado através do método do tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio segundo Chomczynski e Sacchi (1987), com algumas modificações. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 200µl de solução de lise por 1h a 37°C. Decorrido esse tempo, 50µl de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1% foram adicionados e, após agitação em vortex, 25µl de cloreto de sódio (NaCl) 2M e 200µl Fenol:Clorofórmio foram misturados ao material que permaneceu em gelo por 10 minutos. A mistura foi então centrifugada a 1000rpm a 4°C por 20 min, e o sobrenadante recuperado. Em seguida, isopropanol em igual quantidade ao do sobrenadante foi adicionado e o material mantido a -70°C por 2 horas com posterior centrifugação a 1000rpm por 11min a 4°C. Descartado o sobrenadante, o pellet foi seco e solubilizado com 750µl de etanol 75% em vortex. Após centrifugação a 1000 rpm por 11min a 4°C, o sobrenadante foi novamente descartado e o pellet seco por 1h foi ressuspendido em 30µl água livre de nucleases (Invitrogen™). As amostras de RNA foram tratadas com DNase RQ1 DNase (Ambion AM 1906) para eliminar a contaminação do DNA genômico, seguindo as instruções do fabricante. A pureza e a concentração do RNA foi aferida por NanoDrop ND-1000.

Transcriptase reversa (RT). Reações de RTs foram conduzidas segundo descrito por Chico *et al.* (2006), utilizando 1µg de RNA total, 90ng random hexamers (QIAGEN®) e 0,5mM dNTPs (INVITROGEN™). Para a síntese do cDNA, foi realizada desnaturação prévia por 5 min a 65°C. Após essa etapa, 200 unidades de enzima transcriptase reversa MMLV (Invitrogen™), 10mM de DTT (Invitrogen™) e

20 unidades do inibidor de RNases (RNase OUT, Invitrogen,) foram adicionadas a cada reação com volume final de 20µl. As condições de reação foram 10 min a 25°C, 15 min a 42°C, 5 min a 99°C.

Deteção do nível de expressão de genes. Após a obtenção do cDNA, a qPCR foi realizada utilizando o aparelho 7500 Real Time PCR System, software sds 1.4, Applied Biosystems. As reações foram realizadas em um volume final de 20µl, contendo 300nM de cada primer e 100nM de cada sonda (Tabela 1), 2µl cDNA e 1 X TaqMan® master mix universal (Applied Biosystems). A eficiência das reações de qPCR foi calculada usando a fórmula: $E = [10^{(-1/S)}]-1$, onde E representa a eficiência calculada e S a inclinação da curva padrão.

Análise Estatística. Os resultados foram analisados pelo programa SPSS 18.0. As médias geométricas (MGM) das CipMICs foram calculadas pela fórmula:

$\sqrt[n]{y_1 y_2 y_3 \dots y_n}$, onde y , representa o CipMIC individual de cada cepa, e n , o número de CipMIC utilizados.

Tabela 1. Primers e sondas TaqMan® utilizadas para as reações de Q-RT-PCR (quantitative real-time reverse transcriptase PCR), desenhados com auxílio do programa Primer Express™ 2.0 (Applied Biosystems).

Primers e Sondas*	Seqüência dos primers 5' → 3'
16s-F	CGTGTGTGAAATGTTGGGTAA
16s-R	CCGCTGGCAACAAAGGATAA
sonda 16s	TCCCGCAACGAGCGCAACC
<i>acrB</i> -F	TGAAGACCAGGGCGTATTCCT
<i>acrB</i> -R	TTTTTGCGTGCGCTCTTG
sonda <i>acrB</i>	ACAATGGTCCAGCTCCCCGCG
<i>soxS</i> -F	CGBAATACACGCGAGAAGGT
<i>soxS</i> -R	GAGCGCCCGATTTTTGATATC
sonda <i>soxS</i>	TGCTGCGATACATAGCCCAGGTCCA
<i>marA</i> -F	GACCCGGACGTTCAAAACTAT
<i>marA</i> -R	TCGCCATGCATATTGGTGAT
sonda <i>marA</i>	TGATGTGCCGCCACACAAATACCG
<i>ramA</i> -F	CCAGAAGGTGTATGATATTTGTCTCAAG
<i>ramA</i> -R	GGTTGAACGTGCGGGTAAA
sonda <i>ramA</i>	TTGATTCGCAGCAAACCTTTACGCG

*sonda utilizada: 6-carboxi fluoresceína (FAM); quencher utilizado: 6-carboxi tetrametil-rodamina (TAMRA).

RESULTADOS

Em todas as cepas de *S. enterica* analisadas no presente estudo, a presença de ciprofloxacina durante a fase de crescimento ativou os genes *marA*, *soxS*, *ramA* e *acrB*. Porém, no grupo das cepas sem mutação em *gyrA*, *gyrB*, *parA* e *parC*, o nível de expressão dos genes *marA*, *soxS*, *ramA* foi maior do que nas cepas com mutação. Já para *acrB*, a maior expressão observada foi para as cepas com mutação em *gyrA* (Figura 1).

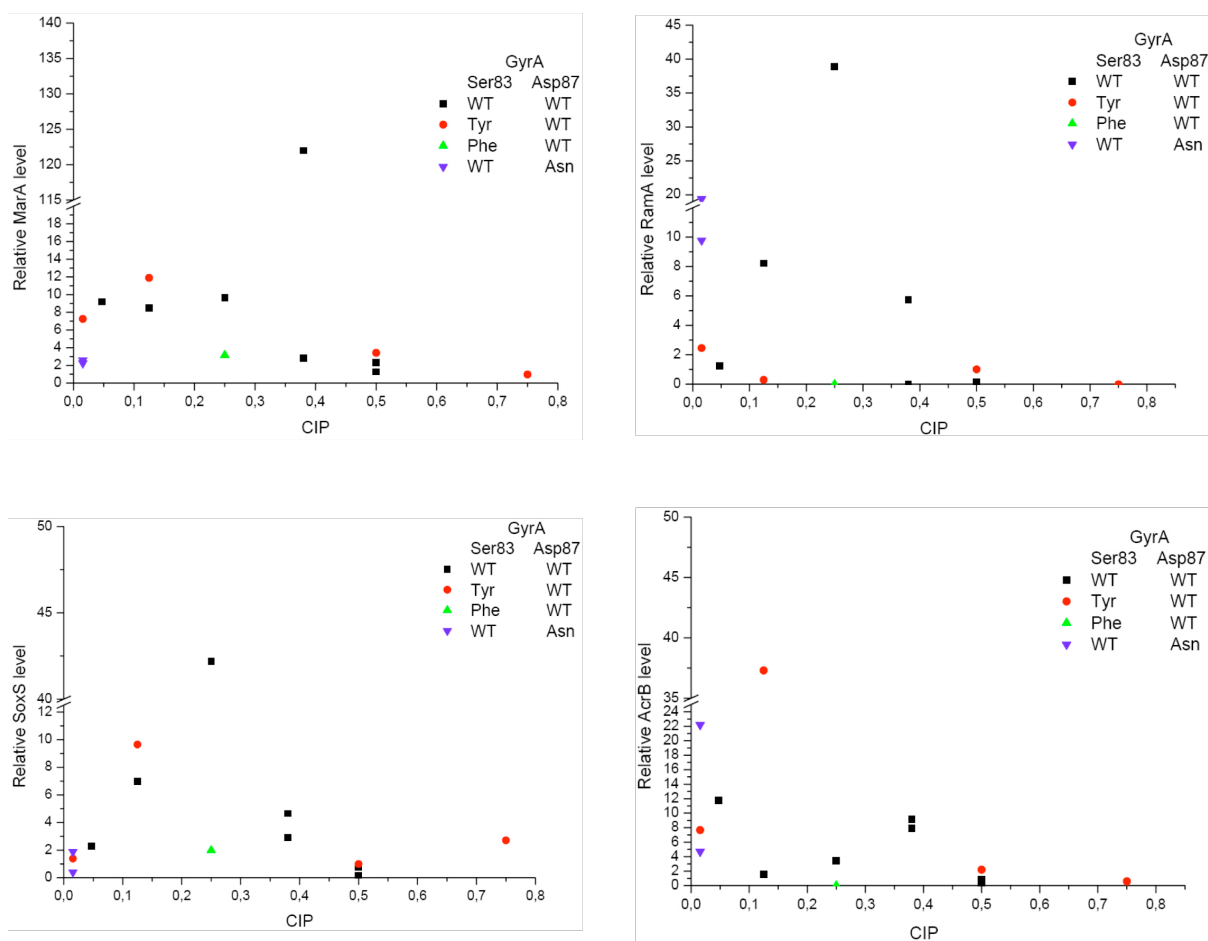


Figura 1 – Distribuição do nível de expressão dos genes *marA*, *soxS*, *ramA* e *acrB* estudados em relação à CipMIC ($\mu\text{g/ml}$) e mutação no gene *gyrA*. WT: cepa selvagem; CIP: ciprofloxacina.

A MGM para os quatro genes da bomba nas cepas sem mutação foi de 2,70 e para as cepas com mutação em *gyrA* 2,13. Dentre as cepas mutantes em *gyrA*, a cepa 209-2 foi a que mais expressou os genes ligados à bomba de efluxo analisados, com MGM de 5,99. Em contrapartida, a cepa sem mutação em *gyrA* com maior nível de expressão dos genes foi a 238-2, com MGM de 15,38 (Tabela 2).

Ao se avaliar, individualmente, os níveis de expressão de cada gene, para as cepas sem mutação em *gyrA*, o gene que apresentou maior expressão foi *marA*

(MGM = 6,93), seguido por *soxS* (MGM = 2,72), *acrB* (MGM = 2,38) e *ramA* (MGM = 1,16). Já para as cepas com mutação em *gyrA*, o gene que apresentou maior nível de expressão também foi *marA* (MGM de 3,41), porém seguido por *acrB* (MGM = 3,25), *soxS* (MGM = 1,77) e *ramA* (MGM = 1,05).

Ao se avaliar o nível de expressão das cepas sensíveis à ciprofloxacina (CipMIC < 0,125µg/l), notou-se que o gene que mais se expressou foi *acrB*; tanto nas cepas com mutação, como nas não mutantes em *gyrA*. Nas três cepas com mutação em *gyrA* que possuíam CipMIC < 0,125µg/l, a MGM para esse gene foi de 9,28. Para a única cepa não mutante e que apresentou sensibilidade à ciprofloxacina, o nível de expressão de *acrB* foi 11,8 (Tabela 2).

Nas cepas com susceptibilidade reduzida (CipMIC ≥ 0,125µg/l) com e sem mutação em *gyrA*, o gene mais expresso foi *marA*. Para as quatro cepas com mutação, o nível de expressão de *marA* variou de 0,98 a 11,96, com MGM de 3,36. Em contrapartida, nas 6 cepas sem mutação o nível de expressão de *marA* variou de 1,29 a 122, com MGM de 6,62.

Dentre as quatro cepas com mutação em *gyrA* e susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina, a cepa 288-2, sorovar Heidelberg e a 300-2, sorovar Enteritidis, praticamente não expressaram os genes de bomba testados. Por outro lado, a cepa Enteritidis 209-2, apesar da MGM de 5,99 apresentou CipMIC quatro vezes menor que a cepa Enteritidis 216-2, com MGM de 1,66 (Tabela 2).

Quatro das seis cepas com susceptibilidade reduzida não mutantes em *gyrA* apresentaram expressão representativa dos genes de bomba de efluxo avaliados, com MGM entre 4,25 a 15,26. Por outro lado, a cepa 232-2 sem mutação em *gyrA* e com o menor nível de expressão dos genes ligados à bomba (MGM de 0,23) apresentou CipMIC de 0,5µg/ml. A cepa 297-2, positiva para o gene plasmidial *qnrB19*, também não apresentou expressão de nenhum dos quatro genes ligados à bomba estudados (MGM de 0,65).

Tabela 2 – Nível de expressão dos genes *marA*, *soxS*, *ramA* e *acrB* na presença de ciprofloxacina em cepas de *Salmonella enterica* mutantes e não mutantes na QRDR do gene *gyrA*.

Cepa ^a	Sorotipo	CipMIC µg/ml	Mutação	Nível de expressão em presença de Ciprofloxacina								
				<i>soxS</i>	d ^b	<i>marA</i>	d ^b	<i>acrB</i>	d ^b	<i>ramA</i>	d ^b	MGM ^c
250-2	Enteritidis	0,0156	Ser83-Tyr	1,39	0,11	7,26	0,51	7,67	0,38	2,46	0,26	3,71
229-2	Enteritidis	0,0156	Asp87-Asn	1,88	0,14	2,60	0,47	4,70	0,07	19,43	0,78	4,60
213-2	Enteritidis	0,0156	Asp87-Asn	0,40	0,30	2,26	0,20	22,16	0,16	9,78	0,33	3,74
209-2	Enteritidis	0,1250	Ser83-Tyr	9,65	0,13	11,96	0,30	37,27	0,54	0,30	0,85	5,99
300-2	Enteritidis	0,2500	Ser83-Phe	1,99	0,61	3,16	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50
288-2	Heidelberg	0,5000	Ser83-Tyr	2,71	0,46	0,98	1,30	0,59	0,79	0,00	0,00	0,63
216-2	Enteritidis	0,5000	Ser83-Tyr	1,00	0,11	3,43	0,16	2,20	0,27	1,01	0,70	1,66
238-2	Enteritidis	0,2500	wt	42,2	0,29	9,65	0,40	3,43	0,22	38,85	0,19	15,26
121-1	Enteritidis	0,3800	wt	4,66	0,31	2,82	0,72	7,89	0,40	5,74	0,46	4,94
135-2	Enteritidis	0,3800	wt	2,90	0,45	122	0,20	9,19	0,24	0,00	0,00	4,25
91-1	Enteritidis	0,1250	wt	6,96	0,96	8,50	0,43	1,56	0,14	8,22	0,43	5,25
119-2	Enteritidis	0,0470	wt	2,27	0,18	9,19	0,38	11,80	0,36	1,25	0,30	4,19
232-2	Enteritidis	0,5000	wt	0,16	0,68	1,29	0,39	0,00	0,00	0,13	1,25	0,23
297-2 ^d	Corvallis	0,5000	wt	0,79	0,33	2,31	0,13	0,97	0,19	0,00	0,00	0,65

^atodas as cepas foram resistentes ao NAL; ^bdesviação típica; ^cmédia geométrica dos quatro genes; ^dcepa positiva para *qnrB19*; wt: cepa sem mutação em *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*.

DISCUSSÃO

Existem relatos que a expressão da bomba AcrAB em *E. coli* pode aumentar em até cinco vezes o MIC para ciprofloxacina e norfloxacina (Nishino and Yamaguchi, 2001). No presente estudo todas as cepas, na presença de ciprofloxacina, apresentaram expressão de pelo menos um dos genes ligados às bombas de efluxo avaliados. Entretanto, a expressão desses genes e a sua relação com a redução da susceptibilidade à ciprofloxacina foi muito divergente, independente da mutação em *gyrA*. As cepas de *S. Enteritidis* 250-2, 229-2 e 213-2 com mutação em *gyrA* e expressão de pelo menos três genes ligados à bomba, apresentaram CipMIC menor que 0,125. Porém, as outras cepas de *S. Enteritidis* (209-2, 300-2 e 216-2) também apresentando mutação em *gyrA* e expressão ou não dos genes relacionados às bombas de efluxo estudados, apresentaram susceptibilidade reduzida ciprofloxacina.

Em seu estudo sobre a relação entre substituições nas regiões QRDR dos genes das topoisomerasas e outros mecanismos de resistência, Baucheron, et al. (2004) relataram redução de até 64 vezes no valor da CipMIC após inibição do operon AcrAB em cepas de *Salmonella Typhimurium* mutantes ou não em *gyrA*. Morgan-Linnell et al., (2009) também não conseguiram correlacionar a expressão de

AcrAB e a presença de mutações nos genes das topoisomerases com a MIC para fluoroquinolonas. O aumento nos níveis de expressão de AcrAB nem sempre aumentava as MICs, sugerindo que a expressão isolada de AcrAB não gera altos valores de MICs. Além disso, o mecanismo de bomba de efluxo já foi relatado como sendo responsável apenas pelo nível basal de resistência (Saenz et al., 2004).

No presente trabalho, cepas de *S. Enteritidis*, sem mutação no *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, apresentaram susceptibilidade reduzida a ciprofloxacina. A expressão de alguns genes ligados à bomba de efluxo, neste caso, parece ter influenciado essa redução. As cepas de *S. Enteritidis* 121-1, 135-2 e 91-1 apresentaram, respectivamente, MGM de 4,94; 4,25 e 5,25. Nesse grupo de cepas, é importante ressaltar que cepa 135-2 apresentou expressão para *marA* de 122. Outro destaque neste grupo é para a cepa *S. Enteritidis* 238-2, que apresentou MGM de 15,26 com grande expressão dos genes *soxS* e *ramA*, seguido de *marA*.

A expressão de *marA* é induzida por uma série de substâncias, incluindo alguns antibióticos, dentre os quais as quinolonas (Cohen, et al., 1993, Piddock, 2002). MarA é capaz de mediar a resistência às drogas por provocar diminuição da expressão da porina OmpF e superexpressar a bomba de efluxo ArcB (Aleksun and Levy, 1997, Sulavik, et al., 1997). Estudos realizados com *E. coli* relataram MIC para ofloxacina até oito vezes maior em cepas com superexpressão do gene *marA*, em comparação as cepas somente mutadas em *gyrA* (Oethinger, et al., 1998). Kern et al., (2000) observaram em *E. coli*, que a taxa de sucesso no tratamento por fluoroquinolonas (ofloxacina e norfloxacina) foi significativamente menor em cepas que expressaram *marA*. Estudos mostram que níveis aumentados MarA levam ao aumento das MICs em fluoroquinolonas e parece proteger as bactérias do efeito destas drogas quando concentrações mais elevadas do que a MIC são utilizadas (Goldman, et al., 1996). O aumento dos níveis AcrAB em isolados clínicos pode surgir devido a alterações em MarA ou a reguladores deste gene que acabam por gerar proteção bactericida (Morgan-Linnell, et al., 2009).

O gene *soxS* foi o mais expresso, depois de *marA*, em cepas não mutantes em *gyrA* analisadas neste trabalho. Esse gene é ativador da transcrição que regula positivamente a expressão de mais de 20 genes (Imlay, 2008, Pomposiello and Demple, 2001), os quais geram um aumento da síntese das proteínas ligadas à bomba de efluxo AcrAB-TolC (Aono, 1998). O sistema regulador SoxRS protege a célula contra o estresse oxidativo gerado por diversos antimicrobianos (Delilhas and Forst, 2001). A cepa de *S. Enteritidis* 238-2 sem mutação no *gyrA* apresentou

expressão do gene *soxS* e susceptibilidade reduzida a ciprofloxacina. Kehrenberg et al. (2009) observaram em cepas de *Salmonella* Virchow que embora a CipMIC tenha aumentado oito vezes quando *soxS* foi expresso, esse aumento não teve correlação com a presença de mutação no *gyrA*.

Diversos estudos demonstraram que a inativação de *acrB* resulta no aumento de sensibilidade as quinolonas (Chen et al., 2007; Coldham et al., 2010; Baucheron et al. 2004; Eaves et al., 2004; Lacroix et al., 1995; Lacroix et al., 1996) e que cepas que superexpressam esse gene podem ser facilmente selecionadas por exposição prévia às fluoroquinolonas *in vitro* ou *in vivo* (Ricci, et al., 2006). Porém, a expressão do gene *acrB* neste trabalho foi maior em cepas mutadas em *gyrA*, e sensíveis à ciprofloxacina. De fato, Oethinger, et al., (2000), Baucheron, et al., (2002) e Horiyama, et al.(2010) relataram que o principal transportador envolvido na resistência às fluoroquinolonas em *Salmonella enterica* parece ser AcrB. Sulavik et al. (2001) também demonstraram que essa proteína foi a principal responsável pela resistência intrínseca às quinolonas e a outras drogas não relacionadas.

A expressão dos genes da bomba de efluxo foi praticamente nula (MGM de 0,63) para a cepa do sorovar Heidelberg, que apresentou a maior CipMIC entre todas as cepas analisadas neste trabalho. Sugere-se que esta redução na susceptibilidade se deve a resistência intrínseca comumente observada nesse sorovar (Randall, et al., 2004, van Hoek et al., 2005, Clothier et al., 2010).

O sorovar Corvallis apresentou CipMIC de 0,5, porém sem mutação na região QRDR dos genes das topoisomerasas e com baixo nível de expressão dos genes ligados às bombas de efluxo estudadas. Porém, a redução na susceptibilidade a ciprofloxacina observada pode estar relacionada a presença do gene *qnrB19*. Conforme Li (2005), o gene *qnr* facilita a seleção de mutações cromossômicas ligadas à resistência às quinolonas em *S. enterica* através do aumento significativo dos níveis em que mutantes podem ser selecionados, e que a sua expressão fenotípica em *Salmonella enterica*, nunca deve ser subestimada.

A cepa *S. Enteritidis* 232-2 apresentou CipMIC de 0,5 µg/ml e não expressou nenhum dos genes ligados à bomba estudados. Possivelmente, podem estar envolvidos outros mecanismos alternativos de regulação gênica, tais como *acrR*, independentes de *mar-sox-rob*, responsáveis pelo controle da expressão de AcrB em *S. enterica* (Piddock, et al., 2000). Mutações nos genes controladores de transcrição ou expressão de outros genes, tais como *acrD*, *acrA*, *tolC* (Ricci, et al., 2006), além do sistema de efluxo AcrEF recentemente descrito em *S. enterica*,

podem também estar envolvidos (Jellen-Ritter and Kern, 2001, Olliver, *et al.*, 2005). Outra possibilidade para a redução da susceptibilidade à ciprofloxacina observada na cepa 232-2 seria mutação em *gyrA* fora da região QRDR comumente estudada. Capoor *et al.* (2009), Crump *et al.* (2003) e Friedman *et al.* (2001) sugeriram, anteriormente, o aumento da região que compreende a QRDR do gene *gyrA*, já que foram observadas mutações associadas à resistência à quinolonas fora do atual domínio QRDR estudado.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que cepas resistentes ao NAL, sem mutação em *gyrA*, apresentaram, provavelmente, como forma de resistência primária a esta droga a expressão de genes ligados à bomba de efluxo. No entanto, a expressão desses genes parece ocorrer independentemente de mutações em *gyrA*, já que cepas não mutantes nas regiões QRDR dos genes das topoisomerasas apresentaram maior expressão dos genes associados às bombas de efluxo estudados. Esse mecanismo pode desempenhar uma pré-seleção de cepas menos sensíveis, para posterior surgimento de cepas mutantes e mais resistentes. Inibidores do sistema AcrAB-TolC se forem desenvolvidos poderiam minimizar a seleção de cepas resistentes ao NAL, podendo aumentar a vida útil das quinolonas, como também das fluoroquinolonas. Em relação à *marA*, por este gene funcionar como um ativador do operon *marRAB*, é possível sugerir *marA* como um potencial alvo para futuras estratégias na luta contra a resistência microbiana. Portanto, este trabalho fornece dados que contribuem para a melhor compreensão da complexa interação entre os genes bombas de fluxo e outros mecanismos de resistência, assim como, elucida a importância do envolvimento de tais genes em cepas não mutantes na região QRDR dos genes das topoisomerasas em *Salmonella enterica*.

Agradecimentos

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido às alunas Rafaela Ferrari e Marciani Magnani. A Marcelo Moreschi, pela revisão, correção e preciosas sugestões referentes ao texto.

Bibliografia

- Alekshun, M. N. and Levy, S. B. 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: The mar regulon. *Antimicrob Agents Chemother.* 41, 2067-2075.
- Amabile-Cuevas, C. F. and Demple, B. 1991. Molecular characterization of the soxrs genes of escherichia coli: Two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res.* 19, 4479-4484.
- Aono, R. 1998. Improvement of organic solvent tolerance level of escherichia coli by overexpression of stress-responsive genes. *Extremophiles.* 2, 239-248.
- Bailey, A. M., Paulsen, I. T., and Piddock, L. J. 2008. Rama confers multidrug resistance in salmonella enterica via increased expression of acrb, which is inhibited by chlorpromazine. *Antimicrob Agents Chemother.* 52, 3604-3611.
- Barchiesi, J., Castelli, M. E., Soncini, F. C., and Vescovi, E. G. 2008. MgtA expression is induced by rob overexpression and mediates a salmonella enterica resistance phenotype. *J Bacteriol.* 190, 4951-4958.
- Baucheron, S., Imberechts, H., Chaslus-Dancla, E., and Cloeckaert, A. 2002. The acrb multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in salmonella enterica serovar typhimurium phage type dt204. *Microb Drug Resist.* 8, 281-289.
- Baucheron, S., Tyler, S., Boyd, D., Mulvey, M. R., Chaslus-Dancla, E., and Cloeckaert, A. 2004. AcrAB-tolC directs efflux-mediated multidrug resistance in salmonella enterica serovar typhimurium dt104. *Antimicrob Agents Chemother.* 48, 3729-3735.
- Capoor, M. R., Nair, D., Walia, N. S., Routela, R. S., Grover, S. S., Deb, M., Aggarwal, P., Pillai, P. K., and Bifani, P. J. 2009. Molecular analysis of high-level ciprofloxacin resistance in salmonella enterica serovar typhi and s. Paratyphi a: Need to expand the qdr region? *Epidemiol Infect.* 137, 871-878.
- Chen, S., Cui, S., McDermott, P. F., Zhao, S., White, D. G., Paulsen, I., and Meng, J. 2007. Contribution of target gene mutations and efflux to decreased susceptibility of salmonella enterica serovar typhimurium to fluoroquinolones and other antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother.* 51, 535-542.
- Chico, V., Gomez, N., Estepa, A., and Perez, L. 2006. Rapid detection and quantitation of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow trout by real-time rt-pcr. *J Virol Methods.* 132, 154-159.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 156-159.
- Clothier, K. A., Kinyon, J. M., and Frana, T. S. Comparison of salmonella serovar isolation and antimicrobial resistance patterns from porcine samples between 2003 and 2008. *J Vet Diagn Invest.* 22, 578-582.
- Cohen, S. P., Levy, S. B., Foulds, J., and Rosner, J. L. 1993. Salicylate induction of antibiotic resistance in escherichia coli: Activation of the mar operon and a mar-independent pathway. *J Bacteriol.* 175, 7856-7862.
- Coldham, N. G., Webber, M., Woodward, M. J., and Piddock, L. J. A 96-well plate fluorescence assay for assessment of cellular permeability and active efflux in salmonella enterica serovar typhimurium and escherichia coli. *J Antimicrob Chemother.*
- Crump, J. A., Barrett, T. J., Nelson, J. T., and Angulo, F. J. 2003. Reevaluating fluoroquinolone breakpoints for salmonella enterica serotype typhi and for non-typhi salmonellae. *Clin Infect Dis.* 37, 75-81.

- Delilhas, N. and Forst, S. 2001. Micf: An antisense rna gene involved in response of escherichia coli to global stress factors. *J Mol Biol.* 313, 1-12.
- Demple, B. 1996. Redox signaling and gene control in the escherichia coli soxrs oxidative stress regulon--a review. *Gene.* 179, 53-57.
- Dinh, T., Paulsen, I. T., and Saier, M. H., Jr. 1994. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* 176, 3825-3831.
- Eaves, D. J., Ricci, V., and Piddock, L. J. 2004. Expression of acrb, acrf, acrd, mara, and soxs in salmonella enterica serovar typhimurium: Role in multiple antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 48, 1145-1150.
- Friedman, S. M., Lu, T., and Drlica, K. 2001. Mutation in the DNA gyrase a gene of escherichia coli that expands the quinolone resistance-determining region. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 2378-2380.
- George, A. M., Hall, R. M., and Stokes, H. W. 1995. Multidrug resistance in klebsiella pneumoniae: A novel gene, rama, confers a multidrug resistance phenotype in escherichia coli. *Microbiology.* 141 (Pt 8), 1909-1920.
- Giraud, E., Cloeckaert, A., Kerboeuf, D., and Chaslus-Dancla, E. 2000. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in salmonella enterica serovar typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 1223-1228.
- Goldman, J. D., White, D. G., and Levy, S. B. 1996. Multiple antibiotic resistance (mar) locus protects escherichia coli from rapid cell killing by fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 40, 1266-1269.
- Heurtin-Le Corre, C., Donnio, P. Y., Perrin, M., Travert, M. F., and Avril, J. L. 1999. Increasing incidence and comparison of nalidixic acid-resistant salmonella enterica subsp. Enterica serotype typhimurium isolates from humans and animals. *J Clin Microbiol.* 37, 266-269.
- Horiyama, T., Yamaguchi, A., and Nishino, K. Tolc dependency of multidrug efflux systems in salmonella enterica serovar typhimurium. *J Antimicrob Chemother.* 65, 1372-1376.
- Imlay, J. A. 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* 77, 755-776.
- Jellen-Ritter, A. S. and Kern, W. V. 2001. Enhanced expression of the multidrug efflux pumps acrab and acrf associated with insertion element transposition in escherichia coli mutants selected with a fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 1467-1472.
- Kehrenberg, C., Cloeckaert, A., Klein, G., and Schwarz, S. 2009. Decreased fluoroquinolone susceptibility in mutants of salmonella serovars other than typhimurium: Detection of novel mutations involved in modulated expression of rama and soxs. *J Antimicrob Chemother.* 64, 1175-1180.
- Kehrenberg, C., de Jong, A., Friederichs, S., Cloeckaert, A., and Schwarz, S. 2007. Molecular mechanisms of decreased susceptibility to fluoroquinolones in avian salmonella serovars and their mutants selected during the determination of mutant prevention concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 59, 886-892.
- Kern, W. V., Oethinger, M., Jellen-Ritter, A. S., and Levy, S. B. 2000. Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 814-820.
- Koutsolioutsou, A., Martins, E. A., White, D. G., Levy, S. B., and Demple, B. 2001. A soxrs-constitutive mutation contributing to antibiotic resistance in a clinical isolate of salmonella enterica (serovar typhimurium). *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 38-43.
- Koutsolioutsou, A., Pena-Llopis, S., and Demple, B. 2005. Constitutive soxr

- mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical escherichia coli isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, 2746-2752.
- Lacroix, F. J., Avoyne, C., Pinault, C., Popoff, M. Y., and Pardon, P. 1995. Salmonella typhimurium tnphoa mutants with increased sensitivity to biological and chemical detergents. *Res Microbiol.* 146, 659-670.
- Lacroix, F. J., Cloeckert, A., Grepinet, O., Pinault, C., Popoff, M. Y., Waxin, H., and Pardon, P. 1996. Salmonella typhimurium acrb-like gene: Identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection. *FEMS Microbiol Lett.* 135, 161-167.
- Li, X. Z. 2005. Quinolone resistance in bacteria: Emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *Int J Antimicrob Agents.* 25, 453-463.
- Martin, R. G. and Rosner, J. L. 2001. The arac transcriptional activators. *Curr Opin Microbiol.* 4, 132-137.
- Miller, P. F., Gambino, L. F., Sulavik, M. C., and Gracheck, S. J. 1994. Genetic relationship between soxrs and mar loci in promoting multiple antibiotic resistance in escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother.* 38, 1773-1779.
- Morgan-Linnell, S. K., Becnel Boyd, L., Steffen, D., and Zechiedrich, L. 2009. Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in escherichia coli clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, 235-241.
- Nishino, K., Latifi, T., and Groisman, E. A. 2006. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of salmonella enterica serovar typhimurium. *Mol Microbiol.* 59, 126-141.
- Nishino, K. and Yamaguchi, A. 2001. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in escherichia coli. *J Bacteriol.* 183, 5803-5812.
- Oethinger, M., Kern, W. V., Jellen-Ritter, A. S., McMurry, L. M., and Levy, S. B. 2000. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in escherichia coli in the absence of the acrab efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 10-13.
- Oethinger, M., Podglajen, I., Kern, W. V., and Levy, S. B. 1998. Overexpression of the mara or soxs regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother.* 42, 2089-2094.
- Olliver, A., Valle, M., Chaslus-Dancla, E., and Cloeckert, A. 2005. Overexpression of the multidrug efflux operon acrf by insertional activation with is1 or is10 elements in salmonella enterica serovar typhimurium dt204 acrb mutants selected with fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, 289-301.
- Paulsen, I. T., Park, J. H., Choi, P. S., and Saier, M. H., Jr. 1997. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 156, 1-8.
- Piddock, L. J. 2002. Fluoroquinolone resistance in salmonella serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol Rev.* 26, 3-16.
- Piddock, L. J., White, D. G., Gensberg, K., Pumbwe, L., and Griggs, D. J. 2000. Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in salmonella enterica serovar typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 3118-3121.
- Pomposiello, P. J. and Demple, B. 2001. Redox-operated genetic switches: The soxr and oxyr transcription factors. *Trends Biotechnol.* 19, 109-114.
- Randall, L. P. and Woodward, M. J. 2001. Multiple antibiotic resistance (mar) locus in salmonella enterica serovar typhimurium dt104. *Appl Environ Microbiol.* 67, 1190-1197.
- Randall, L. P. and Woodward, M. J. 2002. The multiple antibiotic resistance (mar) locus and its significance. *Res Vet Sci.* 72, 87-93.

- Randall, L. P., Cooles, S. W., Osborn, M. K., Piddock, L. J., and Woodward, M. J. 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of salmonella enterica isolated from humans and animals in the uk. *J Antimicrob Chemother.* 53, 208-216.
- Ricci, V., Tzakas, P., Buckley, A., and Piddock, L. J. 2006. Ciprofloxacin-resistant salmonella enterica serovar typhimurium strains are difficult to select in the absence of acrb and tolC. *Antimicrob Agents Chemother.* 50, 38-42.
- Saenz, Y., Ruiz, J., Zarazaga, M., Teixido, M., Torres, C., and Vila, J. 2004. Effect of the efflux pump inhibitor phe-arg-beta-naphthylamide on the mic values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in escherichia coli isolates of different origin. *J Antimicrob Chemother.* 53, 544-545.
- Sulavik, M. C., Dazer, M., and Miller, P. F. 1997. The salmonella typhimurium mar locus: Molecular and genetic analyses and assessment of its role in virulence. *J Bacteriol.* 179, 1857-1866.
- Sulavik, M. C., Houseweart, C., Cramer, C., Jiwani, N., Murgolo, N., Greene, J., DiDomenico, B., Shaw, K. J., Miller, G. H., Hare, R., and Shimer, G. 2001. Antibiotic susceptibility profiles of escherichia coli strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 1126-1136.
- van Hoek, A. H., Scholtens, I. M., Cloeckaert, A., and Aarts, H. J. 2005. Detection of antibiotic resistance genes in different salmonella serovars by oligonucleotide microarray analysis. *J Microbiol Methods.* 62, 13-23.
- Zheng, J., Cui, S., and Meng, J. 2009. Effect of transcriptional activators rama and soxS on expression of multidrug efflux pumps acrab and acref in fluoroquinolone-resistant salmonella typhimurium. *J Antimicrob Chemother.* 63, 95-102.