



**UDESC**

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETECÇÃO DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO  
ESTENDIDO (ESBLs) EM ISOLADOS DE *SALMONELLA*  
PROVENIENTES DE CARNES DE FRANGO**

**JÉSSICA GIURIATTI**

CHAPECÓ, 2017

**JÉSSICA GIURIATTI**

**DETECÇÃO DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBLs) EM  
ISOLADOS DE *SALMONELLA* PROVENIENTES DE CARNES DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**.

**Orientadora: Prof. PhD. Lenita Moura Stefani**

**Chapecó, SC, Brasil  
2017**

**Universidade do Estado de Santa Catarina**  
**UDESC Oeste**  
**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**DETECÇÃO DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBLs) EM  
ISOLADOS DE *SALMONELLA* PROVENIENTES DE CARNES DE FRANGO**

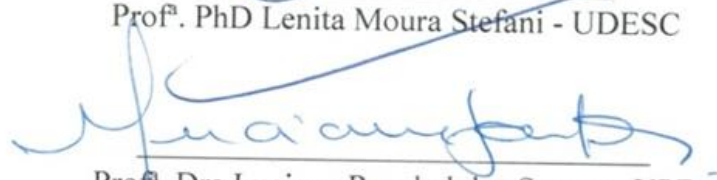
Elaborada por  
**Jéssica Giuriatti**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Zootecnia**

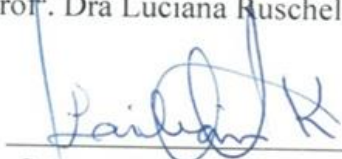
Comissão Examinadora:



Prof.<sup>a</sup>. PhD Lenita Moura Stefani - UDESC



Prof.<sup>a</sup>. Dra Luciana Ruschel dos Santos - UPF



Prof.<sup>a</sup>. Dra Lilian Kolling Girardini - UNOESC

Chapecó, 08 de março de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus acima de tudo por ter me permitido participar de mais esse processo de aprendizado, por ter me dado calma e paz nas atribuições.

A minha família, pelo apoio incondicional durante todas as minhas escolhas, por terem auxiliado na formação do meu caráter, e pelo amor despendido comigo todos esses anos.

A Universidade Estadual de Santa Catarina-UDESC, principalmente aos profissionais éticos, por terem me acolhido e terem feito parte da minha história, minha formação e da minha profissão.

A Prof<sup>a</sup>. PhD. Lenita Moura Stefani, pela amizade, paciência, orientação, conselhos, e aprendizados acima de tudo, o meu muito obrigado.

A equipe LABMIM, pelo auxílio durante o meu experimento, pelo apoio nos momentos bons e difíceis, pelas brincadeiras, e por tornarem o nosso ambiente de trabalho o mais agradável possível.

E pra finalizar com chave de ouro, aos meus amigos do mestrado, pelos momentos divididos, especialmente a Juscivete Favero, Maiara Brisola e Regiane Crescencio, que se tornaram verdadeiras amigas e aos poucos nos tornamos mais que amigas, quase irmãs... Obrigada por dividir comigo as angústias, alegrias e ouvirem minhas bobagens. É muito bom poder contar com vocês!

A todos o meu muito obrigado!

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

### DETECÇÃO DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBLs) EM ISOLADOS DE *SALMONELLA* PROVENIENTES DE CARNES DE FRANGO

AUTORA: Jéssica Giuriatti

ORIENTADORA: Prof. PhD. Lenita Moura Stefani

Chapecó, 8 de março de 2017.

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil fenotípico e genotípico da susceptibilidade antimicrobiana, e o possível envolvimento de enzimas ESBLs em isolados oriundos de carnes de frango. Foram utilizados 18 isolados de *Salmonella* Heidelberg (SH) e 9 de *S. Enteritidis* (SE) pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Biologia Molecular, Imunologia e Microbiologia (LABMIM) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) também isoladas de carnes de frango no estado do Paraná foram utilizadas. Os 27 isolados de SE e SH foram submetidos aos teste de disco-difusão para definir o Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA) e a Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) utilizando-se os seguintes antimicrobianos: amoxicilina associado ao ácido clavulânico, ácido nalidíxico, cefotazima, ceftazidima, ceftiofur, ceftriaxone, enrofloxacina, estreptomomicina, gentamicina, e tetraciclina. Foi considerado multirresistente o isolado que apresentou resistência a três ou mais classes de antimicrobianos. Outro teste realizado foi o disco-aproximação com o intuito de averiguar zonas de inibição interpostas, indicativas da produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs). Nos isolados de SH que apresentaram multirresistência (18/18) foi realizada a pesquisa de genes de resistência relacionados às ESBLs, sendo eles: *bla*CMY-2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1 e *AmpC* através da técnica de PCR. A resistência geral encontrada foi de 17,77% e 80,55% para SE e SH, respectivamente. Os maiores níveis de resistência foram observados para o ácido nalidíxico, onde ambos sorovares foram 100% resistentes, seguido do ceftiofur com 22,22% para SE e 100% para SH. O padrão de resistência mais encontrado foi o B, cujo as classes são: penicilina, cefalosporinas, quinolona e tetraciclina, presentes em 42,1 % dos isolados de SH. De acordo com o teste de disco-aproximação não observamos zona de inibição, porém quanto a pesquisa dos genes de resistência via beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), detectamos cinco dos sete genes avaliados sendo que a média de prevalência dos genes estudados foi de 26,18%, onde os genes *bla*TEM-1, *bla*CMY-2 e *AmpC* obtiveram maior amplificação (83,33%, 38,88% e 38,88%, respectivamente). Os genes *bla*OXA-1 e *bla*PSE-1 não foram detectados. Estes resultados certamente denotam preocupação por se tratar de uma bactéria que causa doença em humanos e que pode estar presente em carnes de frango, com elevado perfil de resistência as cefalosporinas de terceira geração, sendo esta a classe de antimicrobianos mais utilizada no tratamento e controle das salmoneloses humana e animal.

**Palavras-chave:** Antibiograma, Genes de Resistência, PCR, Salmonelose, Saúde Pública.

## ABSTRACT

Master's Thesis

Animal Science Graduate Program

University of Santa Catarina State

### DETECTION OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASES (ESBLs) IN *SALMONELLA* ISOLATES FROM CHICKEN MEAT

AUTHOR: Jéssica Giuriatti

ADVISOR: Prof. PhD. Lenita Moura Stefani

Chapecó, March 8<sup>th</sup>, 2017.

The objective of this study was to evaluate the phenotypic and genotypic profile of antimicrobial susceptibility and the possible involvement of ESBLs enzymes in chicken meat isolates. Eighteen isolates of *Salmonella* Heidelberg (SH) and nine *S. Enteritidis* (SE) belonging to bacterioteca from the Laboratory of Molecular Biology, Immunology and Microbiology (LABMIM) of the State University of Santa Catarina (UDESC) were also isolated from chicken meats in the state of Paraná were used. The 27 isolates of SE and SH were submitted to the disc-diffusion test to define the Multiple Antimicrobial Resistance Index (IRMA) and Multiple Drug Resistance (MDR) using the following antimicrobial agents: amoxicillin associated with clavulanic acid, Nalidixic, cefotazime, ceftazidime, ceftiofur, ceftriaxone, enrofloxacin, streptomycin, gentamicin, and tetracycline. The isolate that presented resistance to three or more classes of antimicrobials was considered multidrug resistant. Another test was the disc-approximation in order to investigate interposed inhibition zones, indicative of the production of extended spectrum beta-lactamase enzymes (ESBLs). In the isolates of SH that presented multiresistance (18/18) the resistance genes related to ESBLs were investigated: *bla*CMY-2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1 and *AmpC* by the PCR technique. Overall resistance was 17.77% and 80.55% for SE and SH, respectively. The highest levels of resistance were observed for nalidixic acid, where both serovars were 100% resistant, followed by ceftiofur with 22.22% for SE and 100% for SH. The most commonly found resistance pattern was B, whose classes are: penicillin, cephalosporins, quinolone and tetracycline, present in 42.1% of SH isolates. We did not observe zone of inhibition according to the disc-approximation test, but when searching for resistance genes via ESBLs, we detected five of the seven genes evaluated, and the mean prevalence of the studied genes was of 26.18%, where the *bla*TEM-1, *bla*CMY-2 and *AmpC* genes obtained higher amplification (83.33%, 38.88% and 38.88%, respectively). The *bla*OXA-1 and *bla*PSE-1 genes were not detected. The multiresistance profile possibly justified by the presence of resistance genes involved with ESBLs. These results are certainly of concern because it is a bacterium that causes disease in humans and can be present in chicken meat, with a high resistance profile to third generation cephalosporins, being this the class of antimicrobials most used in the treatment and control of human and animal salmonellosis.

**Keywords:** Antibiogram, Health Public, PCR, Resistance genes, Salmonellosis.

## SUMÁRIO

<b>1. CAPÍTULO I.....</b>	<b>10</b>
REVISÃO DE LITERATURA .....	10
1.1 SALMONELOSE E SUA IMPORTÂNCIA NA SAÚDE PÚBLICA .....	10
1.1.1 Salmonelose .....	10
1.1.2 Vias de transmissão .....	11
1.2 GÊNERO <i>SALMONELLA</i> .....	12
1.2.1 Características gerais .....	12
1.2.2 Taxonomia .....	12
1.2.3 Virulência .....	13
1.3 USO DE ANTIMICROBIANOS NA AVICULTURA.....	14
1.3.1 Resistência bacteriana frente aos antimicrobianos .....	15
1.3.2 Resistência bacteriana aos antimicrobianos beta-lactâmicos.....	16
1.3.3 Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBLs).....	17
1.4 OBJETIVOS.....	20
1.4.1 Objetivo geral.....	20
1.4.2 Objetivos específicos.....	20
<b>2. CAPÍTULO II.....</b>	<b>21</b>
<b>MANUSCRITO .....</b>	<b>21</b>
2.1 MANUSCRITO I .....	22
BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBLs) EM ISOLADOS DE <i>SALMONELLA</i> PROVENIENTES DE CARNES DE FRANGO.....	22
RESUMO .....	23
INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS .....	30
DISCUSSÃO.....	34
REFERÊNCIAS DO MANUSCRITO .....	36
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>39</b>
<b>4. REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO .....</b>	<b>40</b>

## 1. CAPÍTULO I

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.1 SALMONELOSE E SUA IMPORTÂNCIA NA SAÚDE PÚBLICA

##### 1.1.1 Salmonelose

A Salmonelose é uma enfermidade de importância mundial que preocupa as autoridades sanitárias e constitui uma importante barreira ao comércio internacional de alimentos pelo seu potencial zoonótico. A ampla distribuição da *Salmonella* entre os animais e sua capacidade de sobreviver por longos períodos no meio ambiente contribuem para seu destacado papel em saúde pública (BUTAYE et al., 2003).

De acordo com a patogênese, os sorotipos de *Salmonella* podem ser divididos em dois grupos: aqueles adaptados ao hospedeiro e os não adaptados aos hospedeiros (UZZAU et al., 2000; STEVENS et al., 2009; BARROW; FREITAS 2011). Os sorovares adaptados ao hospedeiro causam doença sistêmica em um limitado número de espécies, por exemplo, *S. Enteritidis* associado a doenças em seres humanos, *S. Gallinarum* associado à doença sistêmica em aves. Eventualmente estes sorovares adaptados ao hospedeiro podem causar doença sistêmica em outras espécies quando os indivíduos estão imunodeprimidos. Entretanto, de acordo com Uzzau et al. (2000), algumas vezes esses sorovares adaptados podem infectar outras espécies, e estes indivíduos infectados podem desenvolver o *status* de carreador assintomático, podendo excretar a bactéria no meio, caracterizando um grande risco para o controle da enfermidade.

O sorovar hospedeiro adaptado *S. Gallinarum* é dividido em dois biotipos, sendo eles, *gallinarum* e *pullorum*. Estes podem ser diferenciados bioquimicamente e genotipicamente. Esses biotipos causam duas diferentes síndromes em aves que são o tifo aviário e a pulorose, respectivamente. O tifo aviário é uma doença sistêmica que acomete aves de todas as idades, especialmente aquelas acima de três meses, enquanto a pulorose afeta aves jovens.

Há mais de 2000 sorovares não adaptados, como por exemplo, *S. Typhimurium* e *S.*



Enteritidis que normalmente produzem uma enterite aguda em um grande número de espécies, incluindo seres humanos. Esses sorovares não são restritos a um único hospedeiro e sua epidemiologia pode ser bastante complexa. De acordo com Stevens et al. (2009), diferenças em vias e doses de inoculação, além da genética e *status* imunológico do hospedeiro podem determinar o tipo de resposta clínica aos sorovares hospedeiros não adaptados. Como exemplo podemos citar a *S. Enteritidis* que pode ser restrita ao intestino, sem sinais clínicos em aves adultas, mas pode causar doença sistêmica fatal em aves jovens.

### 1.1.2 Vias de transmissão

As aves têm um papel importante como veículos de transmissão nos casos de salmonelose humana (WHO, 2002). Os principais alimentos responsáveis pela transmissão desta enfermidade são os ovos, carnes de aves e seus derivados, sendo que, em geral, a manipulação inadequada, durante o preparo de alimentos é um fator importante de contaminação cruzada (TÉO, 2002). Segundo Okamura et al. (2001), ainda há a capacidade de transmissão transovariana e horizontal, que pode resultar em ampla disseminação e persistência desse sorovar na indústria avícola. A contaminação das carcaças de frango pode decorrer da presença da bactéria no ambiente de criação que se dissemina durante o abate, caso cuidados higiênicos não sejam realizados. A legislação nacional e internacional determina a ausência de qualquer *Salmonella* spp. em 25 gramas da amostra analisada, incluindo carnes de frango e perus (IBGE, 2016).

Uma pesquisa publicada pela Foodborne Diseases Active Surveillance Network (CDC, 2011) comparou o número de casos de doenças por contaminação alimentar em seres humanos nos Estados Unidos e demonstrou que as infecções causadas por *Salmonella* corresponderam a 43,25% dos casos confirmados em laboratório e também foram maiores em números de internações (2.290 casos) e mortes (29 casos).

O período de incubação da doença em seres humanos é de aproximadamente 10 dias e em 47% dos casos são necessários atendimentos hospitalares (CURRIE et al., 2005). Porém, segundo o CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças do Governo Norte Americano (2011), a maioria das pessoas recupera-se sem tratamento. Infecções por *Salmonella* spp. tendem a desenvolver febre, diarreia e cólicas abdominais 12 a 72 horas após a infecção e aproximadamente 33% dos casos apresentam diarreia sanguinolenta (CURRIE et al., 2005). De acordo com Demczuk; Soule; Clark, (2003) as infecções por *Salmonella* Heidelberg (SH)

são associadas a sintomas de doença grave, incluindo infecções extra-intestinais, septicemia e miocardite.

Infecções por *Salmonella* spp podem se espalhar do trato intestinal para a corrente sanguínea e depois para outros locais do corpo, podendo causar a morte se o paciente não for medicado rapidamente com antimicrobianos. Adultos mais velhos, crianças e pacientes com comprometimento do sistema imune são mais susceptíveis as infecções graves por *Salmonella* spp (CDC, 2011).

## 1.2 GÊNERO *SALMONELLA*

### 1.2.1 Características gerais

As *Salmonellas* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, e morfologicamente são bactérias Gram negativas, anaeróbicas facultativas, com formato de bastonetes, geralmente móveis. Utilizam flagelos para sua locomoção, com exceção dos sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, sendo capazes de formar ácido e na maioria das vezes, gás a partir da glicose exceto *S. Typhi*, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (FOLEY et al., 2013).

A adaptabilidade fisiológica desta bactéria é demonstrada por sua habilidade para proliferar em valores de pH entre 7.0 e 7.5 (extremos 3.8 e 9.5), temperatura de 35 °C a 43 °C (extremos 5 °C a 46 °C) e uma atividade de água > 0,94, ocorrendo variações entre sorovares. É sensível ao calor, não sobrevivendo à temperaturas superiores a 70 °C (BRASIL, 2011).

### 1.2.2 Taxonomia

A corrente taxonômica da *Salmonella* classifica apenas duas espécies dentro deste gênero: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A *S. enterica* é dividida em seis subespécies e abaixo do nível de subespécies, os organismos são sorotipados com base no antígeno somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi) (POPPOFF; MINOR, 1997). Apesar de ser adequado classificar os sorovares desta forma, somente a presença destes antígenos não determina a resposta clínica do hospedeiro à infecção. Por exemplo, o sorovar Gallinarum (fórmula O: 1,9,12: H:- :Vi: -) pertence ao mesmo sorogrupo D como o Typhi e Dublin, mas

nenhuma associação patogênica foi encontrada entre estes sorovares (UZZAU et al., 2000).

### 1.2.3 Virulência

A virulência da *Salmonella* está diretamente relacionada a capacidade da mesma em invadir células do hospedeiro, replicar-se dentro dessas células, e resistir à destruição por componentes fagocitários ou à destruição por componentes plasmáticos do complemento (QUINN et al., 2005). A diversidade do genoma da *Salmonella* spp está relacionada com a aquisição de plasmídeos, uma vantagem seletiva não apenas para os genes de resistência, mas também para a expressão de genes de virulência (CHIU et al., 2006).

Segundo Vieira (2009) para causar doença, a *Salmonella* spp depende de vários fatores determinantes de virulência, e alguns desses fatores podem estar diretamente ligados a elementos genéticos transmissíveis, como os *transposons*, plasmídeos ou bacteriófagos, assim como também podem fazer parte de regiões específicas do cromossomo da bactéria, as chamadas Ilhas de Patogenicidade (IP), onde a maioria dos genes de virulência se agrupam.

Antes de invadir qualquer tipo de célula do hospedeiro, as enterobactérias necessitam entrar em contato e fixar-se a um ou mais tipos celulares encontrados no tecido intestinal. Esse evento é mediado pelas fímbrias que são capazes de realizar fixação, adesão às superfícies, persistência ambiental e formação de biofilmes (GIBSON et al., 2007). Existem quatro tipos de fímbrias ou *pilli*: fímbrias do tipo I (*Fim*), codificadas por plasmídeos; fímbria polar longa, fímbrias agregativas e a fímbria específica de *Salmonella* Enteritidis (DARWIN; MILLER, 1999). Dentre o conjunto de genes fimbriais *Salmonella* específicos, está incluído o *lpf* (*long polar fimbriae*), que regula a expressão da fímbria polar longa (FOLKESSON et al., 1999) e o *agf* (*aggregative fimbriae*), que codifica a fímbria SEF17, a qual permite estabilidade à *Salmonella* e auto-agregação bacteriana (GIBSON et al., 2007).

As IPs são formadas por sequências específicas de DNA bacteriano, que codificam sua virulência, para estabelecer interações específicas com o hospedeiro (MARCUS et al., 2000). Até o presente momento, sabe-se de um total de cinco IPs para *Salmonella* entérica: SPI-1 onde os genes *inv*, *spa* e *hil* são necessários para auxiliar na invasão da bactéria em células epiteliais da mucosa intestinal e, SPI-2, SPI-3 e SPI-4 com genes essenciais para o crescimento e sobrevivência da bactéria com o hospedeiro, manifestando a fase sistêmica da doença e por fim a SPI-5 que codifica fatores de virulência envolvidos na fase entérica da doença (HACKER et al., 1997; MARCUS et al., 2000).

O mecanismo pelo qual a *Salmonella* spp invade as células hospedeiras é bastante complexo. Um dos genes envolvidos neste processo é o *invA*, que está localizado no operon *invABCD*, presente na SPI-1. Este gene codifica a proteína InvA da membrana interna da bactéria, sendo essencial para a invasão das células epiteliais do hospedeiro (DARWIN; MILLER, 1999; OLIVEIRA et al., 2003). Segundo Rahn et al., (2000) este gene pode ser usado para diferenciar *Salmonella* spp de outros microorganismos, pois a sequência de nucleotídeos contida neste gene está presente e é conservada em todos os sorovares de *Salmonella* spp portanto, por ser considerado específico deste gênero. Diante disso, o *invA* é utilizado como gene alvo para detecção de *Salmonella* spp através da técnica de PCR (SALEHI; MAHZOUNIEH; SAEEDZADEH, 2005).

### 1.3 USO DE ANTIMICROBIANOS NA AVICULTURA

O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na avicultura comercial tornou-se uma prática rotineira devido às vantagens que podem trazer com relação aos índices de desempenho zootécnico dos animais, melhorando a eficiência econômica do sistema de produção. Os efeitos dos antimicrobianos são obtidos por interferência na síntese da parede celular, alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática, interferências na replicação cromossômica e na síntese proteica bacteriana (UTIYAMA et al., 2006). Os mecanismos de promoção de crescimento relacionados com o uso de antimicrobianos estão focados, principalmente, na interação destes aditivos com a microbiota intestinal, reduzindo a competição por nutrientes entre a microbiota e o animal e a produção de metabólitos microbianos de patógenos (KERMYT et al., 1999). Apesar dos conhecimentos benéficos associados à produção animal, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento sempre foi contestado devido a provável ocorrência de resistência bacteriana. Além disso, os consumidores de carne de frango têm solicitado modificações na criação destes animais, quanto ao bem estar animal e quanto a utilização de antimicrobianos como aditivos alimentares na produção de aves.

Em janeiro de 2006, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na alimentação dos animais foi banido pela União Européia. Esta proibição tem restringido a importação dos produtos originados destes animais. Pelo exposto, o Brasil tem buscado adaptar-se às exigências internacionais de exportação e a atender às legislações vigentes. Ainda existem algumas substâncias permitidas e autorizadas a serem adicionadas, com

algumas restrições, nas rações animais. A principal consequência desta proibição na Europa, por exemplo, foi o aumento de diarreias e do uso de antimicrobianos com fins terapêuticos (MENDEZ et al., 2013).

Assim, o principal desafio da produção avícola hoje refere-se a busca de um equilíbrio entre a microbiota e o hospedeiro, equilíbrio esse que baseia-se na presença de microorganismos benéficos ao animal e que não façam competição com o hospedeiro por nutrientes, ou que não estejam envolvidos em toxinfecções em seres humanos. A microbiota benéfica do trato gastrointestinal (TGI) evita a colonização por bactérias patogênicas através da exclusão competitiva, e outro benefício é o desenvolvimento de defesas intestinais como o muco, a camada epitelial e a lâmina própria com ajuda da produção de ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas e aminoácidos, sendo que os ácidos graxos de cadeia curta fornecem energia e auxiliam no controle de microorganismos não desejados, estimulando a proliferação de células epiteliais e o tamanho das vilosidades, aumentando a superfície de absorção (HART et al., 2002; DIBNER; RICHARDS, 2005).

### **1.3.1 Resistência bacteriana frente aos antimicrobianos**

Em geral, existem dois tipos de resistência a antimicrobianos: a resistência natural que uma bactéria tem contra os efeitos de um determinado antimicrobiano, devido às características próprias da célula bacteriana, por exemplo, bactérias do gênero *Pseudomonas* spp possuem um envoltório externo que dificulta a entrada de muitos antimicrobiano, o que as torna naturalmente resistentes. O segundo tipo de resistência depende da ação de genes, que atuam no sentido de neutralizar a ação do antimicrobiano, por diversos mecanismos, onde as bactérias resistentes passam os genes que conferem essa resistência para suas descendentes, e em pouco tempo, essas cepas tornam-se predominantes (FRYE; JACKSON, 2013).

Quanto maior for o contato das bactérias com os antimicrobiano, maior será a probabilidade de aparecerem mutantes resistentes. Em outras palavras, a presença do antimicrobiano acaba por selecionar as bactérias resistentes, as quais são minoria no início e acabam rapidamente tornando-se majoritárias. A capacidade que as bactérias têm de transferir o material genético para outras têm um papel importante na disseminação de genes de resistência de uma população para outra (APATA, 2009).

A presença de bactérias multirresistentes se deve a presença de genes de resistência, para diferentes antimicrobianos, em um só plasmídeo ou ainda amostras com resistência

múltipla diante da presença de dois ou mais plasmídeos diferentes em uma mesma bactéria. O aparecimento de cepas bacterianas multirresistentes tem sido relatado por diversos autores, e isso ocorre não só na avicultura, mas em todos os segmentos agropecuários, além é claro, da resistência humana aos antimicrobianos (THRELFALLI, 2002; PEIRANO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2011).

### **1.3.2 Resistência bacteriana aos antimicrobianos beta-lactâmicos**

Os beta-lactâmicos são um grupo de antimicrobiano que se define pela presença do anel beta-lactâmico, sendo uma classe de grande importância devido à sua excelente eficácia terapêutica e baixa toxicidade, visto que atuam na parede celular bacteriana. O uso amplo e indiscriminado destes agentes certamente auxiliou na disseminação da resistência, mas não provocou o aparecimento destas enzimas beta-lactamases. A produção destas enzimas por determinadas bactérias explica a sua permanência em um foco infeccioso quando o antimicrobiano utilizado é um beta-lactâmico (SUAREZ; GUDIOL, 2009).

A família dos beta-lactâmicos apresenta o anel beta-lactâmico, e sua química não é igual, podendo conter diferentes tipos de cadeias lineares, diferenciando assim as suas características, espectros de ação e resistências às beta-lactamases. Assim, o grupo de antimicrobianos classificado como beta-lactâmico é composto por carbapenemos, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Os inibidores das beta-lactamases, como o ácido clavulânico, são também considerados beta-lactâmicos, já que possuem igualmente a estrutura base (SOUSA; CONCEIÇÃO; FERREIRA, 2002).

As beta-lactamases constituem enzimas capazes de inativar as penicilinas, cefalosporinas e os monobactâmicos. Estas enzimas são frequentemente produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias, e lisam o anel beta-lactâmico por hidroxilação irreversível da ligação amida, com inativação do antimicrobiano. Embora o resultado final de sua ação seja o mesmo, a atividade enzimática é variável de acordo com o tipo de beta-lactamase produzida e os diversos substratos existentes. Existe uma variação em especificidade de substrato entre as beta-lactamases: algumas hidroxilam preferencialmente as penicilinas (penicilinases), outras têm atração pelas cefalosporinas (cefalosporinases) e algumas enzimas inativam ambas as classes de antimicrobianos. Em alguns patógenos, verifica-se a produção de diferentes tipos de beta-lactamases, onde diferentes cepas podem produzir diferentes enzimas, ou uma única cepa pode produzir mais

de um tipo de enzima (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

Os inibidores das beta-lactamases, como o ácido clavulânico, tazobactam ou sulbactam, são utilizados para ampliar o espectro das penicilinas na ação de destruição dos microorganismos produtores de beta-lactamases. Os inibidores possuem uma estrutura idêntica à penicilina, modificando apenas a cadeia lateral, desta forma, as beta-lactamases atuam nos inibidores, de forma a deixar disponível o antimicrobiano para atuar na causa da infecção (WILLIAMS, 1999).

Os monobactâmicos, como o aztreonam, apresentam uma elevada afinidade para as proteínas de ligação à penicilina (PBPs) e inibem a síntese da parede celular. A sua estrutura é altamente resistente à hidrólise pelas beta-lactamases, como a penicilinase e cefalosporinase, assim apresentando ação mesmo contra as bactérias produtoras de beta-lactamases (DANDAN; BRUTON, 2008; KATZUNG, 2007; NEU; GOOTZ, 1996).

### 1.3.3 Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBLs)

As ESBLs constituem um grupo de enzimas derivadas das beta-lactamases que são codificadas por plasmídeos, como as famílias: Temoniera (TEM), Sulfidril variável (SHV) e oxacilina (OXA) (STÜRENBURG et al., 2005). Dentro destas maiores “famílias”, estão incluídas as duas primeiras variantes de beta-lactamases identificadas (SIROT et al., 1987) e com o passar do tempo, houve o surgimento de outras ESBLs (famílias CTX-M, PER, VEB, GES, TLA e BES). Estas enzimas conferem resistência às bactérias contra as cefalosporinas de amplo espectro, penicilinas e monobactams (aztreonam), sendo que essas amostras permanecem sensíveis às cefamicinas e carbapenêmicos (STÜRENBURG; MACK, 2003).

A primeira bactéria descoberta e identificada, que possuía a beta-lactamase conferindo resistência ao anel beta-lactâmico foi o *Staphylococcus aureus* em 1944. Após estas, muitas outras foram descobertas (BAUER; PERRY; KIRBY, 1960). Atualmente, sabe-se que essa capacidade era devida a produção de uma beta-lactamase *AmpC*, que só foi sequenciada mais de 40 anos depois, em 1981 (JACOBY, 2009). As beta-lactamases do tipo *AmpC* são serino-proteases pertencem a Classe C da classificação molecular e ao grupo “1” da classificação funcional de Bush; ou seja, são cefalosporinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010).

Dentre os antimicrobianos de relevância na produção animal, as cefalosporinas fazem parte do grupo dos antimicrobianos beta-lactâmicos, atuando na inibição da síntese da parede

bacteriana através da inibição da transpeptidase, proteína ligante da penicilina que catalisa a formação de polímeros peptidoglicanos da parede celular bacteriana (QUINN et al., 2005; WEBSTER, 2005). O ceftiofur, cefalosporina de terceira geração, é a única aprovada para uso em animais de produção (WEBSTER, 2005). A resistência das cepas de *Salmonella* sp. ao ceftiofur tem sido predominantemente associada ao gene *BlaCMY-2* codificado por plasmídeos. Estudos de Frye e Cray (2007) sugerem que a aquisição de plasmídeos de resistência e a disseminação dos sorotipos específicos que abrigam estes plasmídeos estão impulsionando a resistência observada para ceftiofur em isolados de *Salmonella* sp. de origem animal.

Outra característica fenotípica importante é que essas enzimas são sensíveis à ação dos inibidores de betalactamases, como sulbactam, ácido clavulânico e tazobactam. As enzimas foram denominadas de ESBLs devido ao fato da maioria dessas enzimas serem codificadas por genes localizados em plasmídeos, que geralmente carregam genes de resistência a outros antimicrobianos, tais como aminoglicosídeos, trimetoprim, sulfonamidas, tetraciclina e cloranfenicol. As cepas produtoras de ESBLs são geralmente multirresistentes (SOUSA; CONCEIÇÃO; FERREIRA, 2002)

A produção de beta-lactamases é o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas e o grau de resistência irá depender da quantidade de enzima produzida, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão, potência e velocidade com que o beta-lactâmico penetra pela membrana externa da bactéria e permeabilidade da membrana. A superprodução de enzimas induzíveis cromossômicas ou plasmidiais podem inativar antimicrobianos como o imipenem ou as cefalosporinas de terceira geração que eram resistentes à degradação por quantidades normais de enzimas. As ESBLs inativam muitas das cefalosporinas de terceira geração, enquanto que os carbapenênicos são relativamente resistentes a estas enzimas versáteis (SOUSA; CONCEIÇÃO; FERREIRA, 2002).

Por também estarem localizados em plasmídeos, os genes ESBLs podem facilmente ser transferidos dentro e entre espécies bacterianas (XU et al., 2011). Alguns genes são mutantes de beta-lactamases mediadas por plasmídeos estabelecidos, como o *bla*TEM e *bla*SHV e outros são mobilizados a partir de bactérias do ambiente como o *bla*CTX-M, onde no EUA, o gene de resistência mais prevalente é o *bla*CTX-M-15 que está associado a estirpe de *E. coli* S:25b-ST131 amplamente distribuída no país (OVERDEVEST et al., 2011).

As beta-lactamases encontradas em vários sorovares de *Salmonella* sp. são codificadas por um número considerável de genes. Existem pelo menos 10 diferentes subgrupos de genes relacionados à produção das beta-lactamases (*bla*): TEM, SHV, PSE, OXA, PER, CTX-M,



CMY, ACC, DHA e KPC. Numa mesma cepa podem estar presentes vários tipos de genes *bla*. Dentre estes grupos, os que possuem maior importância clínica são aqueles responsáveis pela produção de ESBLs (LEONÍDIO et al., 2015).

Segundo Bradford (2001), a rápida resistência a beta-lactâmicos principalmente em *S. aureus*, é devido a uma penicilinase mediada por plasmídeos que se espalhou rapidamente em outras espécies bacterianas. A primeira beta-lactamase mediada por plasmídeo encontrada em bactérias Gram-negativas foi a TEM-1, descrita no início dos anos 1960, de uma cepa de *E. coli* isolada em uma cultura sanguínea de uma paciente chamada Temoniera na Grécia, e por ser mediada por plasmídeos e *transposons* é de fácil propagação para outras espécies bacterianas.

A resistência bacteriana a cefalosporinas, por exemplo, por ser mediada por plasmídeos contendo o gene *AmpC* e também CMY-2, que é o mais comum e está presente em grandes plasmídeos de diferentes tipos genéticos (BUNT et al., 2016).

Outro plasmídeo que confere genes de resistência é o UO-StVR2, que é um exemplo de plasmídeo híbrido responsável pela transferência de genes de resistência a *S. Typhimurium*, sendo esta resistente a ampicilina (gene OXA-1), cloranfenicol (*catA1*), estreptomicina (*aadA1*), sulfonamidas (*sul1*) e tetraciclina (*tetA(B)*) (BRENNER; MICHAEL et al., 2000)

Tem sido observado que em cepas que transportam ESBLs dos tipos CTX-M-14 e CTX-M-15, também possuem susceptibilidade diferenciada para outros antimicrobianos, como fluoroquinolonas e amoxicilina associada ao ácido clavulânico, sendo um fato importante, pois ambos os fármacos são alternativas no tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de ESBLs (BAJAJ et al., 2016).

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil fenotípico e genotípico da susceptibilidade antimicrobiana, e o possível envolvimento de ESBLs em isolados de *Salmonella* sp. oriundos de carnes de frango.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- a) Determinar o perfil fenotípico e genotípico de resistência antimicrobiana das amostras de *Salmonella* Enteritidis e *S. Heidelberg* pertencentes a bacterioteca do LABMIM (CEO-UDESC);
- b) Investigar a presença de genes de resistência usualmente envolvidos na resistência via beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs).

## **2. CAPÍTULO II**

### **MANUSCRITO**

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de um manuscrito, com sua formatação de acordo com a orientação da revista aos qual será submetido.

## 2.1 MANUSCRITO I

### **BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBLs) EM ISOLADOS DE *SALMONELLA* PROVENIENTES DE CARNES DE FRANGO**

Autores: Jéssica Giuriatti, Lenita Moura Stefani, Maiara Cristiane Brisola, Regiane Boaretto  
Crescencio, Dinael Simão Bitner

De acordo com normas para publicação em:

Brazilian Journal of Microbiology

**BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBLs) EM ISOLADOS DE  
*SALMONELLA* PROVENIENTES DE CARNES DE FRANGO**

Jéssica Giuriatti<sup>2,4</sup>, Maiara Cristiane Brisola<sup>2,4</sup>, Regiane Boaretto Crescencio<sup>2,4</sup>, Dinael Simão  
Bitner<sup>1,4</sup>, Lenita Moura Stefani<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico(a) do Curso de Zootecnia - CEO, UDESC.

<sup>2</sup>Acadêmico(a) do Curso de Mestrado em Zootecnia - CEO, UDESC.

<sup>3</sup>Orientadora, Departamento de Zootecnia - CEO, UDESC ([borruca@hotmail.com](mailto:borruca@hotmail.com)).

<sup>4</sup>Universidade do Estado de Santa Catarina - CEO, UDESC, Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Chapecó, SC, Brasil.

## **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil fenotípico e genotípico da susceptibilidade antimicrobiana, e o possível envolvimento de Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) no perfil de resistência de isolados oriundos de carnes de frango. Foram utilizados 27 isolados já identificados como *Salmonella* sp. cedidas pelo Laboratório Mercolab, sendo destas 9 isolados de *Salmonella* Enteritidis, e 18 amostras de *Salmonella* Heidelberg, isoladas de carnes de frango oriundas do Paraná. Posteriormente os 27 isolados de SE e SH foram submetidos aos testes de disco-difusão para definir o Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos e a Resistência a Múltiplas Drogas utilizando-se dez antimicrobianos utilizados rotineiramente na medicina humana e veterinária. Foi considerado multirresistente o isolado que apresentou resistência a três ou mais classes de antimicrobianos. Outro teste realizado foi o do disco-aproximação com o intuito de averiguar zonas de inibição interpostas,

indicativas da produção de ESBLs. Nos isolados de SH que apresentaram multirresistência (18/18) foi realizada a pesquisa dos genes de resistência envolvidos com a produção de ESBLs, sendo eles: *bla*CMY-2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1 e *AmpC* através da técnica de PCR. A resistência geral encontrada foi de 17,77% e 80,55% para SE e SH, respectivamente. Os maiores níveis de resistência foram observados para o ácido nalidíxico, onde ambos sorovares foram 100% resistentes, seguido do ceftiofur com 22,22% para SE e 100% para SH. O índice de resistência múltipla a antibióticos (IRMA), foi encontrado em cerca de 42,1% dos isolados de SH onde o padrão B foi o mais prevalente, cujo as classes relacionadas são: penicilina, cefalosporinas, quinolona e tetraciclina. De acordo com o teste de disco-aproximação não observamos zona de inibição, porém quanto a pesquisa dos genes de resistência via beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), observamos uma média geral de 26,18% de prevalência dos genes, onde o gene *bla*TEM-1 obteve maior amplificação (83,33%), e o segundo gene mais prevalente foi o *bla*CMY-2 (38,88%) seguido do gene *AmpC* (38,88%). Os genes *bla*OXA-1 e *bla*PSE-1 não apresentaram amplificação. Podemos concluir que as amostras de carne de frango avaliadas encontram-se de acordo com a legislação vigente e que os isolados de SH são mais resistentes que os de SE, com perfil de multirresistência possivelmente justificado pela presença de genes de resistência envolvidos com ESBLs. Estes resultados certamente denotam preocupação já que a *S. Heidelberg* é uma bactéria que pode estar presente em carnes de frango, causadora de toxiinfecções graves em indivíduos imunodeprimidos, e apresenta um elevado perfil de resistência aos antimicrobianos rotineiramente utilizados no tratamento e controle das salmoneloses humana e animal.

**Palavras chave:** Genes de resistência, PCR, *Salmonella*, Saúde Pública.

## INTRODUÇÃO

A salmonelose é uma enfermidade de importância mundial que preocupa as autoridades sanitárias, constituindo uma importante barreira ao comércio internacional de alimentos diante do seu potencial zoonótico (1). Segundo Sousa; Conceição; Ferreira (2), há um crescente número de cepas de *Salmonella* spp. multirresistentes aos antimicrobianos utilizados, tanto na avicultura quanto em humanos, e é de suma importância a detecção precoce destas bactérias para a indicação de um tratamento adequado, e melhorias nas formas de controle e prevenção.

Com a disseminação de cepas produtoras de ESBLs em hospitais, meio ambiente, alimentos, animais e no homem, é necessário conhecer a prevalência da produção de ESBLs para desenvolver novas políticas de terapia e prevenção tanto na medicina humana, quanto na veterinária. As ESBLs são mais comumente encontradas em *Klebsiella pneumoniae*, mas têm sido encontradas com frequência crescente em *E. coli*, *Proteus mirabilis* e outros bacilos Gram negativos como a *Salmonella* spp (2).

Este estudo tem grande relevância já que a salmonelose pode ser uma enfermidade grave principalmente em indivíduos imunodeprimidos e a carne de frango é um alimento passível de transmissão da bactéria *Salmonella*, agente causador da doença. O tratamento mais comumente utilizado para combater esta enfermidade em humanos são os antimicrobianos beta-lactâmicos, como por exemplo, as cefalosporinas de terceira geração, sendo o ceftriaxone o mais recomendado para crianças com salmonelose. Mecanismos de resistência bacteriana, como a produção de ESBLs, podem inibir a ação deste tipo de antimicrobiano. Desta forma, a avaliação dos índices de ESBLs em cepas isoladas de amostras de carnes de frango é necessária a fim de determinar o grau e o tipo de multirresistência presente nestes isolados.

Diante da carência de estudos sobre a presença de ESBLs em isolados de *Salmonella* sp. oriundas de carnes de frango no sul do Brasil, este trabalho tem o objetivo de avaliar o perfil de susceptibilidade frente a diferentes antimicrobianos e avaliar, pela primeira vez, a presença da resistência através da produção de ESBLs utilizando o teste de disco-aproximação e a técnica de PCR em isolados de *S. Enteritidis* (SE) e *S. Heidelberg* (SH) de carnes de frango, previamente coletadas no estado do Paraná, Brasil.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Amostragem**

Foram utilizadas 18 amostras de *Salmonella* Heidelberg e 9 de *Salmonella* Enteritidis, ambas provenientes de estudos anteriores, cedidas pelo Laboratório Mercolab, isoladas de carnes de frango, oriundas do Paraná do ano de 2013.

### **Teste do disco-difusão**

Foram realizados de acordo com a metodologia aprovada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (3) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que consta na IN M-2 A-8 de Padronização dos Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos por Disco-difusão (4). Os antimicrobianos testados foram: amoxicilina associado com ácido clavulânico 10 µg (penicilina), ácido nalidíxico 30 µg (quinolona), cefotazima 30 µg, ceftazidima 30 µg, ceftiofur 30 µg, ceftriaxone 30 µg (cefalosporinas), enrofloxacin 5 µg (fluorquinolonas), estreptomicina 10 µg, gentamicina 10 µg (aminoglicosídeos), e tetraciclina 30 µg, os discos foram fabricados pela empresa LABORCLIN®. Foi utilizado uma amostra de *Escherichia coli* ATCC® 25922 como referência.

Com o auxílio de uma régua os halos foram mensurados e classificados de acordo com as tabelas descritas pelo CLSI (3). Desta forma foi possível classificar os isolados estudados quanto a seus níveis de susceptibilidade.

### **Teste de disco-aproximação**

Para detecção das enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) foi utilizada a técnica adaptada de acordo com Lezameta (5) de disco-aproximação. Com uma alça bacteriológica de platina devidamente flambada e resfriada, uma colônia da bactéria *Salmonella*, foi inoculada em um tubo contendo 3 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion), e incubada a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  durante 18 horas. Após, utilizando-se um suabe estéril umedecido na suspensão bacteriana, a amostra foi semeada de forma suave em todas as direções da placa contendo ágar Muller-Hinton, e com auxílio de uma pinça flambada e resfriada, os discos contendo cada antimicrobiano foram colocados entre uma distância de 25 mm. Os discos utilizados para este teste foram: amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) (20/10 µg), aztreonam (AZM) (30 µg) ceftazidima (CAZ) (30 µg), ceftriaxone (CRO) (30 µg), cefepime (FEP) (30 µg), posteriormente foram incubados em estufa bacteriológica a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 18 a 24 horas. Foi utilizado uma amostra de *Escherichia coli* ATCC® 25922 como referência.

Após incubação, as placas foram submetidas a leitura do teste, sendo que a presença



de ESBLs foi verificada pela presença da zona fantasma, representada pelo alargamento da zona de inibição entre os discos utilizados.

### **Resistência a múltiplas drogas (MDR)**

A partir dos dados do disco-difusão foi possível determinar o número de isolados que foram considerados multirresistentes. Segundo Frye e Cray (6), são considerados multirresistentes isolados que apresentam resistência a três ou mais antimicrobianos.

### **Índice de resistência múltipla a antimicrobianos (IRMA)**

O índice de resistência múltipla antimicrobiana (IRMA) para cada amostra foi calculado de acordo com a metodologia descrita por Krumperman (7), onde o IRMA revela a relação entre o número de antimicrobianos resistentes e o número total de classes testadas.

### **Pesquisa de genes de resistência relacionados as ESBLs**

Foi utilizado o kit PureLink® Genomic DNA For Purification of Genomic DNA (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad) para a extração do DNA genômico dos isolados de *Salmonella* Heidelberg multirresistentes no teste de disco-difusão.

### **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para genes das ESBLs**

A detecção dos genes de resistência relacionados aos antimicrobianos beta-lactâmicos (*bla*CTY-M2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1 e *AmpC*) foram realizados através da metodologia de PCR convencional. As reações foram realizadas conforme indicado pelo Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA).

As condições de amplificação para os genes *invA* foram obtidas conforme descrito por Singh e Mustapha (8) sendo estas: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação por 95 °C por 15 segundos, anelamento e extensão 60 °C por 45 segundos. As condições para amplificação dos genes *bla*CTY-M2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1, foram obtidas de acordo com Chen *et al.* (9) e as condições para amplificação do gene *AmpC*, foram executadas de acordo com Alcaine *et al.* (10), conforme podemos observar na Tabela 01. Foram utilizados dois tipos de controle para a análise: controle

negativo da reação e o controle positivo. O controle negativo da reação de amplificação constituiu em uma amostra contendo os reagentes da reação, porém sem adição de DNA extraído. Este controle foi utilizado para detectar uma possível ocorrência de amplificação de material genético inespecífico. O controle positivo da reação de amplificação constituiu em uma amostra de SH, todos os reagentes da reação de PCR e primers para o gene *invA*.

### **Eletroforese**

Os produtos da amplificação do PCR foram analisados através da eletroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídeo (Ludwig), com marcador molecular de 1 Kb (Ludwig) a 110 V, 150 mA, 110 W por 60 minutos em fonte Loccus LPS 300 HC.

Após estes procedimentos realizou-se a leitura do gel em fotodocumentador com luz UV, marca Loccus, com sistema de fotodocumentação L-PIXEX.

**Tabela 01:** Genes de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos, primers, condições para amplificação, pares de bases (Pb) e referências utilizadas.

Gene	Sequência Nucleotídeos (5' - 3')	Condições PCR	Ciclos	Pb	Referências
<i>bla</i> CMY-2	(F) TGG CCG TTG CCG TTA TCT AC	95°C-10 min; 95°C-30 s; 55°C- 1 min; 72°C-1 min; 72°C- 7 min	30	870	(9)
	(R) CCC GTT TTA TGC ACC CAT GA				
<i>bla</i> SHV-1	(F) GGC CGC GTA GGC ATG ATA GA	95°C-10 min; 95°C-30 s; 55°C- 1 min; 72°C-1 min; 72°C- 7 min	30	714	(9)
	(R) CCC GGC GAT TTG CTG ATT TC				
<i>bla</i> TEM-1	(F) CAG CGG TAA GAT CCT TGA GA	95°C-10 min; 95°C-30 s; 55°C- 1 min; 72°C-1 min; 72°C- 7 min	30	643	(9)
	(R) ACT CCC CGT CGT GTA GAT AA				
<i>bla</i> CTX-M2	(F) GGC GTT GCG CTG ATT AAC AC	95°C-10 min; 95°C-30 s; 55°C- 1 min; 72°C-1 min; 72°C- 7 min	30	486	(9)
	(R) TTG CCC TTA AGC CAC GTC AC				
<i>bla</i> OXA-1	(F) AAT GGC ACC AGA TTC AAC TT	95°C-10 min; 95°C-30 s; 55°C- 1 min; 72°C-1 min; 72°C- 7 min	30	595	(9)
	(R) CTT GGC TTT TAT GCT TGA TG				
<i>bla</i> PSE-1	(F) TGC TTC GCA ACT ATG ACT AC	95°C-10 min; 95°C-30 s; 55°C- 1 min; 72°C-1 min; 72°C- 7 min	30	438	(9)
	(R) AGC CTG TGT TTG AGC TAG AT				
<i>AmpC</i>	(F) AAC ACA CTG ATT GCG TCT GAC	95°C-9,5 min; 95°C-45 s; 59°C- 45 s; 72°C-1 min; 72°C- 7 min	40	1226	(10; 19)
	(R) CTG GGC CTC ATC GTC AGT TA				

## **RESULTADOS**

### **Teste de disco-difusão**

O teste mostrou diferentes perfis de susceptibilidade para os dois sorotipos de *Salmonella* sp. estudados (Tabelas 02 e 03). A resistência geral encontrada foi de 17,77% e 80,55% para SE e SH, respectivamente. Os maiores níveis de resistência foram observados para o ácido nalidíxico, onde ambos sorovares foram 100% resistentes, seguido do ceftiofur com 22,22% para SE e 100% para SH. O padrão de resistência mais prevalente foi o B, cujo as classes são: penicilina, cefalosporinas, quinolona e tetraciclina, presentes em 42,1% dos isolados de SH.

### **Teste do disco-aproximação**

Nos isolados estudados não visualizamos zona irregular de inibição, também chamada zona fantasma para a detecção da presença de bactérias produtoras de beta-lactamases.

**Tabela 02:** Resultados dos testes de disco-difusão e disco-aproximação dos isolados de *S. Enteritidis* provenientes de carnes de frango do estado do Paraná.

N°	Teste disco- difusão										Teste disco- aproximação
	Penicilina	Cefalosporinas				Quinolona	Fluorquinolona	Aminoglicosídeos		Tetracilcina	
	AMP	CAZ	CTX	CRO	CTF	NAL	ENO	EST	GEN	TET	
5	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	Neg.
11	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	Neg.
14	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	Neg.
15	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	Neg.
16	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	Neg.
19	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	Neg.
20	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	Neg.
23	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	Neg.
24	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	Neg.
<b>R%</b>	0	0	0	22,22	22,2	<b>100</b>	22,22	11,11	0	0	
<b>Média Geral de Resistência (%) 17,77</b>											

N°: Número da amostra conforme bacterioteca, R%: Percentual de Resistência, S: Sensível, R: Resistente, Penicilina (AMP: Amoxicilina + ácido clavulânico); Cefalosporinas (CAZ: Ceftazidima, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, CTF: Ceftiofur); Quinolona (NAL: Ácido Nalidíxico); Fluorquinolona (ENO: Enrofloxacina); Aminoglicosídeos (EST: Estreptomicina, GEN: Gentamicina); Tetraciclina (TET: Tetraciclina).

**Tabela 03:** Resultados dos testes de disco-difusão, disco-aproximação e PCR dos genes de resistência dos isolados de *S. Heidelberg* provenientes de carnes de frango do estado do Paraná.

N°	Teste disco-difusão										Teste disco- aproximação	PCR- genes de resistência						
	Penicilina	Cefalosporina				Quinolona	Fluorquinolona	Aminoglicosídeos		Tetraciclina		<i>bla</i> CMY-2	<i>bla</i> SHV-1	<i>bla</i> TEM-1	<i>bla</i> CTX-M2	<i>bla</i> PSE-1	<i>bla</i> OXA-1	<i>AmpC</i>
	AMC	CAZ	CTX	CRO	CTF	NAL	ENO	EST	GEN	TET								
52	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	Neg.			X				
53	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	Neg.			X				
54	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Neg.	X	X		X			
62	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	Neg.							
63	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	Neg.							
64	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	Neg.			X				
65	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	Neg.			X				
66	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Neg.			X				
67	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	Neg.			X				
68	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	Neg.			X			X	
69	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	Neg.			X			X	
70	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	Neg.	X		X			X	
71	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Neg.			X			X	
73	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	Neg.	X		X				
74	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	Neg.	X		X			X	
78	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	Neg.	X	X	X			X	
79	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	Neg.	X	X	X			X	
93	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Neg.	X		X				
<b>R %</b>	100	100	100	94,4	100	100	38,9	38,9	33,3	100		38,88	16,66	83,33	5,55	0	0	38,88
<b>Média Geral de Resistência (%) 80,55</b>											<b>Média Prevalência Genes ESBL (%) 26,18</b>							

N°: Número da amostra conforme bacterioteca, R%: Percentual de Resistência, S: Sensível, R: Resistente, Penicilina (AMP: Amoxicilina + ácido clavulânico); Cefalosporinas (CAZ: Ceftazidima, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, CTF: Ceftiofur); Quinolona (NAL: Ácido Nalidíxico); Fluorquinolona (ENO: Enrofloxacina); Aminoglicosídeos (EST: Estreptomina, GEN: Gentamicina); Tetraciclina (TET: Tetraciclina).

### Resistências a múltiplas as drogas (MRD) e índice de resistência múltipla a antimicrobianos (IRMA)

Através dos resultados obtidos pelo teste disco-difusão foi possível definir o Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA) e a Resistência a Múltiplas Drogas (MDR), conforme Tabela 04. Foi considerado multirresistente o isolado de SE ou SH que apresentou resistência a três ou mais classes de antimicrobianos diferentes.

De todos os isolados estudados, apenas um isolado de SE mostrou-se resistente a três classes de antimicrobianos. Já os isolados de SH apresentaram maior multirresistência (42,1%) a pelo menos quatro classes diferentes de antimicrobianos.

O Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA) conforme o padrão de resistência pré-estabelecido para os isolados oriundos de produtos avícolas obteve uma média de 0,77 (Tabela 04).

**Tabela 04:** Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA) de isolados de *S. Heidelberg* (SH) e *S. Enteritidis* (SE) oriundas de carnes de frango.

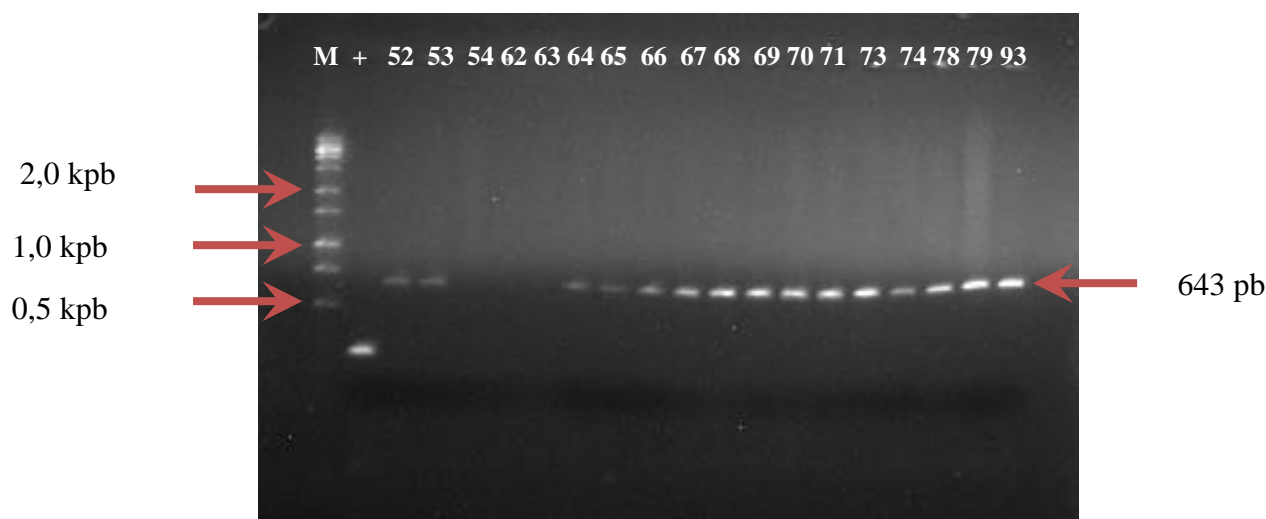
Isolado	Padrão de MDR	ID do			Percentual
		Padrão	IRMA	Nº	
SE	QUI-CEF-FLU	A	0,5	1*	5,26
SH	PEN-CEF-QUI-TET	B	0,6	8	42,1
SH	PEN-CEF-QUI-FLU-TET	C	0,83	3	15,78
SH	PEN-CEF-QUI-AMI-TET	D	0,83	1	5,26
SH	PEN-CEF-QUI-FLU-TET	E	0,83	1	5,26
SH	PEN-CEF-QUI-AMI-TET	F	0,83	1	5,26
SH	PEN-CEF-QUI-FLU-AMI-TET	G	1	4	21,05

Legenda do Padrão de MDR: PEN: Penicilina (Amoxicilina + ácido clavulânico); CEF: Cefalosporinas (Ceftazidima, Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftiofur); QUI: Quinolona (Ácido Nalidíxico); FLU: Fluorquinolona (Enrofloxacina); AMI: Aminoglicosídeos (Estreptomicina, Gentamicina); TET: Tetraciclina (Tetraciclina). \*Amostra número 23 (Tabela 02).

### Resultados da PCR para genes de resistência relacionados as ESBLs

A Tabela 03 mostra a detecção dos sete genes de resistência relacionados as ESBLs das cepas de SH multirresistentes, onde o maior índice de prevalência observado foi para o gene *bla*TEM-1 (15/18), totalizando 83,33% de amplificação. O segundo gene com maior

prevalência foi o *bla*CMY-2 (7/18) com 38,88% de amplificação, e o gene *AmpC* (7/18) com 38,88%. Já os genes *bla*OXA-1 e *bla*PSE-1 não foram detectados. Nas cepas de números 78 e 79 foram detectados quatro genes de resistência, sendo eles: *bla*CMY-2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1 e *AmpC*, relacionado com as ESBLs. A título de exemplificação, a Figura 1 mostra a amplificação apenas do gene mais prevalente (*bla*TEM-1).



**Figura 01:** Gel de agarose 1% com a amplificação do gene *bla*TEM-1 (643 pb).

M: Marcador molecular com peso de 1Kb; + : Controle positivo constituído de um isolado de SH com o gene *invA* amplificado. Nas amostras de número 52, 53, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 78, 79 e 93, podemos visualizar a amplificação do gene *bla*TEM-1.

## DISCUSSÃO

Como já reportado por Neves *et al.* (11) e Krumperman (7), o presente estudo evidencia que a SH é um real desafio frente a resistência a antimicrobianos utilizados rotineiramente no tratamento das salmoneloses em medicina veterinária e humana. Estes autores obtiveram resultados semelhantes para as diferentes classes de antimicrobianos testados, fato este que pode estar relacionado também com a transmissão horizontal de genes de resistência.

A expressão de sensibilidade ou resistência, *in vitro*, depende da concentração enzimática (12), informação essa que podemos correlacionar aos resultados obtidos no presente estudo, onde nas cepas testadas não encontramos produção de ESBLs no teste de disco-aproximação, mas alguns genes relacionados as ESBLs foram detectados na PCR. Futuros estudos avaliando a expressão gênica destes genes detectados auxiliariam a



correlacionar o fenótipo com o respectivo genótipo bacteriano.

Nos testes para detecção dos genes de resistência relacionados aos antimicrobianos beta-lactâmicos (*bla*CMY-2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1 e *AmpC*) observamos que o maior índice de amplificação foi para o gene *bla*TEM-1 (83,33%) e estes resultados são semelhantes aos reportados por Egualé *et al.* (13) cuja detecção de *bla*TEM-1 foi o principal gene detectado e envolvido no mecanismo de resistência a beta-lactamase Já no mecanismo especificamente relacionado a resistência as cefalosporinas, ligados diretamente as ESBLs, o gene *bla*CMY-2 é o mais comumente detectado (14; 15).

A resistência para os antimicrobianos beta-lactâmicos, tais como o ceftriaxone está linearmente correlacionada com um aumento no nível de expressão desta enzima (16). As cefalosporinas de terceira geração, além de serem utilizadas para o tratamento de infecções causadas por *Salmonella* sp. em animais, também são utilizadas para o tratamento em crianças. Há uma crescente preocupação global em função do aparecimento de cepas multirresistentes as cefalosporinas (6), fato este que pode ser confirmado de acordo com os resultados do presente estudo, onde obteve-se 100% de resistência às cefalosporinas para as SH.

De acordo com Krumperman (7), considera-se *E. coli* multirresistentes quando apresentam IRMA acima de 0,2. Neste estudo, a maioria dos isolados apresentaram índices acima de 0,60 o que pode indicar potencial para transferência horizontal de genes de resistência. A presença e a preocupação com a multirresistência aos antimicrobianos também foi relatada por Ribeiro *et al.* (17) que ao estudarem isolados de *Salmonella* de amostras coletadas de alimentos oriundos de frangos e suínos, detectaram a presença dos genes *AadA-Sul1-Sul2* e *bla*TEM-1, conferindo resistência aos aminoglicosídeos, sulfonamidas e cefalosporinas, respectivamente.

Além dos genes *bla*CMY e *AmpC*, outros genes variantes, incluindo *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M também têm sido relacionados como responsáveis pelo aparecimento de resistência às cefalosporinas de terceira geração (18; 6), destacando a importância da pesquisa e estudo destes genes, correlacionando-os com as cepas emergentes de *Salmonella* sp. Pois, de acordo com os resultados deste estudo, podemos observar que a presença de resistência e multirresistência das cepas isoladas aos antimicrobianos testados estão diretamente relacionados a detecção destes genes envolvidos através da técnica de PCR. Pensando no disseminado grau de resistência observado neste e em outros estudos referenciados em relação a SH, devemos ter cautela ao utilizar os antimicrobianos ainda eficientes, para evitarmos ou pelo menos, retardarmos a resistência e, conseqüentemente, o surgimento de novas cepas bacterianas super-resistentes.

Ressalta-se ainda, a localização dos genes de resistência no cromossomo bacteriano,

utilizando o kit de extração genômico. A utilização deste kit se deu pela necessidade do conhecimento de todo o DNA bacteriano, uma vez que o kit de extração plasmidial iria oferecer somente um fragmento do DNA carregado pela bactéria. Outro fato a se destacar é a propagação destes genes de resistência em toda a progênie das bactérias carreadoras, uma vez que esta será mais rápida e eficaz que a simples passagem de plasmídeos. A principal e importante diferença entre estes dois tipos de DNA presentes nas bactérias se dá pela sua multiplicação, onde no DNA genômico há uma multiplicação exponencial, fazendo com que os genes de resistência se propaguem junto a milhares de novas bactérias e assim como as bactérias reconhecidas em nosso experimento, a capacidade de resistência a antimicrobianos se multiplique mais rapidamente.

Este estudo foi capaz de detectar os principais genes de resistência envolvidos na produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido presentes no DNA genômico dos isolados de *S. Heidelberg* oriundas de carnes de frango, o que certamente denota preocupação.

## **REFERÊNCIAS DO MANUSCRITO**

1. Butaye, P.; Devriese, L.A.; Haesebrouck, F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well know antibiotics on Gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, p. 175-188.
2. Sousa, J.M.A.; Conceição, G.C; Ferreira, E.S. (2002). Beta-lactamases de Espectro Ampliado: Um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. *Newslab, Artigo Científico*, v. 63, p. 152-174.
3. CLSI (2015). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. M100-S18. Wayne, PA: CLSI.
4. Brasil. (2003). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada. 8. ed., v. 23, n.1.
5. Lezameta, L.; Gonzales, E.E.; Tamariz. J. (2010). Comparación de cuatro métodos

fenotípicos para La detección de betalactamasa de espectro extendido. Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública, v. 27, p. 345-51.

6. Frye, J.G. Cray, P.J. (2007). Prevalence, distribution and characterization of ceftiofur resistance in *Salmonella* enterica isolated from animals in the USA from 1999 to 2003. Antimicrobial Agents, v. 30, p. 134-142.

7. Krumperman, P.H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Appl. Environ. Microbiology, v. 46, p. 165-170.

8. Singh, P. Mustapha, A. (2013). Multiplex TaqMan detection of pathogenic and multi-drug resistant *Salmonella*. International Journal of Food Microbiology, p. 213-18.

9. Chen, S.; Zhao, S.; White, D. G. *et al.* (2004). Characterization of Meats *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Multiple-Antimicrobial-Resistant. Applied and Environmental Microbiology, v. 1, p. 1-7.

10. Alcaine, S. D.; Sukhnanand, S. S.; Warnick, L. D.; Su, W. L.; McGann, P.; McDonough, P.; Wiedmann, M. (2005). Ceftiofur-resistant *Salmonella* strains isolated from dairy farms represent multiple widely distributed subtypes that evolved by independent horizontal gene transfer. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49, n. 10.

11. Neves, G.B.; Stefani, L.M.; Pick, E.; Araujo, D.N.; Giuriatti, J.; Percio, C.; Brisola, M.C. (2016). *Salmonella* Heidelberg Isolated from Poultry Shows a Novel Resistance Profile. Acta Scientiae Veterinariae, v. 44, p. 1418.

12. Sader, H.S.; Jones, R.N.; Gales, A.C.; Silva, J.B.; Pignatari, A.C. (2004). Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. Brazilian Journal Infectious Diseases. v. 8, p. 25-79.

13. Eguale, T.; Birungi, J.; Asrat, D.*et al.* (2017). Genetic markers associated with resistance to beta-lactam and quinolone antimicrobials in non-typhoidal *Salmonella* isolates from humans and animals in central Ethiopia. Antimicrobial Resistance and Infection Control. v. 6

p. 1-10.

14. Biedenbach, D.J.; Toleman, M.; Walsh, T.R.; Jones, R. N. (2006). Analysis of salmonella spp with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: Report from the Senty antimicrobial surveillance program (1997-2014). *Microbiology Infectious Diseases*, v. 54, p. 13-21.

15. Dune, D.W.; Pearce, E.J. (1999) Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. *Microbes and Infection*, v. 1, p. 553-560.

16. Whichard, J.M.; Gay, K.; Stevenson, J.E. *et al.* (2007). Human Salmonella and concurrent decreased susceptibility to quinolones and extended-spectrum cephalosporins. *Emerg. Infect. Dis.* v. 13, p. 1681–1688.

17. Ribeiro, V.B.; Lincopan, N.; Landgraf, M.; Franco, B. D.; Destro, M. T. (2011). Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in multidrug resistant *Salmonella enterica* isolates from foodstuff and related sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42.

18. Donaldson, S. C.; Straley, B. A.; Hegde, N. V.; Sawant, A. A.; DebRoy, C.; Jayarao, B. M. (2006). Molecular Epidemiology of Ceftiofur-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Dairy Calves. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 3940-3948.

19. Pérez, P.F.J.; Hanson, N.D.(2002). Detection of plasmid-mediated *AmpC* beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p.2153-2162.

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este estudo foi capaz de detectar os principais genes de resistência envolvidos na produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido presentes no DNA genômico dos isolados de *S. Heidelberg* oriundas de carnes de frango, o que certamente denota preocupação por ser uma bactéria com elevado perfil de resistência aos antimicrobianos rotineiramente utilizados no tratamento e controle das salmoneloses humana e animal. Políticas sobre o uso racional dos antimicrobianos devem ser desenvolvidas e implantadas nas diversas cadeias produtivas, bem como na medicina humana, onde testes de sensibilidade e presença de ESBLs deveriam ser utilizados com maior frequência.

#### 4. REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Biological Sciences**, v. 289, p. 321-331, 1980.

APATA, D.F. Antibiotic resistance in poultry science. **Associação dos Exportadores de Frango (ABEF)**, v. 8, p. 404-408, 2009.

BAJAJ, P. et al. *Escherichia coli* beta-lactamases: what really matters. **Frontiers in Microbiology**, n 7, p. 1-14, 2016.

BARROW, P. A.; FREITAS NETO, O. C. Pullorum disease and fowl typhoid - new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.**, v. 40, p.1-13, 2011.

BAUER, A.W.; PERRY, D. M.; KIRBY, W. M. M. Drug usage and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus*. **Journal of the American Medical Association**, v. 173, p. 475-480, 1960.

BRADFORD, P. A. Extended spectrum beta-lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 933-951, 2001.

BRASIL. Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, v. 23, 2003.

BRASIL. Instrução normativa número 78. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em 05 de janeiro de 2017.

BRASIL. Portaria SDA número 9. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/legislacao/Minuta\\_proc\\_salmonela.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/legislacao/Minuta_proc_salmonela.pdf). Acesso em 05 de janeiro de 2017.

BRASIL. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*/Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2011.

BRASIL. Dispõe sobre o Método Analítico de Carcaças de Aves e Pesquisa de *Salmonella*. **Portaria nº 08 de 23 de janeiro de 1995**.

BRENNER, M. et al., Antimicrobial resistance in *Salmonella*. **Salmonella in Domestic Animals**, p. 120 – 131, 2000.

BUNT, V.B. et al. ESBL/ AMPC- producing enterobacteriaceae in households with children of preschool age: prevalence, risk factors and co-carriage. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1-7, 2016.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 969–976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A.A. Functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1211-1233, 1995.

BUTAYE, P. et al. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well know antibiotics on Gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 175-188, 2003.

CDC. Centers for disease control and prevention. Investigation update: multistate outbreak of human *Salmonella* heidelberg infections linked to ground turkey, 2011.

CHIU, C. H. et al. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2354-2358, 2006.

CURRIE, A. et al. Frozen chicken nuggets and strips and eggs are leading risk factors for *Salmonella* Heidelberg infections in Canada. **Epidemiology and Infection**, n. 133, p. 809-816, 2005.

DANDAN, R. H.; BRUNTON, L. Goodman & Gilman's Manual of pharmacology and therapeutics. Nova Yorque: **McGraw Hill**. 2008.

DARWIN, K, H.; MILLER, V. L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 405-428, 1999.

DEMCZUK, W. et al. Phage-based typing scheme for *Salmonella enterica* serovar Heidelberg, a causative agent of food poisonings in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4279-4284, 2003.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v. 84, p. 634-643, 2005.

FAO. Food and agriculture organization of the united nations & who – world health organization. Risk characterization of *Salmonella* spp. in eggs and broiler chickens and *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods, p. 4, 2001.

FOLEY, S. L., et al. *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars microbiology. **Molecular Biology Reviews**, v. 77, p. 582–607, 2013.

FOLKESSON, A. et al. Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of *Salmonella* serovars responsible for human disease. **Molecular Microbiology**, v. 33, p. 612-622, 1999.

FRYE, J. G.; FEDORKA-CRAY, P. J. Prevalence, distribution and characterization of ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* isolated from animals in the USA from 1999 to 2003. **Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 134-142, 2007.

FRYE, J. G.; JACKSON, C. R. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in

*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. Isolates from U.S. food animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-22, 2013.

GIBSON, D. L. et al. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. **Microbiology**, v. 153, p. 1131-1140, 2007.

HACKER, J. et al. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, v. 23, p. 1089-1097, 1997.

HART, A. et al. The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, p. 1383-1393, 2002.

JACOBY, G. A. *AmpC* B-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 161-182, 2009.

KATZUNG, B. Farmacologia básica e clínica. Brasil: **McGraw Hill**. 10<sup>a</sup> ed. 2007.

KERMYT, A. G. et al. Paternal care by genetic fathers and stepfathers ii: reports by xhosa high school students. **Evolution and Human Behavior**, v. 20, p. 433-51, 1999.

LEONÍDIO, A. R. A. et al. Genes de resistência aos antimicrobianos de *Salmonella* sp. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, p. 574-614, 2015.

MENDEZ, F.R. et al. Utilização de antimicrobianos na avicultura. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 10, p. 2352-2389, 2013.

MARCUS, S. L. et al. *Salmonella* pathogenicity island: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, p. 145-156, 2000.

NEU, H.; GOOTZ, T. Antimicrobial chemotherapy. **Medical Microbiology**, 4<sup>a</sup> ed., Cap. 11. 1996.

OLIVEIRA, S.D. et al. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 123-124, 2003.

OKAMURA, M. et al. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. **Avian Diseases**, v. 45, p. 61-69, 2001.

OVERDEVEST, I. et al. Extended spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli*. In: chicken meat and humans, the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1216-22, 2011.

PEIRANO, G. et al. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 305-309, 2006.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. **Pasteur Institut**, 7<sup>a</sup> ed, 1997.

QUINN, P. J. et al. Agentes antimicrobianos. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.



**Artmed**, p. 43-49, 2005.

RAHN, K. et al. Amplification of an *invA* sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular Microbiology**, v. 66, p. 1759-1763, 2000.

RIBEIRO, V. B. et al. Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in multidrug resistant *Salmonella* enterica isolates from foodstuff and related sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, 2011.

SALEHI, T.Z.; MAHZOUNIEH, M.; SAEEDZADEH, A. Detection of *invA* gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method. **International Journal of Poultry Science**, v.4, p. 557-559, 2005.

SIROT, D.; et al. Transferable resistance to third generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 20, p. 323-334, 1987.

SOUSA, M. A.; CONCEICAO, G. C.; FERREIRA, E. S. Beta-lactamases de espectro ampliado: um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **NewsLab**, v. 63, p. 152-174, 2002.

STEVENS L. A. et al. Estimating GFR using serum cystatin C alone and in combination with serum creatinine: a pooled analysis of 3,418 individuals with CKD. **Journal Kidney Diseases**, v. 51, p. 395-406, 2009.

STURENBURG E.; MACK D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **Journal Infection**, v. 47, p. 273-95, 2003.

STURENBURG, E. et al. Evaluation of a new screen agar plate for detection and presumptive identification of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases. **Diagnosis Microbiology Infection Diseases**, v. 51, p.51-5, 2005.

SUAREZ, C.; GUDIOL, F. Beta-lactam antibiotics. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 27, p. 116-129, 2009.

TÉO, C. R.P.A. Avaliação epidemiológica dos surtos de salmonelose ocorridos no Paraná entre janeiro de 1999 e junho de 2001. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2002.

THRELFALL, E. J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food and water-borne infections. **Microbiology Reviews**, v. 26, 2002.

UTIYAMA, C. A. et al. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a frequência de diarreia e o desempenho de leitões recém desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 2359-2367, 2006.

UZZAU S. et al. Host adapted serotypes of *Salmonella* enterica. **Epidemiology Infectious**, v. 125, p. 229-255, 2000.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 33, p. 406-414, 2009.

WEBSTER, C. R. L. Antibióticos: inibem a síntese da parede celular, interferem no metabolismo do DNA e inibem a síntese protéica. **Farmacologia Clínica**. São Paulo: Rocca, p. 75-81, 2005.

WHO. World Health Organization. Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/salmonella/en/>>. Acesso em 10/12/2016.

WILLIAMS, J.D. Beta-lactamases and beta-lactamase inhibitors. **Journal of Antimicroby Agents**, v. 12, p. 3-7, 1999.

XU, L. et al. Regional survey of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* reveals marked heterogeneity in the distribution of the ST131 clone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 505–11, 2011.