

Gabriella Bassi das Neves

DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE ISOLADOS
DE CAMPO E DE FRIGORÍFICO DE SALMONELLA
RESISTENTE AOS ANTIMICROBIANOS E
DESINFETANTES

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal na Universidade
do Estado de Santa Catarina –
UDESC, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre
em Ciência Animal com ênfase
em Biologia Molecular.

Orientadora: Prof. PhD Lenita
Moura Stefani

LAGES, SC
2014

N518d Neves, Gabriella Bassi das

Diferenças na expressão gênica de isolados de campo e de frigorífico de Salmonella resistente aos antimicrobianos e desinfetantes / Gabriella Bassi das Neves. - Lages, 2014.

120 p.: il.; 21 cm

Orientadora: Lenita Moura Stefani

Bibliografia: p. 80-92

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

1. Resistência. 2. Antibióticos. 3. Bactéria. 4. Expressão gênica. 5. Saúde pública. I. Neves, Gabriella Bassi das. II. Stefani, Lenita Moura. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

CDD: 636.08969 - 20.ed.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca
Setorial do CAV/ UDESC

GABRIELLA BASSI DAS NEVES

DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE ISOLADOS
DE CAMPO E DE FRIGORÍFICO DE SALMONELLA
RESISTENTE AOS ANTIMICROBIANOS E
DESINFETANTES

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da
Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal
com ênfase em Biologia Molecular.

Banca Examinadora

Orientadora:

Prof^a PhD Lenita Moura Stefani
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Membro:

Prof^a Dra Laura Beatriz Rodrigues
Universidade de Passo Fundo (UPF)

Membro:

Prof^a Dra Luciana Ruschel dos Santos
Universidade de Passo Fundo (UPF)

Lages SC, 11 de dezembro de 2014.

DEDICAÇÃO

**Dedico a
minha família:
Vittória, Luiz,
Matheus e
principalmente a
minha amada mãe
que sempre me
apoiou e
infelizmente não
está mais entre nós.**

RESUMO

NEVES, Gabriella Bassi das. **Diferenças na expressão gênica de isolados de campo e de frigorífico de *Salmonella* resistente aos antimicrobianos e desinfetantes.** 2014. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

O objetivo deste trabalho foi determinar as diferenças na expressão dos genes de virulência (*invA*) e de resistência aos antibióticos (*blaCTXM-2*) de isolados de *S. Heidelberg* resistentes aos antimicrobianos e desinfetantes. Para isso, primeiramente os isolados de *S. Heidelberg* (54), *S. Enteritidis* (54) e *S. Typhimurium* (54) foram submetidos ao teste do disco difusão frente a dez antibióticos utilizados rotineiramente na medicina veterinária e humana com intuito de avaliar o padrão fenotípico de resistência e multirresistência antimicrobiana. Os isolados de *S. Heidelberg* (17), *S. Enteritidis* (2) e *S. Typhimurium* (1) resistentes as cefalosporinas (ceftiofur e ceftriaxone) foram também avaliados pela técnica de Concentração Inibitória Mínima (MIC). Além disso, os isolados de *S. Heidelberg* (17) resistentes ao ceftiofur pelo disco-difusão e MIC foram submetidos ao teste de diluição em tubos para averiguar a eficiência dos desinfetantes a base de amônia quaternária, glutaraldeído e hipoclorito de sódio. Ainda foi feita a triagem do sistema de efluxo, utilizando o brometo de etídio. Pela técnica do antibiograma, os isolados de *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* apresentaram 18, 16,9 e 9,6% de resistência, respectivamente. Os maiores níveis de resistência foram observados para o ácido nalidíxico nos isolados de *S. Heidelberg* (67%), *S. Typhimurium* (65%), e *S. Enteritidis* (68,5%), assim como para a tetraciclina nos isolados de *S. Heidelberg* (69%) e *S. Typhimurium* (63%). A resistência à gentamicina também foi elevada para os isolados *S. Typhimurium* (31,5%), seguido da *S. Heidelberg* (7%). De grande importância para a indústria avícola, nossos resultados

mostram significativa resistência para o ceftiofur entre os isolados *S. Heidelberg* (32%) diferente do observado para isolados de *S. Enteritidis* (3,7%) e *S. Typhimurium* (1,9%). Apenas os isolados de *S. Heidelberg* (9%) e *S. Enteritidis* (3,7%) apresentaram resistência frente ao ceftriaxone. Ao agrupar os antibióticos utilizados, observou-se que os pertencentes às classes quinolona, penicilina e cefalosporinas apresentaram os maiores níveis de resistência com 68, 47 e 16%, respectivamente. O padrão de resistência mais encontrado foi C em 10% dos isolados. Observou-se ainda que 22,8% dos isolados são multirresistentes, ou seja, resistentes a mais do que três drogas. Em relação aos desinfetantes, apenas um isolado de *S. Heidelberg* (ID 81) mostrou-se resistente a associação glutaraldeído-amônia quaternária. Os isolados submetidos a triagem do sistema de efluxo não mostraram a presença deste mecanismo. Todos os isolados de *S. Heidelberg* (17) expressaram o gene *invA* com diferenças quantitativas, sendo que as amostras provenientes do campo mostraram maior expressão (2,53) quando comparadas as de frigorífico (1,00). Por outro lado, para o gene *blaCTX-M2*, relacionado a resistência antimicrobiana, a expressão foi 4.94 vezes maior nas amostras advindas do frigorífico. A expressão do gene *invA* permitem concluir que as *S. Heidelberg* apresentam potencial patogênico. Já o padrão de resistência observado ao ceftiofur e ceftriaxone associado à multirresistência e aos resultados positivos da expressão gênica comprovam a existência de bactérias produtoras de ESBL, o que dificultaria o tratamento das salmoneloses, já que há o potencial de transmissão direta da *Salmonella* advinda dos produtos cárneos para cadeia alimentar humana, gerando danos à saúde pública. Novos estudos a serem conduzidos no futuro permitirão a melhor avaliação *in vivo* do grau de patogenicidade ao testar os isolados resistentes.

Palavras-chaves: resistência, antibióticos, bactéria, expressão gênica, saúde pública.

NEVES, Gabriella Bassi of. **Gene expression differences of resistant Salmonella from the field and slaughterhouses** . 120f. 2014. Thesis (MS in Animal Science) - University of Santa Catarina State. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2014.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine differences in the expression of virulence genes (*invA*) and antibiotic resistance (*blaCTXM-2*) from *S. Heidelberg* isolates resistant to antimicrobials and disinfectants. To do this, first isolates of *S. Heidelberg* (54), *S. Enteritidis* (54) and *S. Typhimurium* (54) were assessed by the disk diffusion test using ten antibiotics routinely applied in veterinary and human medicine. *S. Heidelberg* (17), *S. Enteritidis* (2) and *S. Typhimurium* (1) isolates resistant to cephalosporins (ceftiofur and ceftriaxone) were also evaluated by the technique of Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Moreover, isolates of *S. Heidelberg* (17) resistant to ceftiofur by disk diffusion and MIC were subjected to dilution test tubes to determine the efficacy of disinfectants quaternary ammonium base, sodium hypochlorite and glutaraldehyde. Screening efflux was performed using ethidium bromide. The technique of antibiotic susceptibility showed 18, 16,9 and 9,6% of resistance for *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*, respectively. High levels of resistance were observed for nalidixic acid in *S. Heidelberg* (67%), *S. Typhimurium* (65%), and *S. Enteritidis* (68.5%), as well as for tetracycline in *S. Heidelberg* (69%) and *S. Typhimurium* (63%). The gentamicin resistance was also high for *S. Typhimurium* (31.5%) followed by *S. Heidelberg* (7%). Of great importance to the poultry industry, our results show significant resistance for ceftiofur among *S. Heidelberg* isolates (32%), differently from that observed for *S. Enteritidis* (3,7%), and *S. Typhimurium* (1,9%). Only isolates of *S. Heidelberg* (9%) and *S. Enteritidis* (3,7%) showed resistance against

ceftriaxone. By grouping the antibiotics used, it is observed that those belonging to the quinolone, penicillin and cephalosporin classes showed higher levels of resistance 68, 47 and 16%, respectively. The resistance pattern most commonly found was C on 10% of the isolates. It was also observed that 22,8% of the isolates were multidrug-resistant or resistant to more than three drugs. In relation to disinfectants, only one isolate of *S. Heidelberg* was resistant to the association of ammonium quaternary and glutaraldehyde. The isolates subjected to screening efflux system did not show the presence of this mechanism. All isolates of *S. Heidelberg* (17) expressed the *invA* gene with quantitative differences and the samples from the field showed higher expression (2.53) when compared to samples from the slaughterhouse (0.56). On the other hand, for the *blaCTX-M2* gene, related to antibiotic resistance, the expression was 4.94 times greater in poultry meat samples. The expression of the gene *invA* allows us to conclude that *S. Heidelberg* isolates have pathogenic potential. But the pattern of resistance to ceftiofur and ceftriaxone associated with multidrug resistance and the positive results of gene expression, demonstrate the presence of ESBL producing bacteria, which could difficult the treatment of salmonellosis, as there is the potential for direct transmission of *Salmonella* from meat products to humans. . New studies in the future will allow in vivo evaluation to assess pathogenicity.

Key-words: resistance, antibiotics, bacterium, gene expression, public health.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela força para superar todas as dificuldades e turbulências que vivenciei neste período.

Agradeço principalmente aos meus pais, Eva e Luiz, que sempre me apoiaram de todas as maneiras possíveis. E só estou aqui hoje, graças a eles. Agradeço a minha irmã Vitória que sempre esteve do meu lado, me motivando e principalmente me acalmando, como só ela sabe fazer.

Agradeço ao meu namorado Matheus pela parceria e por estar ao meu lado em todos nos momentos em que mais precisei e agradeço por tornar as coisas mais simples e por fazer os meus dias cada vez mais felizes.

Agradeço a Prof^ª. Denise Nunes Araújo por toda a ajuda. Agradeço ainda os professores Prof. Rogério Ferreira, Aleksandro Schafer da Silva, Dilmar Baretta e Diovani Paiano.

Agradeço a Nádia Cristine Weinert pela colega e amiga que foi durante este período e obrigada pelos momentos de estudos e risadas que tivemos juntas. Agradeço aos estagiários Nátalia, Eduarda, Vanessa, Jocelita, e Cleverson.

Agradeço a Dra Joice e ao MERCOLAB de Cascavel que além de disponibilizar as amostras para execução do trabalho também, abriram suas portas, permitindo o aprendizado e entendimento de práticas laboratoriais.

Agradeço aos doutores da AURORA: Guilherme, Nívia e a Patrícia e a Professora Marcieli, coordenadora do curso de Zootecnia da UNOESC.

Para finalizar gostaria de agradecer a pessoa responsável por tudo isso, Prof^ª. Lenita Moura Stefani, minha orientadora, e dizer que hoje não estaria aonde estou se não fosse por você, pelo seu apoio. Não tem preço o que aprendi contigo neste período, por isso meu agradecimento eterno.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Número de amostras de *Salmonella* spp. de acordo com a origem. 106
- Tabela 2** - Composição química dos desinfetantes avaliados. 107
- Tabela 3** - Características dos desinfetantes testados. 107
- Tabela 4** - Relação dos genes estudados, sequências iniciadoras (primers), tamanho do segmento alvo (pb), concentração utilizada para amplificá-los, número de acesso no Gene Bank e referência. 108
- Tabela 5** - Perfil de resistência no teste de disco-difusão de cepas de *S. Heidelberg* (SH), *S. Enteritidis* (SE) e *S. Typhimurium* (ST) de origem avícola, isoladas a partir de amostras de campo e frigoríficos. 109
- Tabela 6** - Isolados de *S. Heidelberg* (SH), *S. Enteritidis* (SE) e *S. Typhimurium* (ST) de origem avícola resistentes a nenhum, um, dois, três ou mais antibióticos (atbs). 111
- Tabela 7** - Padrão de Múltipla Resistência a Drogas (MDR) e o Índice de Resistência Múltipla aos Antibióticos (IRMA) de isolados de *S. Heidelberg* (SH), *S. Enteritidis* (SE) e *S. Typhimurium* (ST) de origem avícola frente aos antimicrobianos estudados. 112
- Tabela 8** - Identificação (ID) dos isolados de *S. Heidelberg*, local de origem (frigorífico e campo), e valores do C_q médio e da expressão gênica para o *invA* e *blaCTX-M2*. 118

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Percentual de isolados de *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* resistentes (eixo Y) em relação à classe de antimicrobianos (eixo X). 110
- Figura 2** - Calibração da curva padrão gerada a partir do mRNA extraído de isolado de *S. Heidelberg* para o gene 16SRNA, utilizado como referência. 113
- Figura 3** - Calibração da curva padrão gerada a partir do mRNA extraído de isolado de *S. Heidelberg* para o gene *invA* e *blaCTX-M2*. 114
- Figura 4** - Curva e temperatura de melting do gene 16SRNA utilizado como referência endógena..... 115
- Figura 5** - Curva e temperatura de melting do gene *invA*.... 116
- Figura 6** - Curva e temperatura de melting do gene *blaCTX-M2*. 117
- Figura 7** - Expressão gênica relativa normalizada para o gene *invA* de isolados de *S. Heidelberg* conforme o grupo biológico que variou conforme o local de isolamento da bactéria, sendo C (campo) e F (frigorífico). 119
- Figura 8** - Expressão gênica relativa normalizada para o gene *blaCTX-M2* de isolados de *S. Heidelberg* conforme o grupo biológico que variou conforme o local de isolamento da bactéria, sendo C (campo) e F (frigorífico)..... 120

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DEPC	Pirocarbonato de dietila
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTA	Doença de Transmissão Alimentar
EMB	Eosin Methylene Blue
ESBL	β -lactamase de espectro estendido
EtBr	Brometo de Etídio
FDA	Federal and Drug Administration
FEPAGRO	Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
IN	Instrução Normativa
IRMA	Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos
Kb	Kilobase
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	Múltipla Resistência a drogas
MIC	Concentração Inibitória Mínima
mL	Mililitros
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PBP	Proteínas de Ligação a Penicilina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNSA	Plano Nacional de Sanidade Avícola
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
QAC	Compostos de Amônia Quaternária
qPCR	Reação da Polimerase em Cadeia em tempo real

RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
rRNA	RNA ribossômico
tRNA	RNA transportador
RT	Transcriptase reversa
SGI	Ilha Genômica da <i>Salmonella</i> spp
SPI	<i>Salmonella Pathogenicity Islands</i>
SSTT	Sistema de Secreção do Tipo Três
TSA	Ágar Triptona de Soja
TSB	Caldo Triptona de Soja
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHO	World Health Organization
µg	Microgramas
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	30
2.1	SITUAÇÃO MUNDIAL DA AVICULTURA	30
2.2	SALMONELLA SPP.	30
2.3	SALMONELLA SPP. E A SAÚDE PÚBLICA	32
2.4	RESISTÊNCIA AS CEFALOSPORINAS	37
2.5	RESISTÊNCIA AOS DESINFETANTES	45
2.6	ILHAS DE PATOGENICIDADE	47
2.7	PCR EM TEMPO REAL	49
3	ARTIGO	54
3.1	INTRODUÇÃO	54
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.2.1	Origem dos isolados	57
3.2.2	Teste do disco-difusão	57
3.2.3	Resistência a múltiplas drogas	58
3.2.4	Índice de resistência múltipla a antibióticos	58
3.2.5	Concentração inibitória mínima	59
3.2.6	Método de diluição de desinfetante em tubos	59
3.2.7	Procedimento de triagem do sistema de efluxo	60
3.2.8	Extração de RNA	61
3.2.9	Transcriptase reversa	62
3.2.10	PCR em tempo real	62
3.2.11	Análise estatística	64
3.3	RESULTADOS	64
3.3.1	Teste do disco-difusão	64
3.3.2	Múltipla resistência a drogas	64
3.3.3	Índice de resistência múltipla aos antibióticos	65
3.3.4	Concentração inibitória mínima	65
3.3.5	Método de diluição de desinfetante em tubos	66
3.3.6	Procedimento de triagem do sistema de efluxo	66
3.3.7	PCR em tempo real	66
3.4	DISCUSSÃO	68
4	CONCLUSÃO	82
5	REFERÊNCIAS	84
5.1	REFERÊNCIAS DO ARTIGO	84
5.2	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

A cadeia avícola atualmente se destaca no agronegócio brasileiro, por gerar milhões de empregos no país e arrecadar bilhões de dólares com a exportação. O aumento no consumo de carne de frango é crescente, exigindo do setor industrial o fornecimento de produtos de origem avícola com qualidade.

A salmonelose é uma doença de origem alimentar que representa um significativo problema de saúde pública em muitos países. Os produtos de origem avícola, principalmente ovos crus, têm sido reconhecidos como grandes transmissores desta bactéria, assumindo assim um papel importante na perpetuação desta doença. As salmoneloses são ocasionadas por bactérias do gênero *Salmonella*, bacilos Gram negativos, pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* que podem ser encontradas nos mais variados ambientes, entretanto as aves são os principais reservatórios naturais existentes na natureza.

A resistência microbiana pode ser definida como a capacidade de alguns micro-organismos em crescer e multiplicar na presença de determinados antibióticos. Esta capacidade é uma consequência natural da evolução e pode ser natural ou adquirida. A resistência adquirida é um problema uma vez que populações de bactérias inicialmente sensíveis tornam-se resistentes a um agente antibacteriano e sob a pressão seletiva do uso deste, conseguem crescer e se proliferar, espalhando os genes de resistência para outros micro-organismos. Portanto, o antimicrobiano não induz a resistência, mas sim seleciona as bactérias mais resistentes existentes no meio.

A resistência é codificada geneticamente e pode variar a partir de mutações em genes cromossômicos e/ou pela transferência horizontal de genes que são carregados por

elementos genéticos móveis (plasmídeos, integrons, transposons e fagos). Os mecanismos de resistência, como a destruição ou inativação enzimática da droga, alteração do sítio alvo e redução do nível intracelular do antimicrobiano podem ser codificados por mutações pontuais ou pela aquisição de novos genes.

Atualmente o aumento da virulência e da resistência antimicrobiana em bactérias patogênicas é considerado um sério problema para a medicina humana e veterinária, impactando diretamente na saúde pública. O número de tratamentos eficazes para infecções causadas pela *Salmonella* enterica continua diminuindo, por isso é importante cautela na utilização de agentes antimicrobianos. A terapia para infecções causadas por *Salmonella* enterica invasiva inclui ceftriaxone para humanos e ceftiofur para animais. A infecção invasiva pela corrente sanguínea e hospitalização são consequência da infecção causada pela *Salmonella* enterica associada com resistência a antimicrobianos (HOHMANN, 2001).

A infecção de pacientes pela *S. Typhimurium* mostra uma forte associação entre a resistência a antimicrobianos, infecção invasiva e os casos de hospitalizações (GUERRA B. et al., 2004; FLUIT, 2005; VARMA et al., 2006).

Este cenário de isolados multirresistentes as drogas e potencialmente patogênicos contribuiu para o aumento da morbidade e mortalidade, além de contribuir para o aumento dos custos e cuidados com a saúde, tanto para a medicina humana, como para a medicina veterinária. Portanto, torna-se necessária à investigação e o entendimento dos principais mecanismos de resistência utilizados por este micro-organismo.

O objetivo deste trabalho foi averiguar as diferenças na expressão de genes de virulência (*invA*) e de resistência aos antibióticos (*blaCTXM-2*) de isolados de *S. Heidelberg* de

origem avícola, proveniente de campo e de frigorífico de salmonelas com conhecido perfil de resistência a antimicrobianos e desinfetantes. A PCR em tempo real (qPCR) foi a técnica utilizada para avaliar a expressão dos genes estudados. Para isso, primeiramente os isolados de *S. Heidelberg* (54), *S. Enteritidis* (54) e *S. Typhimurium* (54) foram submetidos ao teste do disco-difusão para identificar o perfil fenotípico de resistência e multirresistência antimicrobiana frente à enrofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, gentamicina, ceftiofur, ceftriaxone, ácido nalidíxico, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol que são antibióticos utilizados rotineiramente na medicina veterinária. Além disso, teve-se por objetivo identificar nos isolados a concentração inibitória mínima (MIC) frente ao ceftiofur. Os mesmos isolados foram testados pelo teste de diluição em tubos para averiguar a eficiência dos desinfetantes a base de amônia quaternária, glutaraldeído e hipoclorito de sódio. Ainda foi feita a triagem do sistema de efluxo, utilizando o brometo de etídio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SITUAÇÃO MUNDIAL DA AVICULTURA

A cadeia avícola é atualmente um dos mais importantes componentes do agronegócio brasileiro, gerando milhões de empregos no país e arrecadando bilhões de dólares com a exportação (NASCIMENTO et al., 2011). Atualmente, o Brasil é o maior exportador de carne de frango, com destaque para a produção dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, respectivamente. Hoje o Oriente Médio é considerado a principal região de destino da carne de frango brasileira, seguida da Ásia e África. Quanto à produção mundial de carne de frango, o maior produtor é os EUA, seguido da China, e do Brasil que se encontra como o terceiro maior produtor. O consumo *per capita* de carne de frango no Brasil vem aumentando gradativamente e nos anos de 2000 a 2013, “subiu” de 29,91 para 47,38 Kg e em 2013 “caiu” para 41,8 Kg (UBABEF, 2014). Do volume total de carne de frango produzida, 68,4% é destinada ao consumo interno e 31,6% a exportação. Já em relação à produção de ovos, 99% é destinada para o mercado interno, enquanto apenas 1% é para o mercado externo (UBABEF, 2014).

2.2 SALMONELLA SPP.

O gênero *Salmonella* engloba um grupo taxonômico com mais de 2500 sorotipos, conhecidos com base em reações bioquímicas e sorológicas (LÁZARO, 2008; BACK, 2002).

Este gênero é composto por duas espécies, *Salmonella* entérica com seis subespécies ou subgêneros e a *Salmonella* bongori. As subespécies são enterica, salamae, arizonae,

diarizonae, houtenae e indica. O nome deste gênero foi adotado em 1990 por Lignières em homenagem ao médico veterinário e bacteriologista Daniel E. Salmon (LÁZARO, 2008; LIBBY, 2004). Aproximadamente 99% dos sorotipos isolados com maior frequência pertencem à subespécie enterica (FOLEY, LYNNE, 2007).

Estas espécies de bactérias pertencem à família das Enterobactérias, morfológicamente classificadas como bacilos Gram negativos que fermentam glicose e outros açúcares, descarboxilam aminoácidos, oxidase negativa, catalase positiva, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, e não formadoras de esporos. A maioria dos sorovares é móvel por meio de flagelos peritríquios, com exceção da *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* (LIBBY, 2004; QUINN et al., 2005).

A *Salmonella* spp é uma bactéria cosmopolita e ubíqua com capacidade de colonizar a maioria dos vertebrados, incluindo mamíferos, aves e répteis. As Salmonelas são adaptadas a condições ambientais adversas tais como solo, adubo e sobrevivem no meio ambiente por longos períodos, o que facilita a sua transmissão para os animais e o homem. Alimentos contaminados, água e meio ambiente também são fontes comuns de infecção para os animais e o homem. Alimentos destinados à produção animal, como farinha de peixe, farinha de osso, farinha de carne e leite são fontes potenciais do micro-organismo. Ainda temos a possibilidade de contaminação na soja a granel que é a base para muitas rações, destinadas a várias espécies de animais domésticos (TERZOLO, 2010; LÁZARO, 2008; LIBBY, 2004; ANDREATTI FILHO, 2006).

A dispersão de *Salmonella* spp no ambiente natural ainda é devida à produção intensiva de alimentos de origem animal, onde os produtos avícolas destacam-se como os principais reservatórios do patógeno, responsáveis por

toxinfecções alimentares em humanos (BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2006). Quando estes produtos são consumidos sem passarem pelo processo de cozimento, atuam como fontes de veiculação e transmissão da bactéria para os humanos. Outros alimentos como pratos prontos e saladas também atuam como disseminadores da bactéria (WELKER et al., 2010).

2.3 SALMONELLA SPP. E A SAÚDE PÚBLICA

Os sintomas da salmonelose iniciam-se após a colonização do epitélio intestinal pelo patógeno. O paratifo aviário é a doença conhecida por acometer aves e humanos, sendo a *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, e *S. Heidelberg* os principais sorovares. Os sorovares *S. Pullorum* (pulorose) e *S. Gallinarum* causam a doença chamada de tifo aviário e são sorovares adaptadas às aves causando doença grave nestas (BACK, 2002; BERCHIERI JÚNIOR, OLIVEIRA, 2006).

Nas aves a salmonelose é causada apenas pela *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* que são responsáveis por significativos índices de morbidade e mortalidade. As taxas de morbidade e mortalidade são variáveis em galinhas e são influenciadas pela idade, susceptibilidade à cepa, nutrição, manejo do lote e características de exposição. Entretanto a morbidade é muito maior que a mortalidade, sendo que algumas aves afetadas se recuperam da doença espontaneamente (GAST, 1997).

De acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* - CDC (2013), a salmonelose é uma das principais doenças entéricas em humanos em todo o mundo.

De acordo com Varnam e Evans (1991) citado por Nascimento et al. (2011), a dose considerada infectante de

Salmonella spp em humanos sadios é de 10^5 a 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC). Já em pacientes imunocomprometidos, segundo Lazaro (2008) a dose infectante é reduzida ($\leq 10^3$) para alguns sorovares quando envolvidas em surtos de doenças de transmissão alimentar (DTA).

No Brasil, de acordo com dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária entre os anos de 2000 a 2011 foram notificados 1600 surtos de salmonelose, sendo que, surpreendentemente, nos anos de 2010 e 2011 esses surtos não chegaram a 50 (BRASIL, 2009).

O ovo é apontado como principal alimento envolvido em surtos de salmonelose transmitidas por alimentos (BRASIL, 2009). Já a carne de aves também pode estar contaminada com *Salmonella* spp quando a bactéria é transferida do conteúdo intestinal à carcaça durante o abate e processamento. Da mesma forma, as poedeiras podem contaminar os ovos no momento da postura ou ainda durante a formação do ovo (GAST, 1997; BACK, 2002; ANDREATTI FILHO, 2006).

Dados da *World Health Organization* (WHO) (1992) mostram que 25% das contaminações estão associadas à contaminação cruzada, envolvendo principalmente práticas de higiene deficientes tais como equipamentos contaminados, estocagem inadequada, e contaminação dos funcionários que manipulam esses produtos.

Além do risco direto pela ingestão de alimentos contaminados, o tratamento inadequado da doença também pode afetar a saúde humana através de resíduos de antibióticos deixados na carne que podem causar alergias e até choques anafiláticos em humanos (TORTORA et al., 2012).

Há ainda o problema da resistência bacteriana observada em isolados de *Salmonella* spp. que podem ser transferidas para patógenos de humanos (FRYE, JACKSON,

2013; BOND; LOEFFLER, 2012). As bactérias resistentes aos antibióticos respondem por grande parte do problema das doenças infecciosas emergentes em todo o mundo. Patógenos resistentes aos antibióticos afetam a recuperação dos pacientes suscetíveis, como o caso dos imunossuprimidos (OLIVEIRA, SILVA, 2008). A seleção de bactérias resistentes pode resultar em cepas mais virulentas como no caso de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A presença de resistência de uma bactéria patogênica pode ocasionar o atraso da administração do antimicrobiano correto e dosagens tóxicas ou insuficientes para eliminá-las (COSGROVE, CARMELI, 2003).

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, mais de 70% das bactérias responsáveis pelas infecções hospitalares são resistentes há pelo menos um dos antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento dos pacientes. Além disso, estes pacientes normalmente permanecem mais tempo no hospital e precisam ser tratados com drogas de segunda e terceira geração, que são mais tóxicas e, além disso, podem ser menos efetivas e mais caras (OLIVEIRA, SILVA, 2008). Taxas de resistência antimicrobiana entre hospitais e sistemas de produção animal aumentaram consideravelmente durante as últimas décadas, tornando o tratamento das doenças ainda mais difícil (FRYE, JACKSON, 2013).

Considerando-se a natureza genética da resistência e a seleção de micro-organismos resistentes pelo contato com os antimicrobianos, o uso destes compostos em animais de produção foi considerado uma potencial fonte de bactérias resistentes que podem ser transmitidas para humanos e outros animais, evidenciando-se a necessidade de um programa sanitário e de biossegurança eficaz a fim de limitar a propagação da epidemia desta bactéria (BOND; LOEFFLER, 2012; FRYE, JACKSON, 2013).

Johnson e colaboradores (2007) identificaram isolados de *E. coli* resistentes em Minnesota e Wisconsin oriundos de humanos e aves, e através de análises filogenéticas concluíram que os isolados de humanos resistentes às drogas testadas provavelmente tiveram origem aviária ou de reservatórios semelhantes que não humanos. Este trabalho permite ressaltar a importância do monitoramento do perfil de resistência fenotípica e genotípica aos antibióticos em espécies de *Salmonella* spp isoladas de animais de produção e seus derivados alimentícios com intuito de proteger a saúde humana e também animal (SAN MARTIN et al., 2005; RIBEIRO et al., 2011).

Relativamente poucos recursos foram utilizados para entender, prevenir e controlar a propagação da resistência bacteriana (SILBERGELD, GRAHAM, PRICE, 2008). Frente a esta situação, diversas iniciativas foram propostas com a finalidade de prevenir ou minimizar a problemática. Mesmo assim, a contínua emergência de micro-organismos resistentes nos sistemas de produção, instituições de saúde e até mesmo na comunidade é ainda um grande desafio. Concomitantemente, algumas medidas vêm sendo utilizadas, entre elas auditorias, melhoras na higienização das mãos, isolamento dos pacientes e educação. Entretanto, estas nem sempre tem sido eficiente no controle da resistência bacteriana (OLIVEIRA, SILVA, 2008).

Segundo Sjölund-Karlsson et al. (2010) tem sido relatado um aumento da resistência aos antibióticos β -lactâmicos, chamadas de bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) em *Salmonellas*. Estas enzimas são capazes de degradar uma ampla gama de antibióticos, incluindo cefalosporinas de quarta geração (FOLEY, LYNNE, 2007). Pacientes com infecção por *E. coli* que produziram ESBL foram tratados por períodos mais longos do que os infectados por *E. coli* não produtoras de β -lactamases

de espectro estendido. Ainda, estes pacientes também tiveram hospitalizações significativamente mais longas e mais caras que os indivíduos controle (LAUTENBACH et al., 2004).

Avaliar as implicações do aumento da prevalência dos patógenos resistentes aos antimicrobianos é importante por várias razões. Primeiro, a informação sobre a resistência pode ser importante na definição do prognóstico para o paciente individual. Em segundo lugar, o conhecimento sobre a consequência da infecção com micro-organismos resistentes incentiva os médicos e hospitais a controlarem e prescreverem antibióticos adequados, prevenindo assim estas infecções. Finalmente, a compreensão do efeito da resistência ao antibiótico na recuperação do paciente é relevante para os responsáveis políticos, que devem tomar decisões sobre o financiamento de programas para controlar e prevenir a propagação destes micro-organismos resistentes a antimicrobianos (COSGROVE, CARMELI, 2003).

O impacto econômico negativo causado pelas doenças transmitidas por alimentos alcança níveis cada vez mais preocupantes, acarretando grandes perdas econômicas para a indústria avícola, o turismo, e a sociedade (WELKER et al., 2010). Embora o problema da resistência antimicrobiana tenha atraído a atenção tanto da comunidade médica como do público em geral, a magnitude do impacto da resistência sobre a saúde e os resultados econômicos permanecem em grande parte desconhecidos (SILBERGELD, GRAHAM, PRICE, 2008).

A resistência aos agentes microbianos é um sério problema mundial. O emprego indiscriminado, o uso abusivo ou não criterioso em pacientes e, também em animais de produção e plantas tem acelerado o processo de desenvolvimento da resistência microbiana (AUTO, CONSTANT, CONSTANT, 2008; BARROS et al., 2008).

2.4 RESISTÊNCIA AS CEFALOSPORINAS

A resistência ao antibiótico é uma consequência natural da evolução e pode ser natural ou adquirida. A natural corresponde a uma característica da espécie bacteriana e todas as amostras desta espécie têm esta propriedade. Na adquirida, somente parte das amostras são resistentes. A resistência natural não perturba a terapêutica porque já se sabe que um determinado micro-organismo é naturalmente resistente ao antimicrobiano. Os antimicrobianos que apresentam este tipo de resistência são às penicilinas semi-sintéticas, cefalosporinas, baixo nível de resistência aos aminoglicosídeos e baixo nível de resistência às fluorquinolonas. Por outro lado a resistência adquirida pode trazer grandes transtornos na clínica médica (ALTERTHUM, 2005; SPINOSA, 2006; TORTORA et al., 2012), uma vez que as populações de bactérias sensíveis inicialmente tornam-se resistentes a um agente antibacteriano, proliferam e se espalham sob a pressão seletiva da utilização desse agente (TENOVER, 2006). Um conceito importante que deve ficar claro é que o antimicrobiano não induz a resistência e sim, seleciona as bactérias mais resistentes já existentes no meio de uma população (ALTERTHUM, 2005).

A resistência é codificada geneticamente e pode variar a partir de mutações em genes endógenos (genes cromossômicos) e pelos genes exógenos (extracromossômicos) que são transmitidos horizontalmente e são carregados pelos elementos genéticos móveis (plasmídeos, integrons, transposons e fagos) (FRYE, JACKSON, 2013). Tanto as mutações pontuais, quanto a aquisição de genes de forma horizontal podem codificar alguns mecanismos de resistência, entre eles, destruição ou inativação enzimática da droga, alteração do sítio alvo e redução do nível intracelular do

antimicrobiano (FRYE, JACKSON, 2013; FOLEY, LYNNE, 2007; TORTORA et al., 2012).

A inativação enzimática é a capacidade que a bactéria tem de produzir enzimas específicas, tais como as β -lactamases, capazes de inativar o princípio ativo do antimicrobiano, através da degradação ou modificação estrutural. Estas enzimas atuam sobre o anel β -lactâmico hidrolisando seletivamente esta estrutura. Este tipo de mutação é observado no gene que codifica a β -lactamase AmpC (AUTO, CONSTANT, CONSTANT, 2008; FRYE, JACKSON, 2013; TORTORA et al., 2012).

Ainda as bactérias podem apresentar resistência pela presença de bombas de efluxo ou mudança na permeabilidade da membrana celular ou transporte do antimicrobiano. Estes mecanismos são capazes de expelir o antimicrobiano, reduzindo sua concentração intracelular, impedindo assim que este alcance uma concentração efetiva, conseqüentemente impedindo a sua ação no sítio alvo para exercer o seu efeito (AUTO, CONSTANT, CONSTANT, 2008; FOLEY, LYNNE, 2007; FRYE, JACKSON, 2013; TENOVER, 2006; TORTORA et al., 2012).

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 (ALTERTHUM, 2005).

A análise destes mecanismos de resistência pode então ser utilizada para determinar a relação genética entre resistência encontrada em isolados a partir de animais e seres humanos. Devido à diversidade de elementos genéticos que levam à resistência à antimicrobianos, pode ser possível determinar se a resistência vista em bactérias isoladas de

infecções de seres humanos está intimamente relacionada com os isolados encontrados em animais, identificando assim animais que são fontes de bactérias resistentes, responsáveis pelas infecções em humanos (FRYE, JACKSON, 2013).

A seleção de bactérias resistentes pode ocorrer através do uso inadequado de antimicrobianos não só em animais, mas também em humanos (SCHWARZ et al., 2001). A pressão seletiva na produção animal, através da profilaxia, promoção de crescimento e tratamentos, podem ser fatores de estímulo da seleção de linhagens resistentes (MOLBAK, 2002).

Durante as últimas quatro décadas, antimicrobianos têm sido utilizados com o objetivo preventivo ou terapêutico, ou seja, como suplemento aditivo nas dietas das aves, chamados de promotores de crescimento (ROSTAGNO, 2003). O aparecimento de resistência antimicrobiana em humanos fez com que a Comunidade Europeia banisse o uso não terapêutico de antimicrobianos como agentes promotores de crescimento na produção animal, fazendo com que países como o Brasil e Estados Unidos reduzissem drasticamente a utilização destas drogas (SANTANA et al., 2011).

Estudos realizados por Rostagno (2003) demonstram que na ausência dos promotores de crescimento, há prejuízo na produção animal, com conseqüentemente redução do desempenho zootécnico, comprometimento do aproveitamento do potencial genético, e possíveis danos à saúde das aves (ROSTAGNO, 2003). Entretanto, isto acontece porque os animais são criados com alto desafio sanitário, uma vez que para evitar estes prejuízos deve-se buscar um manejo sanitário com medidas profiláticas que garantam a qualidade e a segurança dos produtos de origem avícola (JAENISCH, 2000).

No Brasil, segundo a Instrução Normativa (IN) nº 26 do MAPA, é importante que os antimicrobianos utilizados na terapêutica não sejam utilizados como aditivos alimentares,

promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos para animais, sendo vetado o uso de anfenicóis, tetraciclinas, beta lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas (BRASIL, 2009). É importante usar adequadamente os agentes antimicrobianos em medicina veterinária, tanto para o tratamento como para a prevenção de doenças visando à segurança para a saúde pública (SANTANA, 2011; BELLAVER, 2000).

As cefalosporinas constituem o grupo dos antibióticos β -lactâmicos e são separadas em quatro gerações de acordo com a cronologia de descoberta, espectro de ação e estrutura química (WEBSTER, 2005). Na primeira geração, as cefalosporinas atuam principalmente contra bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas. As de segunda geração são bastante resistentes à ação das β -lactamases produzidas pelas Gram-negativas, e as de terceira geração são ainda mais resistentes que estas. Enfim, as cefalosporinas de quarta geração apresentam igual espectro de ação das anteriores, além de agir sobre alguns cocos Gram-positivos e bactérias anaeróbias. As de primeira e segunda geração são mais estáveis frente à produção das β -lactamases (QUINN et al., 2005; WEBSTER, 2005; ALTERTHUM, 2005).

O ceftiofur, cefalosporina de terceira geração, é a única aprovada para animais de produção (WEBSTER, 2005). Este grupo de antimicrobianos impede a síntese da parede celular, estrutura encontrada apenas em micro-organismos, responsável pelas funções de proteção, sustentação e manutenção da morfologia bacteriana. A parede celular é constituída por uma camada basal de mucopeptídeos (também chamada de peptidoglicano, composta de ácido murâmico e N-acetilglicosamida), podendo estar coberta ou não por uma camada de lipoproteínas e/ou lipopolissacarídeos. Ainda as bactérias Gram-negativas possuem uma camada lipídica adicional

(SPINOSA, 2006).

Didaticamente podemos dividir a síntese da camada de peptidoglicano em três etapas: uma ocorrendo no citoplasma, outra na membrana citoplasmática e a terceira, externamente a membrana. Os β -lactâmicos interferem com a terceira etapa da síntese (ALTERTHUM, 2005). Além de impedir a síntese, as cefalosporinas impedem também a manutenção do componente peptidoglicano pela inibição da transpeptidase, uma enzima que é responsável pela construção de polímeros de peptidoglicano para formar a parede celular bacteriana, imitando um bloco de construção (QUINN et al., 2005; WEBSTER, 2005).

Os β -lactâmicos tem um único anel de quatro membros e quando agem sobre a enzima transpeptidase, formam uma ligação irreversível com a enzima inativando-a e impedindo que a enzima complete a síntese da parede celular. Essas enzimas são também conhecidas como proteínas de ligação à penicilina (PBP). A maior parte da resistência aos β -lactâmicos é conferida pela produção de enzimas bacterianas chamadas β -lactamases que clivam o anel β -lactâmico fazendo com que o antimicrobiano apresente-se ineficaz (FRYE, JACKSON, 2013; QUINN et al., 2005; WEBSTER, 2005).

As β -lactamases formam um grupo diverso de enzimas, algumas com afinidade a um número limitado de estruturas de agentes antimicrobianos, enquanto outras, as β -lactamases de espectro estendido ESBL são capazes de degradar uma ampla gama de antibióticos (FOLEY, LYNNE, 2007). Assim como ocorre em inúmeras bactérias Gram-negativas, as enzimas citadas podem ser mediadas por plasmídeos ou codificadas por cromossomos (QUINN et al., 2005).

Outros mecanismos de resistência incluem genes que codificam PBP que não são inativados pelo antibiótico, mas sim, que tem baixa afinidade pelos β -lactâmicos e/ou que usam

diferentes blocos de ligação para construir a parede celular (FRYE, JACKSON, 2013).

A produção de beta-lactamases é o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos beta-lactâmicos. O grau de resistência da bactéria depende da quantidade de enzima produzida, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão (potência) e da velocidade com que o beta-lactâmico penetra pela membrana externa da bactéria (permeabilidade da membrana) (BRADFORD, 2001).

As beta-lactamases podem ser agrupadas de acordo com suas estruturas e substratos em classe A, B, C e D (NORDMANN, POIREL, 2002). O grupo mais importante é a classe A, formada por serino-proteases, as quais têm atividade de amplo espectro, incluindo principalmente as enzimas SHV, TEM-1, CTX-M, VEB, e GES que são encontradas nos cromossomos ou em plasmídeos e, portanto, são transferíveis de uma célula a outra com facilidade. As enzimas da classe C atuam principalmente sobre a cefalosporina com genes encontrados no cromossomo de bactérias Gram-negativas. As enzimas de classe B (metalo enzimas) e D (oxacilinases) têm menor importância clínica (DELAIRE et al., 1992; MAJIDUDDIN; PALZKILL, 2005).

A presença de CTX-M-2 em animais de produção tem sido observada no Japão desde 1999. Em um estudo 2,747 isolados bacterianos de bovinos, suínos e aves no período de 1999-2002 foi observado que 18 cepas de *E. coli* foram resistentes a cefazolina, sendo que quatro destas mostraram a presença da enzima blaCTX-M-2 e duas blaCTX-M-14 (CANTÓN, GONZÁLEZ-ALBA, GALÁN, 2012).

Apesar de não haver evidência direta de transmissão de CTX-M-2 produzido por cepas de *E. coli* do gado para humanos, a presença destas enzimas na superfície das carcaças

de gado e nas fezes sugere fortemente que estas bactérias podem ser transmitidas aos seres humanos através da cadeia alimentar (SHIRAKI, 2004). Na Europa, *Salmonella* enterica Virchow produtora da enzima blaCTX-M-2 têm surgido em aves nos últimos anos, principalmente na Holanda, Irlanda e Bélgica (HASMAN, 2005; BERTRAND, 2006).

O aumento da resistência as cefalosporinas de amplo espectro (ceftiofur e ceftriaxone) entre isolados de *Salmonella* spp é de interesse significativo para a saúde pública, porque o ceftriaxone é uma importante droga para o tratamento de crianças com a forma severa da salmonelose. Considerando-se que os micro-organismos resistentes ao ceftiofur apresentam resistência cruzada ao ceftriaxone, o uso desse agente antimicrobiano em animais de produção está sob a crescente fiscalização, por ser um potencial agente responsável pela emergência e disseminação de resistência ao ceftriaxone em *Salmonella* spp e outros patógenos entéricos (FOLEY, LYNNE, 2007; DUTIL, 2010).

Tem sido observado um aumento brusco da resistência ao ceftiofur entre isolados de *Salmonella* spp associados à medicina veterinária, de 2% em 1997 para mais que 15% em 2005 (FOLEY, LYNNE, 2007).

No Canadá, o Programa Integrado de Vigilância Canadense de Resistência aos Antimicrobianos relatou uma forte correlação ($r = 0,9$) entre isolados de *S. Heidelberg* resistentes ao ceftiofur a partir de retalhos de frango e incidência de infecções por *S. Heidelberg* resistentes ao ceftiofur em seres humanos (DUTIL, 2010).

Os mecanismos de resistência são conferidos principalmente por mutações e pela aquisição de novos genes, sendo, portanto, facilmente transmitidos de uma bactéria a outra, não necessariamente da mesma espécie. A resistência destas aos antimicrobianos é uma consequência natural da

evolução, sendo muito difícil de impedir que novos genes ou mutações apareçam. Dessa forma é importante o monitoramento contínuo destes patógenos resistentes, tanto na indústria avícola, quanto nos hospitais (FRYE, JACKSON, 2013; FOLEY, LYNNE, 2007).

Para acompanhar a evolução da resistência bacteriana a antibióticos, não se deve apenas avaliar bactérias causadoras de doenças, mas também, bactérias não patogênicas para as diferentes espécies de animais e seres humanos, como é o caso de algumas enterobactérias. Estas bactérias não patogênicas também adquirem resistência por meio da pressão de seleção e poderão ser avaliadas ao longo do tempo, servindo como indicadores epidemiológicos da evolução das bactérias resistências aos antibióticos (RUIZ, 2006).

Devido à resistência, novos β -lactâmicos foram sintetizados através de modificações no grupo químico ao redor do anel β -lactâmico produzindo β -lactâmicos que são resistentes as β -lactamases. Em resposta a pressão de seleção criada por esses novos antibióticos, mutações nos genes de β -lactamases tem também criado enzimas que podem digerir estes β -lactâmicos mais recentes (FRYE, JACKSON, 2013). O gasto com a produção de novos antibióticos é inviável além de levar bastante tempo para ser aprovado até a comercialização, pois precisa passar por comitês de ética uma vez que antes de ser liberado para o uso em humanos precisa ser testado em animais. Se faz necessário compreender os mecanismos de resistência, os genes responsáveis por esta resistência, a forma como ocorre a disseminação destas bactérias resistentes e também a relação existente entre o uso do antimicrobiano e o aumento da resistência. Este entendimento auxiliará no monitoramento destes patógenos resistentes, além de servir como base para a busca de uma solução que amenize a

prevalência destas bactérias resistentes (NASCIMENTO et al., 2008).

2.5 RESISTÊNCIA AOS DESINFETANTES

A desinfecção é uma importante medida para a destruição da microbiota patogênica e é obtida principalmente pela limpeza e o uso adequado de desinfetantes nos galpões de criações animais (FERREIRA, 2008). Os desinfetantes agem pela atuação na estrutura ou no metabolismo bacteriano pelo bloqueio da membrana, independentemente de seu estado funcional (GUERREIRO et al., 1984). Segundo Imming (2013), os desinfetantes podem causar a coagulação das proteínas celulares, dissolução de substâncias celulares, lesão irreversível e alteração osmótica.

Diversos compostos químicos ativos estão disponíveis no mercado, sendo os mais utilizados na avicultura, os compostos de amônia quaternária, glutaraldeído, e hipoclorito (JAENISCH et al., 2004; GREZZI, 2007).

De modo geral os compostos clorados são muito utilizados pelo seu baixo custo e por serem efetivos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras, e fungos filamentosos. Dependendo do pH da solução podem ser efetivos até contra esporos bacterianos. Atuam através da liberação do ácido hipocloroso em solução aquosa que é a forma não dissociada, 80 vezes mais bactericida que a forma dissociada (ANDRADE, 2008).

Os compostos quaternários de amônio (QAC), entre os quais se encontra o alquildimetilbenzilamônio, são detergentes catiônicos sintéticos que possuem atividade antimicrobiana. São agentes sanitizantes solúveis em água, com baixa toxicidade e boa eficiência frente as bactérias Gram-positivas e

termodúricas, porém, pouco eficientes contra Gram-negativas, coliformes psicotróficos e ineficientes contra esporos. O mecanismo de ação acontece através da inativação de enzimas relacionadas aos processos de transformação de energia, a desnaturação de proteínas celulares e a ruptura da membrana celular (ANDRADE, 2008).

O glutaraldeído é um agente desinfetante bactericida que apresenta rápida e efetiva ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. É considerado um dialdeído, alifático de baixo peso molecular, líquido miscível em água, álcool e solventes orgânicos, ácido (pH 3 a 4) (BRASIL, 2007).

Uma das características do glutaraldeído como bactericida é a capacidade de se ligar fortemente as camadas exteriores dos micro-organismos, especificamente com aminas não protonadas. O principal alvo do glutaraldeído é a membrana ou a parede celular. Pode interferir diretamente no DNA e RNA bacteriano e conseqüentemente na síntese de proteínas. O glutaraldeído desativa aminoácidos celulares pela forte interação formada, especialmente com a lisina (MCDONNELL, RUSSEL, 1999).

Alguns mecanismos responsáveis pela resistência a antibióticos são também aplicáveis a biocidas, aumentando com isto a possibilidade de resistência cruzada entre antibióticos e biocidas (MCDONNELL, RUSSEL, 1999; RUSSEL, 2002). Existem poucos relatos disponíveis sobre a ação de desinfetantes contra micro-organismos, diferente do observado quanto a resistentes bacteriana a antibióticos (GUIMARÃES et al., 2000).

Assim como acontece para os antibióticos, concentrações residuais de desinfetantes podem acarretar na sobrevivência de micro-organismos tolerantes ou ainda na seleção gradual ou rápida de bactérias tolerantes a biocidas (RUSSEL, 2002).

2.6 ILHAS DE PATOGENICIDADE

A patogenicidade é definida como a capacidade de um micro-organismo causar doença. As bactérias patogênicas possuem e expressam genes que codificam fatores de virulência, isto é, fatores que propiciam a colonização e ocorrência de diversos eventos que perturbam a fisiologia hospedeira, ocasionando o aparecimento de sinais e sintomas que irão definir o estado de doença (VIEIRA, 2009).

A virulência da *Salmonella* está diretamente relacionada à capacidade da mesma em invadir células hospedeiras, replicar-se dentro dessas células e resistir à destruição por componentes fagocitários ou à destruição por componentes plasmáticos do complemento (QUINN et al., 2007).

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 (CHU, CHIU, 2006).

A ilha genômica da *Salmonella* spp (SGI) é um elemento móvel integrativo que confere resistência a multidrogas e pode também estar envolvido no aumento da virulência e invasão das cepas de *S. Typhimurium* (MARCUS et al., 2000).

Quando estas SGIs apresentarem genes comprovadamente ligados à virulência, estas são denominadas de SPIs (*Salmonella Pathogenicity Islands*). Os genes presentes nas SPIs codificam várias proteínas funcionais que resultam na invasão e interação entre o hospedeiro e a célula bacteriana (VIEIRA, 2009; OCHMAN, 1996).

As ilhas de patogenicidade, mencionadas como SPIs são grandes regiões do DNA cromossômico (BLUM et al., 1994). Cinco SPIs estão envolvidas na expressão da virulência e na capacidade de invasão da bactéria, denominadas SPI-1,

SPI-2, SPI-3, SPI-4 e SPI-5 (OCHMAN, 1996; WONG et al., 1998; VIEIRA, 2009).

A capacidade de invasão da *Salmonella* spp é codificada em genes localizados em uma SPI denominada SPI-1. Além de codificar proteínas que capacitam à invasão de células do hospedeiro, existem na SPI-1 genes que codificam inúmeras proteínas para o sistema de secreção. Estes sistemas de secreção são dispositivos moleculares que permitem às bactérias exportar para o interior das células hospedeiras, proteínas denominadas “efetoras” (VIEIRA, 2009). Estas proteínas, após penetrar a célula intestinal, atuam na célula hospedeira provocando modificações no citoesqueleto e consequentemente no arcabouço celular. Além disso, permitem a fuga do sistema de defesa no interior de fagossomos, possibilitando a entrada da bactéria levando a morte da célula e outras alterações celulares (GRASSL; FINLAY, 2008). Um dos sistemas muito bem descrito e encontrado em bactérias que infectam o trato gastrointestinal é o sistema de secreção tipo III (SSTT), o qual é codificado pela SPI-1. Este sistema garante que as proteínas efetoras sejam introduzidas na célula hospedeira por meio de uma “seringa molecular”, garantindo a absorção da *Salmonella* spp pelas células epiteliais intestinais do hospedeiro (VIEIRA, 2009).

O gene *invA* é selecionado como um marcador para cepas virulentas de *Salmonella* spp. Este é o primeiro gene do operon que é responsável pela internalização da bactéria dentro de células de mamíferos (GALÁN, CURTISS, 1999). A SPI-1 encontra-se em toda a *Salmonella* e contém o gene *invA*, como o principal responsável pela expressão do sistema SSTT, entretanto mais de 29 genes codificados dentro SPI-1 estão envolvidas na montagem do aparelho de SSTT. Esta ilha compreende uma região de 40 kb do DNA que codifica um aparelho de secreção que regula a transcrição e secreção das

proteínas efetoras (MADIGAN, 2010).

Devido a existência de proteínas codificadas em outra SPI, a SPI-2, a bactéria adquire a capacidade de sobreviver e multiplicar-se na célula do hospedeiro (VIEIRA, 2009). Após a sua entrada a bactéria sobrevive nos macrófagos promovendo sua distribuição sistêmica no organismo (HENSEL et al., 1995). Há outra ilha, a SPI-3, que codifica o operon *mgtCB* possibilitando a sobrevivência intracelular da *Salmonella* em condições limitadas de magnésio. Embora menor, também codifica elementos que permite a sobrevivência da bactéria no meio intracelular (SMITH et al., 1998). Usando os sistemas codificados em SPI-1 e SPI-2, as outras SPIs da *Salmonella*, que não possuem seu próprio sistema de secreção, realizam suas funções por meio de um consórcio (VIEIRA, 2009).

2.7 PCR EM TEMPO REAL

O avanço das técnicas de Biologia Molecular foi certamente um dos maiores passos das ciências biológicas durante o século XX. Estas técnicas têm revolucionado os conhecimentos sobre o genoma, quanto a sua estrutura, expressão e função. Estudos de expressão gênica vêm sendo empregados em vários organismos. A maioria dos estudos tem a finalidade de identificar e caracterizar genes relacionados a características economicamente importantes, como no caso das reprodutivas e aquelas relacionadas à resistência a doenças (FAHRENKRUG et al., 2002). Além disso, o qPCR é uma ferramenta promissora na detecção e quantificação de amostras patogênicas. A quantificação é baseada na determinação do número de cópias do gene (RODRIGUEZ-LAZARO, 2003; SHARMA, DEAN-NYSTROM, CASEY, 1999).

Uma reação de PCR típica inicia pela desnaturação, ou

seja, o aquecimento de uma amostra de DNA a temperaturas entre 93°C a 95°C, transformando as fitas duplas em fitas simples. O conhecimento da sequência do gene a ser amplificada, é utilizado para projetar o par de primers. O anelamento dos primers acontece quando a temperatura é reduzida entre 50-60°C, ou seja, quando ocorre a formação de pontes de hidrogênio entre cada par de primer e a fita molde (ZAHA, 2003; ALBERTS et al., 2004; GONÇALVES, FIGUEIREDO, FREITAS, 2008).

Os primers já anelados servirão de iniciadores para a síntese da cadeia da nova fita de DNA. Uma vez que a enzima polimerase utiliza um molde de fita simples para sintetizar uma fita complementar. A função desta enzima na amplificação *in vitro* é exercida pela, Taq DNA polimerase, que na presença dos desoxinucleotídeos (dNTPs) vai sintetizar a nova fita de DNA. Ao concluir o processo se obtêm dois segmentos de DNA a partir de um. Tendo em vista que a mesma operação é repetida em cada segmento-filho, ao final do segundo ciclo, são obtidos quatro destes segmentos e assim sucessivamente nos ciclos vindouros (DE ROBERTS, HIB, PONZIO, 2003; ZAHA, 2003; ALBERTS et al., 2004).

A análise genômica funcional é uma das metodologias disponíveis mais informativas para a identificação e a expressão de genes, além de possibilitar a caracterização dos padrões de expressão de mRNA e conseqüentemente da proteína gerada. O transcriptoma é o nome dado ao produto inicial da expressão gênica em um organismo e refere-se ao conjunto de RNA mensageiro, cuja informação é requerida pela célula em determinado momento (BINNECK, 2004). Portanto, a expressão de determinado gene é medida pela quantidade de mRNA (HOCQUETTE, 2005).

O qPCR têm se mostrado uma poderosa ferramenta na quantificação da expressão gênica, permitindo determinar a

presença ou a ausência de determinado transcrito, comparar níveis de mRNAs em diferentes amostras e caracterizar padrões de expressão de mRNAs e ainda possibilita a quantificação de baixos níveis mRNA, uma vez que é um método muito sensível. A principal diferença entre o PCR e qPCR é que a última permite o monitoramento da reação a cada ciclo, permitindo a detecção direta dos produtos de PCR na fase exponencial da reação, onde a quantidade de fragmento gerado é proporcional à quantidade inicial (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001; WONG, MEDRANO, 2005).

O sistema SYBR Green é uma das metodologias descritas que têm sido bastante empregado para amplificação em ensaios de qPCR. As principais diferenças entre as variadas metodologias são a especificidade do alvo de amplificação, o custo e a precisão. Por ser um fluoróforo, o SYBR Green, é responsável por emitir a fluorescência que é detectada pelo termociclador. Para isso, se liga a qualquer dupla fita de DNA gerada durante a reação de PCR, sendo por isso considerado um sistema de detecção não específico. Uma das principais vantagens no uso deste método de detecção em ensaios de qPCR é o custo mais barato em relação à construção de sondas marcadas (BUSTIN, 2000; BUSTIN, NOLAN, 2004).

O fato do corante SYBR Green se ligar a qualquer dupla fita de DNA é importante que os primers utilizados na reação de PCR sejam desenhados cuidadosamente para evitar a amplificação de produtos inespecíficos e formação de dímeros (BUSTIN, 2000; BUSTIN, NOLAN, 2004).

A quantificação do mRNA através do qPCR é feita pela associação entre a amplificação do gene alvo em cada ciclo com a emissão de fluorescência. Portanto, a fluorescência emitida é proporcional a quantidade de produto gênico gerado (BUSTIN, NOLAN, 2004; WONG, MEDRANO, 2005).

O valor de intensidade de fluorescência pode ser

determinado durante a fase exponencial de amplificação. Este valor é denominado Limiar (threshold) e é o nível de sinal que reflete um aumento estatisticamente significativo em relação ao sinal de linha de base (baseline) calculado. É definido por distinguir o sinal de amplificação a partir da linha de base. A linha de base na reação de qPCR refere-se a nível de sinal durante os ciclos iniciais de PCR, geralmente entre o 3º e o 15º ciclo, onde há pouca alteração no sinal de fluorescência. A linha de base é determinada empiricamente para cada reação, por análise automatizada do software do qPCR que gera o gráfico de amplificação, conforme pode ser exemplificado na figura abaixo (BUSTIN, NOLAN, 2004).

O ciclo limiar (*cycle threshold*) ou Ct é a número de ciclos de PCR requeridos para que cada amostra emita fluorescência suficiente para alcançar o limiar, portanto é utilizado para calcular o número inicial de cópias de DNA. O Ct é específico para cada amostra e é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo presente na reação (BUSTIN, NOLAN, 2004).

Existem duas metodologias que podem ser utilizadas para quantificação do mRNA através da técnica do qPCR, a quantificação absoluta e a quantificação relativa. Na primeira, a construção de uma curva padrão (standard curve) é utilizada para determinar o número de cópias de mRNA. Para a construção desta curva é utilizado diluições seriadas de uma amostra de RNA com concentração conhecida. Já na quantificação relativa, ou método comparativo é feita a curva padrão para o gene alvo e para o gene referência, permitindo posteriormente a comparação da expressão de ambos os genes através dos valores do Ct de cada amostra (PFAFFL, 2001). Quando existem muitos genes a serem testados em muitas amostras, está é a metodologia mais utilizada (LEUTENEGGER et al., 2000).

O gene referência (housekeeping gene), também conhecido por controle endógeno, são genes que apresentam caráter constitutivo, ou seja, são expressos em todos os tipos celulares e estádios de desenvolvimento e portanto mantém as funções celulares básicas. São responsáveis pela expressão de proteínas ribossomais, tRNA, rRNA e componentes da RNA polimerase. O uso de um gene constitutivo procurar minimizar as diferenças nas quantidades de RNA utilizadas na transcrição reversa, as quais podem variar por influência das diferentes técnicas de extração ou até pelas variações que possam ocorrer durante cada reação e em cada tubo de reação. Portanto o gene de referência é utilizado para estimar as mensurações no final da reação de PCR, evitando-se, assim, maiores erros (SCHMITTGEN, ZAKRAJSEK, 2000; BAS et al., 2004). Existem vários genes referências que podem ser utilizados, sendo os mais comuns: actina, RNA ribossomal (rRNA), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (HUGGETT et al., 2005).

3 ARTIGO

DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO GÊNICA (INVA E BLACTX-M2) DE ISOLADOS DE CAMPO E DE FRIGORÍFICO DE SALMONELLA RESISTENTE À ANTIMICROBIANOS E DESINFETANTES

3.1 INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é um dos maiores produtores de frangos isso em função da alta demanda de consumo de carne de origem avícola em todo o mundo. O Brasil é o terceiro maior produtor de frango, ficando atrás somente dos Estados Unidos e da China; é ainda o maior exportador mundial (UBABEF, 2014).

A salmonelose é uma doença gastrointestinal decorrente da infecção causada por bactérias do gênero *Salmonella* spp. pertencente à família das *Enterobacteriaceae* e classificadas como bacilos Gram negativos. Por acometer inclusive humanos, ela representa um significativo problema de saúde pública em muitos países. Esta bactéria é encontrada nos mais variados ambientes, entretanto as aves são os principais reservatórios naturais existentes na natureza. A ingestão de alimentos contaminados é a principal forma de contaminação humana, com destaque para os produtos de origem avícola, especialmente o ovo cru.

A resistência microbiana é a capacidade de alguns micro-organismos sobreviver, crescendo e multiplicando-se mesmo na presença de determinados antibióticos. Esta resistência é codificada geneticamente e pode variar a partir de mutações em genes cromossômicos e/ou pela transferência horizontal de genes que são carregados por elementos genéticos

móveis tais como plasmídeos, integrons, transposons e fagos. Tanto as mutações pontuais, quanto a aquisição de genes podem codificar alguns mecanismos de resistência, entre eles, destruição ou inativação enzimática da droga, alteração do sítio alvo e redução do nível intracelular do antimicrobiano.

O tratamento das doenças causadas por bactérias resistentes a antimicrobianos está se tornando cada vez mais difícil e oneroso considerando-se que as taxas de resistência bacteriana em hospitais e sistemas de produção animal aumentaram consideravelmente durante as últimas décadas. Diante do aumento na incidência de toxinfecções por *Salmonella* spp e dos relatos cada vez mais frequentes de cepas multirresistentes a antimicrobianos, torna-se necessária um melhor entendimento e monitoramento dos principais mecanismos de resistência utilizados por estes microorganismos. Relativamente poucos recursos foram utilizados para entender, prevenir e controlar a propagação destas bactérias resistentes.

O objetivo deste trabalho foi averiguar através do PCR em tempo real (qPCR) as diferenças na expressão de genes de virulência (*invA*) e de resistência aos antibióticos (*bla*CTXM-2) de isolados de *S. Heidelberg* de origem avícola, proveniente de campo e de frigorífico já com conhecido padrão de resistência a antimicrobianos e desinfetantes. Para isso, primeiramente os isolados de *S. Heidelberg* (54), *S. Enteritidis* (54) e *S. Typhimurium* (54) foram submetidos ao teste do disco-difusão para identificar o padrão fenotípico de resistência e multirresistência antimicrobiana frente à enrofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, gentamicina, ceftiofur, ceftriaxone, ácido nalidíxico, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol que são antibióticos utilizados rotineiramente na medicina veterinária e humana. O trabalho também teve por objetivo identificar nos isolados a

concentração inibitória mínima (MIC) frente ao ceftiofur. Os mesmos isolados foram testados pelo teste de diluição em tubos para averiguar a eficiência dos desinfetantes a base de amônia quaternária, glutaraldeído e hipoclorito de sódio. Ainda foi feita a triagem do sistema de efluxo, utilizando o brometo de etídio.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Origem dos isolados

Os isolados de *Salmonella* (162) previamente sorotipificados foram gentilmente cedidos por um laboratório veterinário privado credenciado pelo MAPA para a realização de monitorias oficiais e pela Fundação Estadual de Agropecuária (FEPAGRO) no estado do Rio Grande do Sul. Foram analisados 54 isolados de cada uma das *Salmonella* spp. (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, e *S. Heidelberg*). Todas as amostras eram oriundas de materiais avícolas conforme descrito na Tabela 1, apêndice A.

Novos repiques foram realizados a partir das amostras enviadas pelos laboratórios para a confecção de uma bacterioteca seguindo a metodologia de conservação e manutenção de micro-organismos descritas por Sola et al. (2012). A partir desta realizou-se todos os testes microbiológicos descritos a seguir.

3.2.2 Teste do disco-difusão

Os testes de disco-difusão foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular, Imunologia e Microbiologia (LABMIM) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), no Centro de Educação Superior do Oeste (CEO), em Chapecó-SC. Foi utilizada a metodologia aprovada pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que consta na IN M-2 A-8 de Padronização dos Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos por Disco-difusão (BRASIL, 2003). Os antimicrobianos utilizados para verificar a

sensibilidade dos 162 isolados foram: enrofloxacina (5 µg), ciprofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg), gentamicina (10 µg), ceftiofur (30 µg), ceftriaxone (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), tetraciclina (30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg), cloranfenicol (30 µg). A *Escherichia coli* ATCC 25922 foi usada como cepa de referência para o controle dos discos.

As placas foram analisadas quanto a presença de um halo confluyente. Com o auxílio de uma régua os halos foram medidos e classificados de acordo com as tabelas descritas na IN M-2 A-8 e desta forma foi possível classificar os isolados de *Salmonella* spp em sensíveis ou resistentes aos antimicrobianos estudados.

3.2.3 Resistência a múltiplas drogas

A partir dos dados do disco-difusão foi possível determinar o número de isolados que foram considerados multirresistentes. São considerados multirresistentes isolados que apresentam resistência a três ou mais antibióticos (FRYE; CRAY, 2007).

3.2.4 Índice de resistência múltipla a antibióticos

O Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA) foi calculado conforme metodologia descrita por Krumperman (1983), através da razão entre o número de antimicrobianos contra os quais cada isolado foi resistente e o número total de antimicrobianos testados.

3.2.5 Concentração inibitória mínima

A realização do MIC foi feita conforme a IN M-31A-3 de Padronização dos Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos por Disco-difusão e Diluição Para Testar Isolados Bacterianos de Origem Animal (CLSI, 2008). Segundo a IN M-31A-3 os isolados são classificados como resistentes ao ceftiofur se o ponto crítico for $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ e sensíveis se o ponto crítico for $\leq 2 \mu\text{g/mL}$.

Os isolados de *S. Heidelberg* (17), *S. Enteritidis* (2) e *S. Typhimurium* (1) classificados como resistentes ao ceftiofur pelo teste do disco-difusão foram submetidos ao MIC com produto comercial (Excenel®) contendo 50 mg de ceftiofur por mL do produto. Foram testadas 10 diluições, variando de 0,064 mg/mL até 0,000125 mg/mL.

3.2.6 Método de diluição de desinfetante em tubos

Os 17 isolados de *S. Heidelberg* que foram resistentes ao ceftiofur através do teste do disco-difusão e MIC foram submetidos à técnica de diluição em tubos para determinar o nível de resistência dos isolados frente a três desinfetantes. Ainda testou a susceptibilidade de um isolado de *S. Heidelberg* considerado sensível ao ceftiofur pelo teste do disco-difusão. A composição química dos desinfetantes utilizados e as características de fabricação dos produtos estão descritas nas Tabela 2 e Tabela 3 do apêndice B.

A metodologia utilizada para analisar a eficácia dos desinfetantes foi adaptada da Portaria n°101 de 11 de agosto de 1993 do MAPA com a contagem bacteriana total em placa (BRASIL, 1993). *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923),

Escherichia coli (25922 ATCC) e um isolado de *S. Heidelberg* não resistente foram utilizados como cepas controle. O meio de cultura utilizado para o cultivo dos micro-organismos foi ágar verde brilhante para *S. Heidelberg*, ágar nutriente para *Staphylococcus aureus* e EMB para *E. coli*. Para confirmar a presença do *S. aureus* foi feita a coloração de Gram (TORTORA et al, 2012). Para a obtenção da suspensão dos micro-organismos as colônias acima foram submetidas a diluições seriadas de 10^{-1} até 10^{-7} , utilizando-se água peptonada, sendo que a diluição 10^{-5} foi a utilizada para o teste, obtendo uma contagem final de aproximadamente 10^{10} UFC/mL para *S. Heidelberg* e 10^9 e 10^{10} UFC/mL para as cepas padrão de *E. coli* e *S. aureus*. Para análise da eficácia, os desinfetantes testados foram diluídos conforme instruções do fabricante (1:2000 para a amônia quaternária, 1:1500 para o glutaraldeído e 1:25 para o hipoclorito de sódio). As amostras foram testadas na presença e ausência de matéria orgânica (leite) diluída (1:5000) em água destilada autoclavada.

Para o ensaio, distribuiu-se 9 mL de cada amostra do desinfetante em um tubo de ensaio esterilizado. Adicionou-se a esse tubo 0,1 mL de suspensão de *Salmonella Heidelberg*. Imediatamente após o contato do inóculo com o desinfetante, teve início a contagem do tempo (10 minutos). O mesmo foi feito na presença da matéria orgânica (1 mL).

3.2.7 Procedimento de triagem do sistema de efluxo

As análises para avaliar a resistência a compostos de amônia quaternária mediada pelo sistema de efluxo foram realizadas conforme protocolo descrito por Sundheim, Hagtvedt e Dainty (1992). Para isso, 0,1 mL do caldo BHI

(*brain heart infusion*) turvo contendo isolados de *S. Heidelberg* (17 isolados resistentes e 1 isolado sensível ao ceftiofur) foi semeado individualmente em ágar Mueller-Hinton contendo brometo de etídio (0,5µg/mL) com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Após a incubação as placas foram analisadas sob a luz ultra-violeta. Células bacterianas que acumularam o EtBr emitiram fluorescência vermelha e portanto foram consideradas sensíveis a QAC pela ausência de bombas de efluxo.

3.2.8 Extração de RNA

As técnicas de biologia molecular foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, Imunologia e Microbiologia (LABMIM) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), no Centro de Educação Superior do Oeste (CEO), em Chapecó-SC.

As amostras submetidas à extração de RNA foram aquelas que se mostraram resistentes ao ceftiofur através do MIC, totalizando 17 isolados de *S. Heidelberg*. Ainda um isolado de *S. Heidelberg* sensível ao ceftiofur pelo teste do disco-difusão também foi submetido a extração de RNA. Primeiramente as amostras foram retiradas da bacterioteca conservada a 8-10°C e cultivadas em caldo BHI (24 horas à 37°C). Seguido do estriamento no ágar verde brilhante (24 horas à 37°C).

Para a extração de RNA, 3 a 5 colônias isoladas foram retiradas e inoculadas novamente em caldo BHI (24 horas a 37°C) até obter aproximadamente a concentração de $1,0 \times 10^9$ UFC/mL. O RNA foi extraído utilizando-se o Mini kit RNA PureLink® (AMBION, Life Technologies, Carlsbad, EUA) e armazenado em nitrogênio líquido (-80°C) até a quantificação

pelo Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA). A qualidade do RNA foi estimada através da relação entre OD 260/280, onde valores de 1,8 a 2 foram considerados como ótimos por indicar RNA limpo de proteínas e outros cromóforos.

3.2.9 Transcriptase reversa

A fita de cDNA foi sintetizada a partir do RNA, utilizando o kit de Transcriptase reversa com alta capacidade de cDNA (Applied Biosystems, Foster, EUA). Primeiramente o RNA foi tratado com a enzima Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad).

O preparo do RT master mix foi feito utilizando-se 300 a 700 ng de RNA (10 µL), 2 µL tampão, 0,8 µL do mix de dNTP (100 mM), 2 µL primers random, 1 µL enzima transcriptase reversa (RT), água livre de nucleases, correspondendo ao um volume total de 20 µL de reação. O cDNA foi tratado com a enzima inibidora de Ribonuclease Recombinante RNaseOUT™ (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA). O cDNA foi estocado a -15°C até o momento de uso na reação de qPCR. O preparo do cDNA foi realizado no termociclador T100 (Bio-Rad).

3.2.10 PCR em tempo real

A análise da expressão do gene de resistência as cefalosporinas (blaCTX-M2) e do gene de virulência (invA) foi feita utilizando-se a metodologia de PCR em tempo real (qPCR). Como gene de referência foi utilizado o gene 16S RNAr. A concentração do primer, tamanho do fragmento (pb),

autor e referência utilizados para avaliar a expressão dos genes estão descritos na Tabela 4 do apêndice C.

As reações do qPCR foram realizadas utilizando-se o kit de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

As condições de amplificação para os genes *invA* e *16SRNA_r* foram obtidas conforme descrito por Singh e Mustapha (2013) 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 de amplificação para o gene *blaCTX-M-2* foram obtidas conforme descrito por Chen et al. (2004) sendo elas: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação por 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e o passo final consiste de 72°C por 7 minutos. Para os três genes, após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação (curva de *melting*) a fim de validar a ausência de produtos não específicos e dímeros de primers. As amostras foram submetidas a um aumento gradual da temperatura de 0,1°C por 5 segundos, partindo de 60°C até atingir 95°C.

Para determinar a eficiência da reação e a curva de dissociação as reações foram otimizadas para os quatro genes avaliados. Para tal, foi realizado um *pool* com todas as amostras estudadas e na sequência foram feitas diluições seriadas (cDNA puro, 1:10, 1:100 e 1:1000). Cada amostra foi feita em duplicata em placas ópticas específicas para o qPCR com 96 poços, seladas com filme adesivo óptico e amplificadas no termociclador Real Time CFX96 (Bio-Rad). Os resultados de amplificação obtidos foram analisados com o software Bio-Rad CFX Manager.

3.2.11 Análise estatística

O teste do qui-quadrado (X^2) com nível de significância de 1% foi utilizado para avaliar estatisticamente os resultados obtidos nos antibiogramas

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Teste do disco-difusão

Os resultados obtidos pelo teste do disco-difusão foram analisados de forma geral e também separadamente entre amostras oriundas do campo e de frigorífico. O número e o percentual de isolados de *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* podem ser observados na Tabela 5, apêndice D. Em todas as situações foi observado significância entre o perfil de resistência conforme o antibiótico testado ($P < 0,001$), exceto para as amostras de frigorífico para os isolados de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* ($p=0,3505$). Além disso, os isolados testados frente aos dez antibióticos foram agrupados conforme a classe do antibiótico e pode ser observado na Figura 1, apêndice E.

3.3.2 Múltipla resistência a drogas

A Tabela 6, apêndice F, mostra os resultados referente ao número e o percentual de isolados de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* que mostraram-se resistentes a nenhum, um, dois, três ou mais antibióticos.

O número e o percentual de isolados de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* que mostraram um padrão de Múltipla Resistência a Drogas (MDR) com resistência a três,

quatro e cinco antibióticos e a referida identificação (ID) do padrão e o Índice de Resistência Múltipla aos Antibióticos (IRMA) são mostrados na Tabela 7, apêndice G. Do total de isolados estudados, apenas 30 mostraram-se resistentes a três drogas. A resistência a quatro drogas foi baixa (3/162), sendo um de cada sorovar estudado. E não foi observado isolados resistentes a mais que 5 antibióticos.

3.3.3 Índice de resistência múltipla aos antibióticos

O Índice de Resistência Múltipla aos Antibióticos (IRMA) para os isolados de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* foi de 0,2. Considerando-se cada um dos isolados individualmente, a *S. Heidelberg* mostrou o maior IRMA (0,25), variando de 0,2 até 0,5. Já a *S. Typhimurium* mostrou IRMA médio de 0,17, variando entre 0 a 0,4. E a *S. Enteritidis* foi o isolado com menor IRMA (0,12), variando entre 0 a 0,4.

3.3.4 Concentração inibitória mínima

Amostras resistentes ao ceftiofur foram avaliadas pelo MIC. Dos 17 isolados de *S. Heidelberg* obtivemos os seguintes resultados: ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ (11), 32 $\mu\text{g/mL}$ (4), 16 $\mu\text{g/mL}$ (1), 4 $\mu\text{g/mL}$ (1). Dois outros isolados de *S. Enteritidis* foram analisados, onde um mostrou-se sensível no MIC e o outro obtivemos 32 $\mu\text{g/mL}$ como resultado. O sorovar *S. Typhimurium* mostrou-se sensível ao MIC.

3.3.5 Método de diluição de desinfetante em tubos

Dos isolados de *S. Heidelberg* que foram submetidos ao teste de diluição em tubos, 17 mostraram-se sensíveis aos três desinfetantes testados nas diluições recomendadas pelo fabricante, independentemente da presença de matéria orgânica (leite). Entretanto, um único isolado de *S. Heidelberg* (ID 81) inoculado na ausência de matéria orgânica cresceu mesmo na presença do desinfetante B (glutaraldeído).

3.3.6 Procedimento de triagem do sistema de efluxo

Os resultados foram obtidos pela visualização da fluorescência emitida pelas placas de ágar Mueller-Hinton na presença da luz ultra-violeta (UV). Todos os isolados submetidos ao teste foram considerados sensíveis aos compostos de amônia quaternária pela ausência do mecanismo de bomba de efluxo.

3.3.7 PCR em tempo real

A definição da curva padrão das amostras de RNA analisadas foi avaliada a partir da qPCR utilizando primers específicos para os genes 16SRNA, *invA* e *blaCTX-M2* de *Salmonella Heidelberg* (Tabela 4, apendice C). Para o gene 16SRNAr foi obtida uma reta de calibração com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,995 e a eficiência da reação (E) de 80,2%, conforme pode ser observado na Figura 2 do apêndice H. Já para os genes *invA* e *blaCTX-M2* os valores do

R^2 foram 0,990 e 0,995 e os valores do E foram 83,1% e 60%, respectivamente (Figura 3, apêndice I).

A análise da curva de *melting* e da temperatura de *melting* para o gene 16SRNAr, *invA* e *blaCTX-M2* pode ser observada na Figura 4 (apêndice J), Figura 5 (apêndice K) e Figura 6 (apêndice L), respectivamente. Um único pico para os genes 16SRNAr e *invA* foi identificado permitindo concluir que não houve a formação de produtos inespecíficos, já o gene *blaCTX-M2* mostrou o pico chamado *shoulders*.

Na Tabela 8 (apêndice M) consta os valores médios de C_q e da expressão gênica para os genes *invA* e *blaCTX-M2* para cada isolado de *S. Heidelberg*. Todos os isolados de *S. Heidelberg* estudados expressaram o gene *invA*. Entretanto, a quantidade da proteína participante do sistema de secreção do tipo III expressa variou entre os isolados estudados. Diferente do que foi observado para o gene *blaCTX-M2*, onde alguns isolados não mostraram a expressão da enzima responsável pela resistência as cefalosporinas.

O isolado 55 (expressão gênica = 1.00) foi utilizado como amostra padrão para os cálculos da expressão dos outros isolados estudados. Entre os isolados com origem de frigorífico, a amostra identificada como ID 53 teve expressão do gene *invA* 3,42 vezes maior que a amostra controle e entre os isolados com origem de campo, o ID 58 mostrou uma expressão 66,88 vezes maior que o controle, sendo portanto consideradas as amostras com maior potencial de virulência. Já a expressão do gene *blaCTX-M2* entre os isolados com origem de frigorífico o ID 54 teve uma expressão de 74,84 vezes maior que o controle. Quando analisado os isolados provenientes do campo, o ID 56 teve uma expressão gênica 24,26 vezes maior que o controle, sendo portanto consideradas amostras com maiores quantidades da enzima beta-lactamase expressa pelo gene *blaCTX-M2*.

Quando as amostras oriundas do campo foram comparadas as de frigorífico (Figura 7, apêndice N) observou-se que a expressão gênica do *invA* dos isolados provenientes do campo foi 2,53 vezes maior. Já ao comparar as amostras de campo com as de frigorífico (Figura 8, apêndice O) observou-se uma expressão de 4,94 vezes maior do gene *blaCTX-M2* para os isolados provenientes do frigorífico.

3.4 DISCUSSÃO

Os resultados das análises do perfil de resistência dos isolados de *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurum* frente aos dez antimicrobianos mostraram uma significativa incidência de cepas resistentes. É possível notar que os isolados de *Salmonella* spp. estudados apresentaram 100% de susceptibilidade apenas aos antibióticos pertencentes à classe das fluorquinolonas (enrofloxacina, ciprofloxacina e norfloxacina). Estes resultados eram esperados, uma vez que a enrofloxacina é um antibiótico da família das fluorquinolonas, sendo considerada uma quinolona de segunda geração. Portanto, já é um antibiótico que foi desenvolvido diante dos altos níveis de resistência observados nas quinolonas de primeira geração, sendo ambos antibióticos sintéticos e obtidos do ácido nalidíxico, que atualmente também demonstra altos níveis de resistência. Corroborando com os resultados obtidos, Seyfarth, Wegener e Frimodt-moller (1997), Hakanen (2006), Duarte et al. (2009) e Vaz et al (2010) em quatro estudos independentes também avaliaram isolados de *Salmonella* de origem avícola.

Por muitos anos o ácido nalidíxico foi usado para terapia em aves no Brasil. Neste estudo observou-se que 68% dos isolados foram resistentes a este antibiótico. Diferente do

que foi encontrado por Medeiros (2006) e Vaz et al. (2010), onde respectivamente 26,01% e 14,56% dos isolados mostraram-se resistentes ao ácido nalidíxico. Segundo Malorny et al. (1999), um aumento na incidência de cepas resistentes às quinolonas em animais foi associada à utilização de ácido nalidíxico em animais de produção.

A tetraciclina tem sido utilizada como promotor de crescimento em animais de produção desde 1998, quando o seu uso foi banido. Portanto altos níveis de resistência à tetraciclina não é uma surpresa, fato que foi confirmado neste trabalho onde 47% dos isolados foram resistentes a tetraciclina. Corroborando com estes resultados Busani (2004) e Cardoso et al. (2006) encontraram 78% e 100% de isolados resistentes a tetraciclina.

A gentamicina é um aminoglicosídeo comumente utilizado no tratamento de infecções de animais de produção, como nos casos de salmonelose em perus. O seu uso é limitado devido a sua natureza tóxica e a persistência do antimicrobiano na forma residual nos tecidos dos animais. Busani (2004), Cortez et al. (2006) e Ribeiro et al. (2008) encontraram menores níveis de resistência à gentamicina (< 3,45%), diferente do que foi encontrado neste trabalho, onde 14% dos isolados foram considerados resistentes.

As cefalosporinas de terceira geração, além de serem utilizadas para o tratamento de infecções por *Salmonella* spp em animais, também são utilizadas para o tratamento desta infecção principalmente em crianças (FRYE; CRAY, 2007). Os resultados encontrados neste trabalho mostraram menores nível de resistência ao ceftiofur em isolados de *S. Typhimurium* (1,9%) e *S. Enteritidis* (3,7%), concordando com os desenvolvidos por Palmeira (2007). Valores maiores de resistência (18,1%) foram encontrados por Biffi et al. (2012) ao avaliar isolados de origem avícola. Já segundo Medeiros

(2006) e Nunes (2009) menores níveis de resistência ao ceftriaxone foram observados, concordando com os achados aqui reportados (4%).

De importância para a medicina veterinária, o ceftiofur, cefalosporina de terceira geração, é a única aprovada para animais de produção, sendo utilizada para o tratamento da salmonelose na avicultura (WEBSTER, 2005). Conforme pode ser constatado pelo MIC, altos níveis de resistência foram identificados, indicando sua ineficiência no combate à doença evidenciando a necessidade de drogas alternativas no tratamento da infecção.

Para o tratamento da salmonelose em aves a concentração da dosagem indicada pelo fornecedor é de 2mg/Kg. Já as concentrações indicadas para eliminar os isolados de *S. Heidelberg* resistentes são 32 vezes maiores que a dose terapêutica indicada. Frye e Cray (2007) avaliaram a susceptibilidade de isolados de *Salmonella* spp provenientes de animais de produção por um período de cinco anos e observaram que a resistência ao ceftiofur passou de 4% em 1999 para 18% em 2003. Os valores do MIC variaram de 1 a 16 µg/mL, diferente do que foi observado neste trabalho, onde os níveis de resistência foram ainda mais elevados (64 µg/mL). Já Zhao (2008) que também analisou *S. Heidelberg* isolada de retalhos de carne de frango, encontrou menores níveis de resistência (9%) ao ceftiofur. Medeiros et al. (2011) encontraram níveis de resistência ao ceftiofur em isolados de *S. Heidelberg* proveniente de carcaças e retalhos de carne de frango semelhante ao observado no presente trabalho.

Frye e Cray (2007) relataram a crescente preocupação global em função do aparecimento de cepas multirresistentes. O isolado é considerado multirresistência quando mostrar um padrão de resistência a três ou mais antibióticos. Medeiros et al. (2011), também avaliou isolados de *Salmonella* spp. que

apresentaram um padrão de resistência a uma ou duas drogas (36,1 %) e a três ou mais drogas (63,9%). Quando considerada a multirresistência, o presente trabalho constatou que 35,8% dos isolados foram resistentes a uma ou duas drogas e 20,4% dos isolados foram resistentes a três ou mais drogas.

Estudos realizados por Zhao (2008) com intuito de identificar o número de isolados com padrão de multirresistência mostram que dos 298 isolados de *S. Heidelberg* analisados, 67% foram resistentes a pelo menos uma droga, resultados diferentes dos obtidos neste trabalho, onde não foram identificados isolados resistentes a uma única droga, mas sim a no mínimo duas drogas.

Ao avaliar a multirresistência de 16 isolados de *S. Typhimurium*, Medeiros et al. (2011) detectaram 55,6% de isolados resistentes a uma ou duas drogas e 44,4% dos isolados resistentes a mais que três drogas. Estes resultados estão bem acima dos encontrados, uma vez que 15,4% foram resistentes a uma ou duas drogas e 9,3% dos isolados foram resistentes a três ou mais drogas. Segundo Busani (2004) a resistência múltipla tem sido mais comumente observada em *S. Typhimurium*. Diferente do que foi observado no presente trabalho, onde o *S. Heidelberg* apresentou um maior número de isolados multirresistentes, como pode ser observado na Tabela 6 (apêndice F). É possível constatar que as cepas testadas apresentam um grau de multirresistência preocupante o que pode dificultar o tratamento de casos de salmonelose em avicultura.

Estudos conduzidos por Krewer (2012) através da análise da susceptibilidade de isolados de *E. coli* proveniente de granjas suínícolas dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, constataram que o IRMA médio para estes isolados foi 0,52, variando de 0,11 a 1, sendo que a maior parte dos isolados demonstraram índices acima de 0.52. Estes resultados

são mais altos do que o encontra no presente trabalho, uma vez que o IRMA médio, considerando os isolados de *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium*, foi de 0,2 e variou de 0,1 a 0,5. Já ao analisar os isolados de *S. Heidelberg* isoladamente, o IRMA observado foi 0,3 e variou de 0,3 até 0,5, mostrando que os isolados de *S. Heidelberg* são mais preocupantes para saúde pública. Carvalho (2009) que analisou 23 isolados de *Salmonella* spp provenientes de carcinicultura constatou apenas 3 isolados com IRMA superior a 0,29, resultados de IRMA semelhantes ao encontrado neste trabalho.

Além de mostrar altos níveis de resistência ao ceftiofur, ou seja, além da necessidade de altas concentrações do antibiótico para eliminar a bactéria, ainda os isolados mostraram índices acima de 0.2 indicando a multirresistência do isolados e o seu potencial para transferência horizontal de genes de resistência. De acordo com Krumperman (1983) altos valores de IRMA indicam um risco para saúde pública, podendo dificultar o tratamento de enfermidades de animais e humanos, alertando para a necessidade do uso racional destas drogas.

O desinfetante B, avaliado neste trabalho, o qual era composto de amônia quaternária e glutaraldeído, possui um efeito sinérgico que tem sido associado ao maior sucesso no controle de bactérias, bem como, exerce uma menor pressão de seleção em populações microbianas (HARRISON et al., 2008). Produtos à base de amônia quaternária e aldeídos são muito eficazes na desinfecção de ambientes contaminados por *E. coli*, o que também foi mostrado no presente estudo para os isolados de *S. Heidelberg*, particularmente no que diz respeito ao desinfetante nominado C. Entretanto, vários patógenos Gram negativos, em especial *E. coli* são descritos como resistentes aos desinfetantes (GILBERT; MCBAIN, 2003), uma vez que possuem a membrana externa da parede celular relativamente

impermeável (LANGSRUD; SUNDHEIM; HOLCK, 2004). Apesar disso, mutações nesta estrutura tem sido associada a menor hidrofobicidade da membrana, o que facilita a ação destes agentes químicos (KICH et al., 2004). O composto polioxietilenonilfenileter presente no desinfetante A foi efetivo contra todas as amostras testadas sendo caracterizado por sua ação tensoativa capaz de remover biofilmes bacterianos (KICH et al., 2004).

Diversos autores relacionam a resistência bacteriana aos desinfetantes a presença de mecanismos, como o sistema de efluxo de substâncias tóxicas pelas células bacterianas (PAIXAO et al., 2009). Os resultados aqui encontrados reforçam esta hipótese, uma vez que os isolados foram sensíveis aos desinfetantes e o mecanismo de efluxo não foi observado em nenhum dos isolados. O mesmo foi observado por Bjorland et al (2005), ao analisar isolados de *Staphylococcus* spp de amostras de leite de bovinos e caprinos resistente a desinfetantes provenientes de compostos de amônia quaternária.

A *S. Heidelberg* está entre os três principais sorovares isolados de pessoas infectadas com salmonelose no Canadá. Além disso, parece ser mais invasiva que outros sorovares que causam gastroenterite (DUTIL, 2010).

Os resultados do qPCR permitem concluir que todos os isolados de *S. Heidelberg* analisados são virulentos, alguns em maior grau que outros, como é o caso do ID 53 (3,42) (Tabela 8, apêndice M) que apresenta um agravante por ter sido isolada de produtos cárneos (frigorífico) com fácil transmissão para cadeia alimentar humana através da contaminação cruzada entre os alimentos. Além disto, este isolado mostrou um alto nível de resistência ao ceftiofur através do MIC (64 µg/mL) utilizado rotineiramente na produção animal. O valor do IRMA foi de 0,3, mostrando o potencial para transferência horizontal

de genes de resistência. E o padrão de MDR foi o A, ou seja, o isolado não mostrou-se resistente apenas ao ceftiofur, mas também a tetraciclina e ao ácido nalidíxico. Estes achados nos permitem inferir que o consumo de um produto de origem avícola com esta cepa virulenta pode ter o tratamento dificultado em função do alto nível de resistência observado, mesmo que a β -lactamase blaCTX-M2 não tenha sido identificada pela técnica de qPCR, outras enzimas podem ser responsáveis pela multirresistência.

Uma das razões para essa variação observada pode ser devida à grande diversidade de genes de resistência a antibióticos que codificam β -lactamases em membros da família *Enterobacteriaceae* (SINGH, MUSTAPHA, 2013). Segundo Singh, Batish, Grover (2012) a outra razão para a variação na expressão do gene blaCTX-M2 observada pode ser devido ao fato de que algumas cepas terem perdido o plasmídeo contendo o gene de resistência durante a armazenagem.

Hamilton (2012) ao analisar isolados de *S. Typhimurium* resistentes ao ceftriaxone através do MIC e a correlação da resistência e a expressão do gene blaCMY-2, constatou que o aumento da expressão do blaCMY-2 é baixa e por tempo determinado requerendo a presença do ceftriaxone. O aumento da expressão observada após a pressão seletiva pelo contato da bactéria com este antibiótico apresentou correlação com os altos valores do MIC.

O isolado de *S. Heidelberg* ID 103 mostrou-se ainda mais virulento (48,10) (Tabela 8, apêndice M) e por ter sido isolado de swab de arrasto (campo) também pode se tornar uma problemática para a saúde pública, pois além de mostrar altos níveis de resistência frente ao ceftiofur através do MIC (>64 $\mu\text{g/mL}$) tem-se ainda o fato de que o contato do homem com um ambiente contaminado pode levar a disseminação da

bactéria que além de virulenta, mostrou a expressão do gene para a enzima blaCTX-M2 (1,21), confirmando que a presença genotípica, pode ser responsável pelo fenótipo resistente. Já não sendo suficientemente problemático, o isolado ID 103 é considerado multirresistente e mostrou um padrão de MDR A, além disso apresentou um IRMA de 0,3, portanto pode transferir facilmente seus genes de resistência. Os dois isolados, ID 103 e 53, seriam excelentes candidatos para testes futuros *in vivo* para a avaliação da patogenicidade.

A seleção de bactérias resistentes pode resultar em cepas mais virulentas, uma vez que a presença de resistência de uma bactéria patogênica pode levar a um atraso na administração da terapia antimicrobiana ou ser insuficiente para eliminá-las (COSGROVE, CARMELI, 2003).

O isolado de *S. Heidelberg* (ID 58) que mostrou a maior expressão gênica do *invA* (66,88) (Tabela 8, apêndice M) pode ser considerado o mais patogênico entre todos os isolados analisados, provavelmente por apresentar fatores de virulência que propiciam a colonização e ocorrência de diversos eventos que perturbam a fisiologia hospedeira, ocasionando o aparecimento de sinais e sintomas que irão definir um estado mais grave da doença. Além disso, o isolado ID 58 isolado do campo (swab de arrasto) mostrou expressão do gene blaCTX-M2 (8,41) (Tabela 8, apêndice M) tornando esta cepa um problema para saúde pública, uma vez que apresenta potencial para causar a doença e além disso, mostrou expressar a enzima responsável pela degradação das cefalosporinas, permitindo-se concluir que o tratamento desta bactéria com ceftiofur pode não ser efetivo. Por estas razões, são necessários novos estudos que permitam a avaliação do grau de patogenicidade *in vivo* da salmonelose decorrente da contaminação também por este isolado.

O fato dos isolados terem mostrado um perfil fenotípico de resistência mas não terem expressado a enzima blaCTX-M2 pode estar relacionado com a presença de outras β -lactamases também responsáveis pela resistência ao ceftiofur, como por exemplo a blaCMY-2 e blaTEM. A resistência das β -lactamases de espectro estendido mediada pelo gene blaCMY-2 é o principal mecanismo de resistência as cefalosporinas entre cepas de *Salmonella* entérica (BIEDENBACH, 2006; DUNNE, 2000). A resistência para os antibióticos β -lactâmicos, tais como o ceftriaxone está linearmente correlacionada com um aumento no nível de expressão desta enzima (WHICHARD et al., 2007).

Além de expressarem o gene invA, os ID 62 e 69 isolados de produtos cárneos, não mostraram nenhum nível de expressão do gene blaCTX-M2 (Tabela 8, apêndice M), entretanto os isolados mostraram altos níveis de resistência através do MIC (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O ID 62 mostrou o padrão de MDR D e o valor de IRMA foi 0,4. Já o ID 69 mostrou o padrão A e índice de 0,3.

Entre os isolados ID 52 e 79, observou-se a presença do gene invA (0,10 e 2,47, respectivamente) e do gene blaCTX-M2 (0,19 e 0,37, respectivamente) e ambos isolados apresentarão o padrão de MDR A e valor do IRMA foi 0,3. O ID 79 mostrou um MIC de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, portanto foi mais resistente ao ceftiofur frente ao MIC do que o ID 52 (MIC 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Entre os isolados provenientes de produtos cárneos, os isolados ID 54 e 70 (Tabela 8, apêndice M) mostraram os maiores níveis da expressão gênica da enzima blaCTX-M2, 74,84 e 15,48, respectivamente, concordando com o fenótipo observado, uma vez que altos níveis de resistência ao ceftiofur (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram detectados. A contaminação com estas bactérias poderia ter o tratamento prejudicado, uma vez que

além da presença do gene de resistência, o perfil fenotípico também mostrou que altas dosagens do antibiótico são necessárias para eliminar a bactéria, entretanto análises *in vivo* devem ser realizadas futuramente, para confirmar a relação da expressão da enzima blaCTX-M2 e da resistência ao ceftiofur, com possíveis falhas no tratamento da Salmonelose. Além disso, os isolados ID 54 e 70 podem ser chamados de superbactérias, uma vez que apresentam perfil de multirresistência, apresentando o padrão de MDR F e A, respectivamente. O ID 54 foi um dos três isolados que mostraram resistência a cinco, entre as dez drogas analisadas. Além disso, o ID 54 mostrou maior potencial de transferência de genes de resistência, uma vez que o valor do IRMA foi 0,5. Já o ID 70 mostrou IRMA de 0,3.

Este cenário ilustra a grande problemática da resistência aos antimicrobianos para saúde pública, pois todos os isolados foram provenientes de produtos cárneos, mostrando a facilidade de transmissão destas bactérias ao homem pelo consumo de produtos de origem avícola contaminados. Uma vez contaminado com uma bactéria produtora de ESBL resistente a antibióticos que são comumente utilizados para o tratamento de humanos, torna a terapia mais difícil e onerosa, sendo muitas vezes necessárias hospitalizações por períodos mais longos, pois é possível que a droga não seja suficiente para eliminá-la.

Cabe ressaltar que o maior problema destas superbactérias são os casos de complicações em pacientes suscetíveis, como o caso dos imunossuprimidos. A seleção de patógenos resistentes a antibióticos, como o ceftiofur que possuem o mesmo princípio ativo do ceftriaxone, enfatiza mais uma vez a importância do controle destes patógenos, pois estes podem ser considerados uma potencial fonte de bactérias resistentes que podem ser transmitidas para as bactérias

presentes nos seres vivos. E caso isso venha a ocorrer aumenta-se a possibilidade de falhas no tratamento da salmonelose em crianças.

Na figura 06 (apendice N) foi possível observar um pico de *melting* com uma anomalia chamada *shoulders* que literalmente significa “ombro” e é provavelmente consequência da inespecificidade do par de primers utilizado, uma vez que o tamanho ideal de produto de PCR gerados pelo qPCR é de 80 a 150 pb e não 486 pb, tamanho encontrado.

O ID 55 isolado do campo (swab de arrasto) além de ter o potencial para virulência (1,0), também mostrou expressão da enzima blaCTX-M2 (1,0), esta foi a amostra padrão utilizada para calibração do cálculo da expressão gênica uma vez que foi a amostra que mostrou menor resistência ao ceftiofur através do MIC (4 µg/mL). Além disso, este isolado de *S. Heidelberg* foi outro, dentre os três isolados, que apresentaram o padrão de MDR F. O valor do IRMA foi 0,5, mostrando mais uma vez a alta capacidade de transferência de genes de resistência do isolado.

A amostra ID 80, isolada de suabe de arrasto e a ID 91 isolado de aves mortas, expressão o gene *invA* (0,65 e 3,49, respectivamente), entretanto não expressarão o gene blaCTX-M2. Mesmo sem a expressão da enzima ambos isolados foram resistentes ao ceftiofur pelo MIC (64 µg/mL e 32 µg/mL) e ainda mostraram-se multirresistentes com valor do IRMA de 0,3 e padrão de MDR A, para ambos os isolados.

O ID 81, isolado do campo (suabe de arrasto) foi o único isolado que se mostrou resistente ao desinfetante B, a base de glutaraldeído. E além disso, este isolado também mostrou-se resistente ao ceftiofur pelo MIC (32 µg/mL) e concomitantemente expressou o gene blaCTX-M2 e *invA*. O isolado ainda mostrou o padrão de MDR A e capacidade de transferência de genes de resistência, com IRMA de 0,3.

Os ID 57, 77, 82 e 104, assim como ID 80, expressarão os genes, *invA* e *blaCTX-M2*, com a maior expressão do *blaCTX-M2* para ID 82 (5,08). E também mostraram IRMA de 0,3. Já quanto ao MDR, todos mostraram o padrão A, exceto ID 57 que foi o único isolado estudado que apresentou o padrão B. Concordando com genótipo de resistência, o ID 82, mostrou altos níveis de resistência a ceftiofur, com MIC de 64 µg/mL. Diferentes do observado para os ID 77 e 104 que tiveram MIC de 32 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente. O ID 57 mesmo tendo mostrado uma baixa expressão do gene *blaCTX-M2*, apresentou resistência ao ceftiofur com MIC de 64 µg/mL.

O isolado ID 56 isolado do campo (swab de arrasto) mostrou altos níveis de resistência ao ceftiofur (64 µg/mL) e concomitantemente mostrou os maiores níveis de expressão do gene *blaCTX-M2* (24,26) entre os isolados provenientes do campo (Tabela 8, apêndice M). O fato de ter sido isolado do campo a combinação do perfil fenótipo e genótipo de resistência ressalta a importância da utilização de antibióticos de forma criteriosa e com muita cautela, uma vez que o alto nível da expressão gênica da enzima pode ser consequência da pressão de seleção exercida do ceftiofur sobre a *S. Heidelberg*, já que o ceftiofur é utilizado para controle de salmonelose em animais de produção. Aliado a isto, o isolado ID 56 também mostrou-se multirresistente, uma vez que também mostrou padrão de MDR F e portanto também apresentou o IRMA de 0,5, o que indica a facilidade de transferência de genes de resistência.

Cabe destacar que todos os isolados de *S. Heidelberg* submetidos a técnica de qPCR para análise da expressão dos genes *invA* e *blaCTX-M2* foram isolados no ano de 2013 no estado do Paraná, exceto o ID 104 que foi isolado em 2012.

O desenvolvimento de resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas constitui um risco para a saúde pública, uma vez que pode afetar a eficácia do tratamento com medicamentos em seres humanos (CARDOSO et al., 2006).

O aumento da resistência as cefalosporinas de amplo espectro (ceftiofur e ceftriaxone) entre isolados de *Salmonella* spp é de interesse significativo para a saúde pública. Isto devido ao fato do ceftriaxone ser uma importante droga de eleição para o tratamento de crianças com a forma severa da salmonelose. Portanto, é possível aventar que o consumo de um produto de origem avícola contaminado com uma bactéria resistente ao ceftiofur ou até mesmo o contato com um animal que esteja contaminado com esta bactéria leve a resistência cruzada ao ceftriaxone.

Em função disso, o uso desse agente antimicrobiano em animais de produção está sob a crescente fiscalização, por ser um potencial agente responsável pela emergência e disseminação de resistência ao ceftriaxone em *Salmonella* spp e outros patógenos entéricos (FOLEY, LYNNE, 2007; DUTIL, 2010).

A análise dos isolados proveniente do campo e frigorífico, permite concluir que os isolados de frigorífico mostraram níveis bem mais elevados da enzima blaCTX-M2. Isso nos leva mais uma vez a grande problemática da resistência aos antimicrobianos para saúde pública, pois os isolados foram provenientes de produtos cárneos e do campo, mostrando a facilidade de transmissão destas bactérias ao homem pelo consumo de produtos de origem avícola contaminados ou até mesmo pelo contato com um animal contaminado.

É importante destacar a importância de medidas sanitárias e higiênicas tanto no sistema de saúde pública, como em sistema de produção de animais zootécnicos. Desta forma é

evidente a necessidade de um programa sanitário e biossegurança para prevenir a colonização e infecção em animais e médicos veterinários a fim de limitar a propagação da epidemia desta bactéria (BOND; LOEFFLER, 2012; FRYE, JACKSON, 2013).

4 CONCLUSÃO

É possível concluir que há a ocorrência de altos níveis de resistência nos isolados estudados, principalmente de *S. Heidelberg* frente à tetraciclina e de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* ao ácido nalidíxico. Em relação ao ceftiofur, de grande importância para a avicultura, este foi responsável por altos níveis de resistência nos isolados de *S. Heidelberg*. A *S. Typhimurium* mostrou altos níveis de resistência à gentamicina. O MIC comprovou a resistência dos isolados e mostrou que altas concentrações do ceftiofur são necessárias para eliminar a *S. Heidelberg*. Um único isolado de *S. Heidelberg* mostrou-se resistente ao desinfetante a base de glutaraldeído.

Todos os isolados estudados expressaram o gene *invA*, entretanto, observou-se uma variação onde tanto os isolados proveniente de frigorífico como os de campo, mostraram altos níveis de expressão do gene. Ao comparar os dois grupos biológicos, os isolados provenientes do campo mostraram maior expressão do *invA*. Já ao analisar a expressão do gene *blaCTX-M2* constatou-se que nem todos os isolados estudados expressaram o gene, o que poderia ser explicado pela presença de outras β -lactamases. Ao comparar os dois grupos biológicos foi possível constatar que os isolados provenientes do frigorífico mostraram maior expressão do gene *blaCTX-M2*.

Este cenário, onde isolados de *S. Heidelberg* mostram potencial patogênico e perfis de resistentes e multirresistência aos antibióticos, é um grande problema para a saúde pública uma vez que estas cepas também foram isoladas de produtos cárneos, facilitando a transmissão para cadeia alimentar humana através da contaminação cruzada entre os alimentos. Além disto, os altos níveis de resistência ao ceftiofur podem levar a resistência cruzada com ceftriaxone que é comumente

utilizado para tratamento de salmonelose em humanos, podendo tornar a terapia mais difícil e onerosa.

Este panorama ressalta a importância do uso com cautela dos antibióticos, uma vez que o alto nível da expressão gênica da enzima blaCTX-M2 pode ser consequência da pressão de seleção exercida do ceftiofur sobre a *S. Heidelberg*, já que o ceftiofur é utilizado para controle de salmonelose em animais de produção.

Os níveis de resistência antibacteriana encontrado neste estudo deixam claro que os antibióticos devem ser utilizados criteriosamente, sendo necessária muita cautela na hora de decidir qual o tratamento a ser adotado. Vale salientar a necessidade do monitoramento contínuo destes patógenos resistentes, tanto na indústria avícola, quanto nos hospitais e outros ambientes. Ainda pesquisas devem ser realizadas para melhor entender os mecanismos e os níveis de expressão destas β -lactamases para a busca de uma solução que mitigue a prevalência destas bactérias resistentes.

5 REFERÊNCIAS

5.1 REFERÊNCIAS DO ARTIGO

ANDREATTI FILHO, R. L. Prevenção de doenças: biosseguridade em avicultura. In: _____. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Roca, 2006. p. 2-8.

BACK, A. **Manual de Doenças de Aves**. Cascavel, 2002. 246p.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, G. H. Salmoneloses aviárias. In: ANDREATTI FILHO, R. L. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Roca, 2006. p. 84-111.

BIEDENBACH, D. J et al. Analysis of *Salmonella* spp with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, n. 54, p. 13–21, 2006.

BIFFI, C. P. et al. Phenotypic and Genotypic Resistance Profile of *Salmonella* Typhimurium to Antimicrobials Commonly Used in Poultry. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.16, n.2, p. 93-96, 2014.

BJORLAND, J. et al. Widespread Distribuição of Disinfectant Resistance Genes among Staphylococci of Bovine and Caprine Origin in Norway. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 9, p. 4363-4368, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Rótulos de ovos alertam para riscos à saúde. 2009. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Sala+de+Imprensa/Menu++Noticias+Anos>>. Acesso em: 17 maio 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007, Regulamento Técnico Para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana. Disponível em <<http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=25959>>. Acesso em: 16 setembro 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada. 8. ed., v.23, n.1, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa número 78. Programa Nacional de Sanidade Avícola, 2002. Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Manual%20de%20Legisla%C3%A7%C3%A3o%2020Sa%C3%BAde%20Animal%20-%20low.pdf>. Acesso em: 7 agosto 2014.

BRASIL. Portaria 101, de 17 de agosto de 1993. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. **Diário Oficial** [Da República Federativa do Brasil], Brasília, v.n.p. 11937-11945, 17 de agosto de 1993, Seção I, 1993.

BOND, R.; LOEFFLER, A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. **Journal of Small Animal Practice**, v.53, p.147-154, 2012.

BUSANI, L. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium, Enteritidis and Infantis from human infections, foodstuffs and farm animals in Italy. **Epidemiology and Infection**, v.132, p. 245–251, 2004.

CANTÓN, F. R; GONZÁLEZ-ALBA, J. M; GALÁN, J. C. CTX-M enzymes: origin and diffusion. **Frontiers em Microbiology**, v.3, n. 110, p. 1-19, 2012.

CARDOSO, M. O. et al. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, Porto Alegre, v.37, p. 368-371, 2006.

CHEN, S et al. Characterization of Meats *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Multiple-Antimicrobial-Resistant. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 70, v. 1, p. 1-7, 2004.

CHU, C; CHIU, C. H. Evolution of the virulence plasmids of non-typhoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance. **Microbes and Infection**. n. 8, v. 7, p. 1931-1936, 2006.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Norma M31-A3. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals**; Approved Standard. 3. ed., 2008.

CORTEZ, A. L. L. et al. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp isoladas de abatedouros de aves. **Instituto Biológico**, São Paulo. v.73, p.157-163, 2006.

DELAIRE, M. et al. Site-directed mutagenesis at the active site of *Escherichia coli* TEM-1 beta-lactamase. Suicide inhibitor-resistant mutants reveal the role of arginine 244 and methionine 69 in catalysis. **Journal Biological Chemistry**, v. 267, n. 29, p. 20600-20606, 1992.

DUARTE, D. A. M. et al. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, Recife. v.40, p.569-573, 2009.

DUNNE, E. F et al. Emergence of domestically acquired ceftriaxone resistant *Salmonella* infections associated with AmpC β -lactamase. **Journal of the American Medical Association**, n. 284, p.3151–3156, 2000.

FLUIT, A. C. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 43, p. 1–11. 2005.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 173-187, 2013, 2007.

FRYE, J. G.; 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. Isolated from U.S. food animals. **Frontiers Microbiology**, v. 4, n. 135, p. 1-22, 2013.

GALÁN, J.E., CURTISS, R. Distribution of the *invA*,-B,-C, and-D genes of *Salmonella* Typhimurium among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella* Typhi are deficient for entry into mammalian cells. **Infection and Immunity**, n. 59, v. 9, p. 2901-2908, 1991.

GAST, R. K. *Salmonella* infections. In: GYLES, C.L. et al. **Diseases of Poultry**. 10 ed. Iowa: Iowa State University Press, 1997. p. 81-129.

GUERRA B et al. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrugresistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. **Microbial Drug Resistance**, n. 10, p. 83–91, 2004.

HAKANEN, A. J. et al. New Quinolone Resistance Phenomenon in *Salmonella enterica*: Nalidixic Acid-Susceptible Isolates with Reduced Fluoroquinolone Susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 11, p. 5775-5778, 2006.

HOHMANN, E. L. Nontyphoidal salmonellosis. **Clinical Infectious Diseases**, n. 32, p. 263–269, 2001.

KICH J.D. et al. Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, n 32, p. 33-39, 2004.

KREWER, A. C. Suscetibilidade a desinfetantes e perfil de resistência a antimicrobianos em isolas de *Escherichia coli*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.11, p. 1116-1120, 2012.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 46, v. 1, 165-170, 1983.

MAJIDUDDIN, F. K.; PALZKILL, T. Amino acid residues that contribute to substrate specificity of class A betalactamase SME-1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3421-3427, 2005.

MALORNY, B; CHROETER, A; HELMUTH, R. Incidence of Quinolone Resistance Over the Period 1986 to 1998 in Veterinary *Salmonella* Isolates from Germany **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 9, p. 2278–2282, 1999.

MEDEIROS, L. M. **Estudo sobre cepas de *Salmonella* enterica sorovar Typhimurium resistentes a antimicrobianos isoladas de diferentes fontes da cadeia alimentar no Brasil**. 2006. 127p. Dissertação (Pós Graduação-Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

MEDEIROS, M. A. N et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Publica**. v. 30, n. 6, 2011.

NUNES, I. A. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Enteritidis strains from different sources. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 166-173, 2009.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, Minas Gerais, v. 10, n.1, p. 189-197. 2008.

PALMEIRA, A. L. B. **Prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos dos sorovares de *Salmonella* sp. isolados das carcaças de frango e peru na Região Sul do Brasil no período de 2004 a 2006**. 2007. 62p. Dissertação (Pós Graduação- em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

PAIXAO L. et al. Fluorometric determination of ethidium bromide eflux kinetics in *Escherichia coli*. **Journal of Biomedical Engineering**. v. 3, p. 3-18, 2009.

RAHN, K et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, n. 6, p. 271-279, 1992.

RIBEIRO, A. R. et al. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frango de corte e matrizes pesadas, **Arquivo**

Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Porto Alegre, v. 60, n. 5, p. 1259-1262, 2008.

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**, São Paulo, v. 42, 2011.

RODRIGUEZ-LAZARO, D. M et al. A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. **Journal of Microbiological Methods**, n. 54, p.381–390, 2003.

RUIZ, J. D. et al. Susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Salmonella* spp. en granjas de ponedoras comerciales del departamento de Antioquia. **Revista Colombiana de Pesquisas Pecuárias**, Medellín, v.19, n.3, p 297-305, 2006.

SEYFARTH, A. M; WEGENER, H. C.; FRIMODT-MOLLER, N. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Typhimurium from humans and production animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 40, p.67-75, 1997.

SHARMA, V. K.; DEAN-NYSTROM, E. A.; CASEY, T. A. Semi-automated fluorogenic PCR assays (TacMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxicogenic *E. coli*. **Molecular and Cellular Probes**, n. 13, p. 291–302, 1999.

SINGH, J.; BATISH, V.K.; GROVER, S. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in dairy products using real time PCR-melt curve analysis.

Journal of Food Science and Technology, n. 49, v. 2, 234-239, 2012.

SILBERGELD, E.; GRAHAM, J.; PRICE, L. B. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. **Annual Review of Public Health**, Baltimore, v. 29, p. 15-169. 2008.

SINGH, P., MUSTAPHA, A. Multiplex TaqMan_ detection of pathogenic and multi-drug resistant *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, n. 166, p. 213-18, 2013.

SOLA, M. C et al. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.8, n.14, p. 1398 – 2012.

SUNDHEIM, G., HAGTVEDT, T., DAINTY, R. Resistance of meat associated staphylococci to a quaternary ammonium compound. **Food Microbiology**, n. 9, p. 161–167, 1992.

TORTORA, G. et al. Doenças microbianas do Sistema Digestório. In: TORTORA, G. et al. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 705-742.

União Brasileira de Avicultura (UBABEF). Relatório Anual 2013/2014. São Paulo. UBABEF, 55p.

VARMA, J. K et al. Highly resistant *Salmonella* Newport-MDRampC transmitted through the domestic US food supply: a FoodNet case-control study of sporadic *Salmonella* Newport infections, 2002-2003. **Journal of Infectious Diseases**, n. 194, p. 222–230, 2006.

VAZ, C. S. L. et al. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 89, p. 1530-1536, 2010.

ZHAO, S. Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg Isolates from Retail Meats, Including Poultry from 2002 to 2006. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6656–6662, 2008.

WEBSTER, C. R. L. Antibióticos: Inibem a Síntese da Parede Celular, Interferem no metabolismo do DNA e Inibem a Síntese Protéica. In: WEBSTER, C. R. L. et al. **Farmacologia Clínica**. São Paulo: Rocca, p. 75-81, 2005.

WHICHARD, J. M et al. β -Lactam resistance and *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, n. 11, p. 1464–1466, 2005.

WHICHARD, J. M et al. Human *Salmonella* and concurrent decreased susceptibility to quinolones and extended-spectrum cephalosporins. **Emerging Infectious Diseases**, n. 13, p. 1681–1688, 2007.

5.2 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et.al. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1584p.

ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antimicrobianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 79-84.

ANDRADE, N. J, PINTO, C. L, ROSADO, M. S. Higiene na Indústria de Alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. *In:_____*. **Controle da higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela; 2008. p. 181-226.

AUTO, H. F; CONSTANT, J. M. C; CONSTANT, A. B. L. **Antibióticos e Quimioterápicos**. 5. ed. Maceió: EDUFAL, 2008.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. Agentes antimicrobianos. In: BARBOSA, H. R.; TORRES, B.B. **Microbiologia Básica**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 157-173.

BARROS, E. et al. **Antimicrobianos: consulta rápida**. 4.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2008.

BAS, A. et al. Utility of the Housekeeping Genes 18SrRNA, b-Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, p. 566–573, 2004.

BELLAVER, C. O uso de microingredientes (aditivos) na formulação de dietas para suínos e suas implicações na produção e na segurança alimentar. In: Congresso Mercosur de Producción Porcina, 2000, Buenos Aires. **Anais...** Buenos Aires: Embrapa CNPSA, 2000.

BELTRAME C. A. 2009. **Avaliação da eficiência de sanitizantes utilizados pelas indústrias de alimentos.** Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS. 78p.

BERTRAND, S et al. Clonal emergence of extended-spectrum b-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella* enterica serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). **Journal of Clinical Microbiology**, n. 44, p. 2897–2903, 2006.

BINNECK, E. As ômicas: integrando a bioinformação. **Biociência**, v. 32, p. 28-37, 2004.

BLUM, G. M. et al. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. **Infection and Immunity**. v.62, p.606–614, 1994.

BRAGA, S. M. S.; FURTADO, V. C. S; FURLAN, C. M. Avaliação *in vitro* da eficácia bactericida de desinfetantes de uso geral frente a amostras de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Científica da FEPI**, Itajubá, v.3 n.3, 2010.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169-193, 2000.

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 15, p. 155-166, 2004.

CARVALHO, F. C. T et al. Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de fazendas de carcinoculturas no estado do Ceará. **Revista de Ciências Agronômicas**, v. 40, n. 4, p. 549-555, 2009.

CDC: CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **What is Salmonellosis?**, 2012. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/Salmonella /general/](http://www.cdc.gov/Salmonella/general/)>. Acesso em: 21 março 2013.

COSGROVE, S. E; CARMELI, Y. The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. **Antimicrobial Resistance**, v. 36, p. 1433-1437, dez/jun. 2003.

DE ROBERTS, E. M. F.; HIB, J.; PONZIO, R. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2003. 413p.

DUTIL, L. Cefitofur Resistance in *Salmonella* enterica Serovar Heidelberg from Chicken Meat and Humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, Canada, v. 16, n. 1, p. 48-54, 2010.

EAVES, D. J. 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*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.48, n.10, p. 4012-4015, 2004.

ESCRIBANO, I. et al. The importance of active efflux systems in the quinolone resistance of clinical isolates of *Salmonella* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 428-432, 2004.

FAHRENKRUG, S. C. et al. Porcine gene discovery normalized cDNA-library sequencing and EST cluster assembly. **Mammalian Genome**, v. 13, p. 475-478, 2002.

FERREIRA, H. C. O desafio da limpeza e desinfecção de galpões na avicultura. In: Simpósio sobre bem estar de frangos e perus. **Anais...** Campinas: Facta, 2008. p. 199-204.

FONSECA, E. L; VICENTE, A. C. P. Caracterização funcional de promotores específicos de cassetes gênicos em integrons classe 1. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 56, 2010, Guarujá, SP. **Anais eletrônico...** Disponível em: <<http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs2010/GM037-33797.pdf>> Acesso em: 17 maio 2012.

FRYE, J. G; JACKSON, C. R. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. Isolated from U.S. food animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 135, 2013. p. 1-22.

GILBERT P.; MCBAIN A. J. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, n 16, p. 189-208, 2003.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. 393p.

GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24(1), p. 22-6, 2008.

GREZZI G. Limpeza e desinfecção na avicultura. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2007, Campinas, SP. **Anais...**Campinas, SP: FACTA, 2007. p.161-182.

GUERREIRO, M. et al. **Bacteriologia especial: com interesse em saúde pública e saúde animal**. Porto Alegre: Sulina, 1984. p.51-66.

GUIMARÃES, M. A. et al. Disinfectant and antibiotic activities: a comparative analysis in Brazilian hospital bacterial isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v.31, p. 193-199, 2000.

HARRISON, J. J. et al, Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas Aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 52, p.2870-2881, 2008.

HASMAN, H et al. Beta-lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 56, p. 115–121, 2005.

HENSEL, M. et al. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. **Science**. v.269, p.400–403, 1995.

HOCQUETTE, J. F. Where are we in genomics? **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 37-70, 2005.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations. **Genes and Immunity**, v. 6, n. 4, p.1-6, 2005.

JACOBY, G. A. AmpC β -lactamases. **Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 22, n. 1, p. 161-182, 2009.

JAENISCH, F. R. F. et al. **Importância da higienização na produção avícola**. Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 363, Concórdia, SC. 2004.

JAENISCH, F. R. F. **Procedimentos de biossegurança na criação de frangos no sistema agroecológico**. Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 248, Concórdia, SC. 2000.

JOHNSON, J.R. et al. Antimicrobial Drug-Resistant *Escherichia coli* from Humans and Poultry Products, Minnesota and Wisconsin, 2002–2004. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, 2007.

KANASHIRO, A. et al. Serovars of *Salmonella* spp isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 7(3), 2005.

LANGSRUD, S.; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A. L. Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers. **Journal of Applied Microbiology**, n° 96, p. 201-208, 2004.

LÁZARO, N. S. et al. Gênero **Salmonella: Características epidemiológicas e laboratoriais**. Instituto Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), p.01-67, 2008.

LAUTENBACH, E. et al. Longitudinal trends in fluoroquinolone resistance among Enterobacteriaceae isolates from inpatients and outpatients, 1989-2000: differences in the emergence and epidemiology of resistance across organisms. **Clinical Infectious Diseases**, Filadelfia, v. 38, p. 655-662, jun/out. 2004.

LEUTENEGGER, C.M. et al. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan® polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, p.275-287, 2000.

LIBBY, S. J. et al. Salmonella. In: GYLES, C. L et al. **Pathogenesis of Bacterial Infection in Animals**. 3. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2004. p.143-160.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Instrução Normativa número 26. 2009. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 17 agosto 2013.

MADIGAN, M. T et al. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARCUS, S. L et al. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**. n. 2, v. 2, p. 145-156, 2000.

MOLBAK, K. et al. Increasing Quinolone Resistance in *Salmonella* enterica Serotype Enteritidis. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 5, p. 555-560, 2002.

MCDONNELL, G.; RUSSEL, D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 147-179, 1999.

NASCIMENTO, V. P. et al. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Porto Alegre, v. 60, n. 5, p. 1259-1262, out/ago. 2008.

NASCIMENTO, V. P. et al. *Salmonella* em produtos avícolas: desafios em seguridade alimentar y exigências para el comércio internacional. In: Seminário Internacional sobre Salmonelose Aviária, 2011, Rio de Janeiro. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2011.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 6, p. 321-331, Jun. 2002.

OCHMAN, H et al. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, n. 93, v. 15, p. 7800-7804, 1996.

OLIVEIRA, V. L. S.; CAETANO, R. M.; GOMES, F. C. O. Avaliação da qualidade de saneantes clandestinos comercializados em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista de Ciências Farmacêuticas - Básica e Aplicada**, Minas Gerais, v. 33, n.4, p.577-582, 2012.

PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9 e45, 2001.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

ROSTAGNO, H. S. et al. Utilização de probióticos e prebiótico em aves. In: FERREIRA, C. L. F. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa: UFV, p. 181-201, 2003.

RUSSEL, A. D. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction. **Journal of Applied Microbiology**. Symposium Supplement 92, 1S–3S, 2002.

SANTANA, E. S. et al. **Uso de antibióticos e quimioterápicos na avicultura**. Centro Científico Conhecer. 2011. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/>

2011a/agrarias/uso%20de%20antibioticos.pdf>. Acesso em: 12 março. 2013.

SAN MARTIN, B. et al. Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp from poultry farms. **Veterinary Microbiology**, v.110, n. 3-4, p. 239-244, 2005.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 20, n. 46, p. 69-81, 2000.

SCHWARZ, S. et al. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.l.], v.17, p. 431-437, 2001.

SHIRAKI Y, et al. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, **Emerging Infectious Disease**, n. 10, p. 69-75, 2004.

SJÖLUND-KARLSSON, M et al. Salmonella isolates with decreased susceptibility to extended-spectrum cephalosporins in the United States. **Foodborne Pathogens and Disease**, n. 7, v. 12, p. 1503-1509, 2010.

SMITH, R. L. et al. Magnesium transport in *Salmonella* Typhimurium: regulation of mgtA and mgtCB during invasion of epithelial and macrophage cells. **Microbiology**, v. 144, p. 1835-1843, 1998.

SPINOSA, H. S. et al. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**. v. 119, n. 6, p. 3-10, 2006.

TERZOLO, H. R. **Estudio bacteriológico de las salmonelosis de las aves (*S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*) en América Latina**. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária (INTA), Área de Producción Animal. Balcarce, Argentina, 2010.

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

WELKER, C. A. D. et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

WHO - World Health Organization. **WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe**. 6. ed. Geneva: World Health Organization, 1992.

WONG, K. K. et al. Identification and sequence analysis of a 27-kilobasechromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Infection and Immunity**. v. 66, p. 3365-3371, 1998.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Bio Techniques*, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005.

ZAHA, A. **Biología molecular básica**. 3 ed. Porto Alegre: Mercado aberto, 2003.424p.

APÊNDICE A

Tabela 1 - Número de amostras de *Salmonella* spp. de acordo com a origem.

CAMPO	
	forro de caixa 2
	suabe de arrasto 74
	mêconio 2
	fezes de aves 1
	ovos bicados de aves 2
	saco da gema 8
Incubatórios	penugem 1
	papel ração 1
Fábricas de ração	farinha 1
	aves mortas 6
	ceco 2
	baço 1
	intestino 3
	papo 1
Órgãos de aves necropsiadas	bursa 1
Cultura	- 26
	Total campo 132
FRIGORÍFICO	
	fígado/coração 1
	pescoço 1
	produtos cárneos 24
	asa 1
	cms 1
	carcaça 1
Produtos de origem avícola	drumet 1
	Total frigorífico 30
TOTAL	162

Fonte: o autor.

APÊNDICE B

Tabela 2 - Composição química dos desinfetantes avaliados.

Produto	Princípio ativo e concentração
Desinfetante A	Cloreto de alquil dimetil benzil amônio 100% Polietilenonilfenileter
Desinfetante B	Glutaraldeído 100% Cloreto de alquil dimetil benzil amônio
Desinfetante C	Hipoclorito de sódio 2%

Fonte: o autor

Tabela 3 - Características dos desinfetantes testados.

Produto	Data de fabricação	Data de validade
Desinfetante A	abr/14	abr/17
Desinfetante B	jun/14	jun/16
Desinfetante C	jun/14	dez/14

Fonte: o autor.

APÊNDICE C

Tabela 4 - Relação dos genes estudados, sequências iniciadoras (primers), tamanho do segmento alvo (pb), concentração utilizada para amplificá-los, número de acesso no Gene Bank e referência.

gene estudado	primer	tamanho fragmento (pb)	concentração primers (µM)	nº de acesso no Gene Bank	referência
invA	<u>F GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA</u>	284	0,15	U43239	Rahn et al., 1992.
	<u>R TCATCGCACCGTCAAAGGAAC</u>				
16S RNAr	<u>F CAGAAGAAGCACCCGGCTAACTC</u>	87	0,3	X80681	Botteldoorn et al, 2006.
	<u>R GCGCTTTACGCCAGTAATT</u>				
blaCTX-M-2	<u>F GGCGTTGCGCTGATTAACAC</u>	486	0,1	X92507	Chen et al, 2004.
	<u>R TTGCCCTTAAGCCACGTCAC</u>				

Fonte: o autor.

Apêndice D

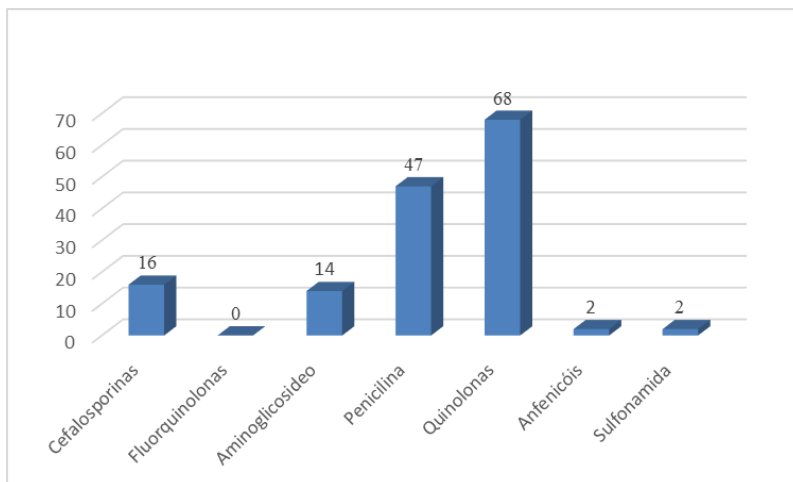
Tabela 5 - Perfil de resistência no teste de disco-difusão de cepas de *S. Heidelberg* (SH), *S. Enteritidis* (SE) e *S. Typhimurium* (ST) de origem avícola, isoladas a partir de amostras de campo e frigoríficos.

Antibióticos	Campo e Frigorífico			Campo			Frigorífico		
	SH (%)	ST (%)	SE (%)	SH (%)	ST (%)	SE (%)	SH (%)	ST (%)	SE (%)
ceftiofur	17/54 (31,5)	1/54 (1,9)	2/54 (3,7)	10/36 (27,8)	1/53 (1,9)	2/43 (4,7)	7/18 (38,9)	0/1	0/11
gentamicina	4/54 (7,4)	17/54 (31,5)	2/54 (3,7)	3/36 (8,3)	17/53 (32)	2/43 (4,7)	1/18 (5,6)	0/1	0/11
enrofloxacina	0/54	0/54	0/54	0/36	0/53	0/43	0/18	0/1	0/11
ciprofloxacina	0/54	0/54	0/54	0/36	0/53	0/43	0/18	0/1	0/11
ceftriaxone	5/54 (9,3)	0/54	2/54 (3,7)	3/36 (8,3)	0/53	2/43 (4,7)	2/18 (11,1)	0/1	0/11
ácido nalidíxico	36/54 (66,7)	37/54 (68,5)	37/54 (68,5)	36/36 (100)	36/53 (67,9)	37/43 (86)	0/18	1/1 (100)	0/11
cloranfenicol	0/54	0/54	1/54 (1,9)	0/36	0/53	0/43	0/18	0/1	1/11 (9,1)
sulfá-trimetropim	0/54	0/54	1/54 (1,9)	0/36	0/53	1/43 (2,3)	0/18	0/1	0/11
tetraciclina	35/54 (64,8)	34/54 (63)	7/54 (13)	35/36 (97,2)	33/53 (62,3)	6/43 (14)	0/18	1/1 (100)	1/11 (9,1)
norfloxacina	0/54	0/54	0/54	0/36	0/53	0/43	0/18	0/1	0/11
Média Geral (%)	18	16,9	9,6	24,2	16,8	11,6	5,6	20	1,8

Fonte: o autor.

Apêndice E

Figura 1 - Percentual de isolados de *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* resistentes (eixo Y) em relação à classe de antimicrobianos (eixo X).



Fonte: o autor.

Apêndice F

Tabela 6 - Isolados de *S. Heidelberg* (SH), *S. Enteritidis* (SE) e *S. Typhimurium* (ST) de origem avícola resistentes a nenhum, um, dois, três ou mais antibióticos (atbs).

	Total	nenhum atb		1 atb		2 atbs		≥ 3 atbs	
	n°	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
SE	54	5	9,3	42	77,8	3	5,6	4	7,4
ST	54	14	25,9	6	11,1	19	35,2	15	27,8
SH	54	0	0,0	0	0,0	36	66,7	14	33,3
Total	162	19	11,7	48	29,6	58	35,8	33	20,4

Fonte: o autor.

APÊNDICE G

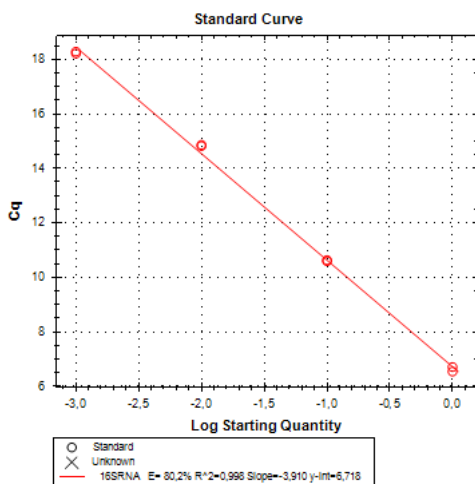
Tabela 7 - Padrão de Múltipla Resistência a Drogas (MDR) e o Índice de Resistência Múltipla aos Antibióticos (IRMA) de isolados de *S. Heidelberg* (SH), *S. Enteritidis* (SE) e *S. Typhimurium* (ST) de origem avícola frente aos antimicrobianos estudados.

Isolado	Padrão de MDR	ID do Padrão	IRMA	Total (n°)	Percentual (%)
SH	Ceftiofur-Ácido nalidíxico-Tetraciclina	A	0,3	12	7
SH	Ceftiofur-Ceftriaxone-Ácido nalidíxico	B	0,3	1	1
SH (1), SE (2), ST (14)	Gentamicina-Ácido nalidíxico-Tetraciclina	C	0,3	17	10
SH (1), SE (1)	Ceftiofur-Ceftriaxone-Ácido nalidíxico-Tetraciclina	D	0,4	2	1
ST	Ceftiofur-Gentamicina-Ácido nalidíxico-Tetraciclina	E	0,4	1	1
SH (3), SE (1)	Ceftiofur-Gentamicina-Ceftriaxone-Ácido nalidíxico-Tetraciclina	F	0,5	4	2
Total de isolados multirresistentes				37	23

Fonte: o autor.

APÊNDICE H

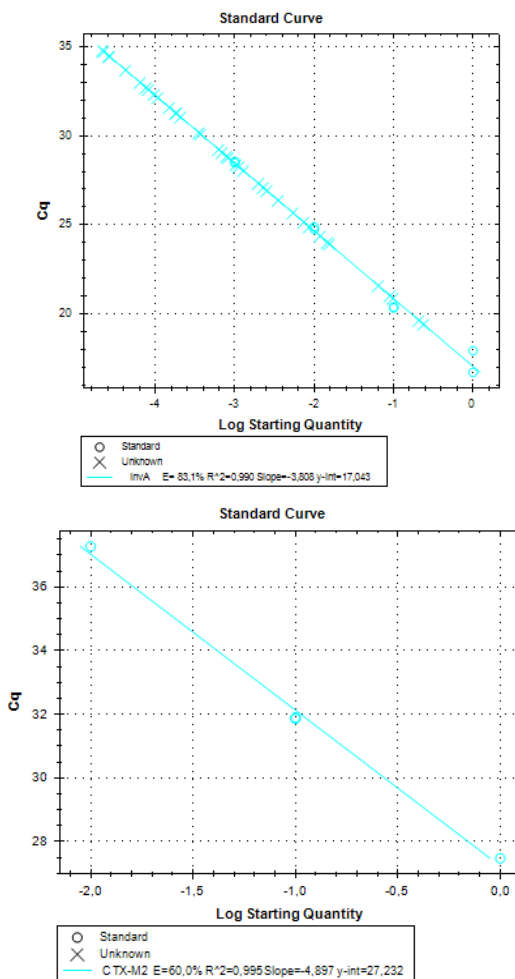
Figura 2 - Calibração da curva padrão gerada a partir do mRNA extraído de isolado de *S. Heidelberg* para o gene 16SRNA, utilizado como referência.



Fonte: o autor.

APÊNDICE I

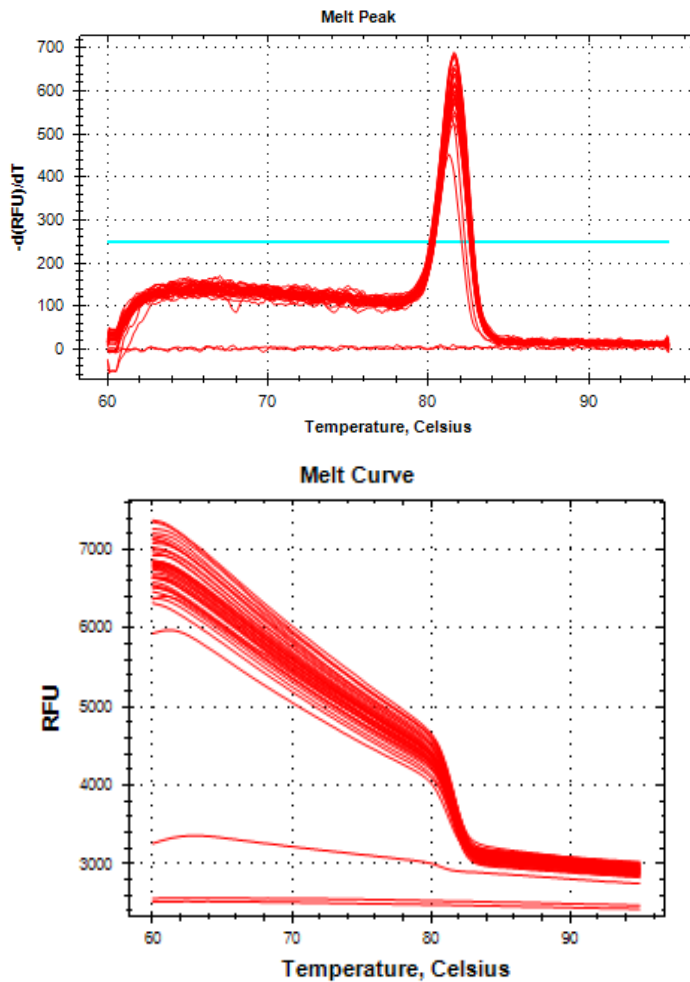
Figura 3 - Calibração da curva padrão gerada a partir do mRNA extraído de isolado de *S. Heidelberg* para o gene *invA* e *blaCTX-M2*.



Fonte: o autor.

APÊNDICE J

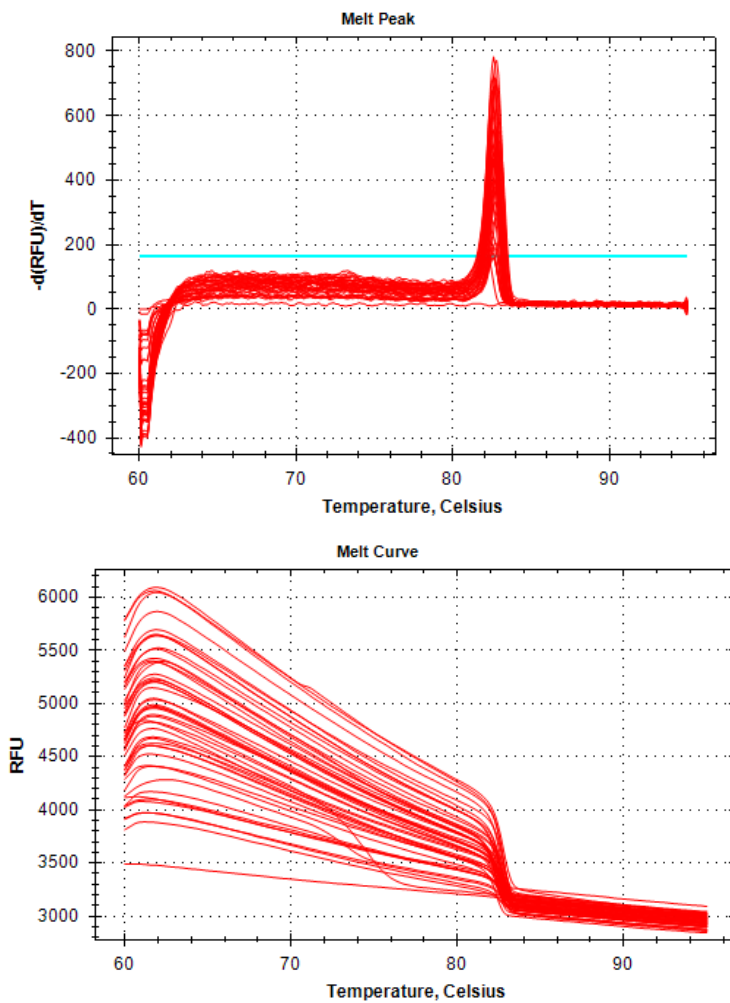
Figura 4 - Curva e temperatura de melting do gene 16SRNA utilizado como referência endógena.



Fonte: autor.

APÊNDICE K

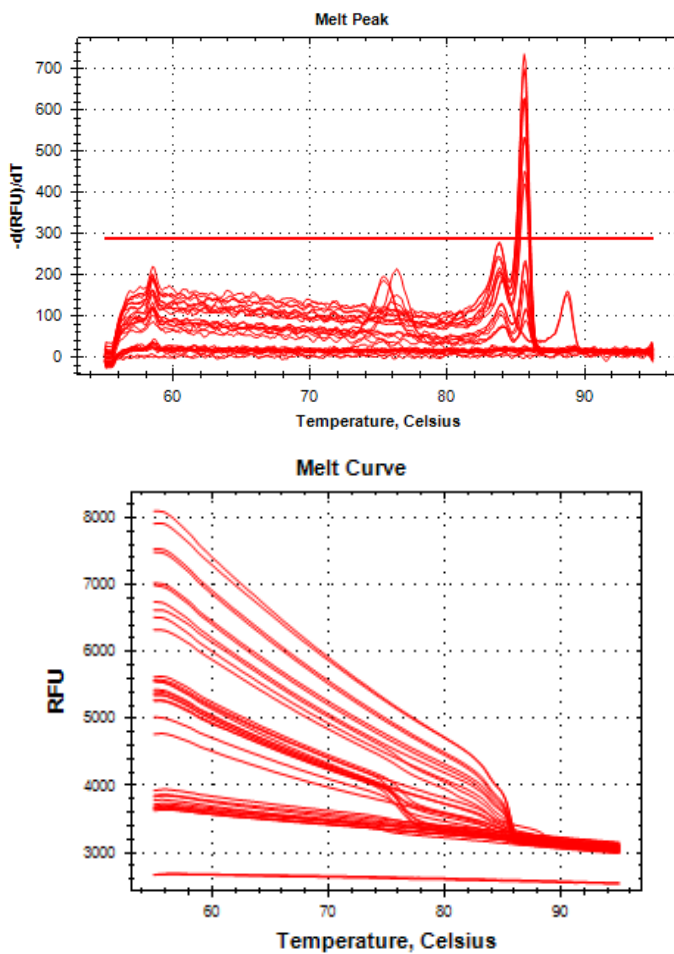
Figura 5 - Curva e temperatura de melting do gene invA.



Fonte: o autor.

APÊNDICE L

Figura 6 - Curva e temperatura de melting do gene blaCTX-M2.



Fonte: o autor.

APÊNDICE M

Tabela 8 - Identificação (ID) dos isolados de *S. Heidelberg*, local de origem (frigorífico e campo), e valores do Cq médio e da expressão gênica para o invA e blaCTX-M2.

ID	Origem	invA		blaCTX-M2	
		Expressão gênica	Cq médio	Expressão gênica	Cq médio
Frigorífico					
52	produtos cárneos	0,10	31,16	0,191	31,39
53	produtos cárneos	3,42	23,97	0,000	33,15
54	produtos cárneos	0,41	27,01	74,842	24,37
62	produtos cárneos	0,08	32,00	0,000	30,09
69	produtos cárneos	0,02	30,59	0,000	31,66
70	produtos cárneos	0,01	33,15	15,487	27,03
79	produtos cárneos	2,47	25,28	0,374	33,1
Campo					
55*	suabe de arrasto	1,00	24,10	1,00	29,35
56	suabe de arrasto	0,01	30,28	24,26	23,9
57	suabe de arrasto	0,01	34,48	0,36	33,3
58	suabe de arrasto	66,88	20,26	8,41	28,99
77	suabe de arrasto	0,73	24,76	0,05	33,79
80	suabe de arrasto	0,65	28,16	0,00	39,91
81	suabe de arrasto	1,36	26,86	0,15	31,81
82	suabe de arrasto	0,04	34,77	5,08	31,67
91	aves mortas	3,49	29,15	0,00	39,49
103	suabe de arrasto	48,10	21,30	1,21	32,22
104**	suabe de arrasto	0,24	30,15	0,55	33,41
Média		7,17	28,19	7,33	31,59
Desvio Padrão		18,10	4,18	17,58	4,04
Coefficiente Variação		2,53	0,15	2,40	0,13

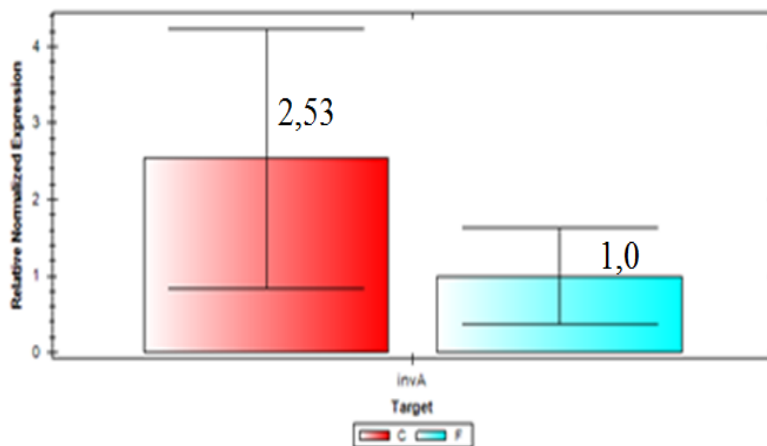
*Amostra padrão para calibração da expressão gênica.

** Todos as amostras foram isoladas no ano de 2013 no estado do Paraná, exceto ID 104 que foi isolado em 2012.

Fonte: o autor.

APÊNDICE N

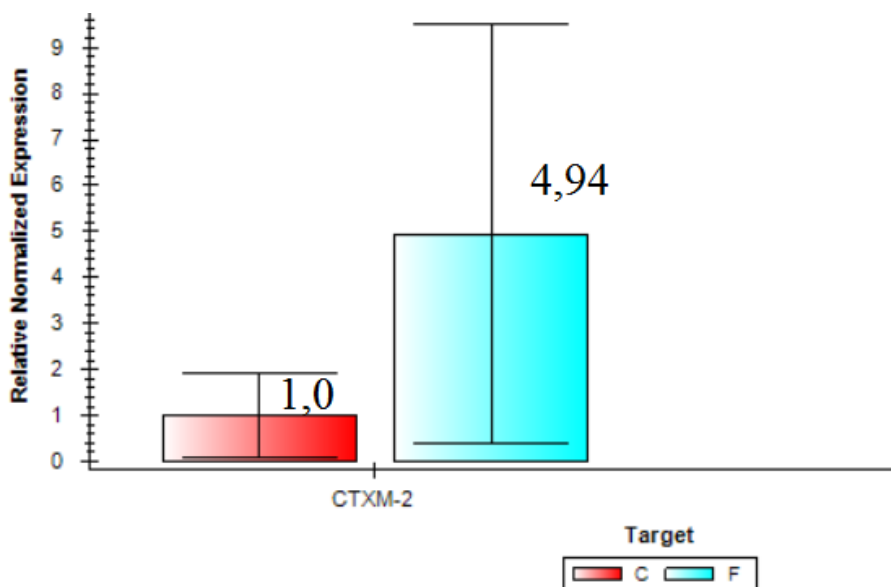
Figura 7 - Expressão gênica relativa normalizada para o gene *invA* de isolados de *S. Heidelberg* conforme o grupo biológico que variou conforme o local de isolamento da bactéria, sendo C (campo) e F (frigorífico).



Fonte: o autor.

APÊNDICE O

Figura 8 - Expressão gênica relativa normalizada para o gene blaCTX-M2 de isolados de *S. Heidelberg* conforme o grupo biológico que variou conforme o local de isolamento da bactéria, sendo C (campo) e F (frigorífico).



Fonte: o autor.