

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**CLAUDIA PIES BIFFI**

**PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE ISOLADOS DE *Salmonella* Enteritidis E  
*Salmonella* Typhimurium DE ORIGEM AVÍCOLA FRENTE AOS  
ANTIMICROBIANOS CEFTIOFUR, GENTAMICINA E ENROFLOXACINA**

**LAGES, SC**

**2012**

**CLAUDIA PIES BIFFI**

**PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE ISOLADOS DE *Salmonella* Enteritidis E  
*Salmonella* Typhimurium DE ORIGEM AVÍCOLA FRENTE AOS  
ANTIMICROBIANOS CEFTIOFUR, GENTAMICINA E ENROFLOXACINA**

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.

Orientadora: Prof. PhD. Lenita Moura Stefani

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Miletto

**LAGES, SC**

**2012**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária  
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região  
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Biffi, Claudia Pies

Perfil fenotípico e genotípico de isolados de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium de origem avícola frente aos antimicrobianos ceftiofur, gentamicina e enrofloxacin. / Claudia Pies Biffi; orientadora: Lenita Moura Stefani. – Lages, 2012. 66f.

Inclui referências.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias / UDESC.

1. Antimicrobiano. 2. Genes de Resistência. 3. Salmonella .  
4. Saúde Pública. I. Título.

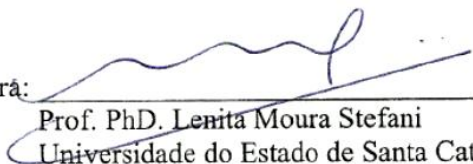
CDD – 636.50896

CLAUDIA PIES BIFFI

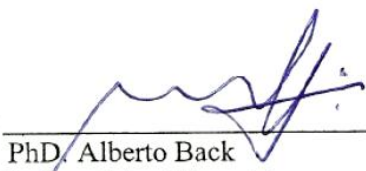
**PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE ISOLADOS DE *Salmonella* Enteritidis E  
*Salmonella* Typhimurium DE ORIGEM AVÍCOLA FRENTE AOS  
ANTIMICROBIANOS CEFTIOFUR, GENTAMICINA E ENROFLOXACINA**

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.

**Banca Examinadora:**

Orientadora:   
Prof. PhD. Lenita Moura Stefani  
Universidade do Estado de Santa Catarina - CEO/UDESC

Co-Orientador:   
Prof. Dr. Luiz Claudio Miletto  
Universidade do Estado de Santa Catarina - CAV/UDESC

Membro:   
PhD. Alberto Back  
Laboratórios Mercolab

Membro:   
Prof. Dra. Eliana Knackfuss Vaz  
Universidade do Estado de Santa Catarina - CAV/UDESC

Lages, SC, 21 de agosto de 2012.

*Amor incondicional. À minha família, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram fundamentais para a realização desse projeto.

Agradeço primeiramente ao nosso bom Deus, que me deu força para mais esta jornada e por ter permitido a realização de um sonho.

Aos meus pais, Antonio e Eleni e meus irmãos Ana Paula e Luiz Antonio, por serem exemplo de amor, dedicação e solidariedade, agradeço por ter essa família maravilhosa.

Ao amor da minha vida, Leonardo, pelo carinho, compreensão, companheirismo e toda ajuda dispensada para a elaboração desse trabalho.

À minha orientadora, Lenita, pelo apoio, amizade e ensinamentos repassados nessa caminhada, obrigada por tudo.

Aos meus queridos professores Eliana Vaz e Luiz Claudio Miletti, a ajuda e os ensinamentos repassados por vocês foram fundamentais para que esse projeto fosse realizado.

Ao laboratório Mercolab, pelo fornecimento das amostras e por ter me proporcionado imenso aprendizado ao permitir que acompanhasse suas atividades de rotina.

Aos laboratórios FIOCRUZ e de Protozoologia da UFSC pela sorotipagem e sequenciamento das amostras.

Aos professores Glaucia Amorim e Marcos Cordeiro pela ajuda na análise estatística.

A todos os mestres que contribuem continuamente para o meu aprendizado.

Aos estagiários dos laboratórios CEDIMA e Hemoparasitas e Vetores, do CAV, por toda a ajuda dispensada na análise das amostras. Em especial as minhas “professoras” de biologia molecular Cícera e Mariana, vocês foram muito importantes para o meu aprendizado, obrigada pela bela amizade que construímos.

À minha fiel companheira e amiga Cecília, o que teria sido de mim sem a sua preciosa ajuda, você é muito especial.

Ao meu colega João Zuffo pela ajuda e disponibilidade de materiais necessários para a realização das análises, muito obrigada.

Aos meus grandes e velhos amigos Daniela, Valquer, Ana, Cristina, Soraia e Debóra, que mesmo estando distantes sempre torcemos uns pelos outros, amizade como a nossa é eterna.

Às minhas amigas Fernanda, Franciane, Patrícia, Tiffany, Juliana e ao amigo Rodrigo, obrigada por fazerem parte desta jornada.

A Todos que contribuíram de uma forma ou outra, muito obrigada!

## RESUMO

As salmoneloses são responsáveis por significativas perdas econômicas na avicultura e por sérios danos à saúde pública, pois estão envolvidas na maioria dos casos de infecções alimentares. Estudos destes surtos em humanos indicam que produtos de origem animal, especialmente avícola, participam de forma significativa como fontes de contaminação. Observa-se que entre os isolados de *Salmonella* a resistência aos antimicrobianos utilizados rotineiramente na avicultura está aumentando significativamente, além da presença de multirresistência. O objetivo deste trabalho foi verificar o perfil fenotípico e genotípico de resistência antimicrobiana em isolados de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium de origem avícola frente à Gentamicina, Enrofloxacina e Ceftiofur, através do teste de disco-difusão, concentração inibitória mínima (MIC) e pesquisa de genes de resistência por PCR. Amostras de diversas origens avícolas foram isoladas em um laboratório privado no estado do Paraná, o isolamento foi realizado de acordo com o preconizado pela normativa do MAPA. Os isolados identificados como *Salmonella* sp. foram enviados para o laboratório FIOCRUZ onde foram sorotipados. Destas amostras, duas foram identificadas como *S* Enteritidis e onze como *S* Typhimurium. Após esta etapa as amostras foram avaliadas quanto a sua sensibilidade fenotípica, para isto foram realizados os testes de concentração inibitória mínima e antibiograma. Os resultados desta avaliação mostraram diferentes níveis de resistência nas duas metodologias para os antimicrobianos testados. No antibiograma os isolados de *S*. Enteritidis foram 100% sensíveis aos antimicrobianos Gentamicina e Enrofloxacina e apresentaram resistência de 50% ao Ceftiofur. Já a *S*. Typhimurium apresentou resistência em graus variados aos três antimicrobianos testados, 18,1% para o Ceftiofur, 45,4% para Gentamicina e 18,1% para Enrofloxacina. No MIC os isolados de *S*. Typhimurium apresentaram resistência de 27,2% ao Ceftiofur, 54,5% à Gentamicina e 18,1% à Enrofloxacina, resultados esses muito semelhantes aos observados no antibiograma. Já as amostras de *S*. Enteritidis tiveram 100% de resistência à Gentamicina e 50% para a Enrofloxacina e Ceftiofur. Na análise genotípica observou-se que as amostras de *S*. Typhimurium e *S*. Enteritidis, independente de serem resistentes ou sensíveis fenotipicamente à Enrofloxacina, apresentaram senão os quatro, mas três dos genes responsáveis pela resistência. Com relação à Gentamicina e ao Ceftiofur, os genes de resistência foram encontrados principalmente nas amostras que apresentaram resistência fenotípica. Porém também foram encontradas amostras resistentes fenotipicamente mas que não tinham o gene de resistência, assim como amostras sensíveis que apresentavam o gene. Esses resultados demonstram o elevado grau de resistência das cepas isoladas aos antimicrobianos testados, assim como a presença de multirresistência. Soma-se a isso o fato de amostras possuírem o gene de resistência e não estarem expressando fenotipicamente, salientando que os antimicrobianos rotineiramente utilizados podem tornar-se ineficientes dentro de um curto período de tempo.

**Palavras-chave:** Antimicrobiano. Genes de Resistência. *Salmonella*. Saúde Pública.

## ABSTRACT

Salmonellosis is responsible for significant economic losses in poultry and serious harm to public health because they are involved in most cases of foodborne illness. Studies of these outbreaks in humans indicate that animal products, in particular poultry, are significant sources of contamination. It is observed that among isolates of *Salmonella* resistance to antimicrobial agents used routinely in poultry is increasing significantly, including the presence of multidrug resistance. The objective of this study was to investigate the genotypic and phenotypic profile of antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from poultry products to Gentamicin, Ceftiofur and Enrofloxacin by the disk diffusion test, minimum inhibitory concentration (MIC) and search for resistance genes by PCR. *Salmonella* sp. from poultry samples were isolated in a private laboratory from the state of Parana. The isolation was performed as recommended by the Brazilian official methods. Isolates identified as *Salmonella* sp. were sent to the FIOCRUZ laboratory where they were serotyped. Of these samples, two were identified as *S. Enteritidis* and eleven as *S. Typhimurium*. Different levels of resistance were verified when compared diffusion test and MIC. *S. Enteritidis* was 100% sensitive for Enrofloxacin and Gentamicin and 50% resistant to Ceftiofur according to the diffusion test. As for *S. Typhimurium* there was resistance to all three antibiotics tested (18.1% for Ceftiofur, 45.4% for gentamicin and 18.1% for Enrofloxacin). In the MIC the isolates of *S. Typhimurium* were resistant to Ceftiofur (27.2%), Gentamicin (54.5%), and to Enrofloxacin (18.1%). These results were very similar to those observed in the diffusion test. However, the samples of *S. Enteritidis* had 100% resistance to Gentamicin and 50% for Enrofloxacin and Ceftiofur in the MIC test. Genotypic analysis by PCR showed that *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*, either resistant or susceptible to Enrofloxacin, presented at least three (out of four) of the genes responsible for resistance. Regarding Gentamicin and Ceftiofur, resistance genes were found mainly in samples with phenotypic resistance. Interestingly phenotypically resistant strains did not presented the resistance gene, as well as sensitive strains present the gene. These results demonstrate the high degree of resistance to the antibiotics routinely used in poultry, as well as the presence of multidrug resistance. In addition, the fact that some isolates already contain the resistance gene but are not phenotypically expressing it, stress out the possibility that these antimicrobials may become ineffective within a short period of time.

**Key-words:** Antimicrobial. Public Health. Resistance Gene. *Salmonella*.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gel de agarose 1,5% mostrando a presença da banda para o gene AmpC (1226 pb).....	60
Figura 2 - Gel de agarose 2% mostrando a presença da banda para o gene BlaCMY (354 pb) .....	60
Figura 3 - Gel de agarose 1,5% mostrando a presença da banda para o gene GyrA (251 pb).....	61
Figura 4 - Gel de agarose 1,5% mostrando a presença da banda para o gene GyrB (181 pb).....	61
Figura 5 - Gel de agarose 1,5% mostrando a presença da banda para o gene ParC (260 pb).....	62
Figura 6 - Gel de agarose 1,5% mostrando a presença da banda para o gene ParE (237 pb).....	62
Figura 7 - Gel de agarose 1,5% mostrando a presença da banda para o gene AadA (526 pb).....	63
Figura 8 - Gel de agarose 1,5% mostrando a presença da banda para o gene AadB (700 pb).....	63
Figura 9 - Sequência do gene GyrA depositado no banco de dados públicos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica, NCBI, similaridade de 99%. .....	66
Figura 10 - Sequência do gene AadA depositado no banco de dados públicos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica, NCBI, similaridade de 98%. .....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Soluções de antimicrobianos.....	34
Tabela 2 - Genes de resistência para cada antimicrobiano testado, primers específicos, tamanho dos pares de bases e trabalhos de referência para protocolos de amplificação.....	36
Tabela 3 – Sorotipos de <i>Salmonella</i> sp. identificados através da técnica de sorotipificação realizada pelo laboratório FIOCRUZ.....	37
Tabela 4 – Perfis de susceptibilidade no antibiograma dos isolados de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> aos antimicrobianos Ceftiofur, Gentamicina e Enrofloxacina.....	37
Tabela 5 – Perfis de susceptibilidade no MIC dos isolados de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> aos antimicrobianos Ceftiofur, Gentamicina e Enrofloxacina.....	38
Tabela 6 - Presença dos genes de resistência aos antimicrobianos Enrofloxacina, Gentamicina e Ceftiofur para os isolados de <i>S. Typhimurium</i> e <i>S. Enteritidis</i> ...	39
Tabela 7 - Análise de sensibilidade e especificidade das metodologias MIC e Antibiograma para os antimicrobianos Ceftiofur, Gentamicina e Enrofloxacina.....	40
Tabela 8 - Tamanho dos halos de inibição dos antimicrobianos testados.....	58
Tabela 9 – Concentrações dos reagentes e condições do termociclador para a realização da PCR para os genes testados.....	59
Tabela 10 – Análise do teste exato de Fisher para verificar dependência dos resultados do MIC com a presença ou ausência dos genes de resistência à Enrofloxacina.	64
Tabela 11 – Análise do teste exato de Fisher para verificar dependência dos resultados do Antibiograma com a presença ou ausência dos genes de resistência à Enrofloxacina.....	64
Tabela 12 - Análise do teste exato de Fisher para verificar dependência dos resultados do MIC com a presença ou ausência dos genes de resistência ao Ceftiofur.....	64
Tabela 13 - Análise do teste exato de Fisher para verificar dependência dos resultados do Antibiograma com a presença ou ausência dos genes de resistência ao Ceftiofur.....	65
Tabela 14 - Análise do teste exato de Fisher para verificar dependência dos resultados do MIC com a presença ou ausência dos genes de resistência à Gentamicina. ..	65

Tabela 15 - Análise do teste exato de Fisher para verificar dependência dos resultados do Antibiograma com a presença ou ausência dos genes de resistência à Gentamicina. ....	65
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg: Microgramas

µL: Microlitros

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI: Infusão de cérebro e coração

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CEDIMA: Centro de Diagnóstico de Microbiologia Animal

DNA: Ácido desoxirribonucleotídeo

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos

FIOCRUZ: Fundação Osvaldo Cruz

LPS: Lipopolissacarídeos

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MIC: Concentração Inibitória Mínima

mL: Mililitros

mm: Milímetros

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

pb: Pares de base

PCR: Reação da Polimerase em Cadeia

PNSA: Plano Nacional de Sanidade Avícola

SPI: *Salmonella* Pathogenicity Islands

TSA: Ágar triptona de soja

UBABEF: União Brasileira de Avicultura

WHO: World Health Organization

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1	<b>GÊNERO SALMONELLA</b> .....	15
2.1.1	<b>Características morfológicas, bioquímicas e nomenclatura</b> .....	15
2.1.2	<b>Fatores de virulência</b> .....	16
2.1.2.1	<b>Fímbrias</b> .....	17
2.1.2.2	<b>Flagelos</b> .....	17
2.1.2.3	<b>Lipopolissacarídeos (LPS)</b> .....	17
2.1.2.4	<b>Ilhas de patogenicidade</b> .....	17
2.2	<b>SALMONELOSE NAS AVES</b> .....	18
2.3	<b>IMPORTÂNCIA NA SAÚDE PÚBLICA</b> .....	20
2.4	<i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Salmonella</i> Typhimurium .....	22
2.5	<b>USO DE ANTIMICROBIANOS NA AVICULTURA</b> .....	23
2.5.1	<b>Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos</b> .....	24
2.5.1.1	<b>Resistência Bacteriana as Fluorquinolonas</b> .....	26
2.5.1.2	<b>Resistência Bacteriana aos Aminoglicosídeos</b> .....	27
2.5.1.3	<b>Resistência Bacteriana as Cefalosporinas</b> .....	28
3	<b>ARTIGO</b> .....	31
3.1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	32
3.2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
3.2.1	<b>Isolamento</b> .....	32
3.2.2	<b>Antibiograma</b> .....	33
3.2.3	<b>Concentração Inibitória Mínima (MIC)</b> .....	33
3.2.4	<b>Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)</b> .....	35
3.2.4.1	<b>Extração do DNA</b> .....	35
3.2.4.2	<b>Pesquisa dos genes de resistência</b> .....	35
3.2.4.3	<b>Sequenciamento</b> .....	35
3.2.4.4	<b>Análise Estatística</b> .....	36
3.3	<b>RESULTADOS</b> .....	36
3.3.1	<b>Sorotipificação</b> .....	36
3.3.2	<b>Antibiograma</b> .....	37
3.3.3	<b>Concentração Inibitória Mínima (MIC)</b> .....	38
3.3.4	<b>Comparativo Antibiograma e MIC</b> .....	38
3.3.5	<b>PCR</b> .....	38
3.3.6	<b>Análise Estatística</b> .....	38
3.3.7	<b>Sequenciamento</b> .....	40
3.4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	41

<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>48</b>
5.1	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO .....	48
5.2	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
<b>6</b>	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda pelo consumo de carne de origem avícola em todo o mundo fez com que o Brasil se tornasse um dos maiores produtores mundiais de frangos de corte. Atualmente o Brasil é o terceiro maior produtor, ficando atrás somente dos Estados Unidos e da China, no entanto é o maior exportador mundial, totalizando 3.819 mil/ton de carne exportada, principalmente para países como o Oriente Médio e Ásia. Além da grande quantidade exportada, em torno de 69% da produção é destinada ao mercado interno (UBABEF, 2011). Os hábitos alimentares dos brasileiros têm mudado nos últimos tempos, aliado ao aumento do poder aquisitivo das classes mais baixas e ao preço mais acessível da carne de frango, fizeram com que o consumo per capita anual da população chegasse a patamares de 47,4 kg, valores esses que já ultrapassaram o consumo de países como os Estados Unidos, onde o consumo foi em torno de 44,4 kg (UBABEF, 2011).

Com o intuito de manter sua competitividade no mercado e garantir a qualidade dos produtos ofertados aos consumidores, o Brasil trabalha persistentemente em seus programas de biossegurança. Grande exemplo é o PNSA (Plano Nacional de Sanidade Avícola), instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Portaria Ministerial número 193 de 19 de setembro de 1994. Este programa visa manter a saúde do plantel avícola brasileiro através de monitorias contra as doenças de Newcastle, Influenza Aviária, Micoplasmoses e Salmoneloses, sendo esta última responsável por grandes perdas econômicas relacionadas tanto a produtividade do plantel, como à saúde pública.

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. As perdas econômicas na avicultura mundial são elevadas em função das contaminações por *Salmonellas* sp. O prejuízo ocasionado pela salmonelose é causado pela alta mortalidade que as Salmonelas, principalmente *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum*, podem ocasionar nas aves, além da queda na produção de ovos e perda de peso devido à baixa conversão alimentar (RISTOW, 2010). Para diminuir essa incidência, Andreatti Filho (2006) comenta que os cuidados preventivos devem estar presentes em todas as fases de criação, desde o planejamento do aviário até o abate do lote. Ainda, de acordo com Sesti (2004) um programa efetivo de biossegurança é a única maneira de manter os sistemas de produção livres ou controlados, no que diz respeito à presença de doenças de impacto econômico e risco à saúde pública.

Deve-se salientar que esta bactéria é um dos mais importantes agentes patogênicos de interesse em saúde pública, segundo Amson et al. (2006), em um trabalho conduzido entre 1978 a 2000 no Estado do Paraná, verificou-se que em doenças transmitidas por alimentos a *Salmonella* sp. estava presente em 33,8% dos surtos deste período, número inferior apenas aos registrados por *Staphylococcus aureus* que representou 41,2% dos casos.

Os produtos de origem avícola apresentam importante papel na disseminação desses agentes, Nadvorny et al. (2004), investigando surtos de Salmoneloses causadas por alimentos, verificaram que 74,7% dos casos intoxicação alimentar foram ocasionados por *Salmonella* sp. Estes autores investigaram ainda a origem dos surtos e identificaram que 83,6% dos casos tiveram origem avícola, destacando assim a importância deste setor na saúde pública.

Dentre os mais de 2600 sorotipos já identificados, os sorotipos entéricos com maior patogenicidade para humanos são a *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, sendo estes isolados com frequência em amostras avícolas. No ano de 2010, 12,5% dos isolados de *Salmonella* sp. em um laboratório no Paraná foram de S. Enteritidis (BACK, 2012).<sup>1</sup>

Observa-se também o aparecimento de cepas de *Salmonella* sp. resistentes aos antimicrobianos rotineiramente utilizados, Guerra et al. (2002) verificaram que 51% das cepas analisadas eram multirresistentes, e essa resistência variava de dois a nove tipos de antimicrobianos. Alguns autores consideram como responsável direto pelo aumento na incidência de casos de cepas resistentes a antibióticos o uso de medicamentos como promotores de crescimento na ração animal (MACDONALD et al., 1987; KELLEY et al., 1998; GUERRA, et al., 2002; MOLBAK et al., 2002). Ainda segundo Threlfall (2002) a exposição continuada a antibióticos desenvolve resistência nas cepas expostas após um determinado período de tempo. Soma-se a isso o uso de forma indiscriminada na terapêutica dos animais.

O objetivo deste trabalho foi averiguar o perfil fenotípico e genotípico de resistência antimicrobiana de amostras de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium de origem avícola frente à Gentamicina, Enrofloxacina e Ceftiofur, através do teste de disco-difusão, concentração inibitória mínima e pesquisa de genes de resistência por PCR.

---

<sup>1</sup> Comunicação pessoal



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GÊNERO SALMONELLA

#### 2.1.1 Características morfológicas, bioquímicas e nomenclatura

O gênero *Salmonella* pertence à família das *Enterobacteriaceae*, recebeu esse nome em homenagem ao seu descobridor, Daniel E. Salmon, médico veterinário do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA), (SNOEYENBOS; WILLIAMS, 1991).

São bacilos Gram-negativos que infectam todos os animais, inclusive as aves e o homem. Neste gênero estão incluídos mais de 2500 sorotipos (BACK, 2002). Essas bactérias são bacilos não esporulados, que possuem flagelos na sua maioria, aeróbios ou anaeróbios facultativos, fermentam glicose e outros açúcares e descarboxilam aminoácidos. As reações bioquímicas são importantes para a caracterização de gênero e diferenciação de alguns biotipos. *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum estão entre os poucos que não possuem flagelos, sendo imóveis (BERCHIERI; OLIVEIRA, 2006). Dentre os 2600 sorotipos, menos de 50 são os responsáveis pela maioria dos casos de infecção em animais e humanos. Os demais sorotipos vivem nos chamados animais de sangue frios, principalmente répteis e no ambiente (LIBBY et al., 2004). Todas as salmonelas tem o potencial de patogenicidade, causando salmonelose ou gastroenterite por *Salmonella* (TORTORA et al., 2012).

Dentro do gênero *Salmonella*, a classificação é feita de acordo com o esquema de Kauffmann-White, no qual a divisão entre os sorotipos é baseada nos antígenos H (flagelares), O (somáticos) e menos frequentemente capsulares (K), também conhecidos como Vi, a partir disto os sorotipos podem ser diferenciados sorologicamente (POPOFF et al., 2003). Quando essa bactéria entra em contato com o organismo animal, seus flagelos, cápsulas e paredes celulares, atuam como antígenos e induzem o animal a produzir anticorpos, e que são específicos para cada uma dessas estruturas, portanto os meios sorológicos são utilizados para sua diferenciação (TORTORA et al., 2012).

A realização da classificação sorológica pelo esquema de Kauffmann-White segue uma tabela antigênica baseada nos seus antígenos O, Vi e H. Os antígenos O são designados por números arábicos e caracterizam os sorogrupos de *Salmonella*. Por esta razão o mesmo antígeno O é comum a vários sorotipos de *Salmonella*. Só existe um tipo sorológico de

antígeno Vi, e este é encontrado apenas nas *Salmonellas* Typhi, Paratyphi C e Dublin. Os antígenos flagelares podem ocorrer em duas fases, denominadas 1 e 2. Uma *Salmonella* portadora de um antígeno flagelar, ao proliferar, pode dar origem a um clone que expressa outro antígeno flagelar. Por isso em uma cultura, parte das células apresentam com flagelos de fase 1 e parte com fase 2. Os antígenos são designados pelas letras minúsculas do alfabeto (fase 1) e por números arábicos (fase 2). Para exemplificar, a fórmula antigênica para *Salmonella* Typhi é: 9,12[Vi]:d-, onde primeiramente se leem os antígenos somáticos, seguidos ou não pelos capsulares, entre colchetes e após os antígenos flagelares, na fase 1 ou 2, sendo que se não houver representar com um traço (CAMPOS, 2005). O esquema ainda divide o gênero em 2 espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A *S. enterica* por sua vez se divide em 6 subespécies, sendo essas a *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. A espécie *S. bongori* por sua vez se divide unicamente na subespécie *bongori* (POPOFF et al., 2003). Ainda de acordo com Brenner et al. (2000) novas metodologias podem ser utilizadas para a identificação dos diferentes sorotipos, como análise de DNA através de estudos de hibridização.

A nomenclatura para *Salmonella* é frequentemente confusa e difere da nomenclatura binomial (gênero e espécie) das outras bactérias, entretanto a padronização é necessária para adequada comunicação entre microbiologistas, órgãos oficiais, profissionais da saúde e população em geral (BRENNER et al., 2000). Para ter uma nomenclatura de forma clara e correta, esta deve conter a espécie, a subespécie e o sorotipo sendo que este não deve estar em itálico, por exemplo, *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium, é usado como primeira citação, posteriormente pode ser referenciado utilizando somente *Salmonella* Typhimurium (LIBBY et al., 2004).

### 2.1.2 Fatores de virulência

Os microrganismos patogênicos se distinguem de outros da mesma espécie pelo fato de possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência, isto é, fatores que propiciam a colonização e ocorrência de diversos eventos que subvertem a fisiologia hospedeira, ocasionando o aparecimento de sinais e sintomas anormais, que irão, finalmente, definir o estado de doença. Além dos fatores de virulência a aquisição de genes que permitem a resistência a drogas antimicrobianas tornou-se um elemento adicional no arsenal de virulência das bactérias (VIEIRA, 2009).

### **2.1.2.1 Fímbrias**

Caracteriza-se por serem estruturas mais curtas, retas e finas que os flagelos, têm função relacionada mais a fixação e transferência de DNA que à motilidade (TORTORA et al., 2012).

Estão associadas à adesão em diferentes células epiteliais e possivelmente à matriz extracelular. São encontradas em praticamente todos os sorotipos de Salmonela, sua distribuição é variável o que dificulta entender seu real papel na virulência (CAMPOS, 2005) e os mecanismos de aderência podem variar de acordo com o hospedeiro (LIBBY et al., 2004). As fímbrias podem estar localizadas tanto no cromossomo como nos plasmídeos (LIBBY et al., 2004).

### **2.1.2.2 Flagelos**

Os flagelos são longos apêndices filamentosos que propõem as bactérias (TORTORA et al., 2012). Conferem dessa forma motilidade à bactéria, as regras para a virulência ocasionada pelos flagelos ainda não são bem conhecidas, mas estão relacionados na invasão intestinal (LIBBY et al., 2004).

### **2.1.2.3 Lipopolissacarídeos (LPS)**

Compõem a membrana externa das bactérias Gram-negativas (TORTORA et al., 2012). São os maiores componentes de membrana e é uma importante toxina que interage com o sistema imune do hospedeiro induzindo inflamação, choque septicêmico, febre e morte. LPS consiste de 3 componentes: cadeia de polissacarídeos (antígeno O), oligossacarídeos (região do *core*) e molécula lipídica (lipídeo A) (LIBBY et al., 2004).

O lipídeo A é a porção lipídica do LPS, quando as bactérias morrem liberam o lipídeo A que atua como uma endotoxina. É ele o responsável por ocasionar febre, choque e formação de coágulos. Os oligossacarídeos estão ligados ao lipídeo A, contém açúcares e responde pela função estrutural. Já o polissacarídeo O tem a função de antígeno (TORTORA et al., 2012).

### **2.1.2.4 Ilhas de patogenicidade**

São grandes regiões localizadas no DNA cromossômico e são referidas como SPIs (*Salmonella* Pathogenicity Islands) (BLUM et al., 1994). Cinco ilhas de patogenicidade são identificadas nas *S. Typhimurium* e na *S. Typhi* (WONG et al., 1998), no entanto três ilhas são consideradas como sendo as mais importantes (VIEIRA, 2009).

A capacidade de invasão da *S. Typhimurium* está 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 uma série de proteínas para o sistema de secreção. Através desse sistema de secreção passam proteínas efetoras que, uma vez dentro da célula intestinal, atuam na célula hospedeira, causando modificações no citoesqueleto e, conseqüentemente no arcabouço celular, possibilitando desse modo a entrada da bactéria (GRASSL; FINLAY, 2008).

Após a entrada da bactéria na célula do hospedeiro, esta sobrevive nos macrófagos, e assim promove sua distribuição sistêmica no organismo (HENSEL et al. 1995). Essa capacidade de sobrevivência e multiplicação se deve a proteínas codificadas em outra SPI, denominada SPI-2 (VIEIRA, 2009).

Outra ilha, SPI-3, embora menor, também codifica elementos que permitem a sobrevivência da *Salmonella* no meio intracelular (VIEIRA, 2009). Essa ilha codifica o operon *mgtCB* possibilitando a sobrevivência intracelular da bactéria em condições limitadas de magnésio (SMITH et al., 1998).

As outras SPIs da *Salmonella* não possuem seu próprio sistema de secreção e realizam suas funções por meio de um consórcio, utilizando os sistemas codificados em SPI-1 e SPI-2 (VIEIRA, 2009).

O mecanismo de patogenicidade e a invasão das células epiteliais ocorrem quando a salmonela invade primeiramente a mucosa intestinal e ali se multiplica. Ocasionalmente ela dirige a passagem através da mucosa intestinal, nas células M, para penetrar nos sistemas linfático e cardiovascular, e dali se disseminar para muitos órgãos. Elas se replicam rapidamente dentro dos macrófagos. A salmonelose tem um período de incubação que varia de 12 a 36 horas. Até 1 bilhão de salmonelas por grama podem ser encontradas nas fezes de uma pessoa na fase aguda da doença (TORTORA et al., 2012).

## 2.2 SALMONELOSE NAS AVES

O termo Salmonelose é utilizado para designar os quadros de doenças ocasionados por bactérias do gênero *Salmonella* sp. (SNOEYENBOS; WILLIAMS, 1991).

Essas bactérias são responsáveis pelo aparecimento de 3 formas da doença nas aves: Pulorose, Tifo Aviário e Paratifo (POMEROY; NAGARAJA, 1991; BACK, 2002; ANDREATTI FILHO, 2006).

A Pulorose é ocasionada pela *Salmonella Pullorum*, que assim como a *Salmonella Gallinarum* é extremamente adaptada às aves. Acomete principalmente aves jovens, com menos de três semanas de vida, ocasionando alta mortalidade e aumento de aves debilitadas. A sintomatologia se caracteriza principalmente pela presença de diarreia esbranquiçada e empastamento cloacal. Aves adultas acometidas geralmente não manifestam sintomatologia clínica, tornam-se portadoras e disseminadoras sãs, o que se pode observar é queda de produção de ovos que pode chegar a 30%. A transmissão do agente ocorre tanto por via vertical como horizontal (POMEROY; NAGARAJA, 1991; SNOEYENBOS; WILLIAMS, 1991; BERCHIERI JUNIOR, 2000; BACK, 2002; ANDREATTI FILHO, 2007).

*Salmonella Gallinarum* é o agente causador do Tifo Aviário, sendo que este acomete principalmente as aves adultas. As aves podem apresentar mortalidade súbita, que pode variar de 10 a 80%, além de diarreia esverdeada, prostração e queda de produção. Na necropsia se observa um fígado com coloração “bronzada”. A principal forma de transmissão é a horizontal, mas a forma vertical também pode ocorrer (POMEROY; NAGARAJA, 1991; SNOEYENBOS; WILLIAMS, 1991; BERCHIERI JUNIOR, 2000; BACK, 2002; ANDREATTI FILHO, 2007).

Esses dois agentes foram considerados responsáveis por grandes perdas econômicas na avicultura mundial por muitos anos, em função principalmente da mortalidade, refugagem e perdas de carcaça no abate. No entanto, de acordo com Snoeyenbos; Williams (1991) e Pomeroy; Nagaraja (1991), esses agentes foram praticamente erradicados nos Estados Unidos e em outros países.

No Brasil, através do PNSA com os programas de controle e erradicação, também se observou significativa diminuição desses agentes, porém não a sua completa erradicação, pois de acordo com Back (2012)<sup>2</sup> há isolados de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* nos plantéis avícolas brasileiros.

Alguns autores comentam que na tentativa de erradicação desses dois agentes, abriu-se um nicho principalmente para *Salmonella Enteritidis* e outras do grupo paratífico (BAUMLER et al., 2000). Ainda de acordo com Back (2012)<sup>2</sup>, tem-se observado significativo aumento dos isolados de *Salmonella Heidelberg*, assim como de *Salmonella Enteritidis*.

---

<sup>2</sup> Comunicação pessoal

O Paratifo é ocasionado pelas salmonelas que não são adaptadas às aves, representado principalmente pela *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Esses sorotipos além das perdas econômicas para a avicultura são responsáveis pelos casos de intoxicações alimentares em humanos. A sintomatologia é mais exacerbada nas aves jovens, que podem apresentar mortalidade principalmente até as 3 primeiras semanas de vida, podem apresentar diarreia, prostração, desuniformidade e sonolência. As aves adultas dificilmente manifestam sinais, mas atuam como portadoras e disseminadoras. As formas de transmissão do agente ocorrem tanto na via vertical, por contaminação no oviduto ou no momento da postura via casca do ovo, como horizontal (POMEROY; NAGARAJA, 1991; SNOEYENBOS; WILLIAMS, 1991; BERCHIERI JUNIOR, 2000; BACK, 2002; ANDREATTI FILHO, 2006). As aves portadoras podem no momento do abate, contaminar as carcaças, assim como as poedeiras podem contaminar os ovos no momento da postura ou da sua formação, e assim contaminar os seres humanos levando ao aparecimento dos quadros de toxinfecções alimentares (POMEROY; NAGARAJA, 1991; SNOEYENBOS; WILLIAMS, 1991; BERCHIERI JUNIOR, 2000; BACK, 2002; ANDREATTI FILHO, 2006; CARRASCO et al., 2012).

### 2.3 IMPORTÂNCIA NA SAÚDE PÚBLICA

A Salmonelose é uma das principais doenças entéricas em humanos em todo o mundo (CDC, 2012). Em função da alta prevalência da *Salmonella* sp. em aves, os produtos de origem aviária, como carne e ovos quando consumidos sem passarem pelo processo de cozimento, atuam como fontes de veiculação e transmissão da bactéria para os humanos (POPPE et al., 1998). Outros alimentos como pratos prontos e saladas também atuam como disseminadores da *Salmonella* sp. (WELKER et al., 2010).

De acordo com o Centers for Disease Control and Prevention-EUA (CDC, 2012) a cada ano, em torno de 42.000 casos de salmonelose são relatados nos Estados Unidos. No entanto esses números podem ser 29 vezes maiores, pois muitos casos considerados leves não são diagnosticados ou notificados. O sorotipo prevalente nos Estados Unidos é a *Salmonella* Typhimurium. Ainda de acordo com estimativas anuais do CDC (2012) para o período de 2000 a 2008, em torno de 1 milhão de pessoas foram acometidas pela salmonelose, dessas 19.000 foram hospitalizadas e 380 pessoas morreram. Esses números só não são maiores que os ocasionados pelo *Norovírus*.

No Brasil, de acordo com dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2012), entre os anos de 2000 a 2011 foram notificados 1600 surtos de salmonelose, sendo que nos anos de 2010 e 2011 esses surtos não chegaram a 50.

A maioria das pessoas infectadas desenvolve febre, diarreia e cólicas abdominais de 12 a 72 horas após a infecção. A doença geralmente dura de 4 a 7 dias e grande parte das pessoas se recuperam sem tratamento. No entanto, em alguns casos, a diarreia pode ser tão severa que o paciente precisa ser hospitalizado, pode ocorrer septicemia e a morte se o mesmo não for medicado rapidamente (CDC, 2012). Idosos, crianças e imunocomprometidos são mais suscetíveis a ter uma doença grave.

De acordo com dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2012), o ovo é apontado como principal alimento envolvido em surtos de doenças transmitidas por alimentos no país se considerado como agente causador a *Salmonella* sp. Dados apontam que, entre 1999 e 2007, o consumo de ovos crus ou mal cozidos foi responsável por 22,6% dos 5.699 casos desse tipo de doença notificados ao Ministério da Saúde. O estudo demonstra, ainda, que as residências são os locais com maior ocorrência desses surtos, com 48,5% do total, seguidas de restaurantes (18,8%) e escolas (11,6%). A legislação vigente para comercialização e estocagem dos ovos para consumo é antiga, necessitando de melhorias para garantir a qualidade do produto ao consumidor (BRASIL, 2012).

Durante os anos de 2006 e 2007 foram realizadas análises nos alimentos envolvidos em surtos de DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos) no Estado do Rio Grande do Sul, foi constatado que a *Salmonella* sp. estava envolvida em 37% dos casos, sendo a carne de frango responsável por 30% das contaminações e as saladas de maionese feitas com ovos crus responsável por 51% das amostras contaminadas (WELKER et al., 2010).

No Estado de Santa Catarina, dados da Vigilância Epidemiológica Estadual (SANTA CATARINA, 2012), mostram que entre os anos de 2006 a 2009, 45% dos surtos de DTA foram ocasionados pela *Salmonella* sp. e os ovos e/ou maionese estavam envolvidos em 100% dos casos.

No entanto, deve-se salientar que a salmonelose em seres humanos é influenciada por uma série de fatores para que ocorra o desenvolvimento da sintomatologia, dentre os quais pode-se citar o sorovar de *Salmonella* envolvido, a idade e dose infectante, tipo de alimento contaminado e predisposição para doenças (POPPE, 1999). Além dos fatores do organismo humano que contribuem para a resistência como a acidez gástrica, microbiota intestinal normal, imunidade intestinal local e motilidade do trato gastrointestinal (TORTORA et al., 2012).

## 2.4 *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium

Durante os últimos 10-15 anos, o aumento da prevalência de *S. Enteritidis* em humanos teve um incremento significativo, começando pelos países da Europa e alcançando todo o mundo. O isolamento desse sorotipo ultrapassou o de *S. Typhimurium*. Geralmente o consumo de ovos, ou produtos contendo esse alimento está associado aos casos de contaminação (POPPE, 1999).

Enquanto a *S. Enteritidis* está associada principalmente ao consumo de carne de aves e ovos, a *S. Typhimurium* está relacionada ao processo produtivo dos alimentos, tanto para aves como suínos e bovinos (CARRASCO et al., 2012).

A contaminação dos ovos pela bactéria pode ocorrer no ovário e/ou oviduto da ave, assim como no momento da postura através da contaminação da casca com as fezes ou ambiente contaminado (BACK, 2002; ANDREATTI FILHO, 2006). De acordo com De Buck et al. (2004), as células da camada granulosa dos folículos pré-ovulatórios seriam o local de eleição para colonização e invasão do ovário pela *S. Enteritidis*. Já a contaminação da carne pode ocorrer principalmente através da contaminação cruzada no momento do abate dessas aves (CARRASCO et al., 2012). Dados do World Health Organization (WHO, 1992), mostram que 25% das contaminações estão associadas a contaminação cruzada, envolvendo principalmente práticas de higiene deficientes, equipamentos contaminados, contaminação dos funcionários que manipulam esses produtos e estocagem inadequada.

Os cinco sorotipos de *Salmonella* mais frequentes ocorridos em humanos no ano de 2009 na União Européia, de acordo com a Community Summary Report, foram *S. Enteritidis* (53%), *S. Typhimurium* (24%), *S. Infantis* (1,6%), *S. Newport*, *S. Virchow* e *S. Derby* (0,7%) respectivamente, sendo que *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram responsáveis por 77% dos casos (LETTINI; RICCI, 2010).

*S. Enteritidis* passou a ser problema de saúde pública no Brasil a partir de 1993, até então era pouco isolada de infecções humanas. A partir desse momento sua prevalência tem aumentado e passou a corresponder a mais de 60% dos sorovares isolados no Instituto Adolfo Lutz, a partir de 1995 (SILVA; DUARTE, 2002). Isto é demonstrado através da avaliação de 4581 isolamentos de fontes não humanas, realizados entre janeiro de 1996 e dezembro de 2000, no estado de São Paulo, onde foram identificados 123 sorotipos de *Salmonella*, sendo que *S. Enteritidis* estava presente em 32,7%, seguida por *S. Senftenberg* (10,3%), *S. Hadar* (6,8%), *S. Agona* (5,1%) e *S. Typhimurium* (2,4%) (TAVECCHIO et al., 2002).



De acordo com Kanashiro et al. (2005), há uma alta incidência de *S. Enteritidis* nos lotes de frangos de corte (84%) e nas granjas de matrizes (57,5%), o que demonstra ser esse o sorotipo frequentemente responsável por surtos e casos esporádicos de salmonelose em humanos no Brasil.

Para que se obtenha o controle das salmonelas devem-se ter programas de controles eficazes que permitam a rastreabilidade dentro da cadeia alimentar, possibilitando a investigação epidemiológica dos surtos (OLSEN et al., 2003). Ainda, de acordo com Nascimento (2012), pode-se afirmar que o controle da presença de patógenos em alimentos de origem animal é um dos grandes desafios da indústria, tanto em nível nacional quanto internacional. Cada vez mais os países importadores irão demandar a redução do risco de contaminação de produtos, devendo os países exportadores como o Brasil responder á altura a estas exigências, como forma de atender adequadamente seus mercados.

## 2.5 USO DE ANTIMICROBIANOS NA AVICULTURA

Os antimicrobianos têm sido utilizados na produção animal há várias décadas, principalmente com objetivo preventivo ou terapêutico. Além disso, os antimicrobianos, também chamados de promotores de crescimento podem ser utilizados com a finalidade de melhorar o desempenho de crescimento das aves, e assim, aumentar a produtividade (ROSTAGNO, 2012).

Logo após sua descoberta, os antimicrobianos e quimioterápicos utilizados em medicina veterinária para o tratamento de doenças foram incorporados em alimentos para animais como promotores de crescimento. Assim, desde a década de 1950, os antimicrobianos e quimioterápicos têm se tornado parte integrante da alimentação animal, em grandes quantidades, gerando preocupações sobre as resistências das bactérias aos mesmos, transmitidas dos animais para os seres humanos (SANTANA et al., 2011).

De acordo com Rostagno (2012), na Europa, onde a pressão por parte dos consumidores e de grupos ativistas é grande, o uso de antimicrobianos como agentes promotores de crescimento na produção animal foi proibido nos últimos anos. Em função disso, nos demais países produtores de aves no mundo (incluindo os EUA e o Brasil) vêm ocorrendo discussões sobre a necessidade de se regulamentar ou, até mesmo, proibir a utilização destes compostos na produção animal. Porém, isto implica em prejuízos para a produção animal, pois estudos realizados indicam que a simples retirada dos antimicrobianos promotores de crescimento da dieta das aves levaria a uma redução média no desempenho de

3% a 7%, além do impacto negativo sobre a saúde animal e aumento da mortalidade (SANTANA et al., 2011).

A proibição da utilização destas substâncias na Europa tem restringido a importação dos produtos originados destes animais. Como este bloco comercial tem grande influência na formação de opinião, pode influenciar importantes importadores como a Ásia e Oriente Médio. O que o Brasil tem feito é buscar se adaptar às exigências internacionais de exportação e atender às legislações vigentes (SANTANA et al., 2011).

Dentre os muitos antimicrobianos utilizados na avicultura industrial, destaca-se a Gentamicina e Ceftiofur, utilizados na injeção “in ovo” no momento da transferência dos ovos das incubadoras para os nascedouros, como forma preventiva de contaminação do pintinho no momento do alojamento. Além disso, destaca-se o uso da Enrofloxacina no tratamento das aves positivas para salmoneloses paratíficas, conforme especificado na Instrução Normativa 78 do MAPA (BRASIL, 2003). Em função disso, esses antimicrobianos foram os escolhidos, pois são rotineiramente utilizados na avicultura industrial.

### **2.5.1 Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos**

A resistência microbiana pode ser conceituada como a habilidade de um microrganismo continuar a multiplicar-se ou persistir na presença de níveis terapêuticos de determinado agente antimicrobiano (TORTORA et al., 2012). As bactérias podem apresentar resistência microbiana em função de três mecanismos principais: inativação enzimática da molécula do antimicrobiano, alteração do alvo celular deste agente e redução do nível intracelular do antimicrobiano (ALEKSHUN; LEVY, 2007).

Na inativação enzimática ocorre ação das enzimas bacterianas sobre o princípio ativo do antimicrobiano, como ocorre em *Staphylococcus aureus* produtores de enzimas  $\beta$ -lactamases que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico. O segundo mecanismo consiste em alterar a estrutura da molécula-alvo do antimicrobiano. Exemplo é o que ocorre com os *Enterococos sp.* resistentes à vancomicina que substituem o resíduo de alanina por lactato, reduzindo a afinidade da vancomicina pelo seu alvo bacteriano. Também pode ocorrer a resistência quando as bactérias possuem mecanismos para reduzir a concentração intracelular do antimicrobiano, com bombas de efluxo. Este mecanismo é utilizado por *Staphylococcus sp.* resistentes a antibióticos macrolídios, como a eritromicina (WALSH, 2000; BYARUGABA, 2009).

A resistência aos antimicrobianos pode ser de dois tipos: intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é baseada em genes presentes no cromossomo, que tipicamente não são transferíveis e incluem resistência às penicilinas semi-sintéticas, cefalosporinas, baixo nível de resistência aos aminoglicosídeos e baixo nível de resistência à clindamicina, lincomicina, fluorquinolonas e trimetoprim-sulfametoxazol. A resistência adquirida normalmente resulta de uma mutação no DNA ou pela aquisição de um novo gene. Esta aquisição pode ocorrer por transformação, transdução, conjugação ou transposição (ALTERTHUM, 2005; TORTORA et al., 2012). Ainda de acordo com esses autores, a resistência a antimicrobianos geralmente decorre da aquisição de genes de virulência carregados por plasmídeos ou transposons, trocados entre linhagens da mesma espécie ou entre diferentes espécies.

Na transformação ocorre a transferência genética na qual um DNA puro passa de uma célula para outra, alterando o genótipo da bactéria receptora. Já na transdução o DNA de um plasmídeo é incorporado por um bacteriófago e então transferido para outra bactéria. A conjugação se caracteriza por um processo comum de transferência genética. Uma bactéria doadora sintetiza uma fímbria sexual, que se liga a uma bactéria receptora em um processo de “acasalamento” e transfere cópias de genes plasmidiais para as células bacterianas receptoras. Por fim, na transposição sequências curtas de DNA, conhecidas como transposons, podem transpor de um plasmídeo para um cromossomo e vice-versa (QUINN et al., 2005; VAZ, 2009; TORTORA et al., 2012).

A resistência a um agente antibacteriano frequentemente resulta em resistência cruzada com outros agentes da mesma classe. Este tipo de resistência pode ser transferido rapidamente entre diferentes gêneros e espécies de bactérias, sendo comum entre os membros da família Enterobacteriaceae (QUINN et al., 2005).

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).

O aparecimento de cepas bacterianas multirresistentes tem sido relatado por diversos autores, e isso ocorre não só na avicultura, mas em todos os segmentos agropecuários, além é claro da resistência humana aos antimicrobianos (POPPE, 1999; SCHWARZ et al., 2001; THRELFALL, 2002; PEIRANO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2011).

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, pode ser um fator de estímulo da seleção de linhagens resistentes (MOLBAK, 2002).

De acordo com Quinn (2005), a resistência antibacteriana está amplamente difundida e medidas de controle em determinado país podem ser ineficazes, devido à importação de bactérias resistentes nos alimentos ou presentes na microbiota normal de animais ou humanos de países com controle menos rigoroso. Por isso, para evitar o aparecimento de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos é necessária a realização de análise de sensibilidade e dessa forma prescrever o medicamento aos quais as cepas apresentam maior sensibilidade.

### **2.5.1.1 Resistência Bacteriana as Fluorquinolonas**

São antimicrobianos de amplo espectro e são efetivos no tratamento de uma grande variedade de infecções em humanos e animais. Em muitos locais do mundo são os antimicrobianos de eleição para o tratamento de gastroenterites em humanos (HOPKINS et al., 2005).

O mecanismo de ação das fluorquinolonas consiste na ligação específica do agente antimicrobiano ao complexo DNA-enzima, bloqueando sua atividade após a clivagem dos filamentos e antes do religação do DNA. Consequentemente, forma-se uma barreira física que impedirá a duplicação do material genético, necessário para a multiplicação bacteriana (HOOPER, 2001).

Em *Salmonella* sp. são encontradas quatro topoisomerases, enzimas que agem tornando a replicação do DNA mais eficiente (HOPKINS et al., 2005). São classificadas em dois grupos de acordo com seu mecanismo de ação. As do Tipo I, representadas pelas topoisomerases I e III, e as do Tipo II, representada pela topoisomerases II, também denominada DNA-girase, e IV. A DNA-girase é composta por duas subunidades A (GyrA) e duas B (GyrB), codificadas pelos genes GyrA e GyrB, respectivamente. A topoisomerase IV, consiste em duas subunidades C (ParC) e duas E (ParE), codificadas pelos genes ParC e ParE, respectivamente. O alvo primário da ação de quinolonas em Gram-negativos é a DNA-girase, enquanto a topoisomerase IV é o alvo secundário (HOOPER, 2001).

Diversos estudos demonstraram que a resistência às quinolonas surgiu devido a mutações cromossômicas nos genes que codificam as enzimas DNA-girase e topoisomerase

IV, que são os alvos da ação destes antimicrobianos (HAKANEN et al., 2005; HOPKINS et al., 2005; GIRAUD et al., 1999).

Além das mutações nos genes que codificam a enzima DNA-girase, podem ocorrer redução do acúmulo do antimicrobiano no interior da célula bacteriana devido à hiperexpressão das bombas de efluxo e ou alterações nas porinas presentes na membrana externa, que reduzem a permeabilidade (SOTO et al., 2003; SAN-MARTÍN et al., 2005).

Em *Salmonella* sp. a resistência às quinolonas se deve principalmente à alterações no sítio de ligação do antimicrobiano com a DNA-girase, devido à mutações em uma região específica do gene *GyrA*, entre os aminoácidos 67 e 106, denominada Região Determinante de Resistência à Quinolona (QRDR) (SOTO et al., 2003; SAN MARTÍN et al., 2005; GIRAUD et al., 1999). Os genes *qnr* codificam pentapeptídeos repetidos que protegem a enzima DNA-girase da ação dos antibióticos, ligando-se ao sítio ativo da enzima em vez do DNA. Essa ligação entre proteínas do tipo Qnr e a enzima DNA-girase ocorre independentemente do complexo enzima-DNA, DNA livre ou concentração de quinolonas (ROBICSEK et al., 2006).

Elementos móveis que carregam o gene *qnr* também têm sido descritos como responsáveis por conferir resistência às quinolonas, sendo que estes apresentam um agravante, o fato de terem o potencial de transferir de forma horizontal os genes de resistência (RUIZ, 2003).

Mutações no gene *ParC* das topoisomerasas IV ocorrem menos frequentemente e as mutações nos genes *GyrB* e *ParE* tem sido consideradas raras em *Salmonellas* (GIRAUD et al., 1999; EAVES et al., 2004; HOPKINS et al., 2005 ).

### **2.5.1.2 Resistência Bacteriana aos Aminoglicosídeos**

Esse grupo de antimicrobianos tem espectro de ação relativamente curto, com atividade predominante sobre microrganismos Gram-negativos (WEBSTER, 2005; SPINOSA, 2006).

Os aminoglicosídeos interferem na síntese protéica bacteriana, promovendo a formação de proteínas defeituosas. Ligam-se a subunidade 30S do ribossomo, provocando a leitura incorreta do código genético e, conseqüentemente permitindo a incorporação de aminoácidos incorretos na cadeia polipeptídica que está sendo formada no ribossomo (WEBSTER, 2005; SPINOSA, 2006).

A resistência bacteriana é relativamente comum entre os aminoglicosídeos (SPINOSA, 2006). Essa resistência pode ser intrínseca, devido à falta de receptores específicos na subunidade 30S, ou extrínseca que é conferida por plasmídeos que podem codificar um número de enzimas que promovem modificações na molécula do aminoglicosídeo impedindo sua entrada na célula (QUINN, 2005; WEBSTER, 2005; SPINOSA, 2006).

A Gentamicina tem o maior espectro de ação entre os aminoglicosídeos, no entanto as bactérias adquirem rapidamente resistência plasmídeo-mediada a esse princípio na presença de pressão seletiva (WEBSTER, 2005).

No entanto, nos últimos anos, um novo grupo de elementos genéticos que podem conter um ou mais genes de resistência inseridos por meio de um sistema de recombinação sítio-específica foram identificadas em bactérias Gram-negativas. Estes elementos são denominados integrons, pelo menos nove classes de integrons têm sido descritos entre isolados clínicos de bactérias, sendo a classe 1 a mais prevalente e responsável pela emergência da resistência, nessa classe se encontram os genes de resistência AadA e AadB (FONSECA;VICENTE, 2010; RIBEIRO et al., 2011). Os integrons são caracterizados pela capacidade de inserir, excisar e rearranjar cassetes gênicos através da recombinação sítio-específica mediada por uma integrase (FONSECA;VICENTE, 2010).

Os integrons são considerados sistema de expressão devido à presença de um promotor que controla a transcrição dos cassetes capturados. Os cassetes seriam estruturas desprovidas de região promotora, portanto a transcrição só ocorreria na presença de um promotor (FONSECA;VICENTE, 2010).

Estudos realizados por Peirano et al.(2006) avaliando a sensibilidade de isolados de *Salmonella* sp. frente a aminoglicosídeos, demonstraram através da PCR que o gene AadA estava localizado nos integrons, o que não aconteceu com os demais genes pesquisados para outros antimicrobianos, os quais estavam localizados em plasmídeos.

No Brasil integrons de classe 1 carreando genes de resistência tem sido relatados em diversos sorotipos de *Salmonella* sp., demonstrando a disseminação dessa estrutura gênica em sorovares não reportados anteriormente (RIBEIRO et al., 2011).

A resistência aos aminoglicosídeos, especialmente a Gentamicina, pode ser atribuída principalmente à presença dos genes AadA (SILVA, 2011).

### **2.5.1.3 Resistência Bacteriana as Cefalosporinas**

As cefalosporinas fazem parte do grupo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Atuam inibindo a síntese da parede bacteriana através da inibição da transpeptidase, proteína ligante da penicilina que catalisa a formação de polímeros peptidoglicanos da parede celular bacteriana (QUINN, 2005; WEBSTER, 2005).

De acordo com a cronologia de descoberta, espectro de ação e estrutura química, as cefalosporinas são divididas em quatro gerações (WEBSTER, 2005). As de primeira geração são ativas principalmente contra bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, já as de segunda geração são mais resistentes à ação das  $\beta$ -lactmases produzidas pelas Gram-negativas. As cefalosporinas de terceira geração são ainda mais resistentes as  $\beta$ -lactmases das bactérias Gram-negativas. Finalmente as cefalosporinas de quarta geração, apresentam o mesmo espectro de ação das anteriores, além de agir sobre alguns cocos Gram-positivos e bactérias anaeróbias. As de primeira e segunda gerações são mais estáveis frente a produção das  $\beta$ -lactmases (QUINN, 2005; WEBSTER, 2005; ALTERTHUM, 2005).

O Ceftiofur cefalosporina de terceira geração, é a única aprovada para animais de produção (WEBSTER, 2005).

O desenvolvimento da resistência aos  $\beta$ -lactâmicos está associada à produção de enzimas bacterianas denominadas  $\beta$ -lactamases, as quais clivam o anel  $\beta$ -lactâmico tornando o antimicrobiano ineficaz (QUINN, 2005; WEBSTER, 2005). Essas enzimas podem ser mediadas por plasmídeos, ou codificadas por cromossomos, como ocorre em várias bactérias Gram-negativas (QUINN, 2005).

Outro grupo de enzimas com sítio ativo de serina e capazes de hidrolisar cefalosporinas são as  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC, as quais são resistentes aos inibidores clavulanato, sulbactam e tazobactam e, portanto, não são classificadas como ESBL ( $\beta$ -lactamases de espectro estendido). Essas enzimas podem ser cromossomais ou plasmidiais (JACOBY, 2009).

Organismos que superexpressam as  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC são uma grande preocupação clínica, pois são geralmente resistentes a todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. A superexpressão ocorre tanto por desregulação do gene cromossômico AmpC ou por aquisição desse gene através de plasmídeo, sendo então chamados de  $\beta$ -lactamases AmpC plasmídeo-mediadas (PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002).

O gene BlaCMY tem relação muito próxima ao gene cromossomal AmpC encontrado em *Citrobacter freundii*, e também tem sido encontrado em plasmídeos carregados por diferentes sorotipos de *Salmonella* sp. e outras bactérias gastrointestinais (ALCAINE et al., 2005).

A resistência das cepas de *Salmonella* sp. ao Ceftiofur tem sido predominantemente associadas ao gene BlaCMY-2 codificado por plasmídeos. Dados de estudos realizado por Frye e Cray (2007) sugerem que a aquisição de plasmídeos de resistência e a disseminação dos sorotipos específicos que abrigam estes plasmídeos estão impulsionando a resistência observada para Ceftiofur em isolados de *Salmonella* sp. de origem animal.

Além dos genes BlaCMY e AmpC, outros genes variantes incluindo BlaTEM, BlaSHV, BlaCTX-M também tem sido relacionados como responsáveis pelo aparecimento de resistência as cefalosporinas de terceira geração (DONALDSON et al., 2006; FRYE; CRAY, 2007).



### 3 ARTIGO

**Perfil fenotípico e genotípico de isolados de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium de Origem Avícola frente aos Antimicrobianos Cefotiofur, Gentamicina e Enrofloxacina**

### 3.1 INTRODUÇÃO

A salmonelose é considerada uma causa comum de doença transmitida por alimentos em humanos, representando um significativo problema de saúde pública em muitos países. Estudos mostram que os produtos de origem avícola têm sido reconhecidos como grandes transmissores desta bactéria, assumindo assim um papel importante nesta doença (CARRASCO et al., 2012).

Devido ao aumento na incidência de toxinfecções por *Salmonella* sp., e os relatos cada vez mais frequentes de cepas multirresistentes a antimicrobianos, torna-se necessária a investigação dos mecanismos de resistência utilizados por este microrganismo. Segundo Guerra (2000) a disseminação de genes que conferem resistência aos microrganismos deriva em função da utilização indiscriminada de antibióticos na medicina veterinária. O mesmo autor verificou em seu estudo que 31% das cepas analisadas eram resistentes a todos os antimicrobianos avaliados, sendo que a espécie com maior resistência foi a *S. Typhimurium* (96% dos antibióticos testados).

Os objetivos deste trabalho foram fazer a avaliação fenotípica de isolados de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium através das técnicas de antibiograma e concentração inibitória mínima sendo que os antimicrobianos testados foram a Gentamicina, Enrofloxacina e Ceftiofur, os quais são rotineiramente utilizados na avicultura industrial. Além disso, realizar a identificação dos genes relacionados à resistência a estes antimicrobianos através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.2.1 Isolamento

Foram utilizados 104 amostras de isolados de *Salmonella* sp. Esses materiais eram provenientes de um laboratório privado no estado do Paraná, o qual é credenciado pelo MAPA para a realização de monitorias oficiais para atender ao PNSA. Para a pesquisa e isolamento, materiais de diversas origens avícolas foram utilizados, tais como suabes de cloaca, de arrasto e das instalações, forro de caixas de transporte de pintinhos, ovos bicados, mecônio, fezes frescas, órgãos, farinhas e rações.

A metodologia utilizada para a pesquisa e isolamento da bactéria foi realizada de acordo com a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2003). Após a etapa de isolamento, as cepas positivas para *Salmonella* sp. foram encaminhadas em ágar nutriente e refrigeradas para o Laboratório de Microbiologia da UDESC em Lages (CEDIMA).

As cepas foram repicadas em ágar TSA e enviadas para a sorotipificação no laboratório FIOCRUZ. Uma alíquota dessas amostras foi congelada em BHI e glicerol para posteriormente ser utilizada para a realização dos testes de antibiograma, MIC (Concentração Inibitória Mínima) e PCR (Reação da Polimerase em Cadeia).

### **3.2.2 Antibiograma**

A técnica para a realização do antibiograma se baseou em testes de disco-difusão com a presença ou ausência de um halo de inibição. A metodologia que foi utilizada é aprovada pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standarts) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), onde consta a instrução normativa M-2 A-8 de Padronização dos Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos por disco-difusão (BRASIL, 2003).

Os antimicrobianos utilizados para verificar a sensibilidade das cepas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são uns dos mais utilizados na avicultura industrial: Enrofloxacina (5 µg), Gentamicina (10 µg) e Ceftiofur (30 µg).

As placas foram analisadas quanto à presença de um halo confluyente. Com o auxílio de uma régua os halos foram medidos e analisados de acordo com dados de uma tabela específica (Apêndice A). Esses valores mostraram se os microrganismos foram sensíveis ou resistentes aos antimicrobianos.

### **3.2.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC)**

Para a realização do MIC foram seguidos os mesmos padrões estabelecidos pela Instrução Normativa M-2 A-8 (BRASIL, 2003) e o inóculo utilizado para a avaliação da resistência também foi o mesmo utilizado na realização do antibiograma.

Os antimicrobianos testados, assim como suas concentrações, dosagens recomendadas de acordo com o fabricante e diluições testadas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Soluções de antimicrobianos.

Nome	Forma física	Dose recomendada (mg/kg)	Concentração	Concentrações para teste (mg/mL)								
Enrofloxacina	Líquido	10 mg/kg PV	1 mL contém 100 mg de Enrofloxacina	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625
Gentamicina	Líquido	5 mg/kg PV	1mL contém 40 mg de Gentamicina	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125
Ceftiofur	Líquido	5 mg/kg PV	1 mL contém 48,75 mg de Ceftiofur	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125

Fonte: o autor

### **3.2.4 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)**

Após a realização do antibiograma e do MIC as amostras foram encaminhadas para a pesquisa dos genes de resistência através da PCR. Nesta reação é possível amplificar exponencialmente o DNA criando múltiplas cópias *in vitro*.

#### **3.2.4.1 Extração do DNA**

A extração do DNA foi realizada através da técnica de fervura-centrifugação, conforme já descrito por Borsoi et al., (2009). As amostras de DNA foram então armazenadas em freezer a -20 °C até sua utilização.

#### **3.2.4.2 Pesquisa dos genes de resistência**

Através da técnica de PCR foram pesquisados os oito genes relacionados à resistência para os antimicrobianos Enrofloxacina (GyrA, GyrB, ParC e ParE), Gentamicina (AadA e AadB) e Ceftiofur (BlaCMY-2 e AmpC). A pesquisa destes genes foi feita para as onze amostras de *S. Typhimurium* e para duas amostras de *S. Enteritidis*.

Os protocolos para preparo dos reagentes e para amplificação dos fragmentos foram adaptados a partir de estudos anteriores (Tabela 2) e estão descritos no apêndice B.

#### **3.2.4.3 Sequenciamento**

Após a observação em luz ultravioleta das ampliações das bandas, dois genes (GyrA e AadA) foram utilizados para a realização do sequenciamento. As bandas desses genes foram excisadas do gel com o auxílio de um bisturi estéril e posteriormente o DNA contido na banda foi purificado com o auxílio do kit Qiaquick Gel Extraction® (*Qiagen*®).

Com a extração do DNA da banda, o mesmo foi inserido no plasmídeo para dessa forma poder ser sequenciado. Para a realização da transformação foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* transformadas em cálcio-competentes e a metodologia seguida foi a descrita por Tavares (2011).

Os materiais após terem passado pela transformação e extraído seu DNA plasmidial, foram enviados para o Laboratório de Protozoologia da UFSC onde foram sequenciados.

Tabela 2 - Genes de resistência para cada antimicrobiano testado, primers específicos, tamanho dos pares de bases e trabalhos de referência para protocolos de amplificação.

Genes resistência	Primers	Tamanho (pb)	Referência
<b>GyrA</b>	5'-CGTTGGTGACGTAATCGG-3'(F) 5'-CCGTACCGTCATAGTTAT-3'(R)	251	Randall et al.(2005)
<b>GyrB</b>	5'-GCGCTGTCCGAACTGTACCT-3'(F) 5'-CGGTGATCAGCGTCGCCACTTCC-3'(R)	181	Eaves et al.(2004)
<b>ParC</b>	5'-CTATGCGATGTCAGAGCTGG-3'(F) 5'-TAACAGCAGCTCGGCGTATT-3'(R)	260	Randall et al.(2005)
<b>ParE</b>	5'-TCTCTTCCGATGAAGTGCTG-3'(F) 5'-ATACGGTATAGCGGCGGTAG-3'(R)	237	Randall et al.(2005)
<b>AadA</b>	5'- GTGGATGGCGGCCTGAAGCC-3'(F) 5'- ATTGCCAGTCGGCAGCG-3'(R)	526	Ribeiro et al.(2011)
<b>AadB</b>	5'- TCCAGAACCTTGACCGAAC-3'(F) 5'- GCAAGACCTCAACCTTTTCC-3'(R)	700	Ribeiro et al.(2011)
<b>BlaCMY-2</b>	5'-TGGCC GAACTGACAGGCAAA-3'(F) 5'-TTTCTCTGAACGTGGCTGGC-3'(R)	354	Alcaine et al.(2005)
<b>AmpC</b>	5'-AACACACTGATTGCGTCTGAC-3'(F) 5'-CTGGGCCTCATCGTCAGTTA-3'(R)	1226	Alcaine et al.(2005) Pérez-Pérez;Hanson (2002)

Fonte: o autor

#### 3.2.4.4 Análise Estatística

O teste estatístico para avaliação dos antimicrobianos testados foi o teste exato de Fisher, com nível de significância de 0,05, em função do número de amostras ser menor do que 20. (SIEGEL, 1975 apud ANDRADE; OGLIARI, 2007).

Para avaliação das metodologias utilizadas, MIC e antibiograma foram avaliadas a sensibilidade e especificidade dos testes (GIOLO, 2012).

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Sorotipificação

A avaliação inicial das 104 amostras identificadas como *Salmonella* sp., permitiu através da sorotipificação, a identificação dos sorotipos descritos na Tabela 3.

Após a realização da sorotipificação as amostras identificadas como *S. Enteritidis* (2/104) e *S. Typhimurium* (11/104) foram submetidas às avaliações de susceptibilidade frente aos antimicrobianos, através das técnicas de Antibiograma por Disco-Difusão e Concentração Inibitória Mínima (MIC).

Tabela 3 – Sorotipos de *Salmonella* sp. identificados através da técnica de sorotipificação realizada pelo laboratório FIOCRUZ.

Sorotipo	Amostras	Sorotipo	Amostras
<i>S. Heidelberg</i>	1/104	<i>S. Tennessee</i>	2/104
<i>S. Kentucky</i>	1/104	<i>S. Corvallis</i>	3/104
<i>S. Muenster</i>	1/104	<i>S. Livingstone</i>	3/104
<i>S. Ohio</i>	1/104	<i>S. Newport</i>	3/104
<i>S. Oranienburg</i>	1/104	<i>S. Minnesota</i>	4/104
<i>S. Orion</i>	1/104	<i>S. Seftenberg</i>	4/104
<i>S. Rissen</i>	1/104	<i>S. Mbandaka</i>	6/104
<i>S. Bredeney</i>	1/104	<i>S. Agona</i>	6/104
<i>S. Anatum</i>	2/104	<i>S. Saintpaul</i>	6/104
<i>S. Enteritidis</i>	2/104	<i>S. Infantis</i>	7/104
<i>S. Give</i>	2/104	<i>S. Enterica</i> subspécie enterica	9/104
<i>S. Havana</i>	2/104	<i>S. Schwarzengrund</i>	9/104
<i>S. Montevideo</i>	2/104	<i>S. Typhimurium</i>	11/104
<i>S. Panama</i>	2/104	Contaminadas	11/104

Fonte: FIOCRUZ, 2011.

### 3.3.2 Antibiograma

O antibiograma para os dois sorotipos de *Salmonella* sp. mostrou diferentes perfis de susceptibilidade (Tabela 4).

Tabela 4 – Perfis de susceptibilidade no antibiograma dos isolados de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* aos antimicrobianos Cefotiofur, Gentamicina e Enrofloxacina.

	<i>S. Typhimurium</i>		<i>S. Enteritidis</i>		<b>Total</b>	
	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)
Cefotiofur	9 (81,8)	2 (18,1)	1 (50)	1 (50)	10 (76,9)	3 (23,0)
Gentamicina	6 (54,5)	5 (45,4)	2 (100)	0	8 (61,5)	5 (38,4)
Enrofloxacina	9 (81,8)	2 (18,1)	2 (100)	0	11 (84,6)	2 (15,3)

Legenda: S – Sensível; R – Resistente

Fonte: o autor

### 3.3.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Com relação a avaliação da susceptibilidade através do MIC, os perfis de resistência estão demonstrados na Tabela 5, resultados esses muito semelhantes aos observados no antibiograma.

Tabela 5 – Perfis de susceptibilidade no MIC dos isolados de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* aos antimicrobianos Ceftiofur, Gentamicina e Enrofloxacina.

	<i>S. Typhimurium</i>		<i>S. Enteritidis</i>		<b>Total</b>	
	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)
Ceftiofur	8 (72,7)	3 (27,2)	1 (50)	1 (50)	9 (69,2)	4 (30,7)
Gentamicina	5 (45,4)	6 (54,5)	0	2 (100)	5 (38,4)	8 (61,5)
Enrofloxacina	9 (81,8)	2 (18,1)	1 (50)	1 (50)	10 (76,9)	3 (23,0)

Legenda: S – Sensível; R – Resistente

Fonte: o autor

### 3.3.4 Comparativo Antibiograma e MIC

As duas metodologias de análise fenotípica foram comparadas frente aos isolados e aos antimicrobianos testados, com exceção à Gentamicina que apresentou perfil de resistência de 61,5% no MIC e 38,4% no antibiograma, os demais antimicrobianos apresentaram resultados muito semelhantes nas duas metodologias.

### 3.3.5 PCR

Os resultados genotípicos obtidos nos isolados de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* estão demonstrados na Tabela 6, sendo que os géis demonstrando a presença dos genes está no apêndice C.

### 3.3.6 Análise Estatística

No teste exato de Fisher podem-se observar para os antimicrobianos Enrofloxacina e Ceftiofur resultados diferentes aos observados para a Gentamicina.



Tabela 6 - Presença dos genes de resistência aos antimicrobianos Enrofloxacina, Gentamicina e Ceftiofur para os isolados de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*.

Origem	Amostra	Sorotipos	ENROFLOXACINA				GENTAMICINA				CEFTIOFUR					
			MIC	ATB	Gene ParC	Gene ParE	Gene GyrA	Gene GyrB	MIC	ATB	Gene AadA	Gene AadB	MIC	ATB	Gene AmpC	Gene BlaCMY
RM/SC	3927	<i>S. Typhimurium</i>	S	S	P	P	P	P	S	S	N	N	S	S	P	N
SA/PR	4950	<i>S. Typhimurium</i>	S	S	P	P	P	P	R	R	N	P	R	R	P	N
SA/PR	16307	<i>S. Typhimurium</i>	S	S	P	P	P	P	R	R	N	N	S	S	N	N
SA/PR	18357	<i>S. Typhimurium</i>	S	S	P	N	P	P	R	R	P	N	S	S	N	N
SA/PR	18759	<i>S. Typhimurium</i>	S	S	P	P	P	P	R	R	P	N	S	S	N	P
SA/PR	18760	<i>S. Typhimurium</i>	S	S	P	P	P	P	S	S	N	N	S	S	N	P
SA/PR	24216	<i>S. Typhimurium</i>	S	S	N	P	P	P	S	S	N	N	S	S	P	N
SA/PR	24513	<i>S. Typhimurium</i>	S	S	P	P	P	P	R	R	P	N	R	R	P	N
RM/PR	27027	<i>S. Enteritidis</i>	S	S	P	P	P	P	R	S	N	N	S	S	P	N
SC/PR	30064	<i>S. Typhimurium</i>	R	R	P	P	P	P	S	S	N	N	R	S	P	P
RI/PR	35574	<i>S. Enteritidis</i>	R	S	P	P	P	P	R	S	P	N	R	R	P	N
SA/SC	39033	<i>S. Typhimurium</i>	S	S	P	P	N	P	R	S	N	N	S	S	P	N
SA/PR	41465	<i>S. Typhimurium</i>	R	R	P	P	P	P	S	S	N	N	S	S	N	N

Legenda: RM – Ração matriz; SA- Suabe de arrasto; SC – Suabe de cloaca; RI – Resíduo de incubação; SC – Santa Catarina; PR – Paraná; S – Amostras sensíveis; R – Amostras resistentes; P – Presença do gene; N – Ausência do gene.

Fonte: o autor

Os resultados de p-valor para Enrofloxacina foram de 1, para o MIC e Antibiograma. Já o Ceftiofur teve p-valor de 0,2937 para o MIC e p-valor 0,4196 no Antibiograma. Os p-valores obtidos foram maiores do que o valor de significância  $\alpha$  que era de 0,05, mostrando que a presença ou ausência do gene de resistência não interfere na resposta fenotípica para o MIC e Antibiograma. Isso significa que os desvios não são significativos e as variáveis são independentes, se há associação entre as variáveis isso é devido ao acaso.

Para Gentamicina os p-valores observados foram de 0,043 para o MIC e de 0,031 para o Antibiograma. Valores esses menores que a significância  $\alpha$  de 0,05, demonstrando que os desvios são significativos, e as variáveis são dependentes entre si.

A análise estatística completa para o teste exato de Fisher está no apêndice D.

Já com relação à análise de sensibilidade e especificidade dos testes, os resultados estão demonstrados na Tabela 7. Pôde-se observar que os resultados obtidos com o antimicrobiano Gentamicina estão próximos ao esperado, pois estes testes devem ser altamente sensíveis e específicos. O que não se observa na Enrofloxacina e Ceftiofur.

Tabela 7 - Análise de sensibilidade e especificidade das metodologias MIC e Antibiograma para os antimicrobianos Ceftiofur, Gentamicina e Enrofloxacina.

	MIC		Antibiograma	
	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade
Ceftiofur	0,4	1	0,3	1
Gentamicina	1	0,62	0,8	0,87
Enrofloxacina	0,23	0	0,15	0

Fonte: o autor

### 3.3.7 Sequenciamento

A confirmação da identidade dos fragmentos foi realizada através do programa de bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), as sequencias obtidas tiveram 99% de identidade para o gene GyrA da Enrofloxacina e 98% para o gene AadA da Gentamicina conforme está demonstrado no apêndice E. Os resultados obtidos demonstram a fidelidade da transcrição e a especificidade dos oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (primers).

### 3.4 DISCUSSÃO

As bactérias de origem animal podem atingir a população humana e outros animais de várias formas: contaminação de fontes hídricas, contaminações no abate, efluentes de granjas e outros. Isto se torna particularmente importante com bactérias entéricas (VAZ, 2009). As *Salmonellas* sp. podem ser isoladas dos mais diferentes locais, como carcaças, ambiente, suabes de arrasto, alimentos, entre muitos outros (RIBEIRO et al., 2008).

O surgimento da resistência antimicrobiana nas bactérias zoonóticas tem importante implicação na saúde pública. Dados de diversos pesquisadores sugerem que a seleção inadequada e o abuso no uso dos antimicrobianos pode levar a resistência a várias bactérias, que podem atingir o consumidor através de produtos de origem animal (RIBEIRO et al., 2011). Estudos realizados por Johnson et al. (2007) em Minnesota e Wisconsin, demonstraram através de análise filogenética em isolados de *E. coli* oriundos de humanos e aves, que os isolados humanos resistentes aos antimicrobianos testados, provavelmente tiveram origem aviária, ou de reservatórios semelhantes que não humanos. Dessa forma, o monitoramento da resistência fenotípica e genotípica aos antibióticos em espécies de *Salmonella* sp. isoladas de animais produtores de alimentos é importante para a proteção da saúde humana e animal (SAN MARTIN, et al., 2005; RIBEIRO et al., 2011).

As cefalosporinas de terceira geração, além de serem utilizadas para o tratamento de infecções por *Salmonella* sp. em animais, também são utilizadas para o tratamento dessas principalmente em crianças (FRYE; CRAY, 2007). Esses mesmos autores relatam a crescente preocupação global em função do aparecimento de cepas multirresistentes. Frye e Cray (2007) avaliaram isolados de *Salmonella* sp. por um período de cinco anos, observaram que a resistência ao Cefotiofur passou de 4% em 1999 para 18% em 2003. No entanto o Ceftriaxone, uma cefalosporina de terceira geração para o tratamento de humanos, manteve-se em 0,3% de resistência. Os isolados de *S. Typhimurium* foram responsáveis por 23,5% das resistências observadas, valores esses muito próximos aos encontrados neste estudo, onde observamos 27,2% de resistência no MIC e 18,1% no antibiograma. Já os isolados de *S. Enteritidis* tiveram apenas 2,1% de resistência, muito diferente do que encontramos, 50% de resistência (Tabela 4 e Tabela 5).

O elemento genético responsável pela maior parte da resistência ao Cefotiofur em *Salmonellas* sp. isoladas a partir de animais nos EUA parece ser o gene *BlaCMY*, pois de acordo com Frye e Cray (2007), eles conseguiram isolar esse gene dos plasmídeos das cepas de *Salmonella* sp. resistentes, inferindo dessa forma que o aumento da resistência está

relacionado a passagem do gene através do plasmídeo entre os diferentes sorotipos de *Salmonella* sp. Essa mesma constatação foi relatada por Alcaine et al. (2005), onde os dezenove isolados resistentes ao Ceftiofur carregavam o gene BlaCMY. No entanto, dos isolados estudados por Frye e Cray (2007), 17% dos resistentes não tiveram o gene BlaCMY ou algum dos outros genes  $\beta$ -lactamases resistentes detectado através do PCR, levantando uma preocupação de que outros mecanismos não detectados estão associados a resistência ao Ceftiofur.

Os resultados obtidos neste estudo, no entanto, mostraram que todas as amostras resistentes, tanto no MIC como no antibiograma, apresentaram pelo menos um dos genes de resistência (Tabela 6).

Rodríguez et al. (2009) demonstrou que nos 22.279 isolados alemães de *Salmonella*, a presença de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos ainda foi reduzida, apenas 26 amostras apresentaram resistência, sendo que destas apenas 6 amostras tinham o gene BlaCMY, as demais apresentaram outros dos genes que podem ser responsáveis pela resistência a antimicrobianos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Allen e Poppe (2002) no Canadá, de 8426 isolados apenas 8 (0,1%) apresentaram produção de  $\beta$ -lactamases resistentes, sendo que todos os isolados apresentaram resistência ao Ceftiofur e tiveram a presença do gene BlaCMY detectada em seu plasmídeo.

No entanto estudos realizados por Peirano et al. (2006) no Brasil, mostram que o número de isolados de *Salmonella* sp. resistentes ao Ceftiofur foi de 16,3%, sendo que destes apenas 13,6% apresentavam o gene BlaCMY, os demais tinham outros genes que podem ser responsáveis pela resistência. Com relação aos isolados de *S. Typhimurium* nenhum apresentou resistência ao Ceftiofur. Resultados esses semelhantes aos encontrados por Borsoi (2005), porém com isolados de *S. Enteritidis*, onde 100% dos isolados foram sensíveis ao Ceftiofur.

De acordo com Winokur et al.(2000) a identificação de dois isolados de *Salmonella* sp.resistentes a cefalosporinas, carregavam o gene BlaCMY no plasmídeo. Desses isolados um era de humano e outro de bovino e através de avaliação epidemiológica e PFGE, observaram padrões semelhantes sugerindo que a resistência da *Salmonella* foi transmitida a partir de alimentos de origem animal para humanos.

Essa preocupação também é relatada por Allen e Poppe (2002) que através de seus estudos sugerem que reservatórios microbianos contendo o gene BlaCMY podem ser selecionados e mantidos através da utilização de Ceftiofur. No entanto, não foi possível

determinar se a utilização de Ceftiofur ou pressões de seleção foram os responsáveis para o aparecimento da resistência nos estudos realizados por eles.

Rodríguez et al. (2009) levantam a mesma preocupação, dos isolados encontrados que carregavam o gene *BlaCMY*, o mesmo estava localizado nos plasmídeos, sugerindo o aparecimento de novas cepas resistentes, haja visto que este foi encontrado tanto em isolados de animais saudáveis como doentes, além de casos clínicos de humanos.

Com relação aos isolados sensíveis mas que apresentam o gene, Alberts et al. (2007) comentam que só porque uma bactéria tem o gene de resistência a um antibiótico, não significa que o gene irá se expressar.

Além da preocupação com a emergência da resistência às cefalosporinas, outro ponto importante é a resistência aos aminoglicosídeos, especialmente à Gentamicina.

Ribeiro et al. (2008) comparando amostras de *S. Enteritidis* isoladas de aves ou de ambiente, entre os anos de 1999 e 2001, observaram um aumento de 15,6% para 42,1% de resistência à Gentamicina na região sul do Brasil. Resultados que diferem dos encontrados neste estudo, onde não foi detectado resistência no antibiograma, mas foi observado 100% de resistência no MIC (Tabela 4 e Tabela 5).

Cardoso et al. (2006) também não detectaram resistência de cepas de *S. Enteritidis* isoladas de carcaça de frangos à Gentamicina, assim como Borsoi (2005) também não detectou presença de resistência em isolados de *Salmonella* sp. Porém, Silva e Duarte (2002) demonstraram que os isolados de *S. Enteritidis* apresentaram resistência de 63,5% a pelo menos um ou dois antimicrobianos, sendo a resistência à Gentamicina de 2,1%. Valores muito semelhantes aos encontrados por Vaz (2007) onde os isolados provenientes de órgãos de aves apresentaram 5,2% de resistência.

As diferenças entre os resultados nos mais diversos estudos, podem ser explicadas devido a vários fatores, como diferenças de origem, período de tempo de coleta e procedimentos de amostragem (CARDOSO et al., 2006).

Com relação às cepas de *S. Typhimurium*, Medeiros (2006) encontrou em isolados principalmente de alimentos e animais, 12,4% de resistência à Gentamicina, resultados esses que diferem dos encontrados neste estudo onde foi verificado 45,4% de resistência no antibiograma e 54,5% no MIC (Tabela 4 e Tabela 5).

Akhtar et al. (2010) avaliando isolados de *S. Enteritidis* de humanos e aves, observou no antibiograma 78,5% de resistência a Gentamicina (10 µg), já na avaliação de diferentes concentrações desse antimicrobiano, a resistência para 50 µg foi de 7,1%.

A análise genotípica dos isolados resistentes à Gentamicina mostrou a presença do gene AadA em praticamente todos, exceto uma amostra que apresentou o gene AadB, porém duas amostras resistentes no MIC não possuíam nenhum dos genes de resistência pesquisados, assim como uma amostra sensível no antibiograma possuía o gene de resistência (Tabela 6).

Esses resultados são semelhantes aos observados por Peirano et al. (2006), onde dos 116 isolados resistentes a pelo menos um dos seis aminoglicosídeos testados, 44 apresentavam o gene AadA. Além desse gene também foram detectados os genes aac(3)-IIa, aac(3)-IV e ant(2)-Ia, que podem conferir resistência à Gentamicina. Porém, três isolados resistentes à Gentamicina não apresentavam nenhum dos quatro genes citados acima. Ainda de acordo com esses autores, genes responsáveis pela resistência à Vancomicina, poderiam estar codificando resistência a Gentamicina.

Ribeiro et al.(2011) obteve resultados semelhantes aos encontrados nestes estudo e por Peirano et al. (2006), onde não se conseguiu relacionar fenótipo e genótipo. Isolados de *S. Typhimurium* carregavam o gene AadA, mas eram susceptíveis aos aminoglicosídeos, o que de acordo com esses autores mostra que a falta de expressão destes genes sugere que, para além do ambiente e do genótipo, a expressão é dependente de um promotor a montante. Já a ausência do gene e apresentando resistência fenotípica, pode estar relacionada a outros mecanismos que precisam ser melhor estudados.

Silva (2011) avaliando a resistência de 44 cepas de *Salmonella* sp. oriundas de produtos avícolas, observou que a resistência apresentada pelos aminoglicosídeos testados, tinha como principais responsáveis a presença dos genes AadA e AadA1.

A presença e a preocupação com a multirresistência aos antimicrobianos também foi relatada por Ribeiro et al. (2011), onde a presença dos genes AadA-Sul1-Sul2- BlaTEM-1, conferindo resistência aos aminoglicosídeos, sulfanamidas e cefalosporinas foi encontrada com frequência nos isolados de *Salmonella* sp. pesquisados.

Essa mesma preocupação foi levantada por Silva (2011) onde foi verificado que dentre as 47 cepas de *Salmonella* sp. resistentes a fluoroquinolonas, 31 apresentavam co-resistência a cefalosporinas de amplo espectro, caracterizando fenótipos multirresistentes.

Os resultados obtidos neste estudo também apresentarem multirresistência aos três antimicrobianos testados, sendo que a resistência à Enrofloxacina no MIC e antibiograma mostrou-se relativamente um pouco mais baixa que os demais (23% e 15,3%). No entanto o que chama atenção é a presença dos genes de resistência presentes em todas as amostras, tanto nas resistentes como nas sensíveis aos testes fenotípicos (Tabela 6).

O percentual de resistência à Enrofloxacina para isolados de *S. Enteritidis* encontrado por Ribeiro et al. (2008) foi de 5,9%, muito semelhantes aos relatados por Cardoso et al. (2006) que obtiveram resultados e 3,7%. Os resultados obtidos nesta pesquisa, no entanto, mostraram 50% no MIC e no antibiograma não houve resistência (Tabela 4 e Tabela 5).

No entanto, Borsoi (2005) encontrou em cepas de *Salmonella* sp. isoladas de carcaças de frango, valores de resistência bastante altos, 69,2%, assim como os encontrados por Ribeiro et al. (2011) que foram de 15%, sendo que estes ainda detectaram que nesses isolados, 55% apresentaram mutações no gene GyrA. Constatação que também foi feita por Giraud et al., (1999) onde analisando *S. Typhimurium* altamente resistente às fluorquinolonas, encontraram alterações somente no gene GyrA.

San Martin et al.(2005) avaliando 39 amostras de *Salmonella* sp., não encontraram resistência à Enrofloxacina. De acordo com esses autores a resistência fenotípica para este antimicrobiano só ocorre quando há mutação dupla no gene GyrA, mutações simples conferem resistência somente ao Ácido Nalidíxico, o que pode ser uma explicação para os isolados deste estudo que possuem o gene GyrA, porém não manifestam fenotipicamente (Tabela 6).

A presença de amostras resistentes sem a presença do gene GyrA, GyrB, ParA e ParC, pode estar relacionada a outros mecanismos, como a superexpressão das bombas de efluxo ou pela modificação da permeabilidade da membrana através de alterações nas porinas (SAN MARTIN et al., 2005; ROBICSEK et al., 2006). O que não é demonstrado nesse estudo, pois todas as amostras que apresentaram resistência fenotípica possuíam os genes de resistência.

Há hipóteses de que a introdução de fluorquinolonas na terapêutica veterinária pode ter contribuído para o surgimento de resistências em bactérias que também causam infecções humanas. Poucos casos de falha no tratamento de salmonelose devido à resistência às fluoroquinolonas tem sido relatada, mas o número crescente de cepas resistentes é uma preocupação. Os animais podem constituir um reservatório de cepas resistentes com mutações iniciais no gene GyrA que poderia persistir e adquirir mecanismos de resistência adicionais sobre exposição posterior à fluorquinolonas (GIRAUD et al., 1999).

Com relação aos resultados da análise através do teste exato de Fisher observou-se que para a Enrofloxacina e Ceftiofur, os valores não eram os esperados, pois a dependência entre as variáveis (sensível, resistente, presença ou ausência do gene) deveria existir. No entanto esses resultados vão de encontro ao que Alberts et al. (2007) comentam sobre a presença do gene e a não expressão pelas bactérias.

Todavia, essa afirmação não ocorre com o antimicrobiano Gentamicina, nesse caso os valores mostram que a presença ou ausência do gene de resistência interfere na resposta fenotípica para o MIC e Antibiograma.

Na análise de sensibilidade e especificidade das metodologias, pode-se observar que os resultados obtidos com o antimicrobiano Gentamicina estão próximos ao que se espera, testes devem ser altamente sensíveis e específicos (GIOLO,2012). O que não se observa na Enrofloxacina e muito pouco no Ceftiofur (Tabela 7). Esses resultados vão de encontro ao que foi observado no teste exato de Fisher, demonstrando que o antimicrobiano Gentamicina foi o que obteve resultados próximos ao esperado.

Com relação ao sequenciamento os resultados obtidos que posteriormente foram analisados no BLAST, demonstram a fidelidade da transcrição e a especificidade, esses resultados foram fidedignos tanto para os genes GyrA como AadA.

A preocupação com relação ao crescente número de cepas de *Salmonella* sp. multirresistentes é problemática, haja visto que muitos dos antimicrobianos utilizados na avicultura também são utilizados para o tratamento em humanos. Além disso, há a preocupação com o próprio controle medicamentoso na avicultura industrial, pois esse aumento de multirresistência levanta o questionamento de que em breve os princípios ativos disponíveis não serão mais eficientes para o controle dessas bactérias.

Uma alternativa para a redução dos lotes positivos para *S. Enteritidis* é o uso de vacinas inativadas em reprodutoras e poedeiras comerciais, que tem se mostrado uma ferramenta importante no controle de *S. Enteritidis*. No entanto, o procedimento mais indicado para o controle de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* na avicultura está na aquisição e produção de lotes livres do agente.

Code e Duarte (2002) comentam que a grande resistência com relação ao controle dessas salmoneloses é porque elas têm pouco ou nenhum impacto na produtividade das granjas, os programas de erradicação são complexos e tem custo elevado e também porque há pouca consciência de que a erradicação nas granjas causará redução dos surtos humanos.



#### 4 CONCLUSÃO

É possível concluir com os resultados obtidos neste trabalho que para Gentamicina foi observada uma correlação entre o caráter fenotípico e genotípico, mas o mesmo não pode ser dito em relação à Enrofloxacin e Ceftiofur uma vez que nem sempre foi observada a resistência fenotípica, mesmo as amostras apresentando o gene de resistência.

De forma prática, estes resultados indicam ainda a necessidade de cautela na hora de decidir qual o tratamento a ser adotado, devendo-se avaliar os resultados das análises fenotípicas, principalmente o MIC por ser considerado mais específico, do que os resultados genotípicos. No entanto os resultados genotípicos também possuem relevância pois os resultados obtidos mostram que as Salmonelas de origem avícola apresentam a informação genética necessária para tornarem-se resistentes aos três antimicrobianos mais utilizados na avicultura brasileira no futuro, apresentando um risco para a área veterinária, e em menor grau para a área humana. Vale salientar a necessidade de pesquisas e desenvolvimento de novas drogas e de medidas regulatórias para evitar o uso indiscriminado dos antimicrobianos.

## 5 REFERÊNCIAS

### 5.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

AKHTAR, F. et al. Prevalence and Antibiogram Studies of *Salmonella* Enteritidis Isolated from Human and Poultry Sources. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 30, n.1, p. 25-28, 2010.

ALBERTS, B. et al. Controle da Expressão Gênica. In: ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 375-466.

ALCAINE, S. D. et al. Ceftiofur-Resistant *Salmonella* Strains Isolated from Dairy Farms Represent Multiple Widely Distributed Subtypes That Evolved by Independent Horizontal Gene Transfer. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 10, 2005.

ALLEN, K.; POPPE, C. Occurrence and characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins mediated by beta-lactamase CMY-2 in *Salmonella* isolated from food-producing animals in Canada. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 3, p. 137-144, 2002.

ALTERTHUM, F. Crescimento Bacteriano. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 31-36.

BLAST, Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: <[www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)>. Acesso em: 01 de julho de 2012.

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

BORSOI, A. et al. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profile, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis pattern to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v. 88, p. 750-758, 2009.

BORSOI, A. **Ocorrência, Contagem e Resistência Antimicrobiana de Salmonella Isoladas de Carcaças de Frangos Resfriadas e Pesquisa de Salmonella em Galpões de Frangos de Corte**. 2005. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

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.

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

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

CODE, C; DUARTE, A. Salmonella Enteritidis em Aves : Retrospectiva no Brasil. Revista Brasileira de Ciência Avícola, v. 4, n. 2, p.85-100, 2002.

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**, v.48, n.10, p. 4012-4015, 2004.

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

GIOLO, S. R. **Introdução à Análise de Dados Categóricos com Aplicações**, 2012. Disponível em: <www.ufpr.br/~giolo>. Acesso em: 02 jun. 2012.

GIRAUD, E. et al. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- and in vivo-selected mutants of Salmonella spp. suggest a counter selection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 9, p. 2131-2137, 1999.

GUERRA, B. Antimicrobial Resistance and Spread of Class 1 Integrons among *Salmonella* Serotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 8, 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.

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

PEIRANO, G. et al. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among Salmonella enterica from Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 305-309, 2006.

PÉREZ-PÉREZ, F. J; HANSON, N.D. Detection of Plasmid-Mediated AmpC -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p.2153-2162, 2002.

RANDALL, L. P. et al. Detection of mutations in Salmonella enterica GyrA, GyrB, ParC and ParE genes by denaturing high performance liquid chromatography(DHPLC) using standard HPLC instrumentation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, 2005.

RIBEIRO, A. R. et al. Resistência antimicrobiana em Salmonella Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, 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**, v. 42, 2011.

ROBICSEK, A. et al. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 10, p. 629-640, 2006.

RODRÍGUEZ, I. et al. Extended-spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases in Ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. 301-309, 2009.

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.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

SILVA, K. C. **Monitoramento dos mecanismos de resistência em *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de animais de produção agropecuária e alimentos derivados.** 2011. 84 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

TAVARES, K. C. S. **Biosíntese de Selenocisteína em *Trypanosoma evansi*.** 2011. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2011.

VAZ, C. S. L. **Determinação da Diversidade Fenotípica e Genotípica de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul.** 2007. 137 p. Tese (Doutorado Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

WINOKUR, P. et al. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant salmonella isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2777-2783, 2000.

## 5.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCAINE, S. D. et al. Ceftiofur-Resistant *Salmonella* Strains Isolated from Dairy Farms Represent Multiple Widely Distributed Subtypes That Evolved by Independent Horizontal Gene Transfer. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 10, 2005.
- ALEKSHUN, M.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037-1050, 2007.
- ALTERTHUM, F. Crescimento Bacteriano. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 31-36.
- AMSON, G.V. et al. Levantamento de Dados Epidemiológicos Relativos à Ocorrências/Surtos de Doenças Transmitidas por Limentos (DTAS) no Estado do Paraná – Brasil, no Período de 1987 a 2000. **Ciências Agrotécnicas**, v. 30, n. 6, 2006.
- ANDRADE, D. F.; OGLIARI, P. J. Testes de hipóteses sobre os parâmetros. In: \_\_\_\_\_. **Estatística para Ciências Agrárias e Biológicas**: com noções de experimentação. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 333-400.
- ANDREATTI FILHO, R. L. Prevenção de doenças: biossegurança em avicultura. In: \_\_\_\_\_. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Roca, 2006. p. 2-8.
- BACK, A. **Manual de Doenças de Aves**. Cascavel, 2002. 246p.
- BAUMLER, A.J. et al. Tracing the origins of Salmonella Outbreaks. **Science**, v. 287, p. 50-52, 2000.
- BERCHIERI JUNIOR, A. Salmoneloses Aviárias. In: BERCHIERI JUNIOR, A; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 185-194.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; OLIVEIRA, G. H. Salmoneloses Aviárias. In: ANDREATTI FILHO, R. L. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Roca, 2006. p. 84-111.
- 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.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/busca>>. Acesso em: 17 maio 2012.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Instrução Normativa número 78. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 17 maio 2012.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Instrução Normativa número 62. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 17 maio 2012.

- BRASIL. **Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)**. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_epidemiologicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos.pdf)>. Acesso em: 20 maio 2012.
- BRENNER, F. W. et al. Salmonella nomenclature. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2465-2467, 2000.
- BYARUGABA, D. K. Antimicrobial Resistance in Developing Countries. **Springer Science**, 2009. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-89370-9>>. Acesso em: 17 jun. 2012.
- CAMPOS, L. C. Salmonella. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2005. 4. ed. p. 319-328.
- CARRASCO, E. et al. Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods : A review. **Food Research International**, v. 45, p. 545-556, 2012.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/general/>>. Acesso em: 17 maio 2012.
- De BUCK, J. et al. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by Salmonella. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 233-245, 2004.
- DONALDSON, S. C. et al. Molecular Epidemiology of Ceftiofur-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Dairy Calves. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3940-3948, 2006.
- 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**, v.48, n.10, p. 4012-4015, 2004.
- 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.; FEDORKA-CRAY, P. J. Prevalence, distribution and characterization of Ceftiofur resistance in Salmonella enterica isolated from animals in the USA from 1999 to 2003. **Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 134-142, 2007.
- GIOLO, S. R. **Introdução à Análise de Dados Categóricos com Aplicações**, 2012. Disponível em: <[www.ufpr.br/~giolo](http://www.ufpr.br/~giolo)>. Acesso em: 02 jun. 2012.
- GIRAUD, E. et al. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- and in vivo-selected mutants of Salmonella spp. suggest a counter selection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 9, p. 2131-2137, 1999.

- GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. Pathogenesis of enteric Salmonella infections. **Curr Opin Gastroenterology**, v. 24(1), p. 22-6, 2008.
- GUERRA, B. Antimicrobial Resistance and Spread of Class 1 Integrons among *Salmonella* Serotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 8, 2000.
- GUERRA, B. et al. Characterization of a Self-Transferable Plasmid from *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Clinical Isolates Carrying Two Integron-Borne Gene Cassettes Together with Virulence and Drug Resistance Genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 9, 2002.
- GUIMARÃES, G. S. Sequenciamento de DNA. In: CARVALHO, C.V. et al. **Guia de Práticas em Biologia Molecular**. São Caetano do Sul: Yendis, 2010. p. 133-144.
- HAKANEN, A. J. et al. New Quinolone Resistance Phenomenon in *Salmonella enterica*: Nalidixic Acid-Susceptible Isolates with Reduced Fluoroquinolone Susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5775-5778, 2005.
- HENSEL, M. et al. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. **Science**.v.269, p.400–403, 1995.
- HOOPER, D. C. Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 337-341, 2001.
- HOPKINS, K. et al. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 5, p. 358-373, 2005.
- JACOBY, G. A. AmpC  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 161-182, 2009.
- 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**, v. 7(3), 2005.
- KELLEY, T. R. et al. Antibiotic Resistance of Bacterial Litter Isolates. **Poultry Science**, v.77, 1998.
- KONEMAN, W. et al. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5. ed. New York: Lippincott, 1997. 1395 p.
- LETTINI, A. A; RICCI, A. Using molecular biology in the diagnosis of avian Salmonellosis. Future and prospects. **OIE Reference Laboratory for Salmonella**, Instituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 2010.
- 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.
- MACDONALD, M. D. K. L. et al. Changes in Antimicrobial Resistance of Salmonella Isolated From Humans in the United States. **JAMA**. v. 258, n.11, 1987.

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

NADVORNY, A. et al. Ocorrência de *Salmonella sp* em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos do Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n.1, 2004.

NASCIMENTO, V.P. et al. Exigências internacionais na qualidade microbiológica da carne de frangos para exportação. In: SIMPÓSIO BRASIL-SUL DE AVICULTURA, 2012, Chapecó. **Anais...** Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários, 2012. p. 33-38.

OLSEN, J.E. et al. M. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p. 826-835, 2003.

PEIRANO, G. et al. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 305-309, 2006.

PÉREZ-PÉREZ, F. J; HANSON, N. D. Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p.2153-2162, 2002.

POMEROY, B. S.; NAGARAJA, K.V. Fowl Tiphoid. In: CALNEK, B.W. **Disease of Poultry**. 9. ed. Iowa: Iowa University Press, 1991. p. 87-99.

POPOFF, M.Y. et al. Supplement 2001 (no 45) to the Kauffmann –White scheme. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 173-174, 2003.

POPPE, C. Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. In: SAEED, A.M.; GAST, R.K.; POTTER, M.E.; WALL, P.G. **Salmonella enterica Serovar Enteritidis in humans and animals: epidemiology, pathogenesis and control**. Iowa State University Press, 1999. p. 3-18.

POPPE, C.; DUNCAN, C. L.; MAZZOCCO, A. *Salmonella* Contamination of Hatching and Table Eggs: A Comparison. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 62, p. 191-198, 1998.

QUINN, P. J. et al. Agentes Antimicrobianos. IN: QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 43-49.

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

RISTOW, L. E. Salmonelose aviária. **Jornada do conhecimento Teca Avicultura**. 2010. Disponível em:

<<http://www.teca.com.br/media/file/pdfs/DICAS%20DA%20SEMANA/AVICULTURA%202010/SALMONELOSE%20AVI%C3%81RIA.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2011.



ROBICSEK, A. et al. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 10, p. 629-640, 2006.

ROSTAGNO, M. Uso de antibióticos na avicultura. Avicultura Industrial. Disponível em: <[http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticias/antimicrobianos-em-aves/20100329111520\\_J\\_005-](http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticias/antimicrobianos-em-aves/20100329111520_J_005-)>. Acesso em: 23 maio 2012.

RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA Gyrase protection. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p. 1109-1117, 2003.

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.

SANTA CATARINA. Vigilância Epidemiológica do Estado de Santa Catarina. Disponível em: <[http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php?option=com\\_content&task=view&id=927&Itemid=605](http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=927&Itemid=605)>. Acesso em: 22 maio 2012.

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: 30 maio 2012.

SCHWARZ, S. et al. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.17, p. 431-437, 2001. selection. **Science**, v. 269, p. 400-403, 1995.

SESTI, L. C. A. Biossegurança em granjas de frango de corte: conceitos e princípios gerais. In: SIMPÓSIO BRASIL-SUL DE AVICULTURA, 2004, Chapecó. **Anais...** Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários, 2004. p. 55-72.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. Salmonella Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

SILVA, K. C. **Monitoramento dos mecanismos de resistência em Salmonella spp. e Escherichia coli isoladas de animais de produção agropecuária e alimentos derivados**. 2011. 84 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

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.

SNOEYENBOS, G. H.; WILLIAMS, J.E. Salmonellosis. In: CALNEK, B.W. **Diseases of Poultry**. 9. ed. Iowa: Iowa University Press, 1991. p. 72-73.

SOTO, S. et al. In vitro fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: analysis of mechanisms involved in resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 5, p. 537-540, 2003.

SPINOSA, H. S. Antibióticos: Aminoglicosídeos, Polimixinas, Bacitracina e Vancomicina. In: SPINOSA, H. S et al. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 473-476.

TAVECHIO, A. T. et al. Salmonella serotypes isolated from non-human sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 6, p. 1041-1044, 2002.

THRELFALL, E. J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food and water-borne infections. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, 2002.

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 2010/2011.

VAZ, E. K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37 n.1, 2009.

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

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, p. 775-781, 2000.

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, 2005. p. 75-81.

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**, 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.

## 6 APÊNDICES

## APÊNDICE A - Tamanho dos halos dos antimicrobianos

Tabela 8 - Tamanho dos halos de inibição dos antimicrobianos testados.

Antimicrobiano	Resistente (mm)	Intermediário (mm)	Sensível (mm)
Ceftiofur	$\leq 17$	18-20	$\geq 21$
Enrofloxacina	$\leq 16$	17-20	$\geq 21$
Gentamicina	$\leq 12$	13-14	$\geq 15$

Fonte: CLSI, 2008.

## APÊNDICE B - Condições para a reação da PCR

Tabela 9 – Concentrações dos reagentes e condições do termociclador para a realização da PCR para os genes testados.

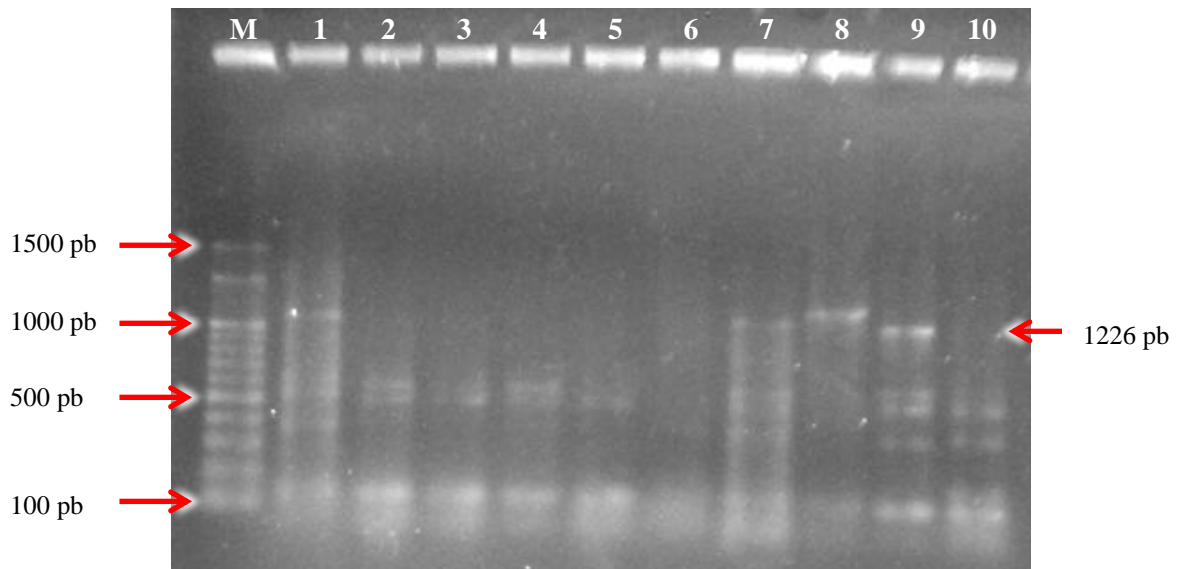
Genes	Concentrações de reagentes	Condições do termociclador	Ciclos
<b>AadA</b>	1µL Tampão 10x, 0,8µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,15µL Taq Polimerase, 0,5µL MgCl <sub>2</sub> (4mM), 2µL DNA	95°C-5min;95°C-60s; 62°C-60s; 72°C-60s; 72°C-15min	35
<b>AadB</b>	1µL Tampão 10x, 0,8µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,15µL Taq Polimerase, 0,5µL MgCl <sub>2</sub> (4mM), 4µL DNA	95°C-5min;95°C-60s; 62°C-60s; 72°C-60s; 72°C-15min	35
<b>GyrA</b>	1µL Tampão 10x, 0,8µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,15µL Taq Polimerase, 0,5µL MgCl <sub>2</sub> (4mM), 2µL DNA	95°C-5min;95°C-60s; 54°C-60s; 72°C-60s; 72°C-15min	35
<b>GyrB</b>	1µL Tampão 10x, 0,8µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,15µL Taq Polimerase, 0,5µL MgCl <sub>2</sub> (4mM), 2µL DNA	95°C-5min;95°C-60s; 54°C-60s; 72°C-60s; 72°C-15min	35
<b>ParC</b>	1µL Tampão 10x, 0,8µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,15µL Taq Polimerase, 0,5µL MgCl <sub>2</sub> (4mM), 2µL DNA	95°C-5min;95°C-60s; 54°C-60s; 72°C-60s; 72°C-15min	35
<b>ParE</b>	1µL Tampão 10x, 0,8µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,15µL Taq Polimerase, 0,5µL MgCl <sub>2</sub> (4mM), 2µL DNA	95°C-5min;95°C-60s; 54°C-60s; 72°C-60s; 72°C-15min	35
<b>BlaCMY-2</b>	1µL Tampão 10x, 0,8µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,15µL Taq Polimerase, 0,5µL MgCl <sub>2</sub> (4mM), 2µL DNA	95°C-9,5min;95°C-45s; 59°C-45s; 72°C-60s; 72°C-7min	40
<b>AmpC</b>	1µL Tampão 10x, 0,8µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,15µL Taq Polimerase, 0,5µL MgCl <sub>2</sub> (4mM), 2µL DNA	95°C-9,5min;95°C-45s; 59°C-45s; 72°C-60s; 72°C-7min	40

Fonte: o autor

## APÊNDICE C - Leitura dos géis de agarose

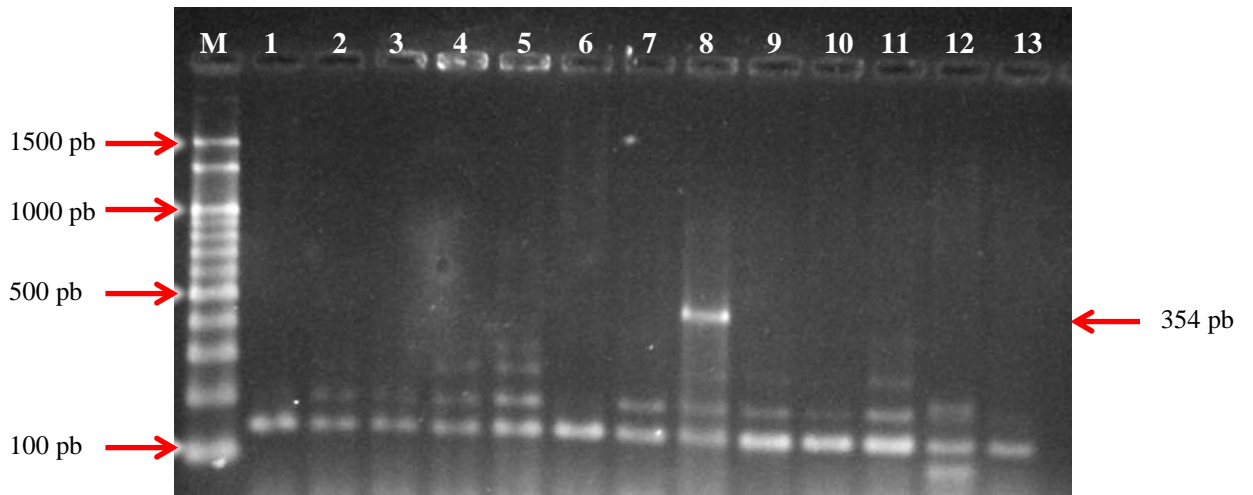
## 1- Resultados da PCR para o antimicrobiano Cefotiofur.

Figura 1 – Gel de agarose 1,5% mostrando a presença da banda para o gene AmpC (1226 pb).



Legenda: M – Marcador peso molecular de 100 pb. Amostras 1, 7 e 9 com presença do gene AmpC.

Figura 2 - Gel de agarose 2% mostrando a presença da banda para o gene BlaCMY (354 pb)



Legenda: M – Marcador peso molecular de 100 pb. Amostra 8 com presença do gene BlaCMY.

## 2 - Resultados da PCR para o antimicrobiano Enrofloxacina

Figura 3 - Gel de agarose 1,5% mostrando a presença da banda para o gene GyrA (251 pb).

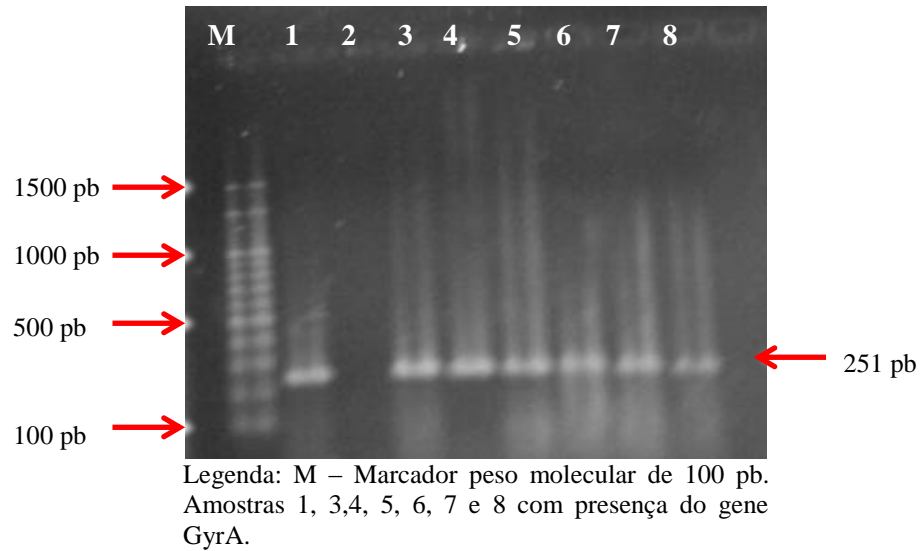


Figura 4 - Gel de agarose 1,5% mostrando a presença da banda para o gene GyrB (181 pb).

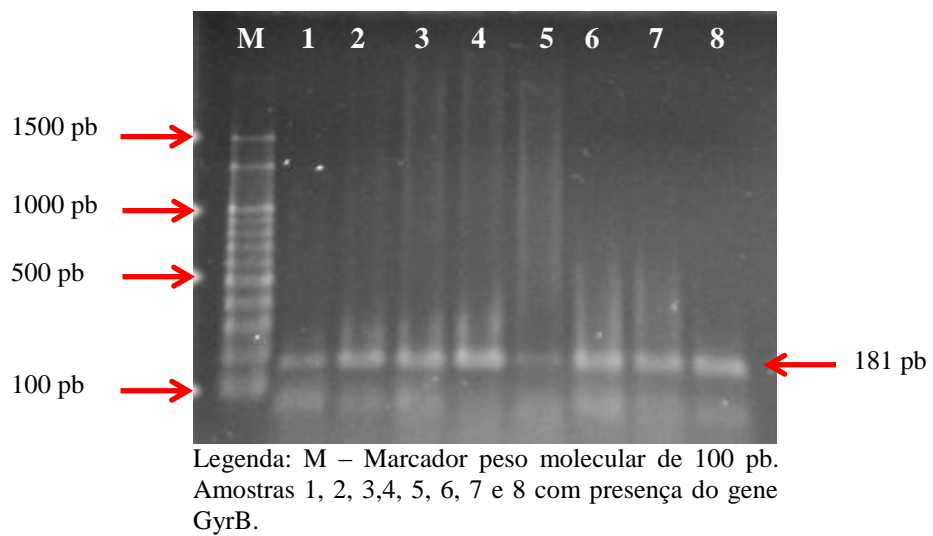


Figura 5 - Gel de agarose 1,5% mostrando a presença da banda para o gene ParC (260 pb).

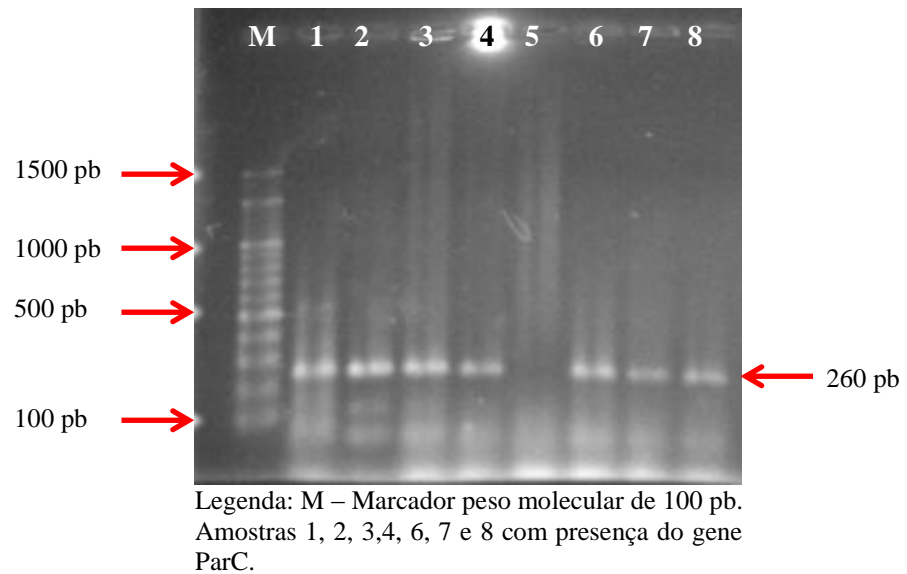
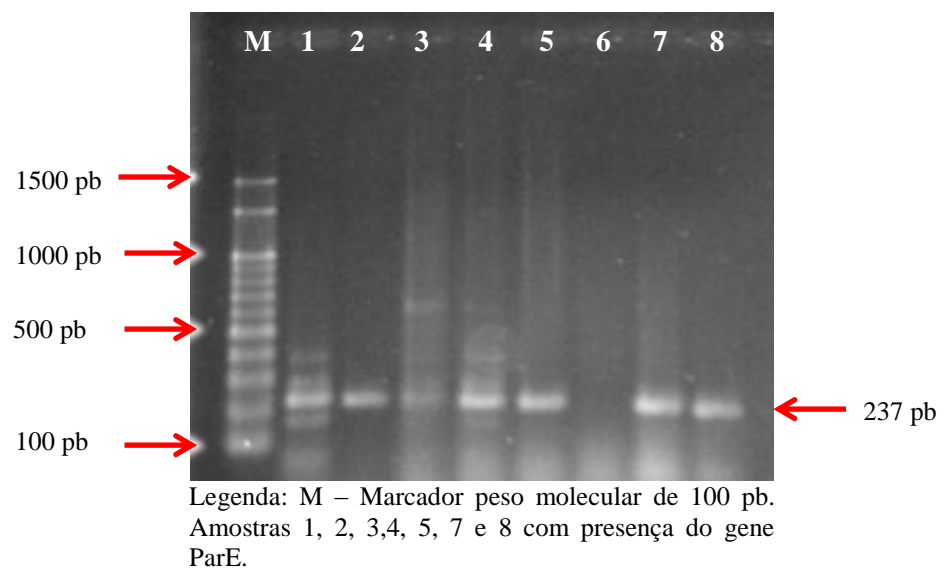


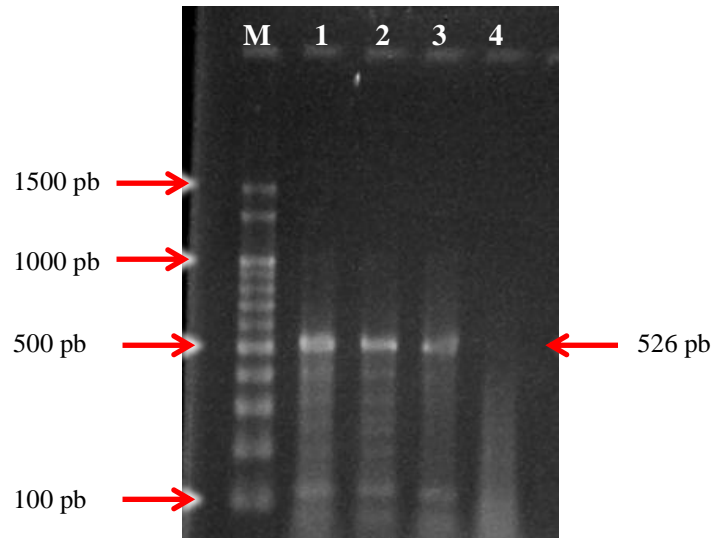
Figura 6 - Gel de agarose 1,5% mostrando a presença da banda para o gene ParE (237 pb).





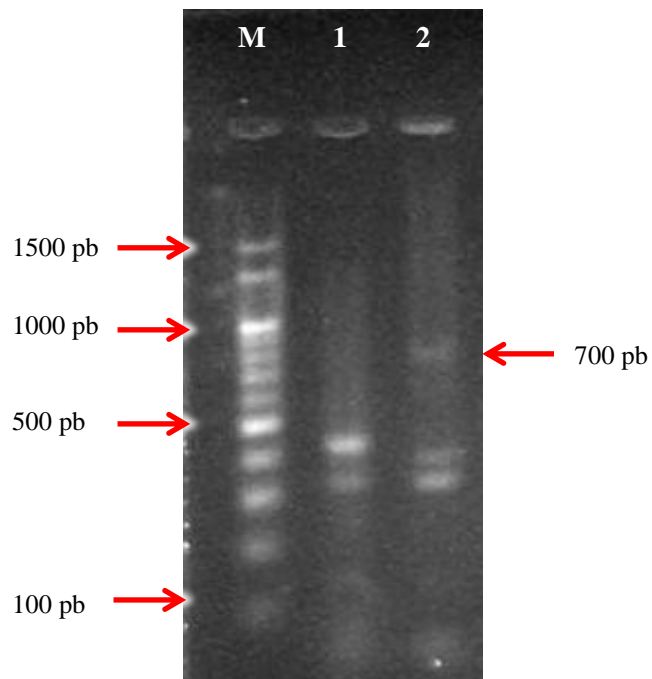
### 3 - Resultados da PCR para o antimicrobiano Gentamicina

Figura 7 - Gel de agarose 1,5% mostrando a presença da banda para o gene AadA (526 pb).



Legenda: M – Marcador peso molecular de 100 pb. Amostras 1,2, e 3 com presença do gene AadA.

Figura 8 - Gel de agarose 1,5% mostrando a presença da banda para o gene AadB (700 pb).



Legenda: M – Marcador peso molecular de 100 pb. Amostra 2 com presença do gene AadB.

APÊNDICE D - Resultados teste exato de Fisher através do programa estatístico R.

Tabela 10 – Análise do teste exato de Fisher para verificar dependência dos resultados do MIC com a presença ou ausência dos genes de resistência à Enrofloxacina.

MIC	Expressão Gênica		Total	p - valor
	Presença (Resistente)	Ausência (Sensível)		
Resistente	3	0	3	1,000
Sensível	10	0	10	
Total	13	0	13	

Valores maiores que o p-valor de 0,05 (nível de significância de 5%) não se rejeita a hipótese nula ( $H_0$ ), onde as variáveis analisadas são independentes.

Tabela 11 – Análise do teste exato de Fisher para verificar dependência dos resultados do Antibiograma com a presença ou ausência dos genes de resistência à Enrofloxacina.

Antibiograma	Expressão Gênica		Total	p - valor
	Presença (Resistente)	Ausência (Sensível)		
Resistente	2	0	2	1,000
Sensível	11	0	11	
Total	13	0	13	

Valores maiores que o p-valor de 0,05 (nível de significância de 5%) não se rejeita a hipótese nula ( $H_0$ ), onde as variáveis analisadas são independentes.

Tabela 12 - Análise do teste exato de Fisher para verificar dependência dos resultados do MIC com a presença ou ausência dos genes de resistência ao Cefotiofur.

MIC	Expressão Gênica		Total	p - valor
	Presença (Resistente)	Ausência (Sensível)		
Resistente	4	0	4	0,2937
Sensível	6	3	9	
Total	10	3	13	

Valores maiores que o p-valor de 0,05 (nível de significância de 5%) não se rejeita a hipótese nula ( $H_0$ ), onde as variáveis analisadas são independentes.

Tabela 13 - Análise do teste exato de Fisher para verificar dependência dos resultados do Antibiograma com a presença ou ausência dos genes de resistência ao Ceftiofur.

Antibiograma	Expressão Gênica		Total	p - valor
	Presença (Resistente)	Ausência (Sensível)		
Resistente	3	0	3	0,4196
Sensível	7	3	10	
Total	10	3	13	

Valores maiores que o p-valor de 0,05 (nível de significância de 5%) não se rejeita a hipótese nula ( $H_0$ ), onde as variáveis analisadas são independentes.

Tabela 14 - Análise do teste exato de Fisher para verificar dependência dos resultados do MIC com a presença ou ausência dos genes de resistência à Gentamicina.

MIC	Expressão Gênica		Total	p - valor
	Presença (Resistente)	Ausência (Sensível)		
Resistente	5	3	8	0,0435
Sensível	0	5	5	
Total	5	8	13	

Valores maiores que o p-valor de 0,05 (nível de significância de 5%) não se rejeita a hipótese nula ( $H_0$ ), onde as variáveis analisadas são independentes.

Tabela 15 - Análise do teste exato de Fisher para verificar dependência dos resultados do Antibiograma com a presença ou ausência dos genes de resistência à Gentamicina.

Antibiograma	Expressão Gênica		Total	p - valor
	Presença (Resistente)	Ausência (Sensível)		
Resistente	4	1	5	0,0319
Sensível	1	7	8	
Total	5	8	13	

Valores maiores que o p-valor de 0,05 (nível de significância de 5%) não se rejeita a hipótese nula ( $H_0$ ), onde as variáveis analisadas são independentes.

## APÊNDICE E - Sequência dos genes no BLAST

Figura 9 - Sequência do gene GyrA depositado no banco de dados públicos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica, NCBI, similaridade de 99%.

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Send for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AY302576.1</a>	Salmonella paratyphi isolate 11559-01 DNA gyrase subunit	470	470	64%	4e-129	100%
<a href="#">CP003416.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg str.	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">CP003386.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str.	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">CP003047.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum/pull	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">CP002614.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str.	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">CP002487.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str.	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">AP011957.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str.	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">FQ312003.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium SL	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">CP001363.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str.	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">FN424405.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str.	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">CP000857.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C str.	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">AE006468.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str.	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">AM933172.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str.	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">CP001144.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin str. CT_1	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">CP001138.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona str. SL48	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">FM200053.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str.	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">CP001120.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg str.	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">CP001112.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport str. SL	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">EU512997.1</a>	Salmonella typhimurium strain GJ0706-136 GyrA (gyrA) gene	464	464	64%	2e-127	99%
<a href="#">EU024687.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum str.	464	464	64%	2e-127	99%

Fonte: NCBI, 2012.

Figura 10 - Sequência do gene AadA depositado no banco de dados públicos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica, NCBI, similaridade de 98%.

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

<a href="#">JN676148.1</a>	Acinetobacter baumannii A424 transposon TnAbaR23, comp	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN102341.1</a>	Uncultured bacterium plasmid pRSB201, complete sequence	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN814923.1</a>	Escherichia coli strain EC 5629 class 1 integron aminoglycos	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN814922.1</a>	Escherichia coli strain EC 4951 class 1 integron aminoglycos	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN814921.1</a>	Escherichia coli strain EC 4932 class 1 integron aminoglycos	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN814920.1</a>	Escherichia coli strain EC 2689 class 1 integron aminoglycos	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN814919.1</a>	Escherichia coli strain EC 2660 class 1 integron aminoglycos	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN814918.1</a>	Escherichia coli strain EC 2521 class 1 integron aminoglycos	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN814917.1</a>	Escherichia coli strain EC 2519 class 1 integron aminoglycos	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN814916.1</a>	Escherichia coli strain EC 2518 class 1 integron aminoglycos	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN814915.1</a>	Escherichia coli strain EC 2513 class 1 integron aminoglycos	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN814914.1</a>	Escherichia coli strain EC 2500 class 1 integron aminoglycos	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN814913.1</a>	Escherichia coli strain EC 2499 class 1 integron aminoglycos	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN814912.1</a>	Escherichia coli strain EC 2493 class 1 integron aminoglycos	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">GQ406246.2</a>	Acinetobacter baumannii strain A92 multiple antibiotic resis	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN687470.1</a>	Providencia stuartii plasmid pMR0211, complete sequence	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">JN645874.1</a>	Campylobacter metamorpha strain 216 C4 class 1 integron an	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">AB605179.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium pl	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">AM991328.2</a>	Bacterium AK-MB26 partial class I integron containing dfrA1	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">AM991326.2</a>	Bacterium AK-MB24 partial class I integron containing aadA	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">AM991333.2</a>	Bacterium AK-MB33 partial class I integron containing aadA	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">FM179327.2</a>	Bacterium AK-MB47 partial class I integron containing dfrA1	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">HE653236.1</a>	Bacterium AK-MB60 class I integron containing dfrA1 and a	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">HE653235.1</a>	Bacterium AK-MB59 class I integron containing dfrA1 and a	752	752	93%	0.0	98%
<a href="#">HE650986.1</a>	Bacterium AK-MB82 class I integron containing oxa1 and aa	752	752	93%	0.0	98%

Fonte: NCBI, 2012.