



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**MARCELA OLIVEIRA DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DETERMINANTES DE  
RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE *Salmonella spp.* ISOLADAS DE  
CARNE DE FRANGO IN NATURA COMERCIALIZADOS EM  
MERCADOS PÚBLICOS DE RECIFE -PE**

**RECIFE / PE 2020**

**MARCELA OLIVEIRA DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE *Salmonella spp.* ISOLADAS DE CARNE DE FRANGO IN NATURA COMERCIALIZADOS EM MERCADOS PÚBLICOS DE RECIFE –PE**

Monografia, apresentada Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Me. Paula Mariana Salgueiro de Souza

**RECIFE / PE 2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S586c Silva, Marcela Oliveira  
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE  
CARNE DE FRANGO IN NATURA COMERCIALIZADOS EM MERCADOS PÚBLICOS DE RECIFE / Marcela  
Oliveira Silva. - 2020.  
47 f. : il.
- Orientadora: Paula Mariana Salgueiro de Souza.  
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2023.
1. Salmonelose. 2. Salmonella. 3.  $\beta$ -lactamases. 4. Quinolona. 5. Resistência. I. Souza, Paula Mariana  
Salgueiro de, orient. II. Título

---

CDD 574

**MARCELA OLIVEIRA DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE *Salmonella spp.* ISOLADAS DE CARNE DE FRANGO IN NATURA COMERCIALIZADOS EM MERCADOS PÚBLICOS DE RECIFE -PE**

Monografia, apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Me. Paula Mariana Salgueiro de Souza

DATA DA APROVAÇÃO: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Profa Dra Anna Carolina Soares Almeida  
Presidente

Me. Ana Paula Domingues de Lima  
Titular

Me. Bárbara Nazly Rodrigues Santos  
Titular

Me. Ana Caroline Oliveira Alves Ribeiro  
Suplente

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao departamento de Biologia, por ter sido minha segunda casa durante todos esses anos. Agradeço a banca examinadora: Profa Dra Anna Carolina, Me. Ana Paula, Me. Bárbara Nazly e a Me. Ana Caroline, por terem aceitado gentilmente avaliar esse trabalho. À minha orientadora, Me. Paula Mariana Salgueiro de Souza por ter me auxiliado ao longo desses últimos meses e por ter feito tudo que estivesse ao seu alcance para que o trabalho pudesse sair da melhor maneira possível. Eu literalmente não teria conseguido sem você, obrigada por ser a melhor orientadora.

Agradeço as meninas do laboratório, por todas as vezes que me ajudaram durante os experimentos. E a Jonas, por todo tempo que dedicou ao projeto, muitas vezes ficando até tarde no laboratório. Além de toda a paciência para me ensinar no começo de tudo. Obrigada por isso, espero poder retribuir quando for a sua vez. A Profa. Dra Anna Carolina, por ter me ajudado a encontrar uma orientadora e um projeto, me permitindo continuar na área com a qual mais me identifiquei ao longo do curso. À minha turma, SB1, por todos esses anos incríveis de amizade que construímos, e por todos os maravilhosos momentos que me proporcionaram. E todos os abraços reconfortantes que me deram quando precisei. Agradeço a Brenda, Emily, Ilana, Lucas, Milena, Rayssa, Rômulo e Ronald. Vocês tornaram a minha vida acadêmica mais divertida, sempre seremos a melhor turma que esse curso já teve.

À Camila, Eduarda, Eridiana Gabriela, Iviane, Joyce, Talyta e Vanessa. Vocês são as irmãs que a Rural me deu. Obrigada por cada madrugada de estudo, por cada festinha de aniversário que fizemos umas para as outras, por cada palavra de incentivo antes das provas e de conforto em momentos difíceis. A Rural foi a minha casa, vocês foram a minha família. Sempre estarão nas minhas melhores lembranças e espero que possamos continuar fazendo novas.

Agradeço à minha mãe, a pessoa mais importante da minha vida, por toda a luta que teve para que eu pudesse estar onde estou agora. Por todo incentivo para que eu estudasse, mesmo quando as coisas estavam difíceis. Obrigada por todo o esforço que a senhora fez e faz para manter todos nós estudando, abdicando de várias coisas por nós. Eu não seria nada sem você.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Salmonella enteritidis</i> sorotipo <i>Typhimurium</i> em ágar XLD	14
Figura 2. Microscopia óptica de <i>Salmonella enteritidis</i> sorotipo Typhi para visualizaçãode flagelos	15
Figura 3. Estruturas químicas dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos	20
Figura 4. Mecanismo de ação dos $\beta$ -lactâmicos	21
Figura 5. Estrutura central dos antibióticos quinolonas.	24
Figura 6. Gel de agarose a 2% referente a corrida de ERIC-PCR	35
Figura 7. Gel de agarose a 1% referente a amplificação do gene bla <sub>CTX-M-like</sub>	36
Figura 8. Gel de agarose a 1% referente a amplificação do gene bla <sub>TEM-like</sub>	36
Figura 9. Gel de agarose a 1% referente a amplificação do gene qnrA	36
Figura 10. Gel de agarose a 1% referente a amplificação do gene qnrB	37
Figura 11. Gel de agarose a 1% referente a amplificação do gene qnrD	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados e diferentes locais de coleta	28
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para detecção dos genes de $\beta$ -lactamases	30
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para detecção dos genes de resistência às quinolonas	31
Tabela 4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>Salmonella</i> spp. Realizados por discos de difusão	33
Tabela 5. Determinantes gênicos de resistência investigados no estudo	38

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos	27
Quadro 2. Características fenotípicas e moleculares dos isolados de <i>Salmonella</i> spp. analisados no trabalho	39



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>bla</i>	Gene de uma Beta-lactamase
CDC	Centros de controle e prevenção de doenças (do inglês, “ <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> ”)
CTX-M	Beta-Lactamase tipo Cefotaximase
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTA	Doenças Transmitidas por alimentos
ERIC-PCR	Reação em cadeia da polimerase por consenso intergênico repetitivo enterobacteriano (do inglês, “ <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic consensus Polymerase Chain Reaction</i> ”)
ESBLs	Beta-lactamase de Espectro Estendido (do inglês, “ <i>Extended Spectrum Betalactamase</i> ”)
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MDR	Resistência a múltiplas drogas (do inglês, “ <i>multidrug resistant</i> ”)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”)
<i>qnrA</i>	Quinolone resistance gene “A”
<i>qnrB</i>	Quinolone resistance gene “B”
<i>qnrC</i>	Quinolone resistance gene “C”
<i>qnrD</i>	Quinolone resistance gene “D”
<i>qnrS</i>	Quinolone resistance gene “S”
SHV	Beta-lactamase tipo variável reagente Sulfhydryl (do inglês, “ <i>Beta-lactamase tipo Sulfhydryl reagent variable</i> ”)
TEM	Beta-lactamase tipo Temoniera

## RESUMO

A *Salmonella* é um dos principais agentes causadores de infecções transmitidas por alimentos. A salmonelose se torna mais preocupante quando cepas resistentes a múltiplas drogas são encontradas em alimentos, especialmente em frangos, um dos principais veículos de transmissão desse patógeno para humanos. O objetivo desse estudo foi caracterizar os determinantes de resistência a antibióticos presentes em *Salmonella spp.* isoladas de carne de frango in natura comercializados nos mercados públicos da cidade do Recife. Para tanto, 21 isolados de *Salmonella spp.* foram submetidos a testes fenotípicos e moleculares para avaliar a susceptibilidade aos antibióticos e investigar determinantes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e quinolonas. Os resultados obtidos demonstraram a presença de três grandes grupos clonais entre os isolados bacterianos, além da presença de genes que codificam  $\beta$ -lactamases e genes que conferem resistência às quinolonas. A disseminação de diferentes grupos clonais de *Salmonella spp.* MDR, em carcaças de frango, mostrada nesse estudo, reforça a necessidade de controles efetivos de contenção desse microrganismo, que além de se configurar com um risco à saúde pública, também é responsável por perdas econômicas consideráveis.

**Palavras-chave:** Salmonelose, *Salmonella* MDR,  $\beta$ -lactamases

## ABSTRACT

*Salmonella* is one of the main causative agents of foodborne infections. Salmonellosis becomes more dangerous when strains resistant to various antibiotics are found in food, especially in chickens, one of the main vehicles for transmitting this pathogen to humans. The aim of this study was to characterize the determinants of antibiotic resistance present in *Salmonella* spp. isolated from fresh chicken meat sold in public markets in the city of Recife. For that, 21 isolates of *Salmonella* spp. underwent phenotypic and molecular tests to assess susceptibility to antibiotics and to investigate determinants of resistance to  $\beta$ -lactams and quinolones. The results obtained demonstrated the presence of three large clonal groups among bacterial isolates, in addition to the presence of genes encoding  $\beta$ -lactamases and genes that confer resistance to quinolones. The spread of different polyclonal groups of *Salmonella* spp. MDR, in chicken carcasses, shown in this study, reinforces the need for effective controls to contain this microorganism, which in addition to being a risk to public health, is also responsible for considerable economic losses.

**Keywords:** Salmonellosis, *Salmonella* MDR,  $\beta$ -lactamases

# SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1	<i>Objetivo geral.....</i>	13
2.2	<i>Objetivos específicos .....</i>	13
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
3.1	<i>Família enterobacteriaceae .....</i>	14
3.2	<i>Salmonella spp. ....</i>	15
3.3	<i>Contaminação dos alimentos e infecções causadas por salmonela .....</i>	16
3.4	<i>Antibióticos utilizados no tratamento de infecções por salmonella e a resistência bacteriana.....</i>	18
3.5	<i>Mecanismos de resistência aos <math>\beta</math>-lactâmicos.....</i>	20
3.6	<i>Mecanismos de resistência às quinolonas.....</i>	24
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
4.1	<i>isolados bacterianos .....</i>	27
4.2	<i>.Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....</i>	28
4.3	<i>Análises Moleculares .....</i>	29
4.3.1	<i>Isolamento do DNA.....</i>	29
4.3.2	<i>Análise do perfil genético dos isolados .....</i>	29
4.3.4	<i>Detecção dos genes de Resistência.....</i>	29
4.3.5	<i>Condições de PCR .....</i>	30
4.3.6	<i>Detecção dos genes de <math>\beta</math>-lactamases.....</i>	30
4.3.7	<i>Detecção dos genes de resistência às quinolonas .....</i>	31
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>31</b>
5.1	<i>Perfil de resistência dos isolados de Salmonella spp. ....</i>	31
5.2	<i>Relação clonal entre os isolados e determinantes gênicos de resistência .....</i>	34
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>41</b>

# 1. INTRODUÇÃO

*Salmonella* é um bacilo Gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, classificado em aproximadamente 2.600 sorotipos de acordo com o esquema de Kauffmann-White (GRIMONT; WEILL, 2007). Subespécies entéricas causam 99% das infecções em animais e humanos. Nos seres humanos, os sintomas de infecção entérica incluem náusea, vômito e diarreia não sanguinolenta, febre, resfriado, dor abdominal, mialgia e dores de cabeça e podem evoluir para bacteremia e endocardite.

A maioria dessas infecções causam diarreia autolimitada e não requer tratamento antimicrobiano. No entanto, em certos casos, como quando a bactéria se espalha pela corrente sanguínea, levando a complicações como meningite, é necessária antibioticoterapia. Tais complicações são mais comumente observadas em crianças e idosos e em pacientes imunocomprometidos. Fluoroquinolonas e cefalosporinas são os medicamentos de primeira escolha nesses casos (CDC, 2016).

Alimentos de origem animal, especialmente itens derivados de aves, são as principais fontes de infecção por *Salmonella spp.* Dada a importância de *Salmonella* como agente causador de doenças transmitidas por alimentos, a redução de sua contaminação em carcaças de frangos de corte é de extrema prioridade para a indústria e para as agências reguladoras (SAÚDE, 2011). Estudos de prevalência e investigações epidemiológicas em todo o mundo identificaram produtos de frango e ovos crus ou mal cozidos como potenciais veículos de transmissão de *Salmonella* em humanos. Sorotipos que frequentemente ocorrem em diferentes países e são comumente isoladas de carcaças de frango, outros cortes e subprodutos também têm sido relatados no Brasil (AZEVEDO, 2014; DUARTE et al., 2009; FITCH et al., 2016; FUMY KOGUISHI BONI; SAMPAIO CARRIJO; BARBOSA FASCINA, 2011; REZENDE et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007).

O surgimento de *Salmonella* multirresistente a drogas (MDR) é uma preocupação mundial, uma vez que a ocorrência de *Salmonella* MDR em alimentos é um risco, representando aumento da gravidade das doenças transmitidas por alimentos, levando ao aumento das taxas de hospitalização e à

possibilidade de morte. Este fenômeno é uma consequência do uso extensivo de antibióticos no tratamento de seres humanos e animais. As cepas com esse perfil representam um problema mundial para os setores hospitalar e de saúde pública. Ao longo dos anos têm-se observado o aumento na prevalência de cepas de *Salmonella* resistentes a múltiplos antibióticos em produtos de origem animal, principalmente aves (AZEVEDO, 2014; BAPTISTA et al., 2018; DUARTE et al., 2009; FITCH et al., 2016; FUMY KOGUISHI BONI; SAMPAIO CARRIJO; BARBOSA FASCINA, 2011; REZENDE et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007; THRELFALL, 2002).

Estudos avaliando esse aspecto em cepas de *Salmonella* ainda são minoria. Portanto, investigações que verifiquem a prevalência de cepas de *Salmonella* MDR em produtos alimentares como carcaças de frango são importantes para produzir informações que subsidiem programas de controle sobre o uso indiscriminado de antibióticos na produção animal. Além disso, há uma certa escassez de informações científicas sobre a presença, comportamento de susceptibilidade a antibacterianos e perfil genotípico de *Salmonella* na carne de frango, considerando que o Brasil é o principal exportador mundial de aves.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar os determinantes de resistência a antibióticos de *Salmonella spp.*  
Isolada de carne de frango in natura.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a relação clonal entre os isolados bacterianos estudados;
- ✓ Caracterizar os determinantes gênicos responsáveis pela resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e quinolonas nos isolados;
- ✓ Avaliar a associação dos determinantes de resistência encontrados nos isolados com a sua relação clonal.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Família enterobacteriaceae

A família *Enterobacteriaceae* é um grupo composto por bactérias Gram-negativas, bacilares, não patogênicas em sua maioria, de distribuição ubíqua, podendo ser encontradas em diversos ambientes como solo, água, vegetação, além de comporem a microbiota natural de animais, incluindo o homem (ILLSI EUROPE, 2011).

Entre os membros da família *Enterobacteriaceae*, destacam-se os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Salmonella*, como os mais frequentemente isolados. Meios seletivos podem ser utilizados para reduzir o tempo de identificação desses gêneros, impedindo o crescimento de organismos competidores e favorecendo o crescimento do organismo desejado (Figura 1) (HONG NHUNG et al., 2007).

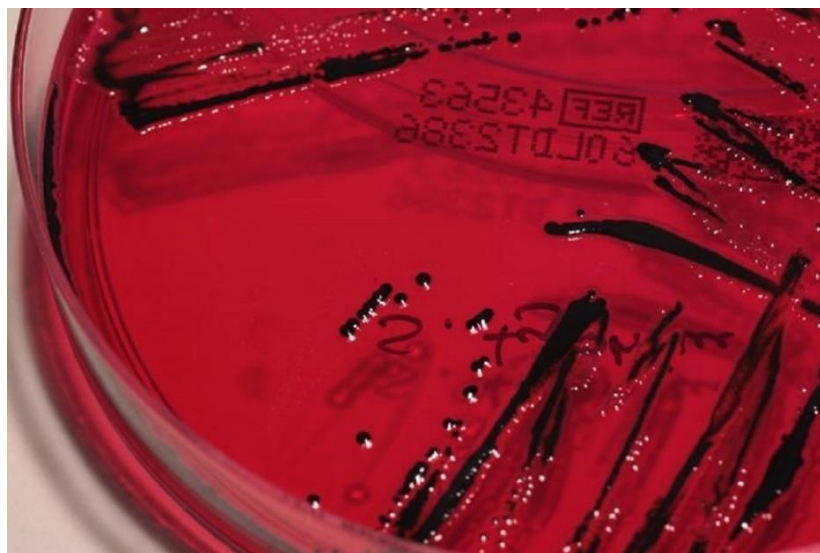


Figura 1- *Salmonella enteritidis* sorotipo *Typhimurium* em ágar XLD (Ágar de desoxicolato-lisina-xilose), um meio seletivo diferencial, que permite a identificação de elementos patogênicos entéricos, particularmente de *Shigella* e *Salmonella*. Fonte: Cangussu, 2010.

Enterobactérias fermentam uma variedade de carboidratos e sua capacidade de produzir ácido e gás a partir da fermentação da D-glicose é uma



característica importante para a identificação desses microrganismos. Alguns membros das Enterobacteriaceae (por exemplo, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Citrobacter spp.* e *Klebsiella spp.*) podem ser reconhecidas usando métodos que exploram sua capacidade de fermentar lactose rapidamente produzindo ácido e gás. Estas são coletivamente denominadas bactérias coliformes e são frequentemente usadas como organismos indicadores da indústria de alimentos e água, uma vez que seu habitat normal é o trato gastrointestinal de mamíferos e aves (ILLSI EUROPE, 2011).

### 3.2 *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella* possuem a forma de bastão, são móveis por flagelos peritríqueos, ou seja, possuem diversos flagelos distribuídos ao longo da célula (Figura 2) e são capazes de formar ácido a partir da glicose. São produtoras de catalase, mas não são produtoras de oxidase, além disso reduzem nitrato a nitrito (ANVISA, 2008).

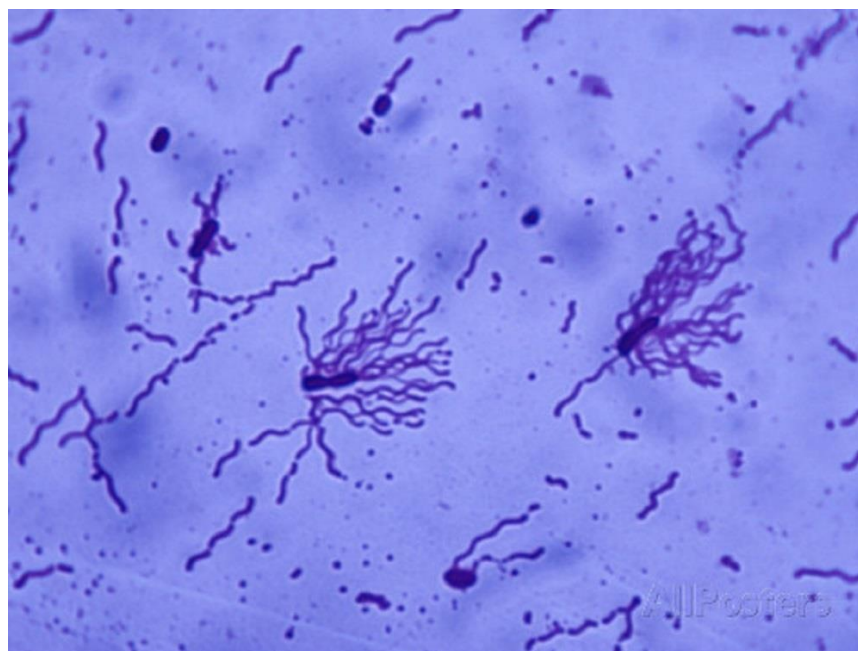


Figura 2- Microscopia óptica de *Salmonella enteritidis* sorotipo Typhi para visualização de flagelos.  
Fonte: Cangussu, 2010.

Há certa discussão a respeito da classificação taxonômica do gênero *Salmonella*. Atualmente o gênero possui duas espécies que se distinguem geneticamente: *S. enterica* e *S. bongori*. No entanto, estudos indicam que a

maioria das cepas encontradas são pertencentes à espécie *Salmonella enterica*, que por sua vez possui seis subespécies e diversos sorotipos descritos. Os sorotipos de ambas as espécies estão contabilizados em cerca de 2.500, segundo o esquema de Kauffmann- White (GRIMONT; WEILL, 2007; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Entretanto, esses sorotipos geralmente eram apresentados como sendo espécies diferentes, como a *Salmonella typhi*, por exemplo (MINISTERIO DA SAÚDE, 2011).

Atualmente a nomenclatura desses sorotipos individuais é escrita com a inicial do nome do sorotipo escrita em maiúsculo, ao invés do itálico usado anteriormente. Dessa forma, a espécie citada passa a ser escrita *Salmonella Typh*. Uma terceira espécie teria sido proposta em 2004, a *S. subterranea* que foi isolada de sedimento subterrâneo de baixo pH, no Tennessee, região sudeste dos Estados Unidos. Através do sequenciamento 16S rRNA foi constatada uma inter-relação com *S. bongori* (SAÚDE, 2011b).

Alguns sorotipos de *Salmonella* são mais patogênicos ao homem, sendo agentes causadores da febre entérica, como a *S. Typhi* e a *S. Paratyphi A, B e C*. Já os sorotipos mais bem adaptados aos animais são *S. Dublin*, *S. Choleraesuis* e *S. Typhisuis* (suínos), *S. Abortusequi* (equinos), *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (aves), causadores do paratifo em animais. Existem ainda sorotipos que afetam tanto o homem quanto os animais de forma indiferente. Essas estão conhecidas como *Salmonellas* zoonóticas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). As doenças mais conhecidas causadas pelo gênero *Salmonella* são enterite e febre entérica, mais conhecida como febre tifoide. Os sintomas incluem febre alta, dores abdominais e diarreia com ou sem sangue. Alimentos contaminados como aves, leite e ovos são a forma mais comum de infecção (PAIÃO et al., 2013).

### **3.3 Contaminação dos alimentos e infecções causadas por salmonela**

A *Salmonella spp.* possui uma sobrevivência muito longa no meio ambiente, sobretudo na matéria orgânica. Ela é eliminada em grande número nas fezes, contaminando assim o solo e a água. Nesse material fecal, pode permanecer por anos, podendo resistir por mais de 28 meses nas fezes das aves e 30 meses no estrume bovino. No solo cultivado, o tempo de sobrevivência é de até 280 dias. Devido a isso, é possível a ocorrência de contaminação de hortaliças e

frutas e alimentos de origem animal como carnes cruas, leite e ovos. A contaminação de carnes se dá geralmente durante o abate, enquanto hortaliças e frutas podem sofrer contaminação através de água contaminada (HU et al., 2017; LI et al., 2013; THIENNIMITR; WINTER; BÄUMLER, 2012).

Entre os produtos de origem animal, os ovos, a carne de animais de abate e o leite são os principais veículos de transmissão de *Salmonella*, conforme demonstram os dados do Ministério da Saúde publicados em 2017. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017) Estes alimentos podem contaminar os humanos diretamente quando insuficientemente cozidos ou pasteurizados, ou ainda através de contaminação cruzada, quando o alimento contaminado entra em contato direto ou indireto com outros alimentos não contaminados tornando-os um novo veículo de infecção, caso não sejam sujeitos a qualquer tratamento térmico antes de serem consumidos (SAÚDE, 2011a)

Em relação à contaminação cruzada dos alimentos, os dados de notificação de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) por *Salmonella* do Ministério da Saúde no Brasil, demonstram que o principal local de contaminação em surtos de salmonelose são as residências. Ainda assim, os dados preliminares da verificação oficial do programa de monitoramento de *Salmonella spp.* nos estabelecimentos de abate de aves no ano de 2017 indicaram 16,99% (254/1.495) de positividade nas amostras de carcaça de aves analisadas para a presença de *Salmonella spp.* no país. Os sorovares predominantes são *S. Heidelberg* (56%), *S. Minnesota* (19%) e *S. Saintpaul* (7%). Os sorogrupos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, que mundialmente estão mais associados aos surtos e casos graves da doença, foram identificados em apenas 0,8% (2/242) e 0,4% (1/242), respectivamente, das amostras analisadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Dados do Ministério da Saúde também apontam *Salmonella* como o principal agente etiológico identificado como causador de DTA. Entre 2014 e 2017, o Sistema de Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmitidas por Alimentos – VEDTA, do Ministério da Saúde, informou a notificação de 85 surtos de DTA relacionados à *Salmonella*, com a ocorrência de 3.433 doentes e 2 óbitos registrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017)

.As infecções por *Salmonella* são consideradas as DTA mais comuns e

foram reconhecidas globalmente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, em razão da alta morbidade e altos custos econômicos gerados em decorrência dessas doenças (IGBINOSA, 2014). Estudos recentes estimam que existam 80,3 milhões de casos anuais de doenças de origem alimentar relacionada com *Salmonella* em todo o mundo (MAJOWICZ et al., 2010) e a *S. Enteritidis* tem sido considerada o sorotipo mais comum em casos de infecções em seres humanos e a maioria está associada a produtos avícolas (CDC, 2018; FERNANDES et al., 1992; KANG et al., 2009)

Na Europa, a *S. Enteritidis* representa 85% dos casos de salmonelose, 38% na Ásia e 31% na América Latina e no Caribe. Desde a primeira pandemia relatada em 1980, a *S. Enteritidis* tem emergido como um dos principais patógenos associados à transmissão por ovos contaminados (GALANIS et al., 2006). A introdução de *S. Enteritidis* no Brasil, provavelmente, ocorreu no final da década de 80, por aves reprodutoras infectadas adquiridas de países europeus (IRINO et al., 1996). Em Curitiba, em 1981 foi descrito o primeiro surto de infecção causado por *S. Enteritidis* no Brasil (KAKU et al., 1995). Em seguida, a partir da década de 90, surgiram diversos relatos de surtos de infecção alimentar em seres humanos, devido principalmente a ingestão de produtos de origem avícola (TAUNAY et al., 1996).

A *S. Enteritidis* é uma bactéria que se disseminou devido ao processo de criação intensiva e ao uso indiscriminado de antibióticos na ração, acarretando resistência bacteriana. Nas duas últimas décadas, diversos países têm relatado aumento no número de surtos-epidêmicos ocasionados por *S. Enteritidis*, constituindo-se na maior causa de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos nos EUA, Reino Unido e Europa Central.

### **3.4 Antibióticos utilizados no tratamento de infecções por salmonella e a resistência bacteriana**

Os antibióticos são compostos que podem ser provenientes de bactérias ou fungos, quando naturais, mas também podem ter origem sintética. Entre os mecanismos de ação de um antibiótico, destacam-se a inibição da síntese da parede celular, assim como o aumento de sua permeabilidade, além da interferência na síntese proteica e no metabolismo do ácido nucleico (VAN

BOECKEL et al., 2015)..Existem classes nas quais os antibióticos podem ser agrupados, de acordo com suas características estruturais e funcionais. As classes mais conhecidas são:  $\beta$ - Lactâmicos (que incluem: Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenêmicos e Monobactâmicos), Quinolonas, Glicopeptídeos, Oxazolidinonas, Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Lincosaminas, Sulfonamidas, Tetraciclina, entre outros (CDC, 2016).

O tratamento de pacientes com sintomas de diarreia infecciosa com agentes antimicrobianos permanece controverso, uma vez que o tratamento com antibióticos em pacientes com salmonelose não tifoide pode realmente prolongar, em vez de limitar, o derramamento fecal desses organismos. O estudo inicial de Nelson e colaboradores, com crianças com salmonelose, mostrou que aquelas que foram tratadas com ampicilina ou amoxicilina eram mais propensas a ter excreção prolongada e recaída clínica, que aquelas que receberam placebo (NELSON et al., 1980). Estudos em animais sustentam a hipótese de que os antibióticos funcionam dessa forma através da supressão dos efeitos protetores da microbiota bacteriana intestinal endógena, o que resulta no fortalecimento das espécies resistentes de *Salmonella* (LI et al., 2013).

Bons medicamentos para a *infecção* por *Salmonella* incluem fluoroquinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMZ), ampicilina ou cefalosporinas de terceira geração (por exemplo, ceftriaxona). Como a resistência ao TMP-SMZ e à ampicilina é comum, o uso de uma cefalosporina ou quinolona é razoável, se as susceptibilidades forem desconhecidas. As fluoroquinolonas não são aprovadas pela *Food and Drug Administration* dos EUA para uso em crianças devido à preocupação com os efeitos adversos na cartilagem que foram observados em animais jovens (CONNOR; SCHWARTZ, 2005).

Dessa forma, com o aumento do uso das fluoroquinolonas, a resistência a essa droga, resultado de uma mutação cromossômica, acabou sendo relatada. Com o surgimento dessa resistência, doses maiores e mais prolongadas de quinolonas passaram a ser administradas. Até 1998 a resistência as quinolonas havia chegado a 76% (CONNOR; SCHWARTZ, 2005).O surgimento de *Salmonella* multirresistente (MDR) é uma preocupação

mundial, uma vez que a ocorrência de Salmonela MDR em alimentos é um risco, representando aumento da gravidade das doenças transmitidas por alimentos, levando ao aumento das taxas de hospitalização e à possibilidade de morte (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ et al., 2012; CHAIBA ABDELLAH, RHAZI FILALI FOUZIA, CHAHLAOUI ABDELKADER, 2009; J.-W. et al., 2015). Este fenômeno é uma consequência do uso extensivo de antibióticos no tratamento de seres humanos e animais.

### 3.5 Mecanismos de resistência aos $\beta$ -lactâmicos

Os  $\beta$ -lactâmicos são a classe de antimicrobianos a qual pertencem as penicilinas, cefalosporinas, os carbapenêmicos e os monobactâmicos. Esses compostos possuem em comum um anel  $\beta$ -lactâmico (Figura 3) que define o seu mecanismo de ação, inibindo a síntese do peptidoglicano. Essa classe de antimicrobianos possui uma grande importância devido a sua eficácia terapêutica (AZEVEDO, 2014)

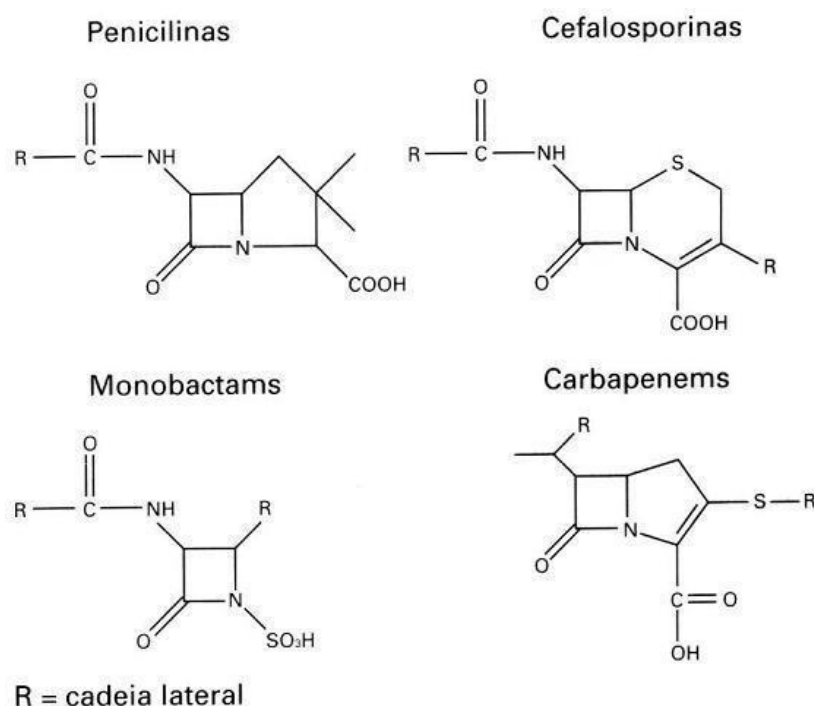
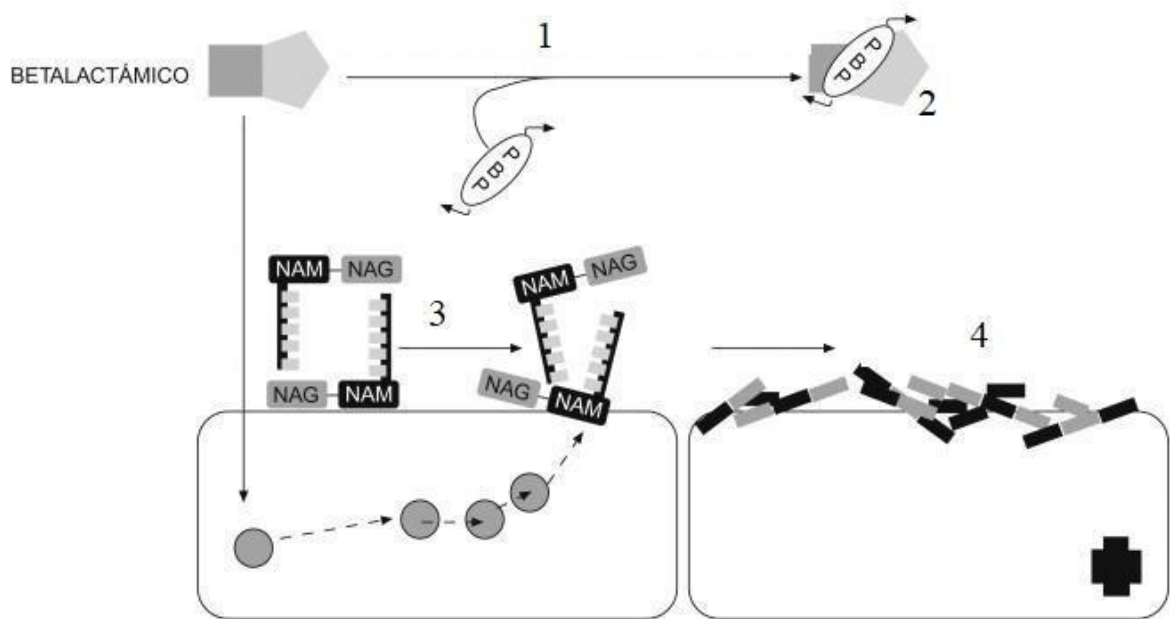


Figura 3- Estrutura química dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Fonte: Williams, 1999.

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos inibem o último passo na síntese do

peptidoglicano, acilando a transpeptidase envolvida nos peptídeos reticulados para formar o peptidoglicano. Os alvos para as ações dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são conhecidos como proteínas de ligação à penicilina (PBPs). Essa ligação, por sua vez, interrompe o processo de transpeptidação terminal e induz a perda de viabilidade e lise, também através de processos autolíticos dentro da célula bacteriana (Figura 4) (ECKBURG et al., 2019).



*Figura 4- Mecanismo de ação dos Beta-lactâmicos. 1 – Competição entre o beta-lactâmico e o pentapeptídeo pela ligação com as PBPs. 2 – União covalente estável entre a PBP e o anel beta-lactâmico. 3 – Destruição do peptidoglicano. 4 – Não formação da parede celular – morte bacteriana. Legenda: NAG- N- Acetilglicosamina, NAM- ácido N-acetilmurâmico. Fonte: LIVROZZILA, 2017.*

Os antibióticos pertencentes a essa classe têm sido amplamente utilizados ao longo dos anos na prática clínica, sobretudo pela sua boa tolerabilidade no organismo (ANVISA, 2007). Entretanto, devido ao surgimento das enzimas conhecidas como  $\beta$ -lactamases, o uso dos  $\beta$ -lactâmicos tornou-se ponderado. As  $\beta$ -lactamases, desde a sua descoberta já foram classificadas de diferentes formas, incluindo seu espectro hidrolítico, susceptibilidade a inibidores e sua localização genética. A classificação fenotípica apresenta alguns problemas, visto que uma mutação pontual pode alterar substancialmente a especificidade da enzima pelo substrato e o poder de ação dos inibidores, assim podendo mudar o grupo no qual a enzima é classificada

(AMBLER, 1980; DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).

Atualmente estão em uso dois sistemas de classificação para essas enzimas, o primeiro é a classificação molecular de Ambler, que é baseada nos motivos

conservados e na sequência aminoacídica que categoriza essas enzimas em quatro, como as enzimas das classes A, B, C e D (AMBLER, 1980; UR RAHMAN et al., 2018). As enzimas pertencentes a essas classes A, B, C e D utilizam serina para a hidrólise do  $\beta$ -lactâmico e metaloenzimas de classe B que requerem íons de zinco divalentes (íons metálicos) para a hidrólise do substrato.

A segunda categorização é denominada classificação funcional de Bush, Jacoby e Medeiros, que agrupa diferentes  $\beta$ -lactamases de acordo com seus perfis de substrato e inibidor. Este método correlaciona as  $\beta$ -lactamases com fenótipos em isolados clínicos. A classificação funcional atualizada mais recente é composta por três grupos: grupo 1 (classe C), cefalosporinases; grupo 2 (classes A e D),  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, resistente a inibidores, espectro estendido e carbapenemases de serina; e grupo 3 (classe B), metalo- $\beta$ -lactamases (BUSH; JACOBY, 2010; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

Apesar da sequência de aminoácidos ter se apresentado como uma forma atrativa para a classificação das  $\beta$ -lactamases, na prática clínica, tal abordagem não é vantajosa. O problema ocorre, pois ainda não é possível somente com ferramentas de biologia molecular prever a função enzimática e conseqüentemente o perfil de susceptibilidade do organismo que carrega a  $\beta$ -lactamase, além do fato de que para os clínicos é mais importante saber se aquele organismo estudado é sensível ou resistente a uma droga, do que a sequência de aminoácidos da  $\beta$ -lactamase carregada pela bactéria. Assim, a classificação de Bush, Jacob e Medeiros, proposta em 1995, combinando a estrutura com características funcionais é a classificação mais aceita, (K. BUSH, G. JACOBY, 2015).

Entre as  $\beta$ -lactamases, as ESBLs ( $\beta$ -lactamases de espectro estendido) têm sido alvo de preocupação e atenção pela comunidade científica nas últimas décadas (UR RAHMAN et al., 2018). Geralmente, as ESBLs têm origem plasmidial e são conhecidas por sua capacidade de hidrolisar oximino-



cefalosporinas (cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração). Além disso, estas são geralmente suscetíveis a inibidores de  $\beta$ -lactamase, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (BRADFORD, 2001).

Classicamente, as ESBLs são definidas como enzimas originalmente derivadas ou evoluídas a partir de  $\beta$ -lactamases de espectro estreito, e dessa forma, adquiriram a capacidade de hidrolisar as cefalosporinas, penicilinas e aztreonam de amplo espectro, mas não as cefamicinas (cefexitina) ou carbapenêmicos por meio de sua atividade hidrolítica inibida pelos inibidores da  $\beta$ -lactamase. São representantes mais antigas de ESBLs, TEM-1, TEM-2 e SHV(AFEMA; MATHER; SISCHO, 2015; CDC, 2016; J.-W. et al., 2015).

A definição mais recente divide a ESBLs em classe A, B e C. As ESBLs classe A compreendem as enzimas mais frequentemente encontrados, como SHV, CTX-M e TEM. Essas enzimas são principalmente transferíveis horizontalmente e podem ser inativadas ou inibidas pelo ácido clavulânico (UR RAHMAN et al., 2018).A ocorrência de *Salmonellas* carreando  $\beta$ -lactamases (a maioria das quais, ESBLs) já foi reportada em todo o mundo(ALLEN; POPPE, 2002; CHIU et al., 2004; SU et al., 2003; WINOKUR et al., 2000). No Brasil, diversos relatos estão descritos na literatura, sendo CTX-M, TEM, SHV e CMY as  $\beta$ -lactamases mais frequentemente encontradas em isolados de *Salmonella* (ALMEIDA et al., 2013; AZEVEDO, 2014; DA CUNHA-NETO et al., 2018; DIAS DE OLIVEIRA et al., 2005; MEDEIROS et al., 2011; ZIECH et al., 2016)

Os genes que codificam essas cefalosporinases de espectro estendido são geralmente transportados por plasmídeos, transposons ou integrons conjugativos. Esses elementos genéticos móveis podem se espalhar horizontalmente entre organismos entéricos. Assim, não apenas pode surgir a resistência antimicrobiana nas salmonelas devido à pressão de seleção derivada do uso inadequado de antimicrobianos em animais, mas as salmonelas suscetíveis a drogas também podem se tornar resistentes através da aquisição in vivo de plasmídeos de resistência a drogas de outros patógenos entéricos no trato intestinal de pacientes (ALLEN; POPPE, 2002; CHIU et al., 2004; SU et al., 2003).

### 3.6 Mecanismos de resistência às quinolonas

As quinolonas são drogas bactericidas sintéticas com atividade contra microrganismos gram-negativos e gram-positivos, as quais surgiram no início dos anos 60, com os primeiros exemplos possuindo um espectro estreito de atividade com propriedades farmacocinéticas desfavoráveis. Com o tempo, o desenvolvimento de novos antibióticos da classe levou a análogos aprimorados com um espectro expandido e alta eficácia. Atualmente, essas drogas são amplamente utilizadas no tratamento de uma variedade de infecções (PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019). As quinolonas são uma família de antibióticos que contêm uma estrutura química central bicíclica (Figura 5). Elas agem inibindo a ação de topoisomerases tipo II (DNA girase) e topoisomerase IV (OLIPHANT; GREEN, 2002). O primeiro alvo de fluoroquinolonas em bactérias gram-negativas é a DNA girase, que apresenta função na replicação e transcrição do DNA, mais precisamente catalisa a superhelicoidização negativa do DNA(DRLICA et al., 2009).

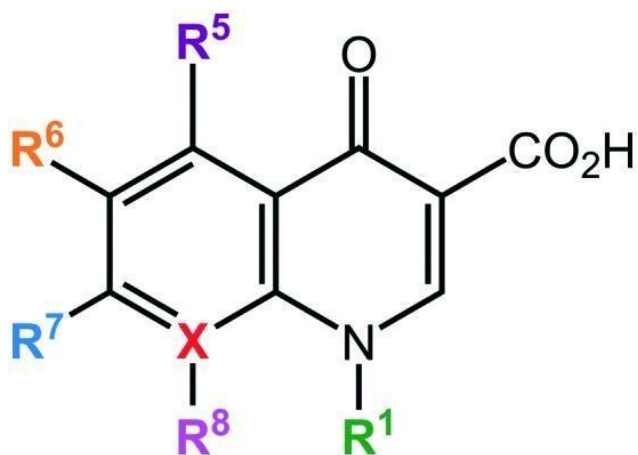


Figura 5- Estrutura central dos antibióticos quinolonas. Os radicais indicados de R1-R8 representam as modificações possíveis para constituir as diferentes drogas da classe. Fonte: Adaptado de Pham et al., 2019.

As quinolonas podem ser classificadas em quatro gerações, com base na sua atividade antimicrobiana. Os agentes de primeira geração, usados hoje com menos frequência, apresentam atividade moderada a microrganismos Gram-negativos e distribuição sistêmica mínima. As quinolonas de segunda geração expandiram a atividade a Gram-negativos, mas limitaram a atividade a Gram-positivos. A principal representante dessa classe é a ciprofloxacina, na qual é relatada com um dos agentes antimicrobianos mais utilizados em todo o mundo.

As quinolonas de terceira geração mantêm atividade contra Gram-negativos, mas melhoram a cobertura gram-positiva. Finalmente, os agentes de quarta geração melhoram a cobertura contra Gram-positivos, mantêm a cobertura contra Gram-negativos e ganham cobertura anaeróbica (DRLICA et al., 2009; HOOPER, 2000; PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019).

O surgimento de resistência às quinolonas está se tornando uma questão crítica que limita o uso dessa classe de antibióticos. Os mecanismos de resistência são classificados em duas categorias diferentes, com base em mutações nos genes bacterianos (mutação nos genes que codificam os alvos da DNA girase e topoisomerase IV ou outras alterações genômicas que afetam a ação de antibióticos) *versus a* aquisição de genes de resistência de outras fontes (aquisição de plasmídeo ambiente ou outras estirpes resistentes, com múltiplas vias de resistência)(DRLICA et al., 2009).

Acreditava-se que pelo fato das quinolonas serem antibióticos sintéticos, mecanismos de resistência carregados por plasmídeos dificilmente existiram. No entanto, em 1998, 31 anos após o ácido nalidíxico começar a ser utilizado clinicamente e 12 anos após a aprovação das fluoroquinolonas modernas, Martinez-Martinez et al. descreveram o primeiro caso de resistência mediada por plasmídeo (MARTÍNEZ- MARTÍNEZ; PASCUAL; JACOBY, 1998). A transmissão desses plasmídeos de resistência ocorre através da transferência horizontal e vertical. Três famílias de genes relatadas estão envolvidas nesse tipo de resistência à quinolona mediada por plasmídeo (STRAHILEVITZ et al., 2009).

A primeira proteína codificada por plasmídeo é Qnr, uma proteína da família de repetição de pentapeptídeos (TRAN; JACOBY, 2002). Essas proteínas são dobradas na forma de  $\beta$ -hélice quadrilateral direita e dimerizam para formar a estrutura em forma de bastonete com tamanho, forma e superfície eletrostática que imitam a forma  $\beta$  do DNA. Mais de 100 variantes foram descobertas em isolados clínicos, classificados em 6 subfamílias (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* e *qnrVC*) (PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019).

Foi relatado que o gene *qnr* se origina nos cromossomos de muitas bactérias aquáticas; com *qnrA* originalmente de algas de *Shewanella*, *qnrB* de *Citrobacter spp.*, *qnrC*, *qnrS* e *qnrVC* de *Vibrio spp.* *qnrD* e *qnrE* de

*Enterobacter spp.* (SÁNCHEZ et al., 2008).Essas proteínas Qnr competem com a ligação do DNA às enzimas, inibindo a entrada de quinolona nos complexos de clivagem e reduzindo o número de quebras de fita dupla nos cromossomos, resultando em redução da toxicidade da quinolona nos cromossomos (TRAN; JACOBY, 2002).

A segunda proteína codificada por plasmídeo envolvida na resistência à quinolona é a AAC (6') - Ib-cr, um derivado da acetiltransferase de aminoglicosídeo que possui mutações em Trp102Arg e Asp179Tyr. Essas duas mutações únicas distinguem essa enzima variante de outras enzimas e levam ao direcionamento específico de quinolonas com uma amina no esqueleto do anel piperazinil, como ciprofloxacina, norfloxacina e enoxacina (VETTING et al., 2008)

A terceira família associada à resistência à quinolona são as bombas de efluxo de quinolona mediadas por plasmídeo, incluindo OqxAB e QepA. OqxAB é uma bomba de efluxo codificada pelo plasmídeo conjugativo pOLA52 encontrado em cepas de *E. coli* isoladas de esterco suíno. Foi recentemente detectado em isolados clínicos humanos de *E. coli* e *K. pneumoniae*. As bactérias com esse gene oqxAB eram 8 a 16 vezes menos suscetíveis ao ácido nalidíxico e à ciprofloxacina, respectivamente. Essa bomba de efluxo não apenas medeia a resistência a quinolonas de baixo nível, mas também ajuda as bactérias a sobreviver sob baixa concentração de quinolonas, facilitando assim o desenvolvimento subsequente de resistência de nível superior (VETTING et al., 2008).

Outra nova bomba de efluxo de quinolona mediada por plasmídeo é a QepA, que é codificada pelo plasmídeo pHPA encontrado em isolados clínicos de *E. coli* do Japão. É uma bomba de efluxo da família dos principais facilitadores que diminui a suscetibilidade bacteriana às quinolonas hidrofílicas. Esses genes codificadores de bombas de efluxo multirresistentes não causam diretamente altos níveis de resistência às quinolonas, mas podem facilitar o desenvolvimento de mutações nas enzimas topoisomerase, permitindo que as bactérias se adaptem a baixas concentrações de quinolonas no interior das bactérias (ALDRED et al., 2017).

**Quadro 1.** Determinantes de resistência as quinolonas mediada por plasmídeos.

<i>qnrS</i>	Mimetiza o DNA
<i>qnrB</i>	Diminui a ligação das enzimas ao DNA → diminuindo os alvos enzimáticos no cromossomo
<i>qnrC</i>	
<i>qnrD</i>	Ligam-se às enzimas e inibem a entrada de quinolonas nos complexos de clivagem
<i>qnrVC</i>	
<i>aac (6 ')</i> -- lb-cr	
<b>Bombas de efluxo de quinolona mediadas por plasmídeos</b>	
OqxAB	Aumenta a atividade da bomba de efluxo
QepA	Diminui a suscetibilidade às quinolonas hidrofílicas

**Fonte:** Adaptado de PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019

O acúmulo desses genes de resistência plasmidiais facilita o desenvolvimento de resistência à quinolona em altos níveis e foram detectados em várias espécies bacterianas em muitos países ao redor do mundo, incluindo *Salmonella*. Há relatos das variantes dos genes *qnr* identificados em perus na Europa (VELDMAN et al., 2011), na Espanha e na Itália (POIREL; CATTOIR; NORDMANN, 2012), nos Estados Unidos (ROBICSEK; JACOBY; HOOPER, 2006) e na China (STRAHILEVITZ et al., 2009). No Brasil um estudo de 2016 conduzido por Pribul e colaboradores, investigou 129 *Salmonellas* isoladas de humanos e aves. Em 15 delas foram detectados os genes *qnrB*, *qnrS* e *qnrD* (PRIBUL et al., 2016)..

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos listados abaixo foram realizados no Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA (Laboratório Genoma), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

### 4.1 isolados bacterianos

Os isolados bacterianos de *Salmonella spp.* utilizados nesse estudo foram anteriormente isolados a partir de carcaças de frango comercializadas em

8 mercados públicos da cidade do Recife/PE (Tabela 1) e foram previamente identificados e caracterizados pelo laboratório de inspeção de carne e leite (LICAL) do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

**Tabela 1.** Isolados e diferentes locais de coleta.

Isolado	Local	Data de coleta
1	Mercado de Santo Amaro	27/11/2018
2		14/01/2019
3		14/01/2019
4	Mercado São José	08/11/2018
5		08/11/2018
6		08/11/2018
7		08/11/2018
8		08/11/2018
9		08/11/2018
10	Mercado da Encruzilhada	08/01/2019
11	Mercado da Boa vista	02/01/2019
12	Mercado de Afogados	07/01/2019
13		07/01/2019
14		07/01/2019
15		07/01/2019
16		07/01/2019
17		07/01/2019
18		07/01/2019
19	Mercado de Água Fria	29/11/2018
20		15/01/2019
21		15/01/2019

## 4.2 .Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade dos isolados aos agentes antimicrobianos ampicilina, clorafenicol, ciprofloxacino, ceftriaxona, sulfametoxazol/trimetoprim, imipenem, amoxicilina/ácido clavulânico, ceftazidima, cefotaxima e aztreonam, foi testado pelo método de disco-difusão em ágar de acordo com as normas preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* (CLSI, 2018).

## 4.3 Análises Moleculares

### 4.3.1 Isolamento do DNA

O DNA utilizado nas análises moleculares foi obtido utilizando-se suspensões bacterianas constituídas de colônias frescas (crescidas por 16-18 horas em ágar Luria Bertani) inoculadas em aproximadamente 300µL de água ultrapura livre de nuclease, homogeneizadas com o auxílio de um agitador de tubos vórtex (Vision Scientific).

### 4.3.2 Análise do perfil genético dos isolados

Para análise do perfil genético dos isolados de *Salmonella* spp. foi utilizada a técnica molecular de ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- PCR), a qual permite comparar e identificar variações no conteúdo genético de estirpes bacterianas homólogas (VERSALOVIC et al., 1991). Para reação foram utilizados os primers ERIC-1R ( 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3' ) e ERIC-2 (5'AAGTAAGTGACTGGGGGGGCCG-3') (Sigma Aldrich) (VERSALOVIC et al., 1991) com modificações descritas por Frendi et al., 2013.

A PCR foi realizada em uma solução de 25 µL contendo 1U de Taq Polimerase (Promega®), Tampão da Taq Polimerase 1X, 200µM de dNTP (Invitrogen), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1µM de cada primer (Exxtend) e 3µL de suspensão bacteriana. As condições de PCR foram de um ciclo a 95 ° C por 10 min, seguidas por 4 ciclos de 5 min a 94 ° C, 5 min a 40 ° C e 5 min a 72° C e seguidas por 30 ciclos de 1 min a 94 ° C, 1 min a 55 ° C e 2 min a 72 ° C, e a última extensão a 72 ° C por 10 min. Uma alíquota de 10 µl de cada reação de amplificação foi analisada usando eletroforese em gel de agarose a 2% durante uma corrida de 2 horas.

### 4.3.4 Detecção dos genes de Resistência

A investigação dos genes que conferem resistência aos β-lactâmicos, quinolonas e sulfonamidas foi realizada a partir da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

### 4.3.5 Condições de PCR

As reações para as PCRs uniplex foram preparadas para um volume final de 25µL contendo 1U de Taq Polimerase (Promega®), Tampão da Taq Polimerase 1X, 200µM de dNTP (Invitrogen), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1µM de cada primer (Extend) e 2µL de suspensão bacteriana.

### 4.3.6 Detecção dos genes de β-lactamases

A investigação dos genes de β-lactamases foi realizada por diferentes PCRs uniplex, como descrito no item 4.3.2. As reações visaram detectar a presença dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>KPC-2</sub>. Para a realização das PCRs do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> a seguinte ciclagem foi utilizada: 10 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos de amplificação contendo: 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 58°C e 1 minuto a 72°C e um ciclo de 10 minutos a 72°C para extensão final.

Para os demais genes, a ciclagem utilizada foi a listada a seguir, alterando-se apenas as temperaturas de anelamento, sendo 56°C para *bla*<sub>CTX-M</sub> e 52°C para *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub>. A ciclagem para esses genes foi: 10 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos de amplificação contendo: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52°C e 1 minuto a 72°C e um ciclo de 10 minutos a 72°C para extensão final. Os primers utilizados ao longo das reações citadas anteriormente estão listados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Primers utilizados para detecção dos genes de β-lactamases.

Primer		Sequência 5' 3'	Gene alvo	Produto	Referência	
KPC	F	TGTCACTGTATCGCCGTC	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	1011pb	Bratu S et. al., 2005	
	R	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC				
CTX-M	F	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub>	500pb		
	R	CCGCRATATGRTTGGTGGTG				
TEM	F	TCGGGGAAATGTGCGCG	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	700pb		Cao V, et al., 2002
	R	TGCTTAATCAGTGAGGCACC				
SHV	F	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	900pb		
	R	GATTTGCTGATTTGCTCGG				



### 4.3.7 Detecção dos genes de resistência às quinolonas

A investigação dos genes de resistência às quinolonas foi realizada por diferentes PCRs uniplex, como descrito no item 4.3.2. As reações visaram detectar a presença dos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*. Para a realização das PCRs, a seguinte ciclagem foi utilizada: 10 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos de amplificação contendo: 1 minuto a 95°C, 30 1 minuto a 54°C e 1 minuto a 72°C e um ciclo de 10 minutos a 72°C para extensão final. Os primers utilizados ao longo das reações citadas anteriormente estão listados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Primers utilizados para detecção dos genes de resistência às quinolonas.

<b>Primer</b>	<b>Sequência de 5'3'</b>	<b>Gene Alvo</b>	<b>Produto</b>	<b>Referência</b>
<b>qnrA-F</b>	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG	<i>qnrA</i>	580pb	CATTOIR, V. <i>et al.</i> 2007.
<b>qnrA-R</b>	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC			
<b>qnrB-F</b>	GGM ATH GAA ATT CGC CAC T	<i>qnrB</i>	264pb	
<b>qnrB-R</b>	TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA			
<b>qnrC-F</b>	GGG TTG TAC ATT TAT TGA ATC	<i>qnrC</i>	447pb	WANG, X. D. <i>et al.</i> 2009.
<b>qnrC-R</b>	TCC ACT TTA CGA GGT TCT			
<b>qnrD-F</b>	CGA GAT CAA TTT ACG GGG AAT A	<i>qnrD</i>	582pb	CAVACO, L. M. <i>et al.</i> , 2009
<b>qnrD-R</b>	AAC AAG CTG AAG CGC CTG			

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Perfil de resistência dos isolados de *Salmonella spp.*

Das 21 amostras submetidas ao teste por disco difusão, 4 apresentaram resistência a quatro dos antibióticos testados. Sendo essas 1,15,16 e 1. A amostra 1 mostrou-se resistente a Ampicilina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina e Sulfametoxazol + Trimetoprim. Enquanto as amostras 15, 16 e 17 mostraram-se resistentes a Ampicilina, Ceftriaxona, Cloranfenicol e Sulfametoxazol + Trimetoprim. O isolado 21, demonstrou resistência a cefotaxima, além dos antibióticos anteriormente citados,

com exceção do cloranfenicol, sendo, portanto, resistente a cinco antibióticos.

As amostras 12, 13, 18 e 20 apresentaram resistência a três antibióticos, sendo eles: Ampicilina, Ceftriaxona, e Sulfametoxazol + Trimetoprim. Os demais isolados demonstraram sensibilidade a maioria dos antibióticos testados, como é possível observar na Tabela 4. O perfil exibido pelos isolados resistentes nesse estudo (38%) indica que eles configuram-se como bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDR), condição em que o microrganismo apresenta resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012). A ocorrência de cepas de *Salmonella* MDR em produtos alimentícios no Brasil vem aumentando ao longo dos anos (ALMEIDA et al., 2013; BAPTISTA et al., 2018; MACIEL; MACHADO; AVANCINI, 2019; TAUNAY et al., 1996; VOSS-RECH et al., 2015). Patógenos multidroga resistentes são associados à alta morbidade, em comparação com cepas sensíveis, uma vez que representam uma dificuldade no tratamento de doenças humanas e de animais.

Quanto os dados referentes ao perfil de resistência dos isolados e o local de coleta são associados, observa-se que a maioria das cepas que apresentaram resistência a três ou mais antibióticos são provenientes do mesmo local, o Mercado de Afogados (13, 15, 16, 17, 18). Esses resultados podem indicar que tenha havido uma contaminação cruzada entre os vendedores ou ainda que as aves tenham sido oriundas do mesmo fornecedor, tendo sofrido uma contaminação prévia.

**Tabela 4.** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Salmonella spp.* realizados por disco difusão.

Isolado	AMP	AMC	CRO	CTX	CAZ	IPM	ATM	CLO	CIP	SUT
1	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R
2	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
3	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
4	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S
5	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
6	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S
7	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S
8	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
9	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S
10	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
11	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
12	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R
13	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R
14	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
15	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R
16	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R
17	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R
18	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
21	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R

Legenda: AMP- Ampicilina; AMC- Amoxicilina + clavulanato; CRO- Ceftriaxona; CTX- Cefotaxima; CAZ- Ceftazidima; IPM- Imipenem; ATM- Aztreonam; CLO- Cloranfenicol; CIP- Ciprofloxacina; SUT- Sulfametoxazol + Trimetoprim. S - Sensível; R- Resistente; I- Intermediário..

## 5.2 Relação clonal entre os isolados e determinantes gênicos de resistência

A partir dos dados gerados pela ERIC-PCR foi possível estabelecer um padrão de relação filogenética preditivo entre os isolados de *Salmonella* incluídos no estudo. Como pode ser observado na Figura 6, os isolados demonstraram um padrão que variou de 3 a 9 bandas, o que revelou a presença de diferentes genótipos com padrão indistinguível entre si e outros, cujo padrão, se diferencia por apenas uma ou duas bandas.

Os isolados 2, 3, 4 e 5 apresentaram perfis genéticos idênticos. Apesar de se tratarem de microrganismos isolados de diferentes locais, os Mercados de Santo Amaro e São José são relativamente próximos, com cerca de 5km de distância, o que pode indicar a possibilidade de os vendedores possuírem um fornecedor em comum, de onde originou a contaminação por *Salmonella* MDR.

Os isolados 6, 7 e 8 oriundos do Mercado São José, também apresentam perfis indistinguíveis. O mercado de Afogados apresentou uma maior quantidade de cepas possivelmente caracterizadas como clones, sendo elas 12, 14, 15, 16 e 18. Neste caso, além da possibilidade de um mesmo fornecedor, de acordo com Germano & Germano (2000) um conjunto de falhas nas condições de higiene, desde a exposição dos produtos a poeira e insetos, até o compartilhamento inadequado dos utensílios como facas e recipientes entre os comerciantes, pode contribuir para a contaminação desses alimentos, resultando na disseminação dos isolados isogênicos (AZEVEDO, 2014).

As amostras 9, 11, 20 e 21 foram consideradas intimamente relacionadas geneticamente, pois possuem um padrão de bandas semelhante, diferindo apenas em uma (9 e 21) ou duas bandas (11 e 20). Segundo Tenover e colaboradores, isolados intimamente relacionados, geralmente sofreram um único evento mutacional, ou seja, uma mutação pontual, inserção ou exclusão no seu genoma (TENOVER et al., 1995).

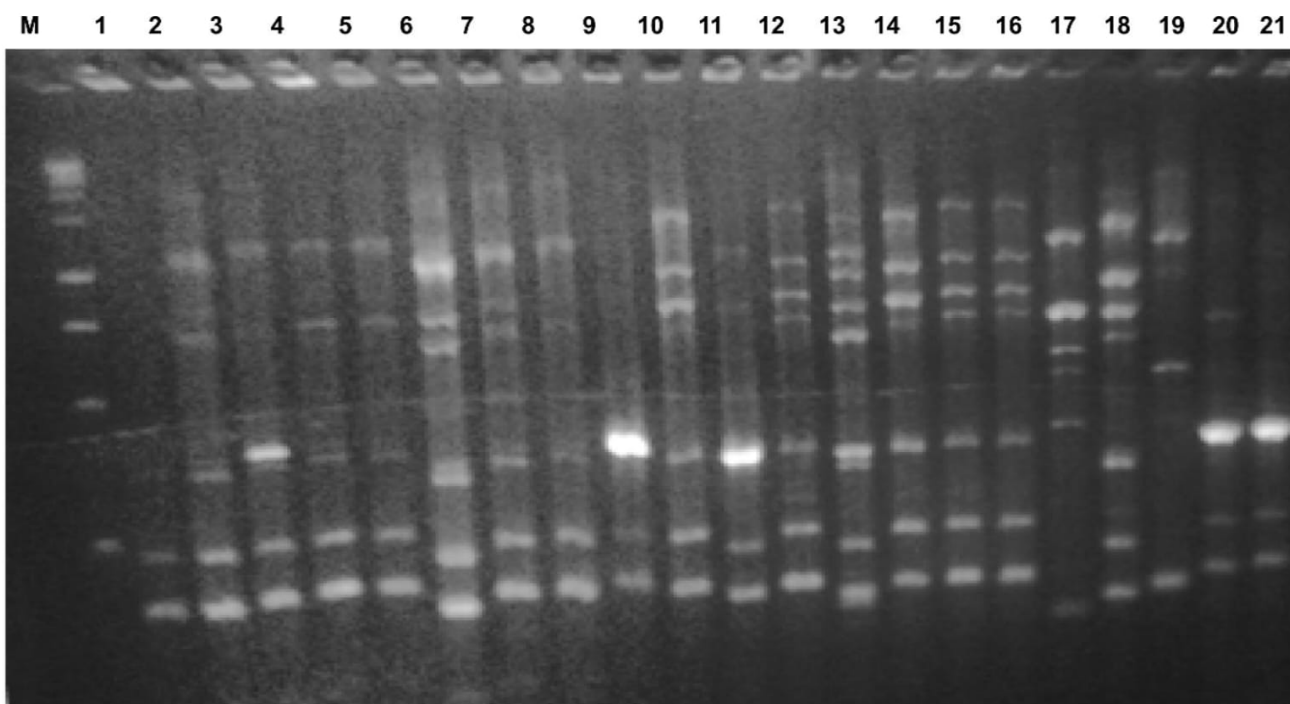


Figura 6- Gel de agarose a 2% referente a corrida de ERIC-PCR. Legenda: M – Marcador de 1000pb; 1-21 – isolados do estudo.

Os resultados obtidos através da busca por determinantes de resistência revelaram a presença de diversos genes que codificam  $\beta$ -lactamases (Figuras 7 e 8), bem como genes que conferem resistência as quinolonas (Figuras 9, 10 e 11) (Tabela 5). Tais achados corroboram com o perfil clonal dos isolados, uma vez que, as cepas que apresentaram padrão indistinguível na ERIC-PCR, possuem os mesmos determinantes gênicos de resistência (Quadro 2).

A transmissão horizontal de genes por plasmídeos que codificam as  $\beta$ -lactamases são uma constante preocupação no controle da resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (GYLES, 2008). As cefalosporinas de terceira geração assim como as quinolonas são consideradas medicamentos críticos no tratamento de salmonelose invasiva no homem, sendo a circulação de cepas resistentes a estes medicamentos um ponto importante de controle na cadeia alimentar, pois constituem uma ameaça à saúde pública (BORGES et al., 2019; MACIEL; MACHADO; AVANCINI, 2019; SIVASANKAR et al., 2020).

Existe uma grande preocupação mundial a respeito da emergência cada vez mais frequente de cepas multirresistentes do gênero *Salmonella* (STEVE YAN et al., 2003). Essa condição de multirresistência traz preocupações acerca das possíveis implicações no tratamento de casos graves de Salmonelose, além de representa

uma ameaça a agropecuária.

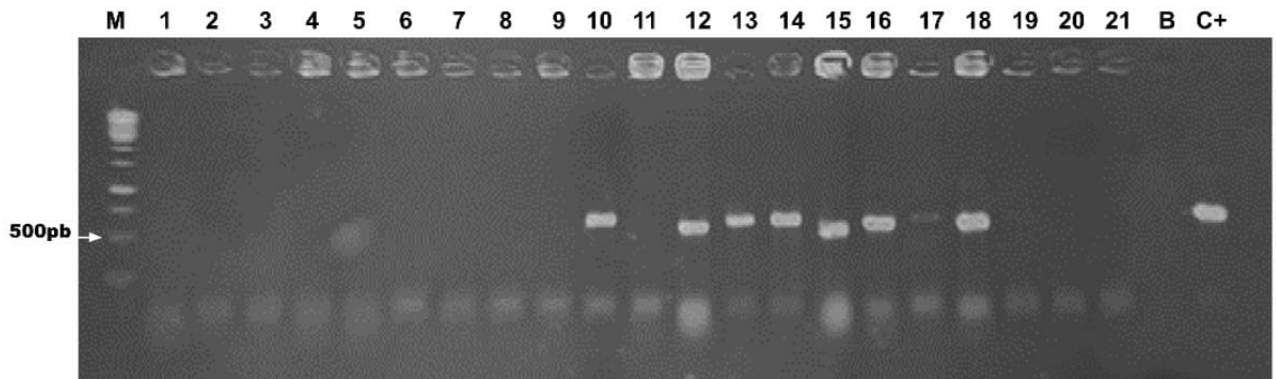


Figura 7- Gel de agarose a 1% referente a amplificação do gene *bla*CTX-M-like. Legenda: M – Marcador de 1000pb; B – Branco; 1-21 – isolados do estudo; C+ - controle positivo.

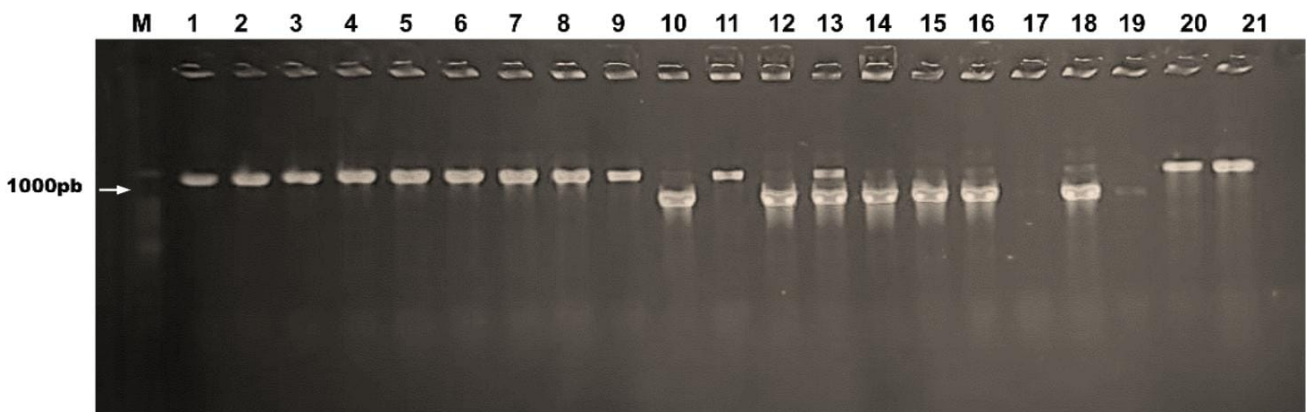


Figura 8- Gel de agarose a 1% referente a amplificação do gene *bla*TEM-like. Legenda: M – Marcador de 100pb; 1-21 – isolados do estudo.

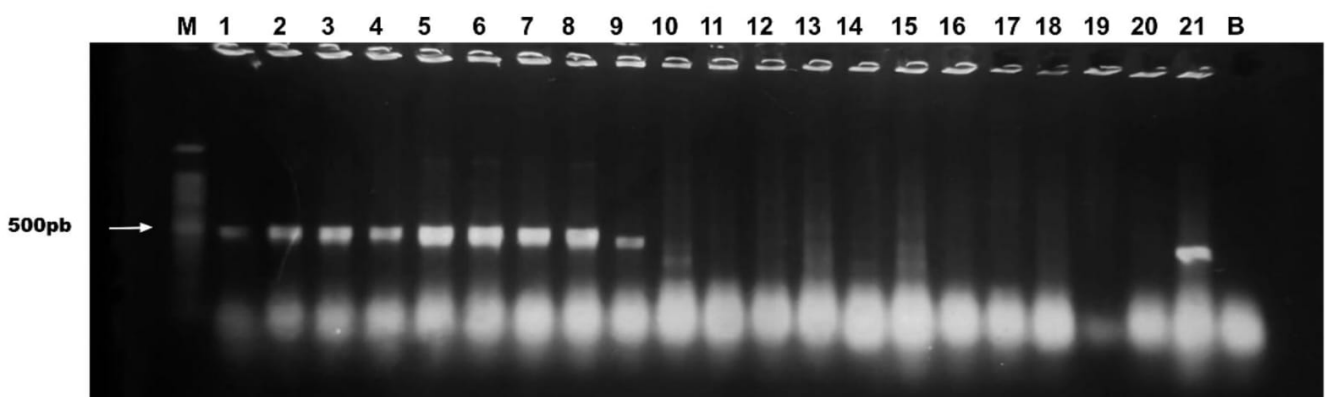


Figura 9- Gel de agarose a 1% referente a amplificação do gene *qnrA*. Legenda: M – Marcador de 100pb; B – Branco; 1-21 – isolados do estudo.

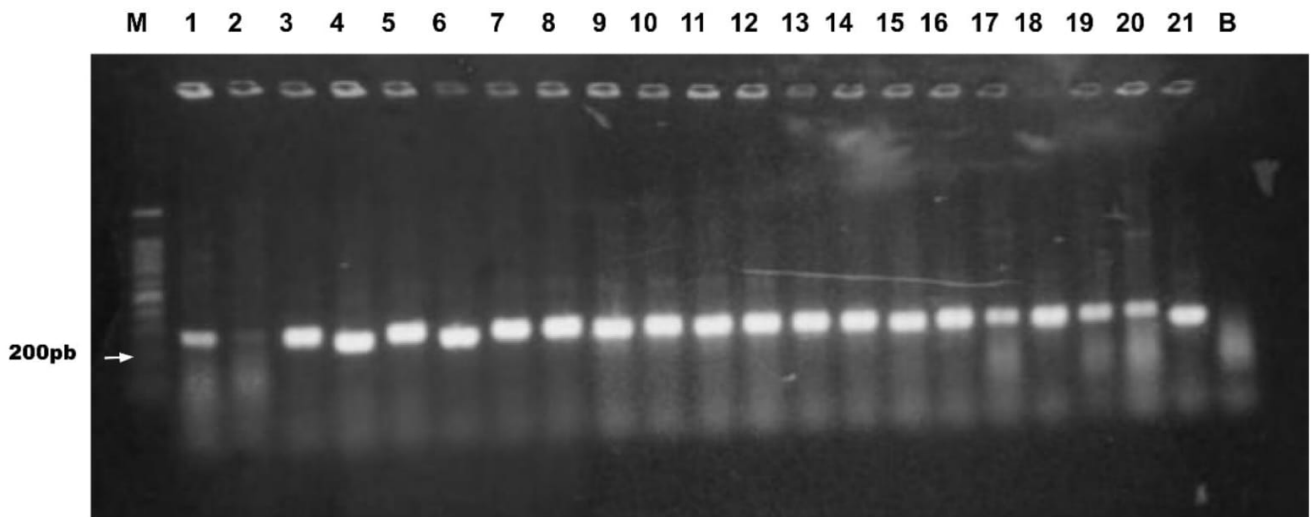


Figura 10- Gel de agarose a 1% referente a amplificação do gene *qnrB*. Legenda: M – Marcador de 100pb; 1-21 – isolados do estudo.

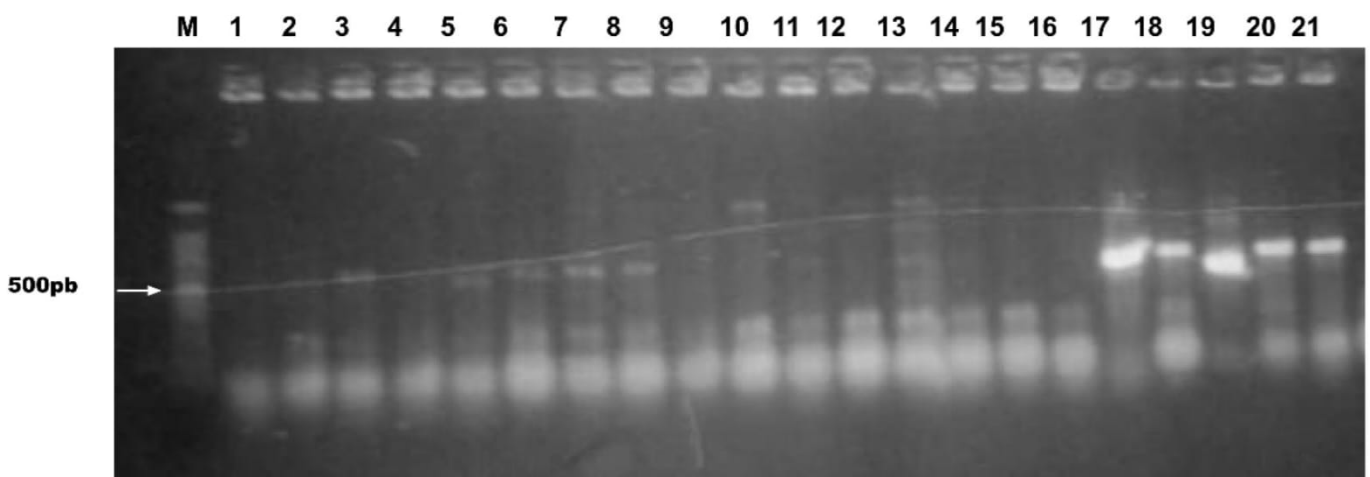


Figura 11- Gel de agarose a 1% referente a amplificação do gene *qnrD*. Legenda: M – Marcador de 100pb; 1-21 – isolados do estudo.

**Tabela 5.** Determinantes gênicos de resistência investigados no estudo.

Isolado	Resistência aos $\beta$ -Lactâmicos				Resistência as Quinolonas			
	<i>BlaTEM-like</i>	<i>BlaSHV-like</i>	<i>BlaCTX-M-like</i>	<i>BlaKPC-2</i>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>
1	+	-	-	-	+	+	-	-
2	+	-	-	-	+	+	-	-
3	+	-	-	-	+	+	-	+
4	+	-	-	-	+	+	-	-
5	+	-	-	-	+	+	-	+
6	+	-	-	-	+	+	-	+
7	+	-	-	-	+	+	-	+
8	+	-	-	-	+	+	-	+
9	+	-	-	-	+	+	-	+
10	+	-	+	-	-	+	-	-
11	+	-	-	-	-	+	-	-
12	+	-	+	-	-	+	-	-
13	+	-	+	-	-	+	-	-
14	+	-	+	-	-	+	-	-
15	+	-	+	-	-	+	-	-
16	+	-	+	-	-	+	-	+
17	-	-	+	-	-	+	-	+
18	+	-	+	-	-	+	-	+
19	+	-	-	-	-	+	-	+
20	+	-	-	-	-	+	-	+
21	+	-	-	-	+	+	-	+



**Quadro 2.** Características fenotípicas e moleculares dos isolados de *Salmonella spp.* analisados no trabalho

Isolados	Local	Perfil de clonalidade	Determinantes gênicos de resistência
1	Mercado de Santo Amaro	Subtipo A1	<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i>
2		Clone A	<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i>
3			<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrD</i>
4	<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i>		
5	<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrD</i>		
6	Mercado São José	Clone B	<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrD</i>
7			<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrD</i>
8			<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrD</i>
9		Subtipo B1	<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrD</i>
10	Mercado da Encruzilhada	Subtipo C1	<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>Bla</i> <sub>CTX-M-like</sub> , <i>qnrB</i>
11	Mercado da Boa vista		<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>qnrB</i>
12	Mercado de Afogados	Clone C	<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>Bla</i> <sub>CTX-M-like</sub> , <i>qnrB</i>
13		Subtipo C1	<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>Bla</i> <sub>CTX-M-like</sub> , <i>qnrB</i>
14		Clone C	<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>Bla</i> <sub>CTX-M-like</sub> , <i>qnrB</i>
15			<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>Bla</i> <sub>CTX-M-like</sub> , <i>qnrB</i>
16			<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>Bla</i> <sub>CTX-M-like</sub> , <i>qnrB</i> , <i>qnrD</i>
17		Subtipo C1	<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>Bla</i> <sub>CTX-M-like</sub> , <i>qnrB</i> , <i>qnrD</i>
18		Clone C	<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>Bla</i> <sub>CTX-M-like</sub> , <i>qnrB</i> , <i>qnrD</i>
19	Mercado de Água Fria	Subtipo C1	<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>qnrB</i> , <i>qnrD</i>
20			<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>qnrB</i> , <i>qnrD</i>
21			<i>Bla</i> <sub>TEM-like</sub> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrD</i>

## 6. CONCLUSÕES

- A detecção de diferentes genes de  $\beta$ -lactamases e determinantes de resistência às quinolonas demonstra o acúmulo de mecanismos de resistência nos isolados analisados, sendo a pressão seletiva exercida pela utilização indiscriminada de antibióticos na agropecuária um importante fator para disseminação destas cepas resistentes.
- A disseminação de diferentes grupos policlonais de *Salmonella spp.* MDR, em carcaças de frango, mostrada nesse estudo, reforça a necessidade de controles efetivos de contenção desse microrganismo, que além de se configurar com um risco à saúde pública, também é responsável por perdas econômicas consideráveis.

## REFERÊNCIAS

- AFEMA, J. A.; MATHER, A. E.; SISCHO, W. M. Antimicrobial Resistance Profiles Diversity in Salmonella from Humans Cattle, 2004-2011. *Zoonoses and Public Health*, v. 62, n. 7, p. 506–517, 2015.
- ALDRED, K. J. et al. Topoisomerase IV-quinolone interactions are mediated through a water-metal ion bridge: Mechanistic basis of quinolone resistance. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. 8, p. 4628–4639, abr. 2017.
- ALLEN, K. J.; 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, jul. 2002.
- ALMEIDA, F. et al. Molecular epidemiology and virulence markers of Salmonella Infantis isolated over 25years in São Paulo State, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 19, p. 145–151, out. 2013.
- ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology*, v. 153, n. 3, p. 281–287, 15 fev. 2012.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980.
- ANVISA. Antimicrobianos - Bases Teóricas e Uso Clínico. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 1, 2007.
- AZEVEDO, S. M. M. Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos. [s.l.] Universidade Fernando Pessoa, 2014.
- BAPTISTA, D. Q. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Salmonella spp. serotypes in broiler chickens and carcasses in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 38, n. 7, p. 1278–1285, 1 jul. 2018.
- BORGES, K. A. et al. Detection and quantification of salmonella spp. In poultry slaughterhouses of southern brazil. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 13, n. 5, p. 455–460, 1 maio 2019.
- BRADFORD, P. A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat *Clinical Microbiology Reviews*, 2001.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, mar. 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, American Society for Microbiology, , 1995.

CDC. Antibiotic / Antimicrobial Resistance | CDC.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Multistate Outbreaks of Salmonella Infections Linked to Contact with Live Poultry in Backyard Flocks, 2018 (Final Update). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/backyard-flocks-06-18/index.html>>. Acesso em: 28 jan. 2020.

CHAIBA ABDELLAH, RHAZI FILALI FOUZIA, CHAHLAOUI ABDELKADER, Z. M. Prevalence and anti-microbial susceptibility of Salmonella isolates from chicken carcasses and giblets in Meknes, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, v. 3, n. 5, p. 215–219, 2009.

CHIU, C. H. et al. Isolation of Salmonella enterica serotype choleraesuis resistant to ceftriaxone and ciprofloxacin. *Lancet*, v. 363, n. 9417, p. 1285–1286, 17 abr. 2004.

CONNOR, B. A.; SCHWARTZ, E. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. *Lancet Infectious Diseases*, v. 5, n. 10, p. 623–628, 2005.

DA CUNHA-NETO, A. et al. Salmonella isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state of Mato Grosso, Brazil: Antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization by repetitive sequence-based PCR system. *Poultry Science*, v. 97, n. 4, p. 1373–1381, 1 abr. 2018.

DIAS DE OLIVEIRA, S. et al. Antimicrobial resistance in Salmonella enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *International Journal of Food Microbiology*, v. 97, n. 3, p. 297–305, 1 jan. 2005.

DRLICA, K. et al. Quinolones: Action and Resistance Updated. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 11, p. 981–998, 17 out. 2009.

DUARTE, D. A. M. et al. Ocorrência de Salmonella spp. em carcaças de frango e sua suscetibilidade a agentes antimicrobianos. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, n. 3, p. 569–573, 2009.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology and Biotechnology*, v. 46, n. 1, p. 11–21, 2008.

ECKBURG, P. B. et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and drug interaction potential of SPR741, an intravenous potentiator, after single and multiple ascending doses and when combined with  $\beta$ -lactam antibiotics in healthy subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 63, n. 9, 2019.

FERNANDES, S. A. et al. MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS DE SALMONELLA TYPHIMURIUM E SALMONELLA AGONA. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*

de Sao Paulo, v. 34, n. 2, p. 91–98, 1992.

FITCH, F. M. et al.  $\beta$ -Lactam Resistance Genes: Characterization, Epidemiology, and First Detection of blaCTX-M-1 and blaCTX-M-14 in *Salmonella* spp. Isolated from Poultry in Brazil - Brazil Ministry of Agriculture's Pathogen Reduction Program. *Microbial Drug Resistance*, v. 22, n. 2, p. 164–171, 1 mar. 2016.

FUMY KOGUISHI BONI, H.; SAMPAIO CARRIJO, A.; BARBOSA FASCINA, V. Detection of *Salmonella* spp. in broiler buildings and stuff of slaughterhouse in the central region of Mato Grosso do Sul. *R. bras. Saúde Prod. Anim.*, 2011.

GALANIS, E. et al. Web-based Surveillance and Global *Salmonella* Distribution, 2000–2002. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 3, p. 381–388, mar. 2006.

GRIMONT, P.; WEILL, F.-X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9th Edition, Institute Pasteur, n. January, p. 1–166, 2007.

GYLES, C. L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 2008.

HONG NHUNG, P. et al. Phylogeny and species identification of the family Enterobacteriaceae based on dnaJ sequences. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 58, n. 2, p. 153–161, jun. 2007.

HOOPER, D. C. New Uses for New and Old Quinolones and the Challenge of Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, v. 30, n. 2, p. 243–254, 1 fev. 2000.

HU, Y. et al. Serovar diversity and antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella enterica* recovered from retail chicken carcasses for sale in different regions of China. *Food Control*, v. 81, p. 46–54, 1 nov. 2017.

IGBINOSA, I. H. Prevalence and detection of antibiotic-resistant determinant in *Salmonella* isolated from food-producing animals. *Tropical Animal Health and Production*, v. 47, n. 1, p. 37–43, 2014.

ILSI EUROPE. ILSI Europe Report Series report Commissioned by the ILSI Europe Emerging Microbiological Issues Task Force. [s.l.: s.n.].

IRINO, K. et al. Progression of *Salmonella enteritidis* phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 38, n. 3, p. 193–196, 1996.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. et al. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, v. 165, n. 7, p. 526–530, 2014.

J.-W., C. et al. High occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing salmonella in broiler carcasses from poultry slaughterhouses in South Korea. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 12, n. 3, p. 190–196, 2015.

K. BUSH, G. JACOBY, P. T.  $\beta$ -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences

for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes Lahey Clinic, 2015.

KAKU, M. et al. Surto alimentar por Salmonella Enteritidis no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 29, n. 2, p. 127–131, 1995.

KANG, Z. W. et al. Genotypic and phenotypic diversity of salmonella enteritidis isolated from chickens and humans in Korea. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 71, n. 11, p. 1433–1438, nov. 2009.

LI, R. et al. Prevalence and characterization of Salmonella species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. *International Journal of Food Microbiology*, v. 163, n. 1, p. 14–18, 5 abr. 2013.

MACIEL, M. J.; MACHADO, G.; AVANCINI, C. A. M. Investigation of resistance of Salmonella spp. isolated from products and raw material of animal origin (swine and poultry) to antibiotics and disinfectants. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 20, 2019.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, v. 351, n. 9105, p. 797–799, 14 mar. 1998.

MEDEIROS, M. A. N. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, v. 30, n. 6, p. 555–560, dez. 2011.

NELSON, J. D. et al. Treatment of Salmonella gastroenteritis with ampicillin, amoxicillin, or placebo. *Pediatrics*, v. 65, n. 6, p. 1125–1130, 1980.

OLIPHANT, C.; GREEN, G. M. Quinolones: A Comprehensive Review - American Family Physician. *Am Fam Physician*, v. 65, p. 455–464, 2002.

PAIÃO, F. G. et al. Detection of Salmonella spp, Salmonella Enteritidis and Typhimurium in naturally infected broiler chickens by a multiplex PCR-based assay. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 37–41, 2013.

PHAM, T. D. M.; ZIORA, Z. M.; BLASKOVICH, M. A. T. Quinolone antibiotics. *MedChemComm Royal Society of Chemistry*, , 2019.

POIREL, L.; CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, n. FEB, 2012.

PRIBUL, B. R. et al. Characterization of quinolone resistance in Salmonella spp.

- isolates from food products and human samples in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 1, p. 196–201, 1 jan. 2016.
- REZENDE, C. S. M. et al. Sorovares de Salmonella isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. *Rev Port Cienc Vet*, v. 100, n. 555–556, p. 199–203, 2005.
- RIBEIRO, A. R. et al. Salmonella spp. in raw broiler parts: Occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the Salmonella enteritidis isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, n. 2, p. 296–299, 2007.
- ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance *Lancet Infectious Diseases*, out. 2006.
- SÁNCHEZ, M. B. et al. Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. *BMC Microbiology*, v. 8, 2008.
- SAÚDE, M. DA. Diagnóstico Laboratorial do Gênero Salmonella spp. 1ª ed. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2011a.
- SAÚDE, M. DA. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da. [s.l: s.n.].
- SIVASANKAR, C. et al. Anti quorum sensing and anti virulence activity of tannic acid and it's potential to breach resistance in Salmonella enterica Typhi / Paratyphi A clinical isolates. *Microbial Pathogenesis*, v. 138, 1 jan. 2020.
- STEVE YAN, S. et al. An overview of Salmonella typing: Public health perspectives *Clinical and Applied Immunology Reviews*, dez. 2003.
- STRAHILEVITZ, J. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat *Clinical Microbiology Reviews*, out. 2009.
- SU, L. H. et al. In vivo acquisition of ceftriaxone resistance in Salmonella enterica serotype anatum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 2, p. 563– 567, 1 fev. 2003.
- TAUNAY, A. E. et al. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 38, n. 2, p. 119–127, mar. 1996.
- TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing *Journal of Clinical Microbiology*, 1995.
- THIENNIMITR, P.; WINTER, S. E.; BÄUMLER, A. J. Salmonella, the host and its microbiota *Current Opinion in Microbiology*, fev. 2012.
- THRELFALL, E. J. Antimicrobial drug resistance in Salmonella : problems and perspectives in food- and water-borne infections . *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, n. 2, p. 141–148, jun. 2002.

TRAN, J. H.; JACOBY, G. A. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 8, p. 5638–5642, 16 abr. 2002.

UR RAHMAN, S. et al. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases *BioMed Research International* Hindawi Limited, , 2018.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 5 maio 2015.

VELDMAN, K. et al. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, n. 6, p. 1278–1286, jun. 2011.

VETTING, M. W. et al. Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant. *Biochemistry*, v. 47, n. 37, p. 9825–9835, 16 set. 2008.

VOSS-RECH, D. et al. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. ***Poultry Science***, v. 94, n. 3, p. 433–441, 14 nov. 2015.

WINOKUR, P. L. 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. 2777–83, out. 2000.

ZIECH, R. E. et al. Multidrug resistance and ESBL-producing *Salmonella* spp. isolated from broiler processing plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 1, p. 191–195, 1 jan. 2016.