JACI CLEA DE CARVALHO CAMARGO

Presença de cepas de Salmonella spp resistentes aos antimicrobianos criticamente importantes usados na produção de aves comerciais no Brasil



JACI CLEA DE CARVALHO CAMARGO

Presença de cepas de Salmonella spp resistentes aos antimicrobianos criticamente importantes usados na produção de aves comerciais no Brasil

Tese apresentada ao Programa da Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. João Palermo-Neto

São Paulo 2013 Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2870 Camargo, Jaci Clea de Carvalho FMVZ Presença de cepas de Saln

Presença de cepas de *Salmonella* spp resistentes aos antimicrobianos criticamente importantes usados na produção de aves comerciais no Brasil. / Jaci Clea de Carvalho Camargo. -- 2013. 102 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo-Neto.

1. Salmonella. 2. Resistência. 3. Antimicrobianos I. Título.

ERRATA

Resumo

1º parágrafo

CAMARGO, J. C. C. Presença de cepas de Salmonella spp resistentes aos antimicrobianos criticamente importantes usados na produção de aves comerciais no Brasil. 2013. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

Paulo, 2013.

Página Parágrafo Onde se lê Leia-se

[...]strains resistant.

[...] strains resitant.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: JACI CLEA DE CARVALHO CAMARGO Título: Presença de cepas de Salmonella spp resistentes aos antimicrobianos criticamente importantes usados na produção de aves comerciais no Brasil Tese apresentada ao Programa da Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Data: ____/___ Banca examinadora Prof. Dr.:____ Instituição:_____Julgamento:_____ Prof. Dr.: Instituição:______Julgamento:_____ Prof. Dr.:_____ Instituição: Julgamento: Prof. Dr.:_____ Instituição:______Julgamento:_____



À minha mãe, Cacilda Camargo, por ensinar-me através do exemplo incansável de dedicação profissional, coragem de vida e caráter humano. Ao meu filho, Marcelo, pelo amor e compreensão em todos os momentos, inclusive nas minhas constantes ausências. Aos meus familiares e amigos com os quais Deus me abençoou e que, por existirem, fizeram a minha vida valer a pena.



AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Projeto Temático – n° 2009/51886-3) e ao CNPq (Projeto Universal – n° 470776/2009-9) pelo suporte financeiro para a execução deste estudo.

Às empresas Eli Lilly e Zoetis Inc. pela generosidade em permitirem que eu dedicasse tempo a esta jornada.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, cujo nome busco honrar como profissional.

Ao Departamento de Patologia, Professores, Secretárias e Funcionários pela convivência prazerosa.

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto, meu orientador, pela coragem em aceitar-me e pela paciência durante esta jornada.

À Profa. Dra. Silvana Lima Górniak, chefe do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada, pela amizade, apoio e convivência.

À Profa. Dra. Isis Hueza, pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Jorge Flório, pelo apoio, por estar sempre disponível e por toda contribuição com seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Antonio Piantino Ferreira pela generosidade em aceitar esta co-orientação.

À Dra. Claudete Astolfi Ferreira pela delicadeza em abrir as portas do Laboratório de Ornitopatologia.

À Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, exemplo de profissionalismo e uma das gratas surpresas que encontrei neste caminho.

À Profa. Dra. Anderlise Borsoi por assumir o desafio de tornar esta tese possível e pela colaboração enriquecedora.

Ao Dr. Wanderley Moreno Quinteiro Filho pela amizade e apoio que jamais esquecerei.

Ao Rodrigo Vieira, amigo incansável em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Nilton Lincopan pela valiosa contribuição.

Ao amigo Bruno Honda pelas palavras de incentivo, por ensinar-me e por estar sempre ao lado. "A amizade duplica as alegrias e divide as tristezas" – Francis Bacon.

Enfim, a todos os companheiros de escola, vida e trabalho com quem convivi durante estes anos e que fizeram esta jornada mais prazerosa.

RESUMO

CAMARGO, J. C. C. Presença de cepas de Salmonella spp resistentes aos antimicrobianos criticamente importantes usados na produção de aves comerciais no Brasil. [Presence of Salmonella spp strains resitant to the critically important antimicrobials used in the commercial poultry production in Brazil]. 2013. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O Brasil é hoje um dos maiores produtores e exportadores de alimento no mundo, destacandose no cenário de produção de proteína animal como o 1º país exportador em volume de carne de frango, dentre tantas conquistas recentes do agronegócio brasileiro. Essas conquistas foram alcançadas pelo país graças à sua inegável vocação agropecuária, resultado de uma série de fatores, como extensão territorial e áreas agricultáveis, clima, disponibilidade de água e ambiente regulatório favorável à adoção de tecnologias. Dentre as tecnologias existentes e disponíveis que tornam possível um país de vocação agrícola se tornar um dos maiores produtores mundiais de alimentos estão os aditivos zootécnicos melhoradores do desempenho e, dentre eles, os antimicrobianos. Na posição de um dos atores principais no cenário internacional de produção de alimentos, o Brasil vem-se deparando com questões relacionadas à preocupação global com relação à segurança do alimento e aos escândalos de contaminação de alimentos ocorridos em diversos países, inclusive na Europa. A preocupação com a segurança do alimento tem levado os diversos organismos internacionais, dentre eles, a Organização Mundial da Saúde e a Organização Mundial de Saúde Animal a estabelecerem critérios de análise de risco com relação aos principais patógenos envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares e ao risco de transmissão de resistência bacteriana através dos alimentos. Sendo assim, o presente estudo foi desenvolvido com base na lista de antimicrobianos criticamente importantes, elaborada em conjunto pela OMS e OIE, na determinação do perfil de resistência destes frente a Salmonella isolada de aves e materiais avícolas em diferentes períodos. Foram utilizadas 100 amostras de Salmonella spp isoladas em granjas no Brasil, sendo 68 amostras colhidas durante o período atual (de 2008 a 2010) e 32 amostras colhidas durante a década de 90 (de 1989 a 1999), as quais passaram por testes de difusão em disco, determinação da concentração inibitória mínima, sorotipificação e determinação clonal por eletroforese em campo pulsado. Com relação às amostras colhidas no período atual (2008 a 2010), evidenciou-se uma redução no perfil de sensibilidade para diferentes antimicrobianos, marcadamente para a classe das cefalosporinas, com 19 (22%) das amostras resistentes e 38 (56%) das amostras apresentando resistência intermediária. Várias das amostras desse período apresentaram multirresistência. Para 32 das amostras isoladas na década de 90, não se evidenciou resistência a nenhum dos antimicrobianos selecionados, embora se tenham encontrado 13 amostras (41%) com perfil de resistência intermediário para o ceftiofur. Ainda, detectaram-se 10 diferentes sorovares de *Salmonella* com somente um perfil clonal para as amostras antigas e perfil variado para as amostras atuais. Os resultados comprovaram o aumento de resistência aos antimicrobianos criticamente importes em amostras recentes isoladas de aves e material avícola. Tais dados comprovam que cada vez mais a atenção deve ser focada no uso prudente dos antimicrobianos na produção animal.

Palavras-chave: Salmonella. Resistência. Antimicrobianos.

ABSTRACT

CAMARGO, J. C. C. Presence of Salmonella spp strains resistant to the critically important antimicrobials used in the commercial poultry production in Brazil. [Presença de cepas de Salmonella spp resistentes aos antimicrobianos criticamente importantes usados na produção de aves comerciais no Brasil]. 2013. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Brazil is currently one of the largest producers and exporters of food in the world, appearing in the animal protein production ranking as the 1st exporter of poultry, in terms of volume, among many recent achievements of the brazilian agribusiness. These achievements have been made possible due to the country natural agriculture vocation, which is the result of a number of factors, such as land extension and available land for agriculture, climate, water availability and regulatory environment open to technology adoption. Among the existing technologies available that enable a country to become one of the largest producers of food are the feed additives and performance enhancers, including the antibiotics. In the position of one of the key actors in the international food production environment, Brazil has been facing issues related to the global concerns on food safety and the food contamination scandals occurred in several countries, including in Europe. These concerns has led several international organizations, including the World Health Organization and the International Organization of Animal Health to establish criteria for risk analysis in relation to the main pathogens involved in foodborne disease outbreaks and the risk of transmission of resistant bacteria from food. Therefore, this study was developed based on the list of the critically important antimicrobials, developed jointly by WHO and the OIE, in determining the resistance profile of them against Salmonella isolated from poultry and poultry materials in different periods. It have been used 100 samples of Salmonella isolated from poultry farms in Brazil, 68 samples taken during the current period (2008 to 2010) and 32 samples taken during the 90s (1989-1999), which have been tested for antibiotic disk diffusion, minimum inhibitory concentration, serotyping and clone determination by pulsed field gel electrophoresis. In the samples collected in the current period (2008-2010), there was a reduction in susceptibility to different antimicrobials, notably for the class of cephalosporins with 19 (22%) of isolates resistant and 38 (56%) of samples presenting intermediate resistance. Several samples from this period showed multidrug resistance. For 32 of the

isolates in the 90s, there was no evidence of resistance to any antimicrobial selected, although it was found 13 samples (41%) with intermediate resistance profile for ceftiofur. It have been identified 10 different *Salmonella* serovars, among them only one clone profile for the old samples and different clone profiles for the current samples. Results showed increased antimicrobial resistance to the critically important antimicrobials for the more recent isolates from poultry and poultry material. These data demonstrate that more attention should be focused on the prudent use of antimicrobials in animal production.

Keywords: Salmonella. Resistance. Antimicrobials.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Características dos diferentes mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos
Quadro 2-	Categorização dos antimicrobianos usados em medicina humana de acordo com a importância no tratamento de doenças
Quadro 3-	Categorização dos antimicrobianos usados em medicina veterinária de acordo com sua importância no tratamento de doenças
Quadro 4-	Comparação dos antimicrobianos criticamente importantes em medicina humana e antimicrobianos criticamente importantes em medicina veterinária33
Quadro 5-	Denominação dos genes, sequência de nucleotídeos, produto esperado e referência dos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para a caracterização das cepas de <i>Salmonella</i>
Quadro 6- '	Tipificação, ano de isolamento, origem da amostra e o perfil de resistência das cepas selecionadas
Quadro 7-	Identificação da amostra, ano de isolamento, origem e concentração inibitória mínima para determinada de amostras de <i>Salmonella</i> que apresentaram resistência frente aos antimicrobianos criticamente importantes
Quadro 8-	Análise de ancestralidade de <i>Salmonella</i> Schwarzengrund, pertencente ao complexo clonal CC33, produtora de beta-lactamase de amplo espectro (ESBL) de enzima do tipo CTX-M-2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Resultados da análise de cinquenta cepas de <i>Salmonella</i> para resistência a antimicrobianos no teste de disco difusão, frente a vinte e um antimicrobianos 64
Tabela 2-	Porcentagem de amostras de <i>Salmonella</i> de diferentes décadas caracterizadas como resistentes, resistência intermediária e sensíveis para os antimicrobianos criticamente importantes em medicina veterinária e/ou humana

LISTA DE FIGURAS

Figura		_	_				Agricultura,			. 42
Figura 2	isoladas no	os entre	2008 e	201	0, testadas	fre	enta cepas de ente aos anti	imicrobian	os	. 65
Figura 3	_	-			•		<i>lla</i> submetidas ana			. 70

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AMR – Antimicrobial Resistance

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain and Heart Infusion

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CDC - Center for Disease Control

CIM (ou MIC) – Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

COMECON – Council for Mutual Economic Assistance

CPAA – Coordenação de Fiscalização de Produtos para Alimentação Animal

CPV - Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários

D.O.U. - Diário Oficial da União

DFIP - Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EMA – European Medicines Agency

EU – European Union

FAO – Food and Agriculture Organization

FDA – Food and Drug Administration

FMI – Fundo Monetário Internacional

FMVZ/USP - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo

GATT – General Agreement on Tarifs and Trade

GT – Grupo de Trabalho

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDA- Ingestão Diária Aceitável

ITO – International Trade Organization

JECFA – Joint of Experts of the Committee on Food Animal

LMR – Limites Máximos de Resíduos

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MLST – Tipificação de Sequência de Multilocos

NAFTA – North American Free trade Agreement

NOEL – Non Observed Effect Level

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

OMC- Organização Mundial do Comércio

OMS- Organização Mundial da Saúde

PCC – Pontos Críticos de Controle

PCR – Reação de Cadeia de Polimerase

PFGE – Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

PIB - Produto Interno Bruto

RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA

SDA – Secretaria de Defesa Agropecuária

 $SE-Salmonella\ enteritidis$

ST – Sequence Type

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

TGI – Trato gastrintestinal

UBABEF - União Brasileira de Avicultura

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

USDA - United States Department of Agriculture

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO20	0
2 REVISAO DA LITERATURA	6
2.1 AGÊNCIAS REGULATÓRIAS E A QUESTÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS	6
2.2 O COMÉRCIO GLOBAL DE ALIMENTOS E A IMPORTÂNCIA DA OMC – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DO COMÈRCIO	5
2.3 ANTIMICROBIANOS DE USO EM MEDICINA VETERINÁRIA E REGULAMENTAÇÃO NO BRASIL 4	1
2.4 AVICULTURA, SAÚDE PÚBLICA E Salmonella	
2.5 DETERMINAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE Salmonella	2
3 OBJETIVOS50	6
3.1 OBJETIVO GERAL	6
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	б
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	7
4.1 EXPERIENTO 1: Perfil de resistência a antimicrobianos	7
4.2 EXPERIMENTO 2: Determinação de sorovar	7
4.3 EXPERIMENTO 3: Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)57	7
4.4 EXPERIMENTO 4: Análise clonal.	8
4.5 EXPERIMENTO 5: Análise de ancestralidade	8
5 MATERIAIS E MÉTODOS59	9
5.1 BACTÉRIAS	9
5.2 ANTIMICROBIANOS	9
5.3 TESTE DE DISCO DIFUSÃO	0
5.4 SOROTIPIFICAÇÃO	0
5.5 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	1

5.6 ANÁLISE POR PFGE	61
5.7 ANÁLISE DE MLST	62
6 RESULTADOS	64
6.1 EXPERIMENTOS 1 e 2	64
6.2 EXPERIMENTO 3	69
6.3 EXPERIMENTO 4	70
6.4 EXPERIMENTO 5	71
7 DISCUSSÃO	72
8 CONCLUSÕES	82
8.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	82
8.2 CONCLUSÃO GERAL	83
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICES	98

1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados da FAO - Food and Agriculture Organization da Organização Mundial da Saúde, em 2009 alcançamos o recorde de 1 bilhão e 200 milhões de pessoas passando fome no mundo. Isso significa que um sexto da população mundial passa fome ou está em estado de desnutrição. O relatório aponta que a maior parte das pessoas desnutridas se encontra na região Ásia-Pacífico (642 milhões), seguida da África subsaariana (265 milhões), América Latina (53 milhões) e da região que compreende o Oriente Médio e o norte da África (42 milhões). Nos países desenvolvidos, estima-se que 15 milhões de pessoas sofrem com a fome (FAO, 2013b).

O aumento da fome no mundo não se deve apenas a problemas relacionados à produção mundial de alimentos; é causado, também, pela crise econômica mundial que tem resultado em menor remuneração e maior desemprego em diversos países no mundo. Desse modo, reduziu-se o acesso dos pobres ao alimento. A desaceleração econômica mundial e o custo dos alimentos vêm empurrando mais 100 milhões de pessoas à pobreza e à fome (FAO, 2013b).

Conforme já apontado pelo senegalês Jacques Diouf, que esteve no comando da FAO de 1994 a 2011, a crise silenciosa da fome, que afeta 1 em cada 6 pessoas no mundo, pressupõe um sério risco à segurança e à paz mundial. O atual Diretor Geral da FAO, o brasileiro José Graziano da Silva, que assumiu esse cargo em janeiro de 2012, declarou que o foco das atividades da FAO é a segurança alimentar, isto é, apoiar os países de baixa renda e com déficit alimentar, especialmente aqueles que se encontram em situação de crise prolongada. De acordo com Graziano, viabiliza-se na FAO a criação de equipes que irão reunir as habilidades da FAO em assessoria sobre políticas, planejamento de investimentos, mobilização de recursos, respostas de emergência e desenvolvimento sustentável. Ainda, a erradicação da fome não deve ser separada de outros desafios globais, como a recuperação das economias nacionais, a proteção dos recursos naturais da degradação ambiental e a mitigação dos impactos negativos das mudanças climáticas, bem como a adaptação a estas. Como Diretor, Graziano tem como compromisso priorizar a erradicação da fome, a produção e o consumo sustentável de alimentos e a busca de uma maior equidade na gestão global de alimentos (FAO, 2013a).

No Programa Alimentar Mundial da FAO, o maior inimigo da saúde em todo o mundo ainda é o mesmo com que a humanidade já se defrontava há 100.000, ou há 10.000 anos atrás,

ou seja, a fome e as doenças provocadas pela fome. Segundo dados do programa, o número de pessoas que morrem no mundo devido à fome já é maior que a soma do número de mortes por AIDS (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida), malária e tuberculose. Vale ressaltar que grande parte do número de mortos pela fome são crianças. Estima-se que todos os anos 17 milhões de bebês nasçam com peso abaixo da média. São crianças que "herdam" a fome de mães subalimentadas. Se viverem tempo suficiente, provavelmente, seus filhos, que já nascerão desnutridos, também passarão fome, ou seja, em determinadas regiões do mundo, a fome ainda é crônica e perdura de geração em geração e com ela suas conseqüências funestas que vão além da mortalidade (FAO, 2006). Ressalte-se, nesse contexto, que a desnutrição peri-natal está relacionada a déficit cognitivo permanente.

Considerando o crescimento da população mundial, é possível inferir que a relação recursos naturais por habitante (por exemplo, espaço territorial, terras agricultáveis e água potável por habitante) certamente continuará a diminuir e a taxa de crescimento potencial da agropecuária no futuro estará mais limitada que agora, devido às questões ambientais e de sustentabilidade, que impor-se-ão de forma cada vez mais incisiva. Dessa forma, o investimento em tecnologia e ferramentas que favoreçam o crescimento da produção agropecuária é de fundamental importância para fechar essa equação desigual: crescimento da população e demanda por alimentos *versus* produção segura e abundante de alimentos e preservação do meio ambiente (FAO, 2006). A boa notícia é que é possível aumentar a produção segura de alimentos, sem necessidade de aumentar a extensão de terras agricultáveis e/ou disponibilidade e uso de água potável. O uso de tecnologias que agreguem valor à produção será definitivo para o crescimento da produção de alimentos de forma tal a assegurar o atendimento da crescente demanda.

O Brasil, um dos maiores produtores e exportadores de alimento no mundo, é um exemplo de como o uso de ferramentas e tecnologia pode fazer o diferencial para o desenvolvimento sustentável. Nosso país se destaca no cenário de produção de proteína animal como o 1º país exportador em volume de carne de frango, 1º. país exportador em volume de carne de bovinos e oscilando entre a 4ª e 5ª posições de exportador de carne suína, ainda com perspectivas de crescimento (IBGE, 2013). Nos últimos anos, o Brasil tem lançado mão do uso de tecnologias de produção como, por exemplo, equipamentos de ponta, sementes de alta qualidade, melhoradas com o uso de biotecnologia, melhoramento genético, qualidade na alimentação animal, sanidade, uso de produtos inovadores no controle de pragas e doenças na agricultura e na pecuária.

Dentre as tecnologias existentes e disponíveis que tornam possível um país de vocação agrícola se tornar um dos maiores produtores mundiais de alimentos, em especial, proteínas, estão os aditivos zootécnicos melhoradores do desempenho e, dentre eles, os antimicrobianos.

Antimicrobianos são substâncias capazes de matar ou inibir o crescimento de microrganismos, sem comprometer a saúde do indivíduo medicado. São empregados em Medicina Veterinária como medicamentos – de grande importância no tratamento e prevenção de doenças infecciosas – e como aditivos de rações, visando diminuir a mortalidade e melhorar o desempenho de animais de produção (PALERMO-NETO, 2006).

Recentemente, está sendo proposta uma nova abordagem com relação ao uso de antimicrobianos em Medicina Veterinária, a saber: uso terapêutico, metafilático (quando um animal está doente, então se tratam todos do rebanho), profilático (quando não existem animais doentes no rebanho, mas existe o desafio, então se tratam todos) e uso como aditivo. Com tamanha variabilidade de usos e aplicabilidade, os antimicrobianos são considerados ferramentas essenciais para o desenvolvimento da produção pecuária no Brasil.

Tal cenário, aliado aos escândalos de contaminação de alimentos ocorridos recentemente na União Européia, como o ressurgimento de doenças como Febre Aftosa no Reino Unido, o aparecimento de casos da Doença da "Vaca Louca" em diversos países pertencentes ao bloco europeu e Estados Unidos, além da disseminação da epidemia de Gripe Aviária por vários países em diferentes continentes, tem gerado inquietações e questionamentos dos consumidores e das autoridades sanitárias da área humana. Em especial, questiona-se a segurança dos alimentos de origem animal, no que se somam as preocupações de que o uso de antimicrobianos em Medicina Veterinária poderia acarretar ou acelerar o desenvolvimento de resistência bacteriana simples, cruzada ou múltipla a antimicrobianos de relevância para o tratamento de enfermidades humanas. Basicamente, as duas grandes questões que se fazem são:

- Seriam os resíduos de antimicrobianos presentes em alimentos de origem animal capazes de oferecer pressão de seleção em bactérias existentes no trato gastrintestinal - TGI de humanos que ingerem esse alimento? E nesse caso, a resposta, obviamente é NÃO!! As autoridades internacionais levam este fato em consideração ao fixar os Limites Máximos de Resíduos (LMRs) para antimicrobianos de uso em animais de produção. De fato, ao avaliar o pacote de estudos toxicológicos de um antimicrobiano para determinação dos LMRs, o JECFA – *Joint of Experts of the Committee on Food Animal* – observa , entre outros, os resultados dos estudos de NOEL – *Non Observed Effect Level* – relativos à menor dose do antimicrobiano que não resulta em qualquer aparecimento de efeito sobre a microbiota

intestinal, isto é, que não induz pressão de selação. Quando o menor valor de NOEL é relativo ao resultado de um estudo sobre a microbiota intestinal, esse valor será utilizado como base para o cálculo da IDA — Ingestão Diária Aceitável, neste caso, chamada de IDA microbiológica, e LMRs. Dessa forma, ao garantir que as avaliações dos efeitos de um antimicrobiano sobre a microbiota intestinal sejam consideradas no início do processo de estabelecimento de níveis de segurança, o JECFA e, logo, o *Codex Alimentarius*, garantem que, ao recomendar limites máximos de resíduos para um fármaco, as eventuais preocupações de efeitos que esses possam ter sobre a microbiota intestinal já foram consideradas. Portanto, uma vez respeitados os LMRs estabelecidos, é mínimo o risco de pressão de seleção, desenvolvimento de resistência ou qualquer outro efeito de um antimicrobiano sobre a microbiota intestinal humana (FAO, 2013c).

- Existiriam bactérias resistentes no TGI (trato gastointestinal) dos animais de produção, oriundas da pressão de seleção exercida pelo tratamento com antimicrobiano durante a fase de criação animal, capazes de deixar o TGI desses animais e contaminar a carcaça dos mesmos, sendo ingerida por seres humanos e transmitindo a resistência adquirida para as bactérias que colonizam o TGI humano? A resposta a esta questão pode ser sim!

Assim, para melhor analisar esta possibilidade, diversos organismos internacionais, como o *Codex Alimentarius* da FAO, a OIE – Organização Mundial de Sáude Animal, a OMS – Organização Mundial de Sáude, autoridades regulatórias ao redor do mundo, universidades, associações de defesa do consumidor, empresas fabricantes de antimicrobianos, empresas produtoras de alimento e demais elos da cadeia produtiva vêm se reunindo, nos últimos anos, em todo o mundo, para debater e avaliar o risco dessa ocorrência.

No Brasil, país signatário do *Codex Alimentarius*, também existe um Grupo de Trabalho composto por representantes de todos os elos da cadeia produtiva de proteína animal, bem como representantes da academia, do MAPA e da ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

De fato, a Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - estabeleceu, através da publicação da Portaria n° 808 no Diário Oficial da União de 06 de novembro de 2003 (BRASIL, 2003b), um grupo de trabalho para análise da segurança de uso em saúde animal das moléculas carbadox, olaquindox, bacitracina de zinco, espiramicina, fosfato de tilosina e virginiamicina. Posteriormente, a mesma SDA do MAPA fez compor novo grupo de trabalho, através da publicação, em D.O.U, da Portaria n° 40 de 08 de janeiro de 2006 (BRASIL, 2006a), para análise das moléculas monensina, maduramicina, avilamicina, flavomicina e enramicina. Recentemente, um terceiro grupo de

trabalho designado pelo MAPA, através da publicação da Portaria nº 428, de 10 de dezembro de 2009 (BRASIL, 2009), ainda trabalha analisando a segurança de uso em saúde animal das moléculas colistina, tiamulina, lincomicina, clorexidina e halquinol. Como resultado das discussões ocorridas nas três ocasiões em que se convocaram os grupos de trabalho, recomendou-se a descontinuação do uso como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho em animais de produção, no Brasil, das seguintes moléculas: olaquindox, pela Instrução Normativa nº 11 de 24 de novembro de 2004 (BRASIL, 2004b), carbadox, pela Instrução Normativa nº35 de 14 de novembro de 2005 (BRASIL, 2005), eritromicina e espiramicina, estas 2 últimas resultantes das análises do terceiro grupo de trabalho, sendo ainda aprovadas para uso veterinário quando prescritas com indicação terapêutica, conforme Instrução Normativa nº 14 de 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012a).

Vale ressaltar que, por questões de segurança de uso e toxicidade e não por questões relacionadas ao tema de resistência bacteriana aos antimicrobianos, o MAPA já havia feito publicar em D.O.U a Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003 (BRASIL, 2003a), proibindo a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contivessem estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível emprego na alimentação animal, ficando cancelados, a partir daquela data, as licenças e registros concedidos tanto às matérias primas quanto aos produtos acabados. Aos produtos de uso em saúde animal contendo cloranfenicol e nitrofuranos até então autorizados foi concedido um prazo de até noventa dias para serem completamente retirados do mercado, o que ocorreu.

Voltando ao cenário mundial, durante reunião conjunta de especialistas realizada pela FAO, (2005) foram identificados pela OIE e OMS, Organização Mundial de Saúde Animal e Organização Mundial da Saúde, respectivamente, os seguintes antimicrobianos criticamente importantes para uso humano e em saúde animal, para os quais deveriam ser priorizadas as medidas de análise de risco com relação à questão de transmissão de resistência: as cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações; os macrolídeos e as quinolonas (incluindo-se aqui as fluorquinolonas). Da mesma forma, as bactérias identificadas como de interesse para as questões de análise risco de transmissão de resistência antimicrobiana foram: *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp e os *Enterococcus* spp. Finalmente, frangos de corte e suínos foram tomados como espécies de animais de produção prioritárias para os estudos relacionados à questão de risco de transmissão de resistência antimicrobiana entre animais e humanos (JOINT FAO/WHO/OIE, 2007).

Ainda que o fenômeno de resistência seja inegável, não existe, até o presente momento, um modelo de análise de risco proposto para o estudo da resistência bacteriana em nível de campo, isto é, que avalie a real contribuição do uso de antimicrobianos em animais de produção para a magnitude do problema. Nesse contexto, a OIE realizou em Paris, França, de 13 a 15 de março de 2013, a Conferência Global da OIE Sobre o Uso Responsável e Prudente de Agentes Antimicrobianos Para Animais (OIE, 2013). A Organização tem trabalhado ativamente, por mais de uma década, para garantir a qualidade dos medicamentos de uso veterinário, incluindo-se aqui os antimicrobianos, desenvolvendo estratégias para as ações nessa área. A Organização promove o uso responsável e prudente dos agentes antimicrobianos em animais terrestres e aquáticos, já que seu uso responsável e prudente é crucial para salvaguardar a eficácia terapêutica dos mesmos em ambos humanos e animais.

Na Conferência, ainda foi ressaltado que a OIE trabalha com a interface animal-humano-ecossistema e, portanto, endossa o conceito de "Uma Saúde" ("One Health" concept), uma vez que humanos e animais compartilham as mesmas bactérias e que 60% das bactérias patogênicas para humanos são de origem animal. Claramente a prioridade da OIE é de fortalecer e melhorar a coordenação entre os setores de saúde pública e de saúde animal, também envolvendo o setor ambiental quando relevante. No tocante às bactérias patogênicas, para o Brasil, dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2009) divulgaram ser a Salmonella a bactéria mais envolvida em surtos alimentares. Os produtos de origem animal, com ênfase em aves e derivados, estão citados como os principais veiculadores deste patógeno a humanos.

Diante desse cenário complexo exposto, a proposta deste trabalho foi avaliar a presença de *Salmonella* spp resistentes aos antimicrobianos criticamente importantes, isoladas de amostras de aves comerciais e material avícola, nas décadas de 90 e durante o período de 2008 a 2010, identificando possíveis mecanismos de resistência nas bactérias, com base em estudos de biologia molecular.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AGÊNCIAS REGULATÓRIAS E A QUESTÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

A FAO (*Food and Agriculture Organization*) foi uma das primeiras agências criadas depois da Segunda Guerra Mundial com a ideia de que a paz havia propiciado as condições para que a humanidade erradicasse a fome. Mais de meio século depois de sua criação, cerca de 1,2 milhões de pessoas ainda sofrem de fome crônica e muitos países estão distantes de atingir o primeiro dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio: reduzir pela metade, entre 1990 e 2015, o número de pessoas famintas e na extrema pobreza (FAO, 2006).

O mandato da FAO é o de atingir a segurança alimentar para todos e, assim, todos os esforços que depreende buscam assegurar que as pessoas tenham, de forma regular, alimento suficiente e de alta qualidade para que tenham uma vida sadia. No mandato da FAO encontrase, ainda, a intenção de elevar os níveis de nutrição, melhorar a produtividade agrícola, melhorar a vida das populações rurais e contribuir para o crescimento da economia global (FAO, 2013a). No entanto e a menos que ações substanciais sejam tomadas, imediatamente, o objetivo da FAO de reduzir o número de pessoas com fome no mundo até 2015 não será atingido.

O aumento da pobreza pela crise mundial e o aumento no preço dos alimentos têm-se mostrado uma combinação devastadora para a população mais vulnerável (FAO, 2013b). A atual crise econômica mundial é historicamente sem precedentes. Primeiramente, porque ela aconteceu logo após uma crise na produção de alimentos que fez os preços dos alimentos de primeira necessidade subirem dramaticamente durante o período de 2006 a 2008. Segundo, a atual crise econômica vem afetando simultaneamente diferentes países e grande parte do mundo. Quando a crise é localizada a um país, ou diferentes países de uma região econômica, os governos possuem ferramentas para contorná-la, como, por exemplo, a desvalorização cambial, o uso de subsídio e de medidas de incentivo governamentais. No entanto, a abrangência e eficácia desses mecanismos é limitada quando se trata de uma crise econômica global. Terceiro, com os países emergentes mais integrados financeira e comercialmente na economia global, eles estão mais expostos às mudanças do mercado internacional. Ou seja, a

queda na demanda global ou a restrição de crédito decorrentes de uma crise global tem repercussão imediata nos países em desenvolvimento (GILPIN, 2001).

O crescimento da fome é um fenômeno global e todas as regiões do mundo são hoje afetadas pela insegurança alimentar. Estimativas da FAO apontam que a região da Ásia e Pacífico, a região mais populosa do globo, é hoje a região com maior número de famintos, 642 milhões de pessoas; a região subsaariana da África, entretanto, possui o maior percentual de subnutridos na população : 32%. Ainda, os dados apontam que as regiões do Oriente Médio e norte da África possuem o maior percentual de crescimento do número de famintos dentre os países emergentes +13,5%, na comparação de dados do ano de 2009 frente ao ano de 2008. A América Latina e a região do Caribe, embora tenham apresentado evidentes sinais de melhora nos últimos anos, ainda apresentam um crescimento no número de famintos da ordem de +12,8%, o que é inaceitável. Mesmo nos países desenvolvidos, a desnutrição tem se tornado uma preocupação crescente (FAO, 2013b).

Diante desse dilema, fica claro que o atual sistema de produção e distribuição de alimentos precisa de mudanças estruturais urgentes.

Medidas de curto prazo poderiam incluir programas de proteção social que garantissem à população mais carente o alimento que mais necessitam e aos pequenos e médios produtores o acesso a tecnologias e meios de produção indispensáveis, como fertilizantes, sementes de boa qualidade e tecnologias que garantam um cultivo de grãos e produção animal segura e abundante. Isto, sem dúvida, facilitaria o acesso das populações mais carentes a alimentos mais baratos. Porém, para remissão da fome no mundo, devem ser tomadas medidas de médio-longo prazo para garantir que a produção de alimentos cresça, em especial, nos países emergentes. Esses países precisam contar com tecnologias e políticas que fortaleçam o setor agropecuário em termos de produtividade e resistência diante de períodos de crise. Políticas estáveis e eficazes, mecanismos regulatórios e institucionais, mudanças na infra-estrutura dos mercados são essenciais para promover o investimento no setor agropecuário. Investimentos em ciência e tecnologia devem ser aumentados. Sem acesso à tecnologia que aumente a produção de alimentos seguros e em abundância, os países continuarão a sofrer com dificuldades de suprir a crescente demanda por alimento no mundo (FAO, 2006).

Ainda de acordo com a FAO, no ano de 2050, precisaremos de 100% a mais de alimentos para alimentar a população em crescimento (FAO, 2006).

Com a necessidade de produzir mais alimentos e de garantir que estes sejam inócuos à saúde humana, o *Codex Alimentarius* da FAO/OMS e a OIE instituíram um grupo de trabalho

para analisar a questão do risco de antimicrobianos como aditivos zootécnicos em produção animal e a resistência bacteriana aos antimicrobianos (GT AMR), cujas reuniões têm gerado o esboço de documentos e guias internacionais para abordar esta questão. Esses documentos, além de levantar uma lista de antimicrobianos criticamente importantes tanto para saúde humana como para saúde animal, propõem um modelo antimicrobiano/ bactéria/ espécie animal, como foco prioritário para os estudos de resistência (JOINT FAO/WHO/OIE, 2007; FAO, 2011b).

O Brasil, como país signatário do *Codex Alimentarius*, também instituiu Grupo de Trabalho composto por representantes de todos os elos da cadeia produtiva de proteína animal, bem como representantes da academia, do MAPA e da ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003b; 2006a; 2009).

Há que lembrar, neste momento, que o fenômeno de resistência bacteriana pode ser natural ou intrínseca e não apenas adquirida como parecem se esquecer as discussões mais recentes sobre o assunto. A resistência natural ou intrínseca é aquela que já é pré-existente e relacionada a uma característica inerente a uma espécie bacteriana como, por exemplo, o são as bactérias Gram negativas que, por não possuírem parede celular e, portanto, não serem capazes de reter a coloração de Gram, também não são susceptíveis aos antimicrobianos que possuem como mecanismo de ação a destruição da parede celular. Já com relação ao fenômeno da resistência adquirida, este pode se dar por vários mecanismos distintos : transformação (quando a bactéria adquire o gene de resistência do meio ambiente), transdução (quando a resistência é adquirida através de um bacteriófago) , transposição (adquirida através de segmentos de DNA, os transposons) e conjugação, quando a ligação sexuada se dá através de uma fímbria (PALERMO-NETO, 2006).

O fenômeno de transformação pode se dar pela modificação do alvo (sítio de ligação do antimicrobiano) ou pela adição de genes que provoquem a inativação do fármaco como, por exemplo, através da produção de enzima específica, como no caso das bactérias produtoras de beta-lactamase resistentes aos antimicrobianos que possuem anel beta-lactâmico, ou através de mecanismos de efluxo, quando a bactéria desenvolve a capacidade de bombear o antimicrobiano para fora da célula, através de bombas de efluxo como ocorre, por exemplo, com as quinolonas. Ainda, cabem aqui as alterações de membrana celular responsáveis pelas alterações de permeabilidade de membrana, as quais impedem a entrada do antimicrobiano para o interior da célula.

O fenômeno da transdução ocorre quando um gene de resistência ou plasmídeo é carreado de uma bactéria a outra através de um bacteriófago. Ao contrário, talvez, do que se

possa esperar, bacteriófagos existem aos milhões na natureza, convivendo conosco, sobre as superfícies, no ar, nos oceanos, sem que, necessariamente, interajam de forma negativa com os seres vivos. Porém, bacteriófagos são espécie-específicos e capazes de infectar somente organismos procariotos. Dessa forma, podem, se for o caso, ligar-se à superfície bacteriana, intercambiando com esta material genético, uma vez que somente são capazes de replicar-se ou reproduzir-se no interior de uma célula hospedeira.

O fenômeno de transposição ocorre quando fragmentos de DNA (Ácido Desoxirribonucléico) de uma determinada bactéria, contendo um ou mais gene de resistência, transfere-se para outra bactéria, através de um bacteriófago.

Já a conjugação ocorre pela transferência de um gene de resistência ou plasmídeo de uma bactéria a outra, através da formação de uma fímbria sexual, ou seja, aquela fímbria capaz de servir como canal de transferência unidirecional de material genético (DNA) entre bactérias.

O Quadro 1 mostra algumas das características ligadas aos diferentes tipos de mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos (PALERMO-NETO, 2006).

Tipo de	Estabilidade	Nível de	Transferência de	Genes de
Resistência		resistência	resistência	Resistência
Cromossômica	Alta	Baixa	Vertical	Simples
(mutação)				
Plasmidial	Moderada	Alta	Horizontal e	Múltipla
(conjugação e			Vertical	
transdução)				
Transposon	Alta	Instável	Horizontal e	Simples e
(transposição)			Vertical	Múltipla

Quadro 1- Características dos diferentes mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos

Para melhor entender a resistência bacteriana aos antimicrobianos, temos que voltar a explorar o fascinante mundo das bactérias. Esses microrganismos microscópicos estão presentes em todo os lugares. As bactérias podem se adaptar a condições extremamente severas e também podem sobreviver em condições extremas como excesso de calor, frio ou radioatividade. A capacidade de adaptabilidade das bactérias está ligada à sua habilidade de se multiplicar com muita rapidez e, em se multiplicando, trocar material genético com muita

facilidade. Conhecendo essas características desses microrganismos, a possibilidade de desenvolvimento de resistência aos antibióticos não é um fato de surpreender (OIE, 2013).

Na natureza, o mecanismo de desenvolvimento de resistência pelas bactérias aos antimicrobianos pode ser entendido como um mecanismo de proteção que algumas bactérias desenvolveram para ser capazes de sobreviver frente aos desafios do ambiente. Nesse mesmo ecossistema, outras bactérias e microrganismos também são capazes de produzir substâncias antimicrobianas. Assim, o fenômeno de resistência pode ser entendido como puro evolucionismo e, portanto a resistência bacteriana aos antimicrobianos não é um fenômeno novo, sendo que bactérias resistentes têm estado presentes na face da terra por muitos milhares de anos (OIE, 2013).

O uso de antibióticos em humanos iniciou-se por volta de 1940 e as primeiras dificuldades para tratar infecções devido ao aparecimento de bactérias resistência já apareceram nos anos 1950. Isso ilustra bem as propriedades de adaptabilidade das bactérias à pressão de seleção dos antimicrobianos. Em uma população bacteriana em contato com determinado antimicrobiano, ocorrerá a destruição das bactérias sensíveis enquanto as bactérias resistentes irão sobreviver e, consequentemente, desenvolver-se. Assim, qualquer uso de antimicrobiano tem a capacidade de induzir pressão de seleção e determinar a proliferação de bactérias resistentes (OIE, 2013).

Recentemente, pesquisadores da Universidade de McMaster do Canadá e da Universidade de Akron nos Estados Unidos da América, encontraram amostras de bactérias em uma caverna isolada no estado americano do Novo México, nos Estados Unidos. Surpreendentemente, essas bactérias isoladas do mundo há cerca de quatro milhões de anos, apresentaram resistência a antibióticos. As bactérias encontradas na caverna Lechuguilla, isoladas do contato humano por mais de quatro milhões de anos, eram resistentes a quase todos os antibióticos sintéticos. Embora nenhuma delas fosse capaz de provocar doenças, nem nunca terem sido expostas a antibióticos, elas apresentavam alta resistência, sendo a maioria dos mecanismos de resistência similares ao que já observamos, atualmente, em bactérias patogênicas que infectam humanos e, apenas, um mecanismo de resistência completamente desconhecido, até o momento (BBC BRASIL, 2012).

Essas considerações corroboram o fato de que o desenvolvimento de mecanismos de resistência a antimicrobianos parece ser inato às bactérias, assim como a simples pressão de seleção por uso de determinado antimicrobiano é capaz de induzir possível aparecimento de resistência bacteriana ao antimicrobiano utilizado. Evolucionismo, Lei de Darwin.

Ainda, cabe-nos ressaltar que os estudos laboratoriais para evidenciação de eventual resistência *in vitro* de uma bactéria a um determinado antibacteriano não indicam, necessariamente, a ausência de eficácia do mesmo antimicrobiano *in vivo*. Com relação à eficácia de um antimicrobiano *in vivo*, é a concentração efetiva que ele alcança no local de ação e a manutenção dessa concentração ao longo do tempo que determinam sua eficácia ou ineficácia.

A maioria dos testes de eficácia in vitro para um antimicrobiano utiliza como parâmetro um ponto de corte (breakpoint), para o qual uma concentração menor ou igual de um determinado antimicrobiano que seja capaz de inibir o crescimento de determinada cepa bacteriana padrão, determinará eficácia. Assim, quando são necessárias concentrações do antimicrobiano mais elevadas que o seu ponto de corte para inibir o crescimento de determinada cepa padrão, esse antimicrobiano será classificado como ineficaz, ou a bactéria será classificada como resistente. Porém, quando in vivo, há que considerar a relação farmacocinética versus farmacodinâmica. De fato, é a concentração tissular de um antimicrobiano que determinará a eficácia do mesmo com relação à CIM de uma determinada cepa bacteriana. Existem diversos exemplos de antimicrobianos que se distribuem com migração preferencial e afinidade pelo tecido pulmonar e, consequentemente, são extremamente eficazes para combater infecções respiratórias, ainda que sua concentração plasmática não se mantenha igual ou superior aos limites de breakpoint. Igualmente, existem exemplos de antimicrobianos com afinidade pelo trato urinário e que, ainda que sua concentração plasmática não se mantenha em níveis iguais ou superiores ao breakpoint determinado nos estudos in vitro, os mesmos, por afinidade, mantêm-se em altas concentrações nos tecidos alvos e, portanto, extremamente eficazes no tratamento de infecções urinárias.

Sendo assim, um microrganismo pode ser considerado sensível a um antimicrobiano *in vivo* quando seu valor de CIM ₅₀ for menor que ½ da concentração média ou ¼ da concentração máxima desse antimicrobiano no sangue ou nos tecidos (PALERMO-NETO, 2005).

O Comitê de Higiene de Alimentos do *Codex Alimentarius*, em sua 40° Sessão, realizada na Cidade da Guatemala, Guatemala, de 1 a 5 de Dezembro de 2008, discutiu a adoção de um documento guia para o controle da contaminação de carne de frango por *Campylobacter* e *Salmonella* spp, através do documento CX/FH 08/40/6 (FAO, 2011c). Esse documento guia proposto, contempla, em sua página 12, um diagrama com pontos críticos de controle (PCC) do processo de produção de frangos, nos quais poderiam ser implementadas medidas específicas de controle, baseadas em um processo de análise de risco Nesse sentido,

vale a pena lembrar que, nos últimos 30 anos, foram realizadas mais de 229 reuniões ao redor do mundo para debater este tema e 638 artigos apenas sobre *Salmonella* resistente foram encontrados nos últimos 05 anos no *site* "Pubmed".

Ainda que um tema emergente e de importância global, estabelecer processos de análise de risco de resistência bacteriana para todos os antimicrobianos de uso em saúde humana e animal seria uma tarefa impossível. Dessa forma, os grupos de trabalho da FAO, OMS e OIE, propuseram a priorização dos estudos de análise de risco para aqueles antimicrobianos de importância crítica para o tratamento de enfermidades em humanos ou em animais (JOINT FAO/WHO/OIE, 2007). Ainda, estabeleceram que os estudos deveriam ser priorizados nas espécies que representam a maior exposição ao risco, ou seja, nos animais de produção, mais especificamente, os bovinos, os suínos e as aves e, ainda, para aquelas bactérias mais frequentemente isoladas em surtos de toxinfecções alimentares em humanos, ou seja, a *Escherichia coli*, a *Samonella sp*, *Campylobacter sp* e os *Enterococcus SP*. Assim, os grupos de estudo da FAO, OMS e OIE, atualmente, focam seus esforços numa matriz antimicrobiano x bactéria x animal (FAO, 2011b).

Os Quadros 2 e 3 mostram a lista proposta pelo Grupo de Trabalho OMS/OIE, durante a Reunião Conjunta de Especialistas da FAO/OMS/OIE em antimicrobianos criticamente importantes, realizada em Roma – Itália, durante o período de 26 a 30 de Novembro de 2007 (JOINT FAO/WHO/OIE, 2007). A lista de antimicrobianos criticamente importantes foi estabelecida com base nos antimicrobianos apontados pelas respectivas áreas.

Quadro 2- Categorização dos antimicrobianos usados em medicina humana de acordo com a importância no tratamento de doenças

Antimicrobianos Criticamente	Antimicrobianos Altamente	Antimicrobianos
importantes	Importantes	Importantes
Aminoglicosídeos	Aminopenicilinas	Polipeptídeos Cíclicos
Ansamicinas	Aminoglicosídeos	Fosfomicina
Carbapenos	Anfenicóis	Ácido Fusídico
Ceflosporinas (3a e 4a Geração)	Ceflosporinas (1a e 2a Geração)	Lincosamidas
Glicopeptídeos	Cefmicinas	Mupirocina
Macrolídeos	Clofasimina	Nitrofurantoina
Oxazolidinona	Monobactamas	Nitroimidazole
Penicilinas	Penicilinas (antiestafilocócicas)	
Quinolonas	Polimixinas	
Estreptograminas	Sulfonamidas	
Tetraciclinas		
Fármacos p/ tratar tuberculose		

Fonte: Modificado de *Report of the FAO/WHO/OIE Expert Meeting*, FAO, Rome, Italy, 26–30 November 2007.

Quadro 3- Categorização dos antimicrobianos usados em medicina veterinária de acordo com

sua importância no tratamento de doenças

		Antimicrobianos
Antimicrobianos Criticamente	Antimicrobianos Altamente	Importantes em
importantes em Veterinária	Importantes em Veterinária	Veterinária
Aminoglicosídeos	Rifamicinas	Biciclomicina
Cefalosporinas	Fosfomicina	Ácido Fusídico
Macrolídeos	Ionóforos	Novobiocina
Penicilinas	Lincosamídeos	Ortosomicinas
Fenicóis	Pleuromutilinas	Quinoxalinas
Quinolonas	Polipeptídeos	Estreptograminas
Sulfonamidas		
Tetraciclinas		

Fonte: Modificado de *Report of the FAO/WHO/OIE Expert Meeting*, FAO, Rome, Italy, 26–30 November 2007.

A partir desses estudos de categorização, foi elaborada a lista dos Antimicrobianos Criticamente Importantes, ou seja, aqueles considerados criticamente importantes, concomitantemente, para a saúde humana e para a saúde animal (Quadro 4):

Quadro 4- Comparação dos antimicrobianos criticamente importantes em medicina humana e antimicrobianos criticamente importantes em medicina veterinária

Antimicrobianos Criticamente	Antimicrobianos Criticamente
importantes Usados em Medicina	Importantes Usados em Medicina
Humana	Veterinária
Aminoglicosídeos	Aminoglicosídeos
Cefalosporinas (3a e 4a Geração)	Cefalosporinas
Macrolídeos	Macrolídeos
Penicilinas	Penicilinas
Quinolonas	Quinolonas
Tetraciclinas	Tetraciclinas
Ansamicinas	
Carbapenos	
Glicopeptídeos	
Oxazolidinonas	
Estreptograminas	
Fármacos usados p/ tratar tuberculose	
	Fenicóis
	Sulfonamidas

Fonte: Modificado de *Report of the FAO/WHO/OIE Expert Meeting*, FAO, Rome, Italy, 26–30 November 2007.

Durante a Conferência Global da OIE Sobre o Uso Responsável e Prudente de Agentes Antimicrobianos Para Animais, realizada em Paris, França, de 13 a 15 de março de 2013, a lista dos Antimicrobianos Criticamente Importantes foi, novamente, abordada como referência para as discussões (OIE, 2013).

Segundo a OIE, foram objetivos da Conferência apresentar uma visão da situação global do uso de antimicrobianos em animais e resistência antimicrobiana; informar sobre as iniciativas tomadas pela OIE e outras organizações para promover o uso prudente e responsável de antimicrobianos em animais nos níveis nacional, regional e internacional; promover boas práticas de governança e encorajar a cooperação internacional; fomentar e fortalecer a cooperação entre as entidades de categoria veterinária e os estabelecimentos de ensino da medicina veterinária; apresentar descobertas científicas sobre alternativas que possam ser usadas em animais de produção em substituição dos agentes antimicrobianos (OIE, 2013).

Esse evento da OIE reuniu representantes da Comissão da União Européia, da EMA - Agência Européia de Medicamentos (*European Medicines Agency*), da Organização Mundial da Saúde, da FAO, da própria OIE e várias autoridades nacionais, dentre elas, o MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, o FDA (*Food and Drug Administration*), o USDA – *United States Department of Agriculture* e autoridades do governo do Japão, dentre, aproximadamente, 100 países representados.

Sendo um tema que requer o envolvimento de diversas áreas e, tendo identificado apropriadamente, os principais desafios enfrentados pela produção de alimentos, a saber:

a) o crescimento da população e a necessidade de aumentar a produção de alimentos ricos em proteína animal em 70% até 2050 e b) a necessidade de preservar as áreas agricultáveis sem aumentá-las, a Conferência da OIE apontou uma lista de medidas que requer o envolvimento do setor público, privado, academia, entidades profissionais, população médica, entre outros. Também foi ressaltada a contínua necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos de uso veterinário, sugerindo a eventual necessidade de parcerias dos setores público / privado para ajudar a financiar e desenvolver inovações em matéria de anti-infecciosos, além da importância de se buscarem novas ferramentas, como o uso de vacinas.

Pelo tom geral da Conferência, não restou dúvidas de que estamos em um mundo com disparidades gritantes, no qual coexistem um grupo de países em que, de um lado, o maior

desafio ainda é o de erradicar a fome de milhões de pessoas, diariamente, através da ingestão de alimentos saudáveis e seguros e, de outro lado, países em que a principal discussão é o direito à escolha do consumidor por um alimento que atenda ao seu perfil de consumo e preferências pessoais. Entre essas duas polaridades estão países ditos emergentes que precisam entender como lidar, simultaneamente, com essas duas realidades e, ainda, enfrentar desafios de infra-estrutura, controle, oferta e demanda de alimentos básicos e contrafaçção. A Conferência também abordou a necessidade de estimular a cooperação internacional em matéria de harmonização de normas para assegurar o controle da distribuição, da produção, importação e comercialização de antimicrobianos, bem como trabalhar com os países para elaboração de um documento sobre as recomendações para o uso prudente de antimicrobianos (OIE, 2013).

2.2 O COMÉRCIO GLOBAL DE ALIMENTOS E A IMPORTÂNCIA DA OMC – ORGANIZAÇÂO MUNDIAL DO COMÈRCIO

O desenho do mundo moderno e as fronteiras dos países estão mudando. Diferentemente de tempos passados, a mudança que ocorre agora não é o resultado de guerras entre os países, nem de conquistas de territórios, mas sim resultado do esforço voluntário de países independentes em se unirem em torno de um benefício comum: o livre comércio e o sistema de comércio internacional.

Mas, por que esse esforço voluntário em superar barreiras físicas, de língua, moeda, sistemas financeiros?

Robert Gilpin, em seu livro *Global Political Economy – Understanding the International Economic Order* (GILPIN, 2001), já nos alerta de que a maioria dos economistas está convencida de que o livre comércio é uma forma de comércio superior, com melhores resultados para os países, se comparado ao protecionismo. Nesse sentido, os países agrupam-se em poderosos blocos, os quais – estes sim – travam uma verdadeira batalha para superar e/ou criar entraves ao comércio, na medida em que isso os favoreça.

A tendência ganhou força com a constituição de gigantes econômicos, como a União Européia, o Nafta e, mais modestamente, o Mercosul.

Essa distribuição em blocos marca a chamada Nova Ordem Mundial, na qual a antiga polarização entre países alinhados à União Soviética (socialista) e aos Estados Unidos

(capitalista) cede lugar à divisão do poder entre alguns megablocos econômicos. Os países mais pobres, entretanto, ainda sofrem certo alijamento dessa nova ordem.

Para entender a origem dos atuais blocos econômicos – nome geral para definir as associações econômicas entre nações de uma mesma área geográfica – é necessário compreender primeiro a reorganização do mundo capitalista pós-Segunda Guerra Mundial e a estrutura do poder geopolítico nessa época.

Em 1945, com a Europa arrasada pela guerra, o panorama internacional apresentava apenas duas grandes superpotências: Estados Unidos e União Soviética, representando, respectivamente, os blocos capitalista e socialista.

Nas conferências de Ialta e Potsdam em 1945, foram estabelecidas áreas de influência soviéticas e norte-americanas. Os países do Leste Europeu (Polônia, Tchecoslováquia, Hungria, Romênia, Bulgária, Iugoslávia e Albânia) ficaram na esfera soviética com o estabelecimento de regimes de governo comunistas. Também foi decidida a divisão de Berlim, a capital alemã, em quatro zonas de ocupação militar: Estados Unidos, Reino Unido, França e União Soviética.

Para estabelecer uma zona de influência norte-americana (e capitalista) na Europa Ocidental, os Estados Unidos lançaram o Plano Marshall em 1947, que injetou bilhões de dólares na região e impulsionou sua reconstrução. Também nesse ano, foi assinado o Acordo Geral de Tarifas e Comércio (GATT) para promover e regulamentar o comércio entre as nações. Em contrapartida, a União Soviética criou, em 1949, o Conselho para Assistência Econômica Mútua (COMECON).

O surgimento da OMC foi um importante marco na ordem internacional que começara a ser delineada no fim da Segunda Guerra Mundial. Ela surge a partir dos preceitos estabelecidos pela Organização Internacional do Comércio, consolidados na Carta de Havana, e, uma vez que esta não foi levada adiante pela não aceitação do Congresso dos E.U.A. (principal economia do planeta, com um PIB maior do que o das outras potências todas somadas), imputou-se no GATT de 1947, um acordo temporário, que acabou vigorando até a criação efetiva da OMC após as negociações da Rodada Uruguai em 1995.

A OMC surgiu do Acordo Geral de Tarifas e Comércio (GATT) que foi criado após a Segunda Guerra Mundial, conjuntamente com outras instituições multilaterais dedicadas à cooperação econômica internacional, como as instituições criadas com Acordos de Bretton Woods: o Banco Mundial e o FMI (Fundo Monetário Internacional).

Em dezembro de 1945, os Estados Unidos convidaram seus aliados de guerra a iniciar negociações a fim de criarem um acordo multilateral para a redução recíproca das tarifas de

comércio de bens. Para realizar este objetivo, tentou-se criar a Organização Internacional do Comércio (ITO- *International Trade Organization*). Um Comitê Preparatório teve início em fevereiro de 1946 e trabalhou até novembro de 1947. Em março de 1948 as negociações relativas à Carta da ITO não foram completadas com sucesso em Havana. Esta Carta tentava estabelecer efetivamente a ITO e designar as principais regras para o comércio internacional e outros assuntos econômicos. Esta Carta nunca entrou em vigor, foi submetida inúmeras vezes ao Congresso Norte Americano que nunca a aprovou.

Em outubro de 1947, um acordo foi alcançado pelo GATT. Finalmente, em 30 de outubro de 1947, 23 países assinaram o "Protocolo de Provisão de Aplicação do Acordo Geral de Tarifas e Comércio" com o objetivo de evitar a onda protecionista que marcou os anos 30. Nessa época, os países tomavam uma série de medidas para proteger os produtos nacionais e evitar a entrada de produtos de outros países como, por exemplo, por meio de altos impostos para importação.

Na ausência de uma real organização internacional para o comércio, o GATT supriu essa demanda, como uma instituição provisória.

O GATT foi o único instrumento multilateral a tratar do comércio internacional de 1948 até o estabelecimento definitivo da OMC, em 1995. Apesar das tentativas de se criar algum mecanismo institucionalizado para tratar do comércio internacional, o GATT continuou operando por quase meio século como um mecanismo semi-institucionalizado.

Após uma série de negociações frustradas, na Rodada do Uruguai foi criada a OMC, de caráter permanente, substituindo o GATT.

A Organização Mundial do Comércio (OMC) é uma organização internacional que trata das regras sobre o comérico entre as nações. Os membros da OMC negociam e assinam acordos que depois são ratificados pelo parlamento de cada nação, passando a regular o comércio internacional. Em inglês é denominada World Trade Organization (WTO) e possui 153 membros. Sua sede é em Genebra, na Suiça.

Já num panorama mais recente, a Comunidade Européia, ou União Européia, foi o primeiro bloco econômico a ser formado (1957) e até hoje o melhor organizado. Tem sua origem na criação da Comunidade Econômica Européia, agrupamento formado, a princípio, por seis nações, mas que foi incorporando novas adesões com o passar dos anos.

A organização da UE tem sido um processo lento, com várias etapas. Um dos marcos de sua história foi a aprovação, em 1991, do Tratado de Maastricht, ou Tratado da União Européia, (EUROPA, 2013) que estabeleceu o ano de 1993 para a formalização da União Européia como um bloco com união econômica e monetária, fixando uma data para a

implantação de uma moeda única, o euro. Em 1992, caíram as barreiras alfandegárias dentro do bloco.

A moeda comunitária, o euro, entrou em circulação em 1999, em um primeiro momento servindo apenas para transações dentro do sistema financeiro. O cronograma de implantação previa que, em 2002, a utilização fosse estendida a qualquer tipo de transação comercial. O processo de integração é complexo e impõe determinadas regras para que os países possam pertencer ao grupo; por exemplo, a inflação deve ser baixa e o déficit público não pode superar 3% do PIB. A integração ainda é contínua e, apesar das crises, atualmente, 27 países constituem a Comunidade Européia (EUROPA, 2013).

Trata-se, sem dúvida, de um poderoso bloco econômico que, hoje, é capaz de influenciar grandemente o cenário do comércio internacional, bem como "ditar" regras a países que vislumbrem exportar seus produtos para o mercado europeu.

Dessa forma e diante dos grandes blocos econômicos, a OMC é hoje a base para as disputas internacionais de comércio, através de seu sistema de Resolução de Controvérsias. Ou seja, em situações de comércio entre dois países que apresentem divergências como, por exemplo, políticas de tarifas de importação, cotas de importação, políticas restritivas como padrões de identificação ou qualidade específicos, a disputa em questão pode ser apresentada à OMC para avaliação e decisão de eventuais medidas de compensação.

Recentemente, o Brasil tem utilizado ativamente de sua posição como país membro da OMC e tem encaminhado questões de disputas internacionais de comércio para esse organismo. Já se vêem alguns resultados dessas disputas levadas pelo Brasil à OMC, principalmente, na área do agronegócio, como no recente caso do contencioso do algodão e de exportação de carne bovina para os Estados Unidos (BRASIL, 2010).

Porém, muito ainda se tem a conquistar.

Para países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, a OMC pode representar uma solução importante em contendas internacionais, especialmente, naquelas que se estabelecem com países desenvolvidos, ou com grandes blocos econômicos. Exemplos dessa situação são vários, em especial, na área do agronegócio brasileiro.

Como se tem acompanhado, o crescimento do Brasil no agronegócio, nos últimos 10 anos, tem sido tremendo. Graças à sua inegável vocação agropecuária, resultado de uma série de fatores, como extensão territorial e áreas agricultáveis, clima, disponibilidade de água, ambiente regulatório favorável à adoção de tecnologias, dentre outros, o Brasil é hoje reconhecido, internacionalmente, como um dos principais atores no cenário do agronegócio internacional.

Assim e, por exemplo, o Brasil é hoje um dos grandes exportadores de soja, rivalizando em volume de produção e exportação com Estados Unidos; da mesma forma, é o maior exportador de carne de frango com 3,6 milhões de toneladas de carne de frango exportadas em 2009, conforme dados da UBABEF — União Brasileira de Avicultura, só perdendo em volume de produção - não em volume de exportação - para os Estados Unidos e China, por razões de maior amadurecimento do mercado interno dos Estados Unidos e do volume do mercado interno da China devido ao imenso contingente populacional desse país (UBEBAF, 2011).

Também hoje o Brasil é o primeiro exportador de carne bovina, sendo possuidor de um dos maiores rebanhos bovinos, com 205,3 milhões de cabeças, de acordo com dados publicados em 2010, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE - perdendo em número de cabeças de animais, apenas, para a Índia (IBGE, 2010).

Com relação à produção e exportação de carne suína, o Brasil deu um grande salto em questões de qualidade de carne e sanidade do rebanho e oscila entre as posições de 4° e 5° país exportador no *ranking* de exportações de carne suína no mundo (IBGE, 2010). Vale a ressalva de que, com a abertura da China para as exportações de carne suína pelo Brasil, oficializada durante a viagem da Presidente Dilma Russef à China, em 2011, o panorama de futuro das exportações brasileiras de carne suína é o mais favorável possível, aliado com a mais recente conquista da notícia de abertura do mercado japonês à carne suína proveniente do estado de Santa Catarina, reconhecido como zona livre de febre aftosa.

Tamanhas conquistas, obviamente, não podem agradar a todos os atores do cenário global. Alguns países que, tradicionalmente, ocupavam posição de destaque como exportadores do agronegócio muito se ressentiram com essa transformação. Em virtude disto e, também, em virtude de eventuais crises focais, alguns países e blocos tem tentado, desesperadamente, buscar mecanismos de desfavorecimento às exportações brasileiras, como uma das formas de retomarem parte de suas exportações anteriores, ou apenas como forma de protegerem seu mercado e sua produção interna.

São comuns os protestos de produtores de países desenvolvidos contra as importações de carne brasileira. Exemplo disso são os constantes protestos de produtores irlandeses contra a importação de carne bovina do Brasil.

Mais ainda se tem visto com relação às inúmeras barreiras não-tarifárias que vem sendo impostas por países e blocos para impedir o avanço dos volumes de exportação dos países em desenvolvimento, dentre eles o Brasil, conforme já falamos, por possuir grande expressão nesse mercado.

Recentemente, algumas discussões nesse sentido tem tomado as reuniões de entidades e organismos internacionais, como, por exemplo , o *Codex Alimentarius*, organismo braço da FAO/OMS (*Food and Agriculture Organization* / Organização Mundial da Saúde), que dispõe sobre padrões para alimentos.

O *Codex Alimentarius* é referência internacional para a adoção de medidas pela OMC, quando de disputas do comércio internacional.

O *Codex Alimentarius* é, atualmente, formado por 166 países, ditos "signatários", dentre os quais o Brasil, e está dividido em diversos comitês técnicos que discutem os padrões, internacionalmente, recomendados para alimentos. Ressalte-se que as discussões levadas a termo nos comitês técnicos do *Codex Alimentarius* são discussões baseadas em ciência.

São dois os mandados do Codex : *food safety* e *fair trade* , o que significa segurança do alimento e comércio igualitário.

Ainda que, sabidamente, o livre comércio seja um mecanismo superior ao protecionismo (GILPIN, 2001) e considerando que países mais democráticos tendem a ser mais favoráveis ao livre comércio, o que se vê, ainda hoje, é que, quer seja fruto de pressões de grupos de interesse específicos, quer seja porque os países, de fato, ainda tendem a ser mais protecionistas do que incentivadores/fomentadores do livre comércio, a existência de organismos internacionais como OMC e o próprio *Codex Alimentarius* nos levam a refletir sobre quais outros mecanismos podem influenciar no estabelecimento de uma situação igualitária de comércio como, por exemplo, grupos de interesse e especificidade de fatores de produção.

Dessa forma, tomando-se em conta os diferentes modelos econômicos e a abordagem adotada pelos grandes blocos econômicos da atualidade, no contexto do comércio internacional, podemos entender porque, apesar de democráticos, muitos países ainda relutam em se abrir totalmente ao livre comércio, ao mesmo tempo em que justifica a existência de organismos internacionais de referência para um comércio justo (GILPIN, 2001).

Isso tem sido visto, claramente, refletido nos embates internacionais de comércio; no caso do Brasil, especialmente com relação à área do agronegócio e, em tempos de globalização, urge a substituição dessa lógica de favorecimento eterno de economias consolidadas, por uma política econômica internacional verdadeiramente democrática, que tenha seus interesses voltados para a extinção da fome, da miséria, que vise dar acesso a uma vasta camada de excluídos a alimentos seguros e abundantes, dando a todos condições dignas de vida a fim de que possam desenvolver seus potenciais criativos e desenvolvimento efetivo.

2.3 ANTIMICROBIANOS DE USO EM MEDICINA VETERINÁRIA E REGULAMENTAÇÃO NO BRASIL

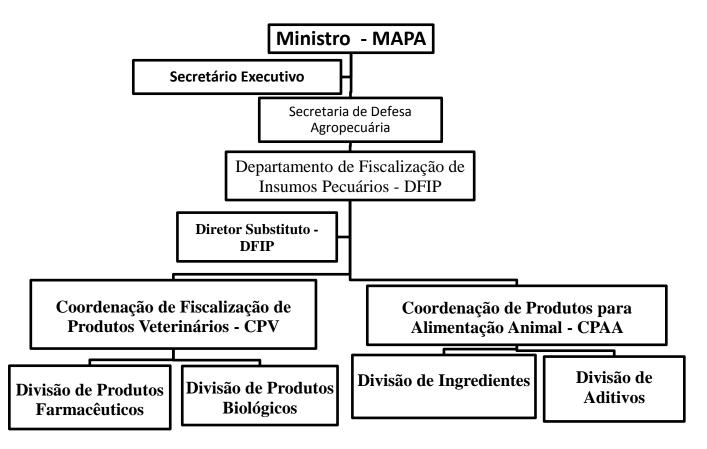
Pesquisadores das áreas clínica e de farmacologia, autoridades regulatórias ao redor do mundo e outros estudiosos do assunto, têm proposto uma nova abordagem para o uso de antimicrobianos em saúde animal (OIE, 2013). De acordo com essa nova abordagem , são os seguintes os usos propostos:

- a) uso terapêutico é aquele feito para tratamento de infecções já existentes através da medicação dos animais doentes; embora possa ser efetivado e realizado de forma individualizada e por vias parenterais ele é conduzido em avicultura e suinocultura, de modo geral, de forma coletiva ou massal (terapia grupal) medicando-se os animais através da ração ou da água de bebida;
- b) uso metafilático também feito de formal grupal ou massal; neste caso, medicam-se com concentrações terapêuticas de antimicrobianos todos os animais de um mesmo lote no momento em que alguns indivíduos apresentam sinais e sintomas indicativos do desenvolvimento ou do curso de um processo infeccioso.
- c) uso profilático no qual os antimicrobianos são utilizados de forma preventiva, isto é, quando nenhum dos animais encontra-se clinicamente enfermo. Neste caso, porém, e, dentro de certos limites, a experiência adquirida no manejo continuado de determinada espécie animal, indica que os mesmos têm grande possibilidade de adquirir uma infecção, ainda que subclínica, em uma determinada fase da produção.
- d) uso aditivo os antimicrobianos são também utilizados como aditivos zootécnicos melhoradores da eficiência alimentar ou do desempenho. Neste caso, nenhum dos animais está doente, sendo o tratamento realizado para aumentar a produtividade, diminuir a quantidade de alimento consumido pelos animais até o momento do abate, melhorar a eficiência alimentar, direcionar processos microbiológicos ligados à produção de ácidos graxos e, dentre tantos outros efeitos de igual relevância, diminuir a mortalidade e manter a homogeneidade do plantel, diminuindo a refugagem. Neste caso, os antimicrobianos são usados continuamente na ração em concentrações significativamente menores que aquelas empregadas terapeuticamente. Ressalte-se e de grande relevância, que o efeito esperado e benéfico dos antimicrobianos usados como aditivos melhoradores do desempenho manifestase também em animais sadios.

Isto posto, fica fácil entender que, dentre os diversos usos propostos para os antimicrobianos, aquele que tem gerado maiores questionamentos, é o uso como aditivo.

De acordo com a legislação brasileira, Decreto-Lei nº 467 de 13 de fevereiro de 1969 (BRASIL, 1969), alterado pela Lei nº 12.689 de 19 de julho de 2012 (BRASIL, 2012b) e Lei 6.198 de 26 de dezembro de 1974 (BRASIL, 1974), os antimicrobianos de uso em medicina veterinária são regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, através do Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários (DFIP) da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). É atribuição do DFIP a regulamentação do uso de antimicrobianos em medicina veterinária. O DFIP está dividido em duas coordenações, a saber: Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários (CPV) e Coordenação de Fiscalização de Produtos para Alimentação Animal (CPAA). A figura 1 ilustra a organograma atual, por áreas de atuação, do Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários do MAPA.

Figura 1- Modelo de Organograma do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Fonte: Modificado de < <u>www.agricultura.gov.br</u>>

Pelo Decreto 5.053 de 22 de abril de 2004 (BRASIL, 2004a), que regulamenta o Decreto-Lei nº 467 de 13 de fevereiro de 1969 (BRASIL, 1969), é atribuição da Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários a regulamentação do uso dos antimicrobianos utilizados com a intenção de prevenir, controlar ou tratar doenças em animais. Isto é, de acordo com a nova abordagem proposta, seriam os antimicrobianos com indicação terapêutica, profilática e metafilática. Por sua vez, através do Decreto 6.296 de 11 de dezembro de 2007 (BRASIL, 2007), que regulamenta a Lei 6.198 de 26 de dezembro de 1974 (BRASIL, 1974), é atribuição da Coordenação de Produtos para a Alimentação Animal a regulamentação do uso dos antimicrobianos como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho, isto é, antimicrobianos utilizados de modo contínuo, administrados via alimentação animal e com a intenção de melhorar o desempenho produtivo ou resultado zootécnico, regulamentação essa estabelecida através da Instrução Normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004 (BRASIL, 2004c).

Segundo a Instrução Normativa n°13, os aditivos são classificados em :

- a) aditivos tecnológicos: qualquer substância adicionada ao produto destinado à alimentação animal com fins tecnológico (adsorventes, aglomerantes, antiaglomerantes, antioxidantes, antiumectantes, conservantes, etc).
- b) aditivos sensoriais: qualquer substância adicionada ao produto para melhorar ou modificar as propriedades organolépticas destes ou as características visuai dos produtos (corantes e pigmentos, aromatizantes, palatabilizantes, etc).
- c) aditivos nutricionais: toda substância utilizada para manter ou melhorar as propriedades nutricionais do produto (vitaminas, pró-vitaminas, oligoelementos, aminoácidos, etc).
- d) aditivos zootécnicos: toda substância utilizada para influir positivamente na melhoria do desempenho dos animais. São os seguintes grupos funcionais: digestivos, equilibradores da flora e melhoradores de desempenho. Os digestivos são substâncias que facilitam a digestão dos alimentos ingeridos (por exemplo, algumas enzimas), atuando sobre determinadas matérias-primas destinadas à fabricação de produtos para a alimentação animal. Os equilibradores da flora são os microrganismos que formam colônias ou outras substâncias definidas quimicamente que têm um efeito positivo sobre a flora do trato digestório (por exemplo probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos). E os melhoradores de desempenho são substâncias definidas quimicamente que melhoram os parâmetros de produtividade (por exemplo antimicrobianos, agonistas de adrenoceptores beta, alguns ionóforos).

e) anticoccidianos: substância destinada a eliminar ou inibir protozoários.

Com relação aos antimicrobianos aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho, pode-se afirmar que o uso dos mesmos têm sido um dos focos das discussões internacionais sobre resistência bacteriana.

Vale reforçar, mais uma vez, que os aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho produzem seus efeitos também em animais sadios, isto é, que não apresentam processos infecciosos subclínicos gastrintestinais. O mecanismo de ação desses agentes faz-se através da manutenção da eubiose gastrintestinal ao selecionar algumas espécies de bactérias comensais relevantes como, por exemplo, os *Lactobacillus* que, ao produzir ácido lático, ácidos graxos de cadeia curta e outros nutrientes importantes, contribuem para o maior crescimento dos animais tratados.

A Organização Mundial de Saúde (FAO, 2004 e FAO, 2005) definiu alguns critérios esperados de um aditivo "ideal". São eles: 1- não ser mutagênico ou carcinogênico; 2-melhorar o desempenho de maneira efetiva e econômica; 3- atuar melhorando a microbiota comensal normal; 4- atuar apenas em bactérias Gram positivas; 5- ser eficaz em pequenas doses; 6- ter nula ou baixa capacidade de absorção oral, isto é, não ter ação sistêmica; 7-possuir baixa capacidade de deposição residual; 8- ser atóxico para os animais nas dosagens recomendadas; 9- não possuir resistência cruzada com outros antimicrobianos; 10- não ser criticamente importante para uso terapêutico em medicina humana ou veterinária e, finalmente, 11- não produzir efeitos deletérios sobre o meio ambiente.

Ainda, enquanto seja difícil para um antimicrobiano aditivo zootécnico melhorador de desempenho preencher todos os critérios estabelecidos como ideais pelo documento CAC RCP 61 do *Codex Alimentarius*, é relevante tê-los em mente quando de sua escolha e do seu uso em produção animal.

Ainda, com relação ao marco regulatório do MAPA, este inclui Instruções Normativas específicas para registro, fabricação, controle e uso de antimicrobianos, como a Instrução Normativa nº 26 de 09 de julho de 2009 (BRASIL, 2009), que estabelece as normas complementares para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego dos produtos antimicrobianos de uso veterinário, produzidos no país ou importados, utilizados em espécies animais terrestres e aquáticas, incluindo-se aqui os antissépticos, a fim de garantir um nível adequado de proteção aos animais, à saúde humana e ao meio ambiente. A Instrução Normativa nº 65 de 21 de novembro de 2006 (BRASIL, 2006) estabelece os procedimentos para a fabricação e o emprego de rações, suplementos, premixes, núcleos ou concentrados

com medicamento para os animais de produção, visando garantir a proteção da saúde humana, animal, do meio ambiente e dos interesses dos consumidores.

Ressalte-se que a Instrução Normativa n° 26, de 09 de julho de 2009 (BRASIL, 2009), determinou uma mudança radical no cenário regulatório de produtos de uso veterinário, em especial, dos antimicrobianos, ao determinar que todos os produtos registrados no MAPA comprovassem, através de estudos de depleção de resíduos, seus períodos de carência, bem como eficácia e segurança nas diversas espécies de registro.

Com relação aos estudos de eficácia, a IN 26 preconiza que:

- Os estudos de eficácia devem demonstrar que o produto antimicrobiano de uso veterinário, na posologia recomendada, possui eficácia contra os agentes etiológicos indicados, em todas as espécies animais para as quais o produto é preconizado.
- Os estudos de eficácia do produto antimicrobiano de uso veterinário podem ser realizados *in vivo* com animais infectados natural ou experimentalmente, em condições controladas.
- Que nos estudos de eficácia *in vivo* do produto antimicrobiano de uso veterinário, podem ser admitidas supressões de agentes etiológicos, desde que o espectro de ação indicado seja comprovado por estudos *in vitro* que contemplem os valores da CIM ou CBM e sua correlação com o perfil farmacocinético e a concentração plasmática eficaz.
- Que os estudos de eficácia do produto antimicrobiano de uso veterinário podem ser realizados *in vivo* com animais saudáveis, correlacionando-se o perfil farmacocinético do fármaco administrado e a concentração plasmática eficaz, com os estudos *in vitro* para a determinação do CIM ou CBM de cada agente etiológico para os quais o produto é indicado.
- Que a determinação do CIM e da CBM deve ser realizada de acordo com os protocolos padronizados pelo CLSI; preferencialmente, o estudo deve ser realizado com micro-organismos oriundos de banco de cultura de cepas isoladas no Brasil e que o tamanho da amostra utilizada nos estudos de eficácia do produto antimicrobiano de uso veterinário deve ser justificado estatisticamente ou por intermédio de referências internacionalmente reconhecidas.
- Que os estudos de eficácia do produto antimicrobiano de uso veterinário devem conter informações pormenorizadas, abrangendo, no mínimo: sumário, local de realização, pesquisador principal, patrocinador, partida do produto utilizada, descrição do método de criação e alimentação fornecida aos animais, características dos animais estudados, origem e

destino dos animais estudados, delineamento experimental, parâmetros avaliados, análise estatística, resultados, discussão e conclusão.

- Que o estabelecimento detentor do registro do produto antimicrobiano de uso veterinário deve manter em arquivo os dados brutos obtidos nos estudos, os quais devem estar disponíveis ao MAPA, pelo período de 10 anos.
- Que os estudos de eficácia para o produto antimicrobiano de uso veterinário oftálmico, otológico e de uso tópico podem ser realizados *in vitro*.
- Que para o produto antimicrobiano de uso veterinário a ser administrado misturado à ração ou à água de bebida, devem ser comprovadas a compatibilidade e a estabilidade do produto na mistura ou na solução.
- E, finalmente, que uma formulação de um produto antimicrobiano de uso veterinário é considerada de longa ação ou ação prolongada quando, comparada com outra formulação registrada (com mesmo(s) ativo(s), concentração, via de administração e forma farmacêutica), de ação convencional (não prolongada), do mesmo estabelecimento detentor do registro, obtiver concentração plasmática ou tecidual eficaz mínima, por um período mínimo de tempo 80% (oitenta por cento) superior ao obtido pela formulação registrada.

Com relação aos estudos de segurança do produto de uso veterinário antimicrobiano, determina a IN 26:

- Que os estudos de segurança do produto antimicrobiano de uso veterinário devem ser realizados em todas as espécies animais para as quais o produto é indicado.
- Que o tamanho da amostra utilizada nos estudos de segurança do produto antimicrobiano de uso veterinário deve ser justificado estatisticamente ou por intermédio de referências internacionalmente reconhecidas.
- Que, finalmente, os estudos de segurança do produto antimicrobiano de uso veterinário devem conter informações pormenorizadas, abrangendo, no mínimo: sumário, local de realização, pesquisador principal, patrocinador, lote do produto utilizado, descrição do método de criação e alimentação fornecida aos animais, características dos animais estudados, origem e destino dos animais estudados, delineamento experimental, parâmetros avaliados, análise estatística, resultados, discussão e conclusão. Da mesma forma, fica o estabelecimento detentor do registro do produto antimicrobiano de uso veterinário obrigado a manter em arquivo os dados brutos obtidos nos estudos, os quais devem estar disponíveis ao MAPA, pelo período de 10 anos.

Por último, com relação ao período de carência do produto de uso veterinário antimicrobiano registrado no MAPA, determina a IN 26:

- Que os estudos para a determinação do período de carência do produto antimicrobiano de uso veterinário devem ser realizados com a formulação requerida do produto antimicrobiano de uso veterinário, nas espécies-alvo e matrizes recomendadas, utilizando a maior posologia indicada.
- Que nos estudos para a determinação do período de carência do produto antimicrobiano de uso veterinário, são aceitos os LMRs estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* ou em legislação específica e, na ausência destes, os reconhecidos internacionalmente e aceitos pelo MAPA.

Adicionalmente, o Plano Nacional de Controle de Resíduos, instituído a partir da Instrução Normativa nº 42 de 20 de dezembro de 1999 (BRASIL, 1999), faz publicar, anualmente, o Subprograma de Monitoramento de Resíduos, dentre eles, de antimicrobianos, em carnes, leite, pescado, mel e ovos, e os resultados do ano do exercício anterior, como forma de garantir que o uso dos antimicrobianos em saúde animal, no Brasil, está ocorrendo dentro da legislação em vigor e respeitando os Limites Máximos de Resíduos – LMRs adotados pelo MAPA.

2.4 AVICULTURA, SAÚDE PÚBLICA E Salmonella

Salmonella spp é um importante microrganismo patogênico amplamente distribuído pelo mundo e um dos agentes mais comuns responsáveis por gastroenterite em humanos, causando sérias implicações em saúde pública e gastos consideráveis em diversos países. Está frequentemente associada à ingestão de alimentos como ovos, carne de aves e suínos, sendo também isolado de outras fontes como água e vegetais (SILVA, 2002).

Por apresentar uma epidemiologia complexa e difícil controle, diversos programas de monitoramento foram criados com o objetivo de estabelecer vigilância epidemiológica, estudando e acompanhando ao longo do tempo a dinamicidade das cepas de *Salmonella* spp, principalmente as que são envolvidas em surtos alimentares.

Nesse contexto a tipificação de *Salmonella* spp tornou-se uma importante ferramenta epidemiológica, permitindo a caracterização e a discriminação de cepas pertencentes à mesma

espécie, melhorando a compreensão dos pesquisadores sobre a transmissão, patogênese e filogenia dessas bactérias (FOXMAN et al., 2005).

Para tanto, existem diversos métodos baseados em características fenotípicas e genotípicas do micro-organismo que devem ser escolhidos de acordo com o objetivo do estudo e condições técnicas laboratoriais (FOLEY et al., 2009).

Diante da importância assumida pela tipificação de *Salmonella* spp dentro do contexto epidemiológico e da diversidade de técnicas existentes, buscou-se relatar, neste trabalho, os métodos mais utilizados, apresentando seus fundamentos e aplicações no âmbito de pesquisas.

O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (CDC, 2011), pertencente à família *Enterobacteriaceae*, classificado como bastonetes Gram negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos (SILVA et al., 2007). A espécie *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies, designadas por números romanos, onde aproximadamente 99.5% dos sorotipos mais comumente isolados pertencem à subespécie *enterica* (FERREIRA; CAMPOS, 2008).

Como as cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* possuem maior relevância para a saúde pública, seu perfil bioquímico é o que normalmente se considera como característico nas análises: fermentação de glicose com produção de ácido e gás, ausência de fermentação de lactose e sacarose, ausência da produção de urease, utilização de citrato, fermentação de dulcitol e ausência de produção de indol (SILVA et al., 2007).

Após a identificação da bactéria utilizando testes bioquímicos e sorológicos, o sorotipo deve ser determinado em laboratórios de referência, baseado em reações antígeno-anticorpo (TOZETTO, 2006).

Dentre os mais de 2500 sorotipos de *Salmonella* conhecidos, aproximadamente 90 são os mais comuns em casos de infecções em animais e seres humanos (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Foram criados programas nacionais e internacionais de vigilância epidemiológica no intuito de estudar a epidemiologia de *Salmonella* spp e identificar padrões de resistência a antimicrobianos das cepas ao longo do tempo, contribuindo assim para a identificação de fatores de risco e suas implicações em saúde pública (YAN et al., 2003).

Com o desenvolvimento industrial, os alimentos passaram a ser produzidos em larga escala. Tomando-se como exemplo a avicultura, que se expandiu no mundo inteiro, pode-se afirmar que, com essa expansão, houve um aumento exponencial da quantidade de animais, concentrando-se mais aves por metro quadrado. Essa situação favorece a instalação, multiplicação e disseminação de agentes patogênicos. Dentre os agentes patogênicos, a

Salmonella permanece um problema importante na avicultura mundial, seja do ponto de vista de saúde animal ou do ponto de vista econômico e, sem dúvida, como um assunto de saúde pública. Os membros do gênero Salmonella são agentes de infecções intestinais humanas e animais, sendo que dentre os agentes de doenças veiculadas por alimentos, o gênero Salmonella é um dos principais responsáveis por casos fatais e complicações clínicas dos afetados (BORSOI et al., 2011).

A salmonelose é uma das zoonoses mais problemáticas para a saúde pública em todo o mundo, devido à elevada endemicidade, alta morbidade e acima de tudo, pela dificuldade no controle. Este desafio resulta do extraordinário número de fontes de infecção, envolvendo praticamente todo o escalão filogenético dos vertebrados, alguns dos quais, fontes de proteína animal para o homem. A contaminação dos produtos avícolas, carnes e ovos para o consumo humano pode ocorrer devido às infecções intestinais e sistêmicas das aves, através do abate, processamento da carcaça, contato com superfícies contaminadas, das mãos dos manipuladores, durante a preparação dos alimentos ou por contaminação cruzada (SILVA, 1996).

Devido à alta prevalência de *Salmonella* em aves, não é surpreendente que produtos avícolas sejam fontes comuns de infecção desta bactéria em humanos. Daí o fato de ter sido a *Salmonella* uma das bactérias apontadas pela FAO como prioritária para os estudos de risco de transmissão de resistência bactariana aos antimicrobianos. A salmonelose em humanos frequentemente ocorre devido ao consumo de carne de aves e ovos mal cozidos (POPPE, 1999), embora o número e a variedade de alimentos envolvidos no aparecimento de surtos de infecções por *Salmonella* sejam maiores. A salmonelose em humanos é influenciada por uma série de fatores que incluem: o sorovar de *Salmonella* envolvido, a idade e a dose infectante, o tipo de alimento contaminado e a predisposição para doenças, dentre outros. Entre os fatores que contribuem para a resistência contra as salmoneloses, estão: acidez gástrica, flora microbiana intestinal normal e imunidade intestinal local, além da motilidade do trato gastrointestinal (BORSOI *et al.*, 2011).

O primeiro relato da ocorrência de *Salmonella enteritidis* em aves no Brasil foi realizado por pesquisadores da Universidade de São Paulo, em 1990 (FERREIRA *et al.*, 1990).

Segundo Silva (2002), a *Salmonella* Enteritidis (SE) emergiu como um grande problema avícola e de saúde pública no Brasil a partir de 1993, sugerindo o autor que a entrada desse agente no Brasil se deu via importação de material genético avícola contaminado, provavelmente no final da década de 80.

Com a expansão da avicultura no Brasil durante a década de 90, criaram-se condições favoráveis para a proliferação da SE nos plantéis avícolas.

Ainda de acordo com os autores, embora as cepas de SE isoladas de aves mostrassem alta sensibilidade aos antibióticos de uso comum em avicultura, já se observava um aumento da resistência antimicrobiana e multirresistência em cepas de origem humana.

Levantamentos realizados no ano de 2001 e utilizados na publicação em questão, mostraram que a SE em materiais avícolas era o principal sorovar responsável pelas infecções humanas e que, embora as carcaças de frangos apresentassem altas taxas de contaminação por SE, eram os ovos e seus derivados os principais responsáveis pelos surtos humanos.

Salmonella sp. é alvo de estudos que enfocam características epidemiológicas e moleculares por se tratar de um importante patógeno responsável por toxi-infecções alimentares em humanos apresentando complexa interação entre agente, meio ambiente e diversas espécies de hospedeiros (LIU et al., 2011).

Durante a caracterização epidemiológica de um surto causado por infecção bacteriana é importante estabelecer a relação clonal entre os isolados, pois em vários casos, a origem da doença se encontra na exposição a uma fonte comum do patógeno. Dessa maneira, muitos desses microrganismos são resultantes da divisão contínua de uma única célula, gerando isolados praticamente idênticos geneticamente (TOZETTO, 2006). Portanto, a identificação e diferenciação de clones bacterianos é possível devido à tipificação bacteriana (OLSEN et al., 1993).

Existem diversas técnicas capazes de diferenciar isolados de *Salmonella* sp. que devem ser constantemente empregadas no âmbito da vigilância epidemiológica, visto o aumento da diversidade de sorovares. Para tanto são aplicados os métodos de tipificação que auxiliam no monitoramento epidemiológico de cepas, sendo possível a investigação da origem de um surto alimentar bem como o monitoramento de perfis de resistência antimicrobiana (YAN et al., 2003). Além disso a tipificação de *Salmonella* também é utilizada para a detecção de focos de contaminação em ambientes de processamento de produtos alimentares (LIM et al., 2005).

Métodos de tipificação bacteriana, portanto, são definidos como quaisquer métodos que possam diferenciar os microrganismos além da classificação em espécies, apresentando como base a capacidade de comparar isolados e agrupar cepas que demonstrem resultados idênticos (OLSEN et al., 1993). Desta forma, parte-se da ideia de que linhagens clonais de bactérias (microrganismos proximamente relacionados) compartilham propriedades que

podem ser identificadas e utilizadas para distingui-las das que não são similares (EBERLE; KIESS, 2012).

As técnicas de tipificação são baseadas no fenótipo e no genótipo das bactérias (FOLEY et al., 2009). Os métodos fenotípicos são aqueles que diferenciam as cepas por meio da caracterização dos produtos da expressão gênica, como por exemplo, a presença de antígenos na superfície celular e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos (TENOVER et al., 1997). Os métodos genotípicos são baseados na análise da estrutura genética do microrganismo utilizando enzimas de restrição, amplificação de ácido nucléico ou sequenciamento de nucleotídeos (YAN et al., 2003).

Dentre os diversos métodos de tipificação existentes, sejam eles fenotípicos ou genotípicos, a escolha do mais adequado ao objetivo do estudo deve ser baseada na análise de três critérios essenciais: tipicidade, reprodutibilidade e discriminação (HUNTER; GASTON, 1988; HUNTER, 1990; BELKUM et al., 2007; HURST et al., 2009; EBERLE; KIESS, 2012).

A proporção de isolados tipificáveis por um determinado método gerando resultados interpretáveis está relacionada à tipicidade (FOLEY et al., 2009). Essa propriedade é frequentemente elevada em métodos genotípicos a medida que métodos tradicionais como a sorotipificação e fagotipificação apresentam limitações devido à variação genética, de forma que os laboratórios devem introduzir novos soros e fagos para melhorá-la (OLSEN et al., 1993).

A reprodutibilidade de um dado método de tipificação é avaliada quando são aplicados testes de repetição de um determinado isolado, em ocasiões diferentes, obtendo-se resultados iguais (BELKUM et al., 2007; BEHRINGER et al., 2011). Essa propriedade é especialmente importante para o desenvolvimento de bases de dados confiáveis contendo as cepas conhecidas de uma determinada espécie para comparação e classificação com organismos desconhecidos (OLIVE; BEAN, 1999). Por isso é necessário uma estrita padronização da técnica, de modo a permitir alta reprodutibilidade intra e inter-laboratorial (SCHÜRCH; SOOLINGEN, 2012).

A discriminação ou poder discriminatório é a competência da técnica de diferenciação dos isolados não relacionados (EBERLE; KIESS, 2012); ao mesmo tempo, ela deve ser capaz de apresentar a relação de todos os organismos isolados de indivíduos infectados por meio da mesma fonte (OLIVE; BEAN, 1999). Para avaliar a capacidade de discriminação dos métodos de tipificação, HUNTER; GASTON (1988) sugeriram a utilização do índice de diversidade de Simpson que é calculado por meio da probabilidade de duas cepas não relacionadas, originadas de uma determinada população, serem alocadas em grupos diferentes.

Cada técnica apresenta vantagens e desvantagens e nenhuma utilizada, isoladamente, irá cumprir todos os requisitos necessários para um resultado adequado ao objetivo do estudo (OLSEN et al., 1993). Por isso, é importante uma avaliação detalhada e a compreensão do pesquisador em relação às limitações de cada uma.

Atualmente, existem diversas técnicas para realizar a tipificação de *Salmonella* sp. Dentre os métodos fenotípicos, que são considerados os mais tradicionais, estão a sorotipificação (MÜRMANN et al., 2008; XIA et al., 2009; YANG et al., 2010; ABBASSI-GHOZZI et al., 2011), fagotipificação (LACONCHA et al., 1998; MAJTANOVA et al., 2011) e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos (LIU et al., 2011; HUR et al., 2012). Em relação às técnicas moleculares, utilizadas para a caracterização do genótipo da *Salmonella*, podem ser destacadas o perfil plasmidial (AKTAS et al., 2007; ABBASSI-GHOZZI et al., 2011), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) (BETANCOR et al., 2004; GUIMARÃES, 2010) e eletroforese em campo pulsado (PFGE) (XIA et al., 2009; CHEN, et al., 2011).

2.5 DETERMINAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE Salmonella

Pelos idos de 1940, Chain e colaboradores (CHAIN et al., 1940) sugeriram pela primeira vez o uso de halos de inibição, inclusive em bases quantitativas, para medir a eficiência da penicilina. Bauer et al. (1966), propuseram o uso de um único disco de alta concentração para determinar a sensibilidade bacteriana, uma vez que, até então, os resultados obtidos com os métodos existentes geravam resultados discrepantes, não só pela metodologia usada como também pelas concentrações de antibacterianos contidos nos discos. Os primeiros trabalhos com o objetivo de padronizar a metodologia do antibiograma foram desenvolvidos pelo FDA (1972) e OMS (1971). Posteriormente, uma padronização de consenso foi adotada entre as entidades acima mencionadas e o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute* – USA), o qual, recentemente, normatizou a prática do antibiograma para drogas utilizadas na terapêutica veterinária, algumas de uso exclusivamente animal e outras de uso tanto em humanos como em animais.

O método de disco-difusão foi idealizado por Bauer *et al.* (1966), e desde então é um dos métodos mais utilizados nos laboratórios de microbiologia. O princípio deste método baseia-se na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em um disco de

papel-filtro. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima (CIM). Esse método é qualitativo, ou seja, permite classificar a amostra bacteriana em suscetível (S), intermediária (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano.

Uma técnica utilizada para dosificar a atividade antimicrobiana de um fármaco é a determinação da Concentração Inibitória Mínina (CIM ou MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*). Nesta técnica utiliza-se uma série de tubos com o mesmo inóculo bacteriano, incorporando-se em cada tubo quantidades crescentes do antimicrobiano a ser estudado mais meio de cultura. Os tubos são posteiormente incubados em estufa a 37 °C, durante 24h. O crescimento bacteriano é observado pela turvação do meio. A menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento é determinada como Concentração Inibitória Mínima.

A CIM (Concentração Inibitória Mínima) de uma bactéria para um determinado agente antimicrobiano pode ser determinada e fornece estimativa quantitativa para a susceptibilidade. CIM é definida como a menor concentração de agente antimicrobiano necessária para inibir o crescimento das bactérias. A CIM informa sobre o grau de resistência e pode dar informações importantes sobre o mecanismo de resistência e os genes de resistência envolvidos. Em contraste, os testes em difusão de disco são principalmente métodos qualitativos que, normalmente, só devem ser utilizados para a verificação da existência de resistência. Testes de difusão são baratos em comparação com a maioria dos métodos dos testes para determinaçao de CIM. O E-teste é um teste de difusão, porém foi desenvolvido para dar um valor de CIM aproximado. Pode ser realizada a determinaçao da CIM por técnicas de micro e macrodiluição além do E-test. O controle de qualidade é recomendado pelo CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute.

Embora os testes fenotípicos tenham boa sensibilidade e confiabilidade de resultados, além da praticidade de execução, só é possível confirmar a presença e determinar eventual fator de resistência por meio de técnicas de genotipagem, que são mais sensíveis e específicas. A disseminação clonal e o encontro de cepas relacionadas entre si também só podem ser avaliados com técnicas moleculares e são particularmente úteis na ocorrência de surtos ou epidemias (CORNAGLIA *et al.*, 2000; GIBB *et al.*, 2002).

Para melhor elucidar questões epidemiológicas e de mecanismos de resistência microbiana, têm sido propostos alguns métodos com aplicação de biologia molecular. Estes métodos genotípicos têm maior reprodutibilidade e são menos sujeitos a variações. Para o estudo de

Salmonella, as técnicas mais utilizadas são a PCR (*Polimerase Chain Reaction*), a PFGE (*Pulsed Field Gel Electroforesis*) e a determinação de MLST (*Multilocus Sequence Typing*).

A análise de fragmentação de DNA por meio de eletroforese em campo pulsado (PFGE) é útil para a investigação epidemiológica de microrganismos e auxilia na elucidação de surtos (CORNAGLIA *et al.*, 2000).

A técnica de PFGE foi descrita pela primeira vez em 1984, como uma ferramenta para exame de DNA cromossomal de organismos eucarióticos. Subsequentemente, a técnica foi comprovada como altamente eficiente para tipagem molecular de diferentes espécies bacterianas. A técnica gera de 10 a 30 fragmentos de restrição, com tamanho de 10 a 800kb, através da preparação do DNA com o uso de enzimas de restrição (TENOVER et al., 1997). Em 1995, Tenover e colaboradores publicaram critérios de interpretação de resultados de PFGE, em um esforço para tornar homogêneo o uso desta técnica para fins epidemiológicos. Assim, se existe uma relação epidemiológica entre as bactérias idênticas, provavelmente tratase de surto. Por outro lado, bactérias de mesma espécie e mesmo genótipo, isoladas de pacientes que não possuem uma ligação epidemiológica detectável, podem representar linhagens epidêmicas. Os mesmos pesquisadores assumiram que bactérias não relacionadas epidemiologicamente devem possuir genótipos diferentes. Considera-se o fato de que um mínimo de 10 fragmentos de DNA (consequentemente 10 bandas no gel) devem ser obtidos por bactéria, para que a técnica tenha poder discriminatório relevante. Alguns fatores podem interferir na PFGE, como composição e concentração da agarose, solução tamponante, tensão da corrente elétrica (voltagem), tempo de pulso e de corrida eletroforética, dentre outros fatores, sendo que a escolha da enzima de uso deve ter sido previamente estudada (MAGALHÃES et al., 2005).

Dentre as técnicas desenvolvidas mais recentemente, a tipagem de sequência de multilocus (MLST) é uma técnica de biologia molecular para a tipagem de múltiplos *loci*. A técnica de MLST mede diretamente as variações da sequência de DNA de um conjunto de genes e caracteriza as estirpes pelos seus perfis de alelos originais. O princípio do MLST envolve amplificação por PCR seguida por sequenciamento de DNA. As diferenças entre as estirpes de nucleotídeos podem ser verificadas em um número variável de genes, de acordo com o grau desejado de discriminação.

A técnica de MLST é utilizada para estudos continuados sobre um determinado microrganismo e baseia-se na amplificação e sequenciamento de 7 genes essenciais/constitutivos (*housekeeping* genes, necessários ao funcionamento normal de uma célula). São sequenciados fragmentos de 450-500bp de cada gene e é feita uma análise

filogenética baseada na comparação entre os fragmentos estudados em bases de dados já existentes. Para bactérias de uma mesma espécie, sequências diferentes de alelos são designadas; para cada isolado, o local de cada alelo constitui um *sequence type* (ST).

O MLST é uma técnica molecular valiosa amplamente utilizada para os estudos epidemiológicos. Para a análise de salmonelas, tradicionalmente emprega-se sete housekeeping genes (MLST, 2013), porém diversas variações têm sido propostas (KOTETISHVILi et al., 2002; SUKHNANAND et al., 2005; TANKOUO-SANDJONG et al., 2007). Comparado a outros métodos de tipagem, o MLST tem muitas vantagens, dentre elas o formato digital dos dados resultantes da técnica, que permite comparação rigorosa com dados obtidos a partir de diferentes laboratórios. Uma das principais limitações, é a insuficiente resolução do MLST no esquema de interpretação atual, que muitas vezes limita a sua utilidade em estudos epidemiológicos locais (FAKHR et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Conhecer e comparar o perfil de resistência a antimicrobianos considerados criticamente importantes em medicina veterinária e humana, para cepas de *Salmonella* isoladas de aves comerciais e materiais avícolas, durante o período da década de 90 e amostras isoladas durante o período entre os anos de 2008 e 2010.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o perfil de resistência a antimicrobianos das cepas de *Salmonella* através do teste de difusão em disco;

Conhecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos para os quais as cepas apresentaram resultado resistente ou resistência intermediária no teste de difusão em disco:

Realizar a sorotipicação das cepas de *Salmonella* selecionadas como resistentes ou com resistência intermediária para os antimicrobianos testados;

Acessar o perfil genético clonal pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) das cepas selecionadas nos testes de resistência a antimicrobianos.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1 EXPERIENTO 1: Perfil de resistência a antimicrobianos

Cem amostras de *Salmonella* isoladas no período da década de 90 e amostras isoladas do período entre os anos de 2008 e 2010, provenientes de aves comerciais e material avícola e estocadas no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP, foram submetidas para avaliação de resistência pelo método de disco difusão em ágar frente agentes antimicrobianos; o trabalho foi dividido em duas fases. Fase 1 de análise de cinquenta amostras da década de 90 frente a vinte e um antimicrobianos e Fase 2 de análise de cinqüenta amostras,isoladas nos anos 2008 a 2010, frente a seis antimicrobianos escolhidos dentre a lista dos antimicrobianos criticamente importantes.

4.2 EXPERIMENTO 2: Determinação de sorovar

Trinta e quatro cepas de *Salmonella* selecionadas pelos testes para avaliação de resistência tiveram seu sorovar determinado pelo método de sorotipificação por aglutinação em placa.

4.3 EXPERIMENTO 3: Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Trinta e quatro cepas dentre as cem amostras de *Salmonella* que apresentaram resistência ou resistência intermediária aos antimicrobianos criticamente importantes no teste de disco difusão em ágar, foram submetidas ao teste de determinação de CIM para os antimicrobianos ciprofloxacina, enrofloxacina, ceftiofur e também para gentamicina, cloranfenicol e florfenicol.

4.4 EXPERIMENTO 4: Análise clonal

Trinta e quatro cepas de *Salmonella* selecionadas pelos testes para detecção de resistência foram analisadas pelo método de eletroforese em campo pulsado (PFGE) a fim de se determinar o perfil clonal das mesmas.

4.5 EXPERIMENTO 5: Análise de ancestralidade

A técnica de MLST (sequência de múltiplos *locus*) foi realizada para a cepa 980, selecionada através da combinação de caracterização entre os testes de resistência e PFGE, para comparação de resultados de ancestralidade pela técnica de MLST com banco de dados internacional para histórico de amostras mundiais.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 BACTÉRIAS

Cem cepas de *Salmonella* foram recuperadas a partir de estoques em ágar. Para cada amostra, uma alçada de agar estoque foi inoculado em 3mL de caldo BHI (Brain *Hearth Infusion*, BD Difco) e incubada a 37° C, por 24 horas. Posteriormente, foram semeadas em placas contendo ágar MacConkey (BD Difco) e incubadas nas mesmas condições descritas. As amostras foram submetidas a testes bioquímicos preliminares padrão (APÊNDICE A) e ressemeadas em ágar MacConkey (BD Difco) e incubada a 37° C, por 24 horas.

5.2 ANTIMICROBIANOS

Discos de papel impregnados com antimicrobianos em concentrações padronizadas da marca Sensifar-Vet Cefar®, fabricados por Cefar Diagnóstica Ltda. (São Paulo, SP), foram utilizados para o teste de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão, assim por classe farmacológica descritos:

- Quinolonas/Fuoroquinolonas: Ácido Nalidíxico (NAL 10μg), Ciprofloxacina (CIP 5μg), Enrofloxacina (ENO 5μg) e Norfloxacina (NOR 10μg);
- Aminoglicosídeos: Apramicina (15μg), Amicacina (AMI 30μg), Espectinomicina (EPT 100μg), Estreptomicina (EST 300μg), Gentamicina (GEN 10μg), Kanamicina (CAN 30μg) e Tobramicina (TOB 10μg);
- Cefalosporinas: Cefalotina (CFL 30μg), Cefotaxima (CTX 30μg) . Ceftiofur (CTF 30μg) e Cefuroxima (CRX 30μg);
- β lactâmicos: Amoxacilina (AMO 20μg);
- Anfenicóis: Cloranfenicol (CLO 30µg) e Florfenicol (FLF 30µg);
- Sulfas: Cotrimoxazol SUT (trimetoprim 1,25 μg + sulfametoxazol 23,75μg);
- Macrolídeos: Eritromicina (ERI 15µg);
- Tetraciclinas: Doxiciclina (DOX 30µg) e Tetraciclina (TET 30µg).

Na Fase 1 de análise das amostras foram utilizados todos os antimicrobianos acima descritos e na Fase 2 foram utilizados os antimicrobianos ceftiofur, ciprofloxacina, cloranfenicol, enrofloxaxina, florfenicol e gentamicina.

5.3 TESTE DE DISCO DIFUSÃO

O teste foi realizado de acordo com metodologia padrão descrita pelo CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006). A partir das amostras isoladas em ágar MacConkey, previamente descrito no item 5.1, foi selecionada uma colônia de cada amostra, sendo elas inoculadas em 10mL de caldo em BHI, a 37°C, até a turbidez alcançar 0,08 a 0,13 de absorbância (correspondente a 0,5 na escala de McFarland) sendo lida em 625 nm (nanômetro) de comprimento de onda em espectrofotômetro ThermoSpectronic – modelo Biomate 3 Series.

As amostras com densidade óptica ajustadas, foram plaqueadas com suabes estéreis em placas contendo ágar Mueller-Hinton. Após 15 minutos foram depositados os discos com os antimicrobianos, e as placas foram incubadas por 16 a 18 horas a 37°C. A leitura de diâmetro dos halos foi realizada após o período de incubação. Colônias grandes que cresceram dentro dos halos de inibição foram isoladas novamente, reidentificadas e retestadas para o antimicrobiano em questão. Controle foi realizado com cepa padrão *Escherichia coli* ATCC 25922.

As amostras que apresentaram resultados resistente ou com resistência intermediária foram, novamente, submetidas aos testes bioquímicos, antes do envio para testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e eletroforese em campo pulsado (PFGE).

5.4 SOROTIPIFICAÇÃO

A identificação dos sorovares de Salmonella foi realizada no laboratório de enterobactérias da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, RJ, com base no esquema de Kauffmann-White (LE MINOR, L; BOCKEMUHL, 1985) para identificação de antígenos capsulares (Vi), antígenos somáticos (O) e antígenos flagelares (H).

5.5 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O método diluição em ágar foi utilizado para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos 6 antimicrobianos (ciprofloxacina, enrofloxacina, ceftiofur, gentamicina, cloranfenicol e florfenicol) conforme recomendado pelo CLSI – *Clinical and Laboratory Standards* (CLSI, 2006). Brevemente, a metodologia é desenvolvida com diferentes concentrações dos antimicrobianos selecionados diluídos em ágar Mueller-Hinton (Oxoid Brasil Ltda.) e solidificados em placas. Um total de 10⁴ UFC/mL foram inoculados em cada placa e estas foram incubadas a 35 ± 2 ° C por 16 a 20 horas. O registro do CIM foi realizado a partir da visualização da placa com a menor concentração do agente antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento das salmonelas.

5.6 ANÁLISE POR PFGE

Para a análise de *Salmonella* por PFGE , foram preparados blocos de agarose contendo DNA genômico com cultivo das cepas em caldo BHI, na concentração celular de 1x10⁹ UFC/mL, para formação dos blocos (*plugs*) em agarose 2%. Cinco blocos de cada isolado foram encubados em uma primeira solução de lise, com 40 μl de lisozima (volume total 200 μl), por 2h a 37°C. Após desprezar a primeira solução os blocos foram incubados a 57°C, em solução a mesmo volume, com 10 μl da enzima proteinase K. Após passar por incubação em tampão e lavagens, os blocos foram mantidos a 3°C em microtubos com 900 μl de tampão TE, até o momento da restrição.

A restrição do DNA genômico foi realizada em solução de restrição com 2 μl de enzima Xba I (Amershan biosciences), incubado por 24h a 37°C. As amostras foram submetidas a análise de perfil de microrrestrição utilizando o sistema de eletroforese CHEF DR III *Chiller System*(Bio-Rad), com corrida das amostras no gel em dois períodos, assim estabelecidos: 11h a 6 V/cm, ângulo fixo de 120°, pulso inicial 7s e final 12s; 13h a 6 V/cm, ângulo fixo de 120°, pulso inicial 20s e final 40s, realizados a 13°C. O gel resultante foi corado com *Blue Green* e a visualização dos fragmentos foi realizada em luz ultravioleta, com sistema de foto documentação ImageMaster® (Amershan biosciences). A análise dos

fragmentos foi realizada com o programa *BioNumerics* (Applied Maths). A metodologia citada foi realizada segundo descrito por Liu e Sanderson (1992).

5.7 ANÁLISE DE MLST

A análise de sequência de múltiplos *locus* foi realizada de acordo com protocolos descritos no site oficial da técnica de MLST (MLST, 2013). Brevemente, as 6 amostras de *Salmonella* selecionadas (SA432, SA670, SA676, SA698, SA980 e SA983) foram plaqueadas em agar TSA (ágar Triptona de Soja, Oxoid), e incubadas a 37 ° C durante 18-24 h. Após a incubação, as colónias foram inoculadas em 40 μl de tampão de lise de células (50 μg / ml de proteinase K (Amresco, Solon) em tampão TE (pH 8). As células foram lisadas por aquecimento a 80° C durante 10 minutos seguido por 55° C durante 10 minutos em termociclador (Eppendorf®). A suspensão final foi diluída 1:02 em água estéril, centrifugada para remover os restos celulares e transferida para um tubo estéril. A amplificação por PCR para os genes do painel MLST foi realizado como segue. Os pares de *primers* (Quadro 5) (IDT) foram utilizados para amplificar o DNA para a presença dos descritos.

Quadro 5- Denominação dos genes, sequência de nucleotídeos, produto esperado e referência dos iniciadores (*primers*) utilizados para a caracterização das cepas de *Salmonella*

Gene	Sequência	Produto	Referência
		(pb)	
thrA	F5'-GTCACGGTGATCGATCCGGT-3'	852	ACHTMAN,
	R 5'-CACGATATTGATATTAGCCCG-3'		et al., 2012.
purE	F1 5'-GACACCTCAAAAGCAGCGT'-3'	510	ACHTMAN,
	R2 5'-AGACGGCGATACCCAGCGG-3'		et al., 2012.
SucA	F1 5'-CGCGCTCAAACAGACCTAC-3'	643	ACHTMAN,
	R1 5'-GACGTGGAAAATCGGCGCC-3'		et al., 2012.
hisD	F1 5'-GAAACGTTCCATTCCGCGC-3'	894	ACHTMAN,
	R1 5-GCGGATTCCGGCGACCAG-3'		et al., 2012.
aroC	F5'-CCTGGCACCTCGCGCTATAC-3'	826	ACHTMAN,
	R 5'-CCACACACGGATCGTGGCG-3'		et al., 2012.
hemD	F15'-GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG-3'	666	ACHTMAN,
	R 5'-ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA-3'		et al., 2012.
dnaN	F 5'-ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA-3'	833	ACHTMAN,
	R 5'-AATTTCTCATTCGAGAGGATTGC-3'		et al., 2012.

pb: pares de base.

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 50 µl contendo 1µl de molde de DNA, Taq DNA polimerase (Promega) (1,25 L), 1 x tampão de PCR (Promega).

Os *primers* (*forward e reverse*) foram adicionados em 0,1 mM, cad; dNTPs a 200 pM (Promega). As reações de PCR foram realizadas num termociclador (Eppendorf), utilizando os seguintes parâmetros para os ciclos 94 ° C durante 30 s, seguido por 30 ciclos de 95 ° C durante 30s, 55 ° C 30s e 76 ° C durante 30s, com extensão final de 75° C durante 2 minutos seguido de espera a 4° C. Para os produtos de PCR, 10 µl foram colocados em géis de agarose a 1% e realizada a eletroforese.

O sequenciamento dos produtos de PCR utilizando o ABI 3730 DNA *Analyser*, sistema de análise de DNA de 48 capilares com a tecnologia *Life Technologies – Applied Biosystems*. Para as reações de sequenciamento foi utilizando o BigDye® terminator v3.1 *Cycle Sequencing Kit* (código 4337456). As corridas foram realizadas em capilares de 36cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas pelo software *Sequencing Analysis* 5.3.1 utilizando o *Base Caller* KB, sendo que as reações de sequenciamento alcançam em 600 a 700 bases.

A análise do índice de ancestralidade foi realizada no site oficial para análise de MLST (http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/GetTableInfo_html).

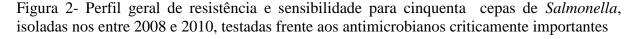
6 RESULTADOS

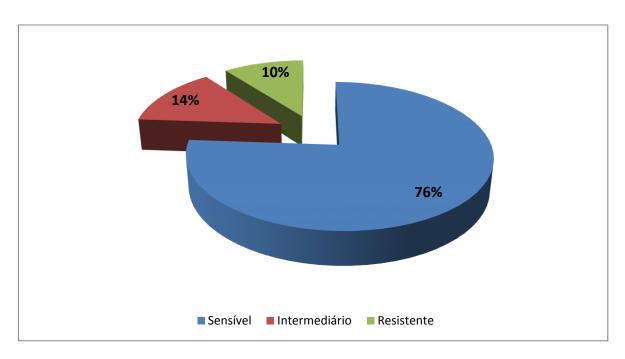
6.1 EXPERIMENTOS 1 e 2

Para a fase de análise de amostras de *Salmonella* isoladas na década de 90, entre os anos de 1989 a 1999, os resultados de disco difusão para os vinte e um antimicrobianos estão detalhados na tabela 1 e figura 2.

Tabela 1- Resultados da análise de cinquenta cepas de *Salmonella* para resistência a antimicrobianos no teste de disco difusão, frente a vinte e um antimicrobianos

Antimicrobiano	Amostras	Amostras	Amostras		
	Resistentes (%)	Intermediárias (%)	Sensíveis (%)		
Ac. Nalidixico	56	12	32		
Ceftiofur	22	62	16		
Cefotaxima	18	8	74		
Tetraciclina	18	0	82		
Estreptomicina	16	12	72		
Cotrimoxazol	12	2	86		
Doxiciclina	10	6	84		
Espectinomicina	10	2	88		
Gentamicina	10	2	88		
Kanamicina	10	12	78		
Apramicina	8	72	20		
Amoxacilina	8	4	88		
Florfenicol	6	0	94		
Cefuroxima	4	16	80		
Ciprofloxacina	4	28	68		
Amicacina	2	2	96		
Cloranfenicol	2	0	98		
Cefalotina	0	4	96		
Enrofloxacina	0	28	72		
Norfloxacina	0	6	94		
Tobramicina	2	6	92		





Nas análises de disco difusão para as amostras da década de 90 (1989 a 1999), os resultados estão apresentados na tabela 2. Ainda, na mesma tabela, a comparação de resultados das amostras isoladas entre de 2008 e 2010, para os antimicrobianos criticamente importantes.

Tabela 2- Porcentagem de amostras de *Salmonella* de diferentes décadas caracterizadas como resistentes, resistência intermediária e sensíveis para os antimicrobianos criticamente importantes em medicina veterinária e/ou humana

Antimicrobiano	Am	ostras 1989 a 19	999	Amostras 2008 a 2010			
	resistente	intermediário	sensível	resistente	intermediário	sensível	
Ceftiofur	0	41%	59%	28%	56%	16%	
Ciprofloxacina	0	0	100	3%	22%	75%	
Cloranfenicol	0	0	100	2%	0	98%	
Enrofloxacina	0	0	100	2%	28%	70%	
Florfenicol	0	0	100	2%	0	98%	
Gentamicina	0	0	100	7%	2%	91%	

O teste de difusão em disco para resistência de *Salmonella* a antimicrobianos apresentou diferentes percentuais de amostras resistentes ou com resistência intermediária aos antimicrobianos de importância em medicina veterinária e/ou humana selecionados, para os diferentes anos de isolamento das amostras. Frente ao resultado descrito na tabela 2, foram selecionadas trinta e quatro cepas para os demais experimentos (Experimentos 2 a 5).

A tipificação das trinta e quatro cepas de *Salmonella* selecionadas no experimento 1 apresentou 10 sorovares. O quadro 5 apresenta dados de tipificação, ano de isolamento, origem da amostra e o perfil de resistência destas cepas selecionadas.

Os sorovares de *Salmonella* (S.) determinados pertencem a 4 grupos antigênicos assim determinados: grupo B (S. Brandenburg, S. Typhimurium, S. Schwarzengrund e S. Saintpaul), grupo C (S. Mbandaka), grupo D (S. Enteritidis e S. Panamá), grupo G (S. Worthington e S. Havana). A amostra sorotipificada pela fórmula antigênica O:6;7:eh:- não está classificada em nenhum dos grupos antigênicos descritos até o momento.

Quadro 6- Tipificação, ano de isolamento, origem da amostra e o perfil de resistência das cepas selecionadas

N° da	Salmonella	Ano	Origem da amostra	Perfil de Resistência	Resistência
Amostra	Sorovar		_		Intermediária
437/487	Enteritidis	1997	ovos bicados	100% sensíveis	CTF
416	Enteritidis	1999	suabe arrasto matriz	100% sensíveis	CTF
430	Enteritidis	1999	órgãos frango corte	100% sensíveis	CTF
432	Enteritidis	1999	órgãos frango corte	100% sensíveis	CTF
423	Enteritidis	1999	ovos bicados corte	100% sensíveis	CTF
429	Enteritidis	1999	órgãos frango corte	100% sensíveis	CTF
417	Enteritidis	1999	órgãos postura	100% sensíveis	CTF
418	Enteritidis	1999	órgãos postura	100% sensíveis	CTF
418 B	Enteritidis	1999	órgãos postura	100% sensíveis	CTF
431	Enteritidis	1999	órgãos frango corte	100% sensíveis	CTF
434	Enteritidis	1999	ovos bicados corte	100% sensíveis	CTF
436	O:6;7:eh:-	2001	ceco frango corte	100% sensíveis	CTF
670	Worthington	2009	ração	CLO,SUT, EST, TET	AMO
672	Mbandaka	2009	ração	SUT, DOX,TET	
673	Brandenburg	2009	suabe cama matrizes	NAL, GEN, TET	AMO
676	Typhimurium	2009	ambiente	NAL, AMO,DOX, GEN, CAN, TET, TOB	
683	Panamá	2009	suabe cama matrizes	CTX,SUT	CTF
687	Typhimurium	2009	órgãos matrizes	CTF, CIP, EST, FLF, GEN, CAN	NAL, ENO
				AMI, CTX, CTF, CRX, SUT, DOX, EPT, EST,	
682	Havana	2009	suabe cama frango	CAN, TET	CLO
696	Enteritidis	2008	órgãos matrizes	NAL, CTF,	CRX, CIP
698	Enteritidis	2008	órgãos matrizes	NAL, CTX, CTF,	CRX, CIP, ENO
699	Enteritidis	2008	suabe cama matrizes	NAL, CTX, CTF,	CRX, CIP, ENO, CAN

705	Enteritidis	2008	suabe cama frango	CTX, EST	CTF	
710	Enteritidis	2008	suabe cama frango	NAL, AMO, CAN, TET	CFL, CTF, CIP, DOX, TOB	
702	Enteritidis	2008	órgãos matrizes	NAL, CTX, CTF	CIP	
706	Enteritidis	2008	suabe cama frango	NAL, CTX,CTF		
707 A	Enteritidis	2008	suabe cama frango	CTX,CTF, EST		
707 B	Enteritidis	2008	suabe cama frango	CTX, EST	NAL, CTF, CRX	
712	Enteritidis	2009	suabe cama frango	NAL, APR, DOX, EPT, TET	CTF, CIP, SUT, ENO, CAN	
713	Typhimurium	2009	suabe cama frango	NAL, AMO, CTF, CRX, SUT, DOX, TET	APR, CIP, ENO, CAN, NOR	
975	Schwarzengrund	2010	Não identificada	CTF, ENO	CIP	
978	Saintpaul	2010	Não identificada	CTF		
980	Schwarzengrund	2010	Não identificada	CTF	ENO	
983	Brandenburg	2010	Não identificada	CTF	ENO	

Amostra 437 também identificada como 487.

6.2 EXPERIMENTO 3

Quadro 7- Identificação da amostra, ano de isolamento, origem e concentração inibitória mínima para determinada de amostras de *Salmonella* que apresentaram resistência frente aos antimicrobianos criticamente importantes

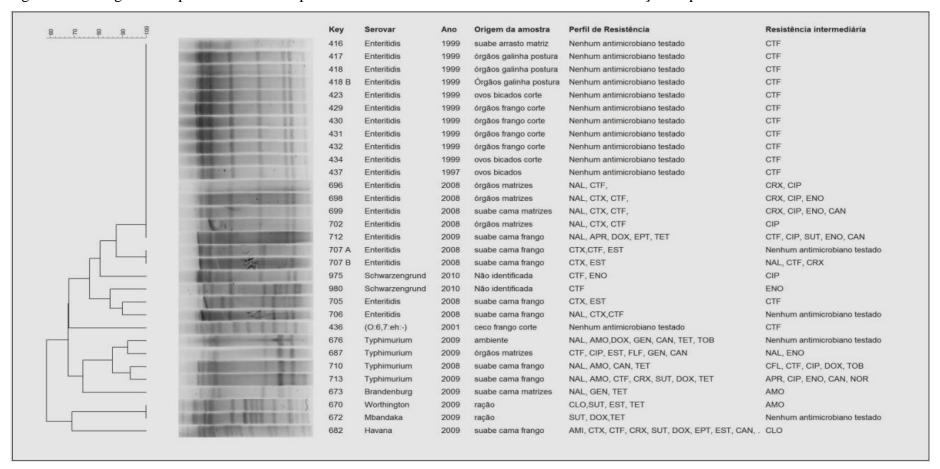
CIP: ciprofloxacina; ENO: enrofloxacina. CEF: ceftiofur; GEN: gentamicina; CLO: cloranfenicol,; FLO: florfenicol.

A magazina / a a mayyan da			CIM (µg/mL)							
Amostra/ sorovar de Salmonella	Ano	Origem	CIP	ENO	CTF	GEN	CLO	FLO	Perfil de resistência*	Perfil de resistência intermediária
437 Enteritidis	1997	Ovos bicados	0,031	4	≤ 0,015	≤0,015	8	8	ENO	
436 O:6;7:eh:-	2001	Ceco frango corte	0,25	1	≤ 0,015	≤ 0,015	8	8	ENO	
706 Enteritidis	2008	Suabe cama frango	0,25	0,5	≤ 0,015	≤ 0,015	4	8	ENO	
696 Enteritidis	2008	Orgãos matriz	1	2	1	1	4	8	CIP, ENO	
698 Enteritidis	2008	Orgãos matriz	0,5	2	≤ 0,015	≤ 0,015	4	8	ENO	
699 Enteritidis	2008	Suabe cama matriz	1	2	≤ 0,015	0,5	8	16	CIP, ENO	FLO
702 Enteritidis	2008	Orgãos matrizes	0,5	2	≤ 0,015	≤ 0,015	8	8	ENO	
707 Enteritidis	2008	Suabe cama frango	0,031	0,125	≤ 0,015	≤ 0,015	≥ 32	≥ 64	CLO, FLO	
710 Typhimurium	2008	Suabe cama frango	0,5	1	≤ 0,015	≤ 0,015	8	8	ENO	
670 Worthington	2009	Ração	0,015	0,125	≤ 0,015	≤ 0,015	≥ 32	≥ 64	CLO, FLO	
676 Typhimurium	2009	Ambiente	0,5	1	1	≥ 32	16	8	GEN	CLO
712 Enteritidis	2009	Suabe cama frango	0,25	1	≤ 0,015	≤ 0,015	8	8	ENO	
713 Typhimurium	2009	Suabe cama frango	0,5	2	1	2	4	4	ENO	
975 Schwarzengrund	2010	NI	2	4	≤ 0,015	0,031	4	4	CIP, ENO	
980 Schwarzengrund	2010	NI	2	4	≥ 32	≤ 0,015	8	16	CIP, ENO, CTF	FLO
983 Brandenburg	2010	NI	1	4	≤ 0,015	≤ 0,015	16	16	CIP, ENO	CLO, FLO

6.3 EXPERIMENTO 4

A determinação de perfil clonal por PFGE apresentou os padrões representados na figura 3.

Figura 3- Dendograma do perfil clonal das cepas de Salmonella submetidas aos testes de determinação de perfil de resistência antimicrobiana



6.4 EXPERIMENTO 5

A cepa 980 de *Salmonella* foi selecionada para análise de ancestralidade por ter apresentado espectro de resistência ao ceftiofur, o qual pertence ao grupo de antimicrobianos criticamente importantes para medicina humana e veterinária, as cefalosporinas.

Os resultados de ancestralidade da cepa de 980 do presente trabalho, pela técnica de MLST revelaram ST pertencente ao Complexo Clonal (CC) 33 do sorotipo S. Schwarzengrund. O resultado mostrou que dentre os STs mundialmente depositados no banco de dados oficiais, existe uma similaridade ancestral com o ST96 descrito na Europa, USA, Ásia e África (Quadro 7).

Quadro 8- Análise de ancestralidade de *Salmonella* Schwarzengrund, pertencente ao complexo clonal CC33, produtora de beta-lactamase de amplo espectro (ESBL) de enzima do tipo CTX-M-2

Cepas	Alelos						ST/CC	País	Ano	
	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA			
980	43	47	49	49	41	-	3	-/33	Brasil	2010
SARB57	43	47	49	49	41	15	3	96/33	Escócia*	1988
M69	43	47	49	49	41	15	3	96/33	Áfr.do Sul*	2001
M81	43	47	49	49	41	15	3	96/33	Áfr.do Sul*	2001
M217	43	47	49	49	41	15	3	96/33	USA*	2001
H2535	43	47	49	49	41	15	3	96/33	Taiwan*	2001
3222	43	47	49	49	41	15	3	96/33	Alemanha*	1985
S/20050	43	47	49	49	41	15	3	96/33	Escócia*	2005
414										
M2	43	47	49	49	41	15	3	96/33	USA*	2001
RM_435	43	47	49	49	41	15	3	96/33	USA*	2008
SARB57	43	47	49	49	41	15	3	96/33	UK*	1988
S/20042	43	47	49	49	41	15	3	96/33	Escócia*	2004
666										
H2500	43	47	49	49	41	15	3	96/33	Dinamarca*	2001
9836/08	43	47	49	49	41	15	3	96/33	Tunísia*	2008

ST: sequence type; CC: complexo clonal; Afr.: Africa; USA: Estados Unidos da América; UK: United Kingdon; -: sem resultado; * Dados de análise comparativa do site mlst.ucc.ie

Não houve resultado para o alelo *SucA*, pois o gene sequenciado não correspondeu ao descrito no site, apesar de o *primer* para este gene ter sido descrito pelo mesmo site oficial.

O resultado do sequenciamento dos alelos, exceto para o *SucA*, encontra-se no APÊNDICE B.

7 DISCUSSÃO

Durante as últimas décadas, há uma crescente preocupação mundial em saúde pública no que concerne ao surgimento de cepas resistentes aos antimicrobianos em bactérias patogênicas, incluindo a *Salmonella*. Os alimentos de origem animal, especialmente auqeles derivados de aves, são os principais veículos para a transmissão de *Salmonella* a humanos devido aos eventos de contaminação cruzada ou cocção inadequada de produtos derivados de aves (CAPITA et al., 2007). Considerando-se a alta prevalência de *Salmonella* em aves, nos últimos anos, foram implementados programas de controle em diversos países nas criações de *Gallus gallus*, incluindo-se matrizes, poedeiras e frangos de corte (EFSA, 2011).

O status dos produtos avícolas como principal veículo de transmissão de Salmonella deve-se, em parte, ao crescimento da indústria avícola dentro de uma visão econômica tipicamente de produção, com aumento do número de aves por espaço de criação. No contexto da produção avícola, a Salmonella é responsável por significativos prejuízos às exportações, sendo uma zoonose que tem importantes consequências para a saúde pública (OKAMURA et al., 2001).

Nesse sentido, pela importância que representam os antimicrobianos e os patógenos zoonóticos para saúde humana, o Comitê de Higiene de Alimentos do *Codex Alimentarius* discutiu em 2008 a adoção de um documento guia para o controle da contaminação de carne de frango por *Campylobacter* e *Salmonella* spp. Esse documento guia proposto, contemplou pontos críticos de controle (PCC) do processo de produção de frangos, nos quais poderiam ser implementadas medidas específicas de controle, baseadas em um processo de análise de risco (CAC, 2008).

Com relação à fase de produção de aves comerciais, o documento descreve que o uso responsável de antimicrobianos é uma ferramenta de extrema importância para garantir um alimento seguro aos consumidores, ou seja, o uso de antimicrobianos na prevenção, controle e tratamento de doenças de ocorrência comum na criação de aves comerciais, ajuda a garantir que o consumidor final tenha acesso a um alimento de boa qualidade, com menor risco de contaminação ou carga bacteriana e que, portanto, não ofereça risco de transmissão de doenças dos animais para os seres humanos, quando ingerido. Por outro lado, o uso dessas mesmas ferramentas de forma não responsável poderia oferecer, ainda que não

imediatamente, risco de pressão de seleção sobre bactérias frente aos agentes bacterianos mais comuns na produção avícola e consequente aumento no aparecimento de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos de eleição no tratamento de doenças de aves comerciais, os quais podem, em alguns casos, pertencer às mesmas classes dos antimicrobianos utilizados no tratamento de doenças em humanos.

Por todo quanto exposto, o presente trabalho foi realizado com base na pauta fundamentada pela OMS e OIE, a qual aborda resistência de microrganismos à antimicrobianos das classes cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, macrolídeos e quinolonas (incluindo-se as fluorquinolonas) criticamente importantes para medicina humana e veterinária, com foco em *Salmonella* spp. isoladas de aves e material avícola em diferentes épocas.

Partindo-se da avaliação de cem amostras de *Salmonella* sp pelo teste de discos de difusão, inicialmente foram identificadas 34 amostras com perfil de resistência ou resistência intermediária para um ou mais antimicrobianos criticamente importantes. Dentre as trinta e quatro amostras identificadas nos testes de discos de difusão, dezesseis amostras foram confirmadas resistentes pela metodologia de CIM. Deste modo, as trinta e quatro amostras selecionadas inicialmente foram analisadas quanto ao perfil clonal para maior poder discriminatório de resultados, juntamente à sorotipificação das mesmas.

As amostras de *Salmonella* isoladas nos anos 2008 a 2010 apresentaram, neste estudo, resistência no teste de disco difusão a pelo menos 1 antimicrobiano, dentre os vinte e um fármacos selecionados para a triagem. Quando testadas as amostras de *Salmonella* das recentes e antigas, frente aos antimicrobianos criticamente importantes (Tabela 2), notou-se clara diferença em resistência ou resistência intermediária entre estes grupos, sendo que as cepas de *Salmonella* antigas apresentaram resistência somente ao ceftiofur e as cepas rrecentes mostraram resistência a todos os antimicrobianos criticamente importantes.

São poucas as publicações mundiais com estudos temporais que abordam, especificamente, *Salmonella* de origem avícola e antimicrobianos; dentre elas, uma pesquisa realizada por Àlvares-Fernández et al. (2012) na Espanha, com amostras de *Salmonella* isoladas de aves, nos anos de 1993 e 2006. Este trabalho mostrou aumento de resistência dessa bactéria para a cefalotina, enrofloxacina e tetraciclina nas cepas do ano de 2006. Esses

dados estão de acordo com os resultados do presente trabalho, onde as cepas novas apresentaram maior percentual de resistência às quinolonas, dentre outros agentes testados. Outro dado temporal foi divulgado pelo sistema de monitoria de resistência a antimicrobianos em aves, nos Estados Unidos da América, para resistência de *Salmonella* isoladas de carne de aves. Esse estudo mostra que, nos anos de 2000 a 2011, não foram registradas amostras com resistência às quinolonas, enquanto que as amostras resistentes aos aminoglicosídeos diminuíram em percentagem (FDA, 2011). Tais dados estão em desacordo com os resultados apresentados nesta tese; porém, há que salientar que as bactérias isoladas de carne de aves dispostas para o consumo humano passam por diferentes tipos de estresses ambientais durante o processamento das aves para consumo, e estes poderiam alterar a expressão de genes de resistência nestas amostras (RANDALL, 2007). Por outro laso, as diferenças podem estar ligadas às diferentes cepas bacterianas analisadas neste trabalho e naquele dos Estados Unidos.

As amostras de *Salmonella* analisadas no presente estudo foram sorotipificadas e identificou-se 10 sorovares de *Salmonella*. Cabe salientar que a grafia correta da denominação completa do gênero é *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar "x", abreviando-se para *Salmonella* (em itálico), seguido do sorovar com primeira letra em caixa alta e sem itálico. Uma amostra foi categorizada somente para fórmula antigênica (O:6;7:eh:-), sabendo-se que ela pertence ao grupo antigênico C. Os 9 sorovares nomeados foram todos envolvidos em surtos alimentares , embora nem todos tenham sido ligados à carne de frango ou nos ovos. No Brasil, dados oficiais indicam que 42,5% dos surtos reportados têm a *Salmonella* spp como agente; além deste percentual, os trabalhos ainda indicam 4,2% de surtos com o sorovar *Salmonella* Enteritidis, totalizando-se 46,7% do geral de notificações para o gênero. Os alimentos mais envolvidos nos surtos foram ovos e produtos a base de ovos (SVS, 2009).

De acordo com o Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos da America, estão registrados surtos em humanos ligado a produtos avícolas para os sorovares *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, e Mbandaka. Ainda nas publicações do CDC, aparecem outros sorovares que estão envolvidos em surtos, porém encontrados em diferentes tipos de produtos relacionados como fonte como, por exemplo, a *Salmonella* Saintpaul em pepinos, a *Salmonella* Schwarzengrund em ração para cães, a *Salmonella* Worthington em mangas e a *Salmonella* Panama em melões (CDC, 2013). Na Itália, foram analisadas amostras de *Salmonella* Brandenburg relacionadas a surtos em humanos; porém não foi especificada a

fonte de infecção das mesmas (MAMMINA et al., 2011). Salmonella Havana também foi associada a surto em humanos envolvendo brotos de alfafa, conforme reportado nos Estados Unidos da América (BACKER et al., 2000).

A epidemiologia dos relatos de surtos indicam que a maioria das pessoas infectadas com *Salmonella* desenvolvem diarréia, febre e cólicas abdominais de 12 a 72 horas após a infecção. A doença geralmente dura 4 a 7 dias, e a maioria das pessoas se recupera sem tratamento. No entanto, em algumas pessoas (idosos, crianças e pessoas com comprometimento do sistema imune) a diarreia pode ser tão grave, que o paciente tem de ser hospitalizado. Nesses pacientes, a infecção por *Salmonella* pode atingir a corrente sanguínea e diferentes órgaos do corpo, podendo causar a morte se o paciente não for rapidamente tratado com antibióticos. De acordo com o CDC (2013), a antibioticoterapia de escolha para as infecções graves incluem fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração (antimicrobianos criticamente importantes) e ampicilina (para infecções suscetíveis). Para tal, é postulado que os testes de sensibilidade podem ajudar a orientar o tratamento adequado, dado o fato, comprovado nesta tese, de que a resistência aos antibióticos é cada vez maior entre algumas cepas/sorovares de *Salmonella*.

A respeito dos sorovares de *Salmonella* encontrados no presente trabalho, notou-se que para as amostras mais recentes a diversidade foi maior que para as amostras mais antigas (Tabela 3). Das amostras antigas, 100% foram identificadas como *Salmonella* Enteritidis, enquanto que para as novas, apenas 39% das amostras foram positivas para esse sorovar. A *Salmonella* Typhimurirum apareceu em segundo lugar entre as amostras novas com 17% de frequência; além de 9% para cada um dos sorovares *Salmonella* Brandenbugr e Schwarzengrund e 4% para cada um dos demais. Neste sentido, independente da variedade de fontes de isolamento, todas as amostras antigas são pertencentes a um único sorovar.

Quanto aos resultados acima citados, pode-se sugerir uma diminuição da circulação de *Salmonella* Enteritidis, a partir da liberação do uso de vacina contra este sorovar em matrizes (BRASIL, 2003c). Desse modo, com a diminuição de incidência do sorovar Enteritidis, outros sorovares puderam ocupar este nicho. Foi sugerido que, uma vez as matrizes vacinadas, os pintinhos de corte diminuíram positividade e, assim, também houve redução da circulação do sorovar no meio ambiente. Esta hipótese é apoiada por trabalhos recentes, a exemplo do estudo realizado em 2009 e 2010 (VOSS-RECH et al., 2011) no qual foram analisados amostras isoladas de aviários de frangos de corte para a presença de *Salmonella* e o sorovar

Enteritidis não foi detectado. Os autores concluíram que o declínio deste sorovar foi consequência do uso de vacinação em matrizes, assim possibilitando a emergência de outros sorovares. Outro estudo, que avaliou 2.323 suabes de arrasto em matrizes de corte, no período de 2006 a 2010, mostra que a *Salmonella* Enteritidis não foi identificada nos anos de 2009 e 2010 e que a *Salmonella* Typhimurium não foi identificada no ano de 2010, sendo o isolamento da *Salmonella* Hadar (34%) mais prevalente naquele ano (CARDOSO et al., 2013). Essa dinâmica populacional em *Salmonella* já foi considerada em outra situação, quando da erradicação do sorovar *Salmonella* Gallinarum, agente do tifo em aves e altamente patogênica para as mesmas, e a subsequente emergência do sorovar *Salmonella* Enteritidis nas populações de aves comerciais (SILVA;DUARTE, 2002; FOLEY et al., 2011).

Novamente abordando a resistência antimicrobiana das amostras de *Salmonella* analisadas, notou-se que não houve concordância entre os resultados dos testes de disco difusão e a concentração inibitória mínima (CIM) (Tabelas 3 e 4). Através dos resultados apresentados pode-se avaliar que, principalmente para os resultados de resistência intermediária nos testes de disco difusão, obteve-se perfil de resistência nos testes de CIM. Salienta-se que para o teste de CIM, as dezesseis cepas que apresentaram algum perfil de resistência, apresentaram-no para os antimicrobianos criticamente importantes. Quanto ao fato de os resultados serem discrepantes nos dois testes, voltando à literatura, encontram-se estudos que abordam este assunto.

Watson et al. (1991) analisaram os pontos de corte para os dois testes, em diferentes bactérias de origem veterinária. Os autores chegaram à conclusão que um único ponto de corte não parece válido para determinar a resistência aos microrganismos que são testados em um laboratório de diagnóstico veterinário. Sugeriram os autores, que um painel com uma gama selecionada de diluições de todos os microrganismos, ou painéis para bactérias Gram negativas e Gram positivas, aumentaria o número de resultados positivos para o teste CIM e, deste modo, os resultados poderiam ser mais aproximados aos dos testes de disco difusão. No entanto, o maior problema na criação destes painéis são os custos adicionados ao trabalho. Citam, ainda, que talvez painéis CIM modificados, que pudessem ser utilizados em um grupo mais amplo de microrganismos seria preferível e, asssim, os resultados positivos questionáveis seriam menores. Foi, ainda, sugerido que a concordância entre os testes seria maior se fossem agregadas as cepas intermadiárias às cepas resistentes.

Ainda a respeito destes dois testes, Poutanen e Low (2003), trabalhando com amostras clinicas de *Salmoenlla* em humanos, salientaram que a resistência às fluoroquinolonas em *Salmonella* spp. está aumentando no mundo inteiro; dessa forma, a tendência é que este aumento continue a ocorrer sem ser notado, a menos que mudanças nos atuais pontos de corte para CIM sejam realizadas e critérios de interpretação para zonas de difusão em disco quanto à sensibilidade para fluoroquinolonas também sejam delineadas. Sugerem que testes de CIM para ciprofloxacina ou testes de sensibilidade ao ácido nalidíxico deveriam ser realizados em todas as amostras de *Salmonella* isoladas de pacientes em que a terapia com fluoroquinolona tenha falhado. Sugerem, ainda, que os isolados com CIMs ≥ 0.125 μg/mL de ciprofloxacina ou resistentes ao ácido nalidíxico, devam ser considerados como representando suscetibilidade reduzida às fluoroquinolonas.

A técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) foi descrita pela primeira vez em 1984, como uma ferramenta para exame de DNA cromossomal de organismos eucarióticos. Subsequentemente, a técnica foi comprovada como altamente eficiente para tipagem molecular de diferentes espécies bacterianas, ou perfil de clones. A técnica gera de 10 a 30 fragmentos de restrição, com tamanho de 10 a 800kb, através da preparação do DNA com o uso de enzimas de restrição (TENOVER et al., 1997). Tenover et al. (1995) publicaram critérios de interpretação de resultados de PFGE, em um esforço para tornar homogêneo o uso desta técnica para fins epidemiológicos. Assim, se existe uma relação epidemiológica entre bactérias idênticas, provavelmente trata-se de um surto. Por outro lado, bactérias de mesma espécie e mesmo genótipo, isoladas de pacientes que não possuem uma ligação epidemiológica detectável, podem representar linhagens epidêmicas. Os mesmos pesquisadores assumiram que bactérias não relacionadas epidemiologicamente devem possuir genótipos diferentes. Para Magalhães et al. (2005), alguns fatores podem interferir na PFGE, como composição e concentração da agarose, solução tamponante, tensão da corrente elétrica (voltagem), tempo de pulso e de corrida eletroforética dentre outros fatores, sendo que a escolha da enzima de uso deve ter sido previamente estudada.

As amostras de *Salmonella* Enteritidis analisadas apresentaram quatro padrões clonais na técnica de PFGE, sendo que as cepas antigas pertenciam todas ao clone dominante. As amostras novas apresentaram-se nos quatro perfis clonais, inclusive no perfil em que as amostras antigas compuseram. Isolados de *Salmonella* Enteritidis normalmente apresentam homogeneidade genética evidenciada por um clone prevalente, sendo tal fato foi demonstrado

no presente trabalho, assim como por outros pesquisadores (BAKERI et al., 2003; VALDEZATE et al., 2007, VAZ et al., 2010). Foram observadas cepas sensíveis e resistentes aos antimicrobianos no padrão do clone predominante de *Salmonella* Enteritidis. Tais diferenças de susceptibilidade antimicrobiana são possíveis para um mesmo clone, podendo estar associadas a alterações genéticas recentes, como, por exemplo, a aquisição de plasmídeo, porém que foram insuficientes para alterar o perfil de PFGE. A associação de perfil de PFGE com o perfil de resistência a antimicrobianos é difícil de ser determinada devido à complexidade das rotas de circulação das cepas, diferentes tipos de pressão sofrida pelas bactérias no animal e ambiente de criação das aves e mudanças temporais na ocorrência de resistência aos antibióticos (PHILLIPS et al., 2004).

As Salmonella do sorovar Typhimurium isoladas de diferentes fontes são mais estreitamente relacionadas do que Salmonella de outros sorovares. A estreita relação genética das variantes do sorovar Typhimurium sugere que relativamente poucas mudanças genéticas possam ser responsabilizadas pelas adaptações aparentes nos diferentes reservatórios e hospedeiros. Um mecanismo possível através da qual estas variantes possam ter surgido é a transferência de fatores de virulência mediada por fagos, dado que os genes de virulência já foram identificados nos genomas de vários dos seus profagos (RABSH et al., 2002). Para este sorovar no presente estudo, observaram-se 2 padrões clonais em 4 amostras o que, de acordo com a literatura citada, parece ter importância. De fato, os diferentes padrões observados podem indicar ocorrência de mudanças genéticas em termos de virulência para estas amostras. Para melhor acossar tal hipótese, far-se-ia necessário o uso da técnica de fagotipagem, recomendada a ser utilizada em conjunto a outra técnica (como PFGE) em função de apresentar um melhor poder discriminatório das cepas (RABSH et al., 2002).

Notou-se que o sorovar Typhimurium apresentou resistência no teste de disco difusão para um número maior de antimicrobianos que os outros sorovares; no teste de CIM, apenas a amostra isolada de meio ambiente não apresentou alguma resistência aos antimicrobianos criticamente importantes. De acordo com Stefani et al. (2013), amostras de origem avícola foram estudadas no estado do Paraná. O sorovar *Salmonella* Typhimurium representou 11% dos isolados e estes apresentaram resistência no teste de difusão em disco para os antimicrobianos ceftiofur, gentamicina e enrofloxacina. O teste de CIM realizado nestas mesmas cepas demonstrou resistência em 27% das amostras para o ceftiofur, 54,5% para gentamicina e 18% para enrofloxacina. Os dados destes autores corroboram com os perfis

encontrados no presente trabalho, tanto para percentual de isolamento e como para o perfil de resistência. Em outro estudo realizado no Paraná (BIFFI et al., 2011), de 28 amostras de *Salmonella* de origem avícola, foram identificadas 2 cepas de *Salmonella* Typhimurium que apresentaram resistência em disco difusão para os antimicrobianos norfloxacina e fosfomicina, sendo este um perfil diferente do encontrado no presente estudo.

Os sorovares de *Salmonella* Mbandaka, Worthington e Schwarzenground identificados na presente tese têm sido isolados no Brasil, a partir de amostras de soja e farelo de soja utilizados para fabricação de rações de aves. A incidência na soja foi de 50% de positividade para Mbandaka, 5,3% para Worthington e 2,6% para Schwarzenground; já para os percentuais de incidência em farelo de soja foram respectivamente 11% para Mbandaka e 4% para Schwarzenground (BACK, 2013). Ainda têm sido identificados estes sorovares em amostras de suabes em poedeiras comerciais e suabes de arrasto em frangos de corte (RODRIGUES, 2003; ANDREATI-FILHO et al., 2009).

As amostras sorotipificadas como Schwarzenground apresentaram-se de um mesmo clone, porém apresentaram diferença de perfil quando do teste de CIM (Tabela 4). Este sorovar tem sido relatado como bastante variável quanto à linhagem genética, como demonstrado por Aarestrup et al. (2007) que, ao analisarem 581 amostras de *Salmonella* Schwarzenground de diferentes países, encontraram 183 padrões clonais por PFGE e resistência em diferentes níveis ao ácido nalidíxico e ciprofloxacina. Tais dados de resistência estão de acordo com os encontrados no presente estudo.

Finalizando, a amostra sorotificada como Worthington apresentou o mesmo perfil clonal do sorovar Mbandaka. Ambas cepas foram isoladas de amostras de ração e somente a amostra de *Salmonella* Worthington obteve perfil de resistência no teste de MIC, este para cloranfenicol e florfenicol. Vaz et al. (2009) citam que são encontradas amostras de *Salmonella* com perfil de resistência aos fenicóís e sulfas, porém esta ocorrência está diminuindo desde a restrição destes antimicrobianos para uso como promotores de crescimento em aves.

O resultado em PFGE apresentado neste estudo para as *Salmonella* Worthington e Mbandaka como sendo de um mesmo clone não era esperado; tratam-se de grupos antigênicos e sorovares distintos. Como anteriormente descrito, a técnica de PFGE tem, dentre seus passos para diferenciação de clones, o uso de enzimas de restrição que fragmentam o DNA das bactérias analisadas. Para o gênero *Salmonella* a enzima Xbal tem sido a mais utilizada, porém para os dois sorovares em questão, esta enzima não fragmentou o DNA em número e

locais suficientes para a diferenciação dos clones. Ramos (2012) cita que a técnica de PFGE é considerada um método de tipagem molecular "padrão ouro"; porém, se variação genética da bactéria não afetar significativamente o tamanho ou a mobilidade de um fragmento específico de restrição durante a eletroforese, então a mudança pode não ser identificada em separado, ou seja o clone pode não ser diferenciado.O autor sugere que esta limitação possa ser superada pelo uso de, pelo menos, uma segunda enzima, ou ainda, um painel de diferentes enzimas de restrição para maior poder discriminatório entre as amostras.

A escolha da cepa 980 sorotipificada como *Salmonella* Schwarzengrund para análise de ancestralidade foi feita em função da apresentação no teste de CIM de um perfil de resistência ao ceftiofur, uma cefalosporina de terceira geração e, portanto, considerada pela FAO, OMS e OIE como cepas de enterobactérias produtoras de betalactamses relevantes à saúde publica.

A produção de betalactamases constitui o principal mecanismo associado à resistência aos antibióticos betalactâmicos: penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens. Estas enzimas são capazes de "destruir" uma ou várias partes da molécula do antibiótico, impedindo sua ação antibacteriana. Até o momento, mais de 430 ESBL foram caracterizadas, havendo descrição de muitas delas no Brasil. Em relação à família *Enterobacteriaceae*, o isolamento de ESBL foi descrito em diversos patógenos de origem hospitalar e comunitária, incuíndo-se aqui a *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus mirabilis* e *Serratia marcescensi* (SILVA; LINCOPAN, 2012).

A possibilidade de um novo ST pertencente ao Complexo Clonal 33 do sorotipo *S*. Schwarzengrund foi revelado, no presente trabalho, para a cepa *Salmonella* analisada . Dentre os STs mundialmente depositados, existe uma similaridade ancestral desta cepa com o ST96 descrito na Europa, USA, Ásia e África; porém, nenhuma das cepas depositas foi produtora de ESBL, o que sugere que a aquisição do gene de resistência deste clone tenha ocorrido no Brasil, como sugerido pela análise de PFGE realizada para os sorovares *S*. Schwarzengrund e Hadar por Silva e colegas (2013).

Cabe salientar que deve-se ter cautela, neste trabalho, com uma conclusão efetiva a respeito da possibilidade de termos encontrado um novo ST, devido ao fato de que um dos *primers* recomendados pelo site oficial da técnica do MLST, o *SucA*, não ter sido, aparentemente, desenhado de forma correta no site. Apesar deste fato, quer-nos parecer tenhamos evidências seguras e fortes para sugerir que tenhamos encontrado, realmente, um clone diferente de bactérias que adquiriu o gene de resistência no Brasil.

Conhecendo-se o problema das doenças transmitidas por alimentos e sabendo-se da presença de patógenos produtores de ESBL em animais produtores de alimentos, quer-nos parecer que o encontro desta cepa bacteriana resistente é preocupante; de fato, há risco de ocorrência de infecções em humanos e em animais que teriam alternativas terapêuticas limitadas e, também, pela possibilidade nada remota de que o intestino dos seres humanos e dos animais de produção venham a servir de reservatório para genes de resistência. Finalmente, e não menos importante, há possibilidade de transferência horizontal dos mecanismos de resistência desta bactéria presente na microbiota residente a outros patógenos.

8 CONCLUSÕES

8.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- O teste de disco difusão possibilitou selecionar trinta e quatro, dentre as cem amostras de *Salmoenella* estudadas, com perfil de resistência ou resistência intermediária aos antimicrobianos criticamente importantes em medicina humana e veterinária.
- Dezesseis amostras de Salmonella foram identificadas como resistente a pelo menos um antimicrobiano no teste de determinação de concentração inibitória mínima para os antimicrobianos ciprofloxacina, enrofloxacina, ceftiofur, gentamicina, cloranfenicol e florfenicol.
- Dez sorovares de *Salmonella* foram identificados na sorotipificação das amostras analisadas, sendo prevalente o sorovar Enteritidis (59%), seguido de Typhimurium (11,8%), Schwarzenground (5,9%). Brandenburg (5,9%) e 2,9% de incidência para os sorovares Mbandaka, Saintpaul, Havana, Panama, Worthington e O:6,7:eh:-.
- Foram detectados quatorze perfis clonais na técnica de PFGE, com relevância para 2 clones entre 4 cepas do sorovar Typhimurium e 4 clones para o sorovar Enteritidis, dentre os quais as amostras antigas pertenceram a um único clone.
- A metodologia utilizada na técnica de PFGE não proporcionou diferença entre as amostras dos sorovares Mbandaka e Worthington.
- A análise de ancestralidade da cepa 980 de *S*. Schwarzengrund revelou a possibilidade de um novo ST pertencente ao Complexo Clonal 33, sendo esta cepa produtora de ESBL, sugerindo que a aquisição do gene de resistência deste clone ocorreu no Brasil.

8.2 CONCLUSÃO GERAL

Houve mudança no perfil de resistência a antimicrobianos criticamente importantes em medicina humana e veterinária quando analisadas diferentes épocas de isolamento de *Salmonella* a partir de aves e material avícola. As amostras antigas apresentaram resistência intermediária a somente um antimicrobiano, diferentemente das amostras novas, que apresentaram perfil de resistência aos seis antimicrobianos criticamente importantes testados.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados, acima, sugerem que existam pontos a serem avaliados com relação ao uso de antimicrobianos em aves de produção e o desenvolvimento de resistência adquirida aos antimicrobianos criticamente importantes, com possível impacto à questão da segurança alimentar e eventual aparecimento e tratamento de doenças em humanos, ainda que este não seja o único ponto crítico a ser considerado no cenário atual. De fato, outras informações referentes ao uso de antimicrobianos em humanos, como automedicação, sub-medicação ou sobremedicação devem ser sempre considerados como fatores importantes no aparecimento de resistência aos antimicrobianos em humanos.

Com relação às doenças entéricas transmitidas por alimentos de origem animal, faz-se necessária a criação, no Brasil, de um banco de dados fidedigno que possa correlacionar, adequadamente, todos os elos envolvidos em uma eventual ocorrência.

Ainda, vale sempre a pena lembrar que a adoção de quaisquer medidas de manejo de risco devam ser, sempre que possível, pautadas em resultados obtidos a partir de processo de análise de risco, o qual deve envolver todos os elos da cadeia de produção de proteína animal, bem como os organismos de referência em saúde pública.

Nesse sentido, como um dos elos da cadeia de produção, os médicos veterinários são um dos pontos-chave no controle da disseminação da resistência antimicrobiana e, para isso, a adoção das ferramentas adequadas de manejo. Dentre elas, o uso dos antimicrobianos na prevenção, controle e tratamento de doenças, deve ser sempre feito de forma responsável e prudente para garantir um alimento seguro para o consumidor e, principalmente, a continuidade do uso dessa relevante ferramenta como alternativa para o setor de produção de alimentos de origem animal.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M.; HENDRIKSEN, R. S.; LOCKETT, J.; GAY, K.; TEATES, K.; MCDERMOTT, P. F.; International spread of multidrug-resistant *Salmonella* Schwarzengrund in food products. **Emerg Infect Dis.** 2007. Disponível em: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/5/06-1489.htm Acesso em: 12 jul.2013.

ABBASSI-GHOZZI, I.; JAOUANI, A.; HAMMAMI, S.; MARTINEZ-URTAZA, J.; BOUDABOUS, A.; GTARI, M. Molecular analysis and antimicrobial resistance of Salmonella isolates recovered from raw meat marketed in the area of "Grand Tunis", Tunisia. **Pathologie Biologie**, Paris. 2011.

ABIEC. Estatística Mercado Mundial Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes ABIEC. Disponível em: http://www.abiec.com.br> Acesso em: 20 set.2011.

ABIPECS. Relatório Anual 2010/2011 Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Disponível em: <www.abipecs.com.br> Acesso em: 20 set.2011.

ACHTMAN, M.; WAIN,J.; WEILL,F.-X.; NAIR,S.; ZHOU,Z.; SANGAL,V.; KRAULAND, M. G.; HALE, J. L.; HARBOTTLE, H.; UEBECK,A.; DOUGAN,J.; HARRISON, L.H.; BRISSE, S. *S. enterica* MLST Study Group. <u>Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in Salmonella enterica</u>. *PLoS Pathogens*. 8, e1002776, 2012.

AKTAS, Z.; MARTIN, D.; KAYACAN, C. B.; DIREN, S.; THRELFALL, E. J. Molecular characterization of Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis by plasmid analysis and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 541-545. 2007.

ALBUQUERQUE, R. Antimicrobianos como promotores do crescimento. In: PALERMONETO, J; SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L. Farmacologia aplicada à avicultura. São Paulo. Roca, 2005. P. 149-159.

ÁLVARES-FERNÁNDEZ, E.; ALONSO-CALLEJA, C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, C.; CAPITA, R. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006. **International Journal of Food Microbiology**, 153, p. 281–287, 2012.

AMERICAN ACADEMY OF MICROBIOLOGY. Antibiotic resistance: an ecological perspective on an old problem. A report of the American Academy of Microbiology, 2008.

ANDREATTI -FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; MECONI, A.; ROCHA, T. S.; GONÇALVES, G. A. M. Pesquisa de *Salmoenlla* em suabes de arrasto de granjas avícolas. **Vet e Zootec.** v. 16, n. 1, p. 190-194, 2009.

BACK, A. Monitoria para salmoneloses aviárias. Funciona? **Anais da Conferência Apinco.** FACTA Campinas 2013.

BACKER, H. D.; MOHLE-BOETANI, J. C.; WERNER, S. B.; ABBOTT, S. L.; FARRAR, J.; VUGIA, D.J. High incidence of extra-intestinal infections in a Salmonella Havana outbreak associated with alfalfa sprouts. **Public Health Rep.** v. 115, n. 4, p.339-345, 2000.

BAKERI, S. A.; YASIN, R. M.; PUTHUCHEARY, S. D.; THONG, K. L. Genetic diversity of human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Malaysia. **J. Appl. Microbiol**. n. 95, p.773–780, 2003.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. v. 45, p. 493-496, 1996.

BBC BRASIL. Cientista busca bactérias em cavernas para produzir novos antibióticos. 2012. Disponível em:

http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2012/09/120910 cavernas antibioticos cc.shtml Acesso em: 12 jul. 2013.

BEHRINGER, M.; MILLER, W.; OYARZABAL, O. A. Typing of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. **Journal of Microbiological Methods,** Amsterdam, n. 84, p. 194-201, 2011.

BELKUM, V. A.; TASSIOS, P.T.; DIJKSHOORN, L. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, Wiesbaden, n. 13, p.1–46, 2007.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O.C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das Aves**. 2.ed. Campinas, São Paulo: Facta, 2009. p.435-456.

BETANCOR, L.; SCHELOTTO, F.; MARTINEZ, A.; PEREIRA, M.; ALGORTA, G.; RODRÍGUES, M. A.; VOGNOLI, R.; CHABALGOITY, J. A. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 3, p.1155-1162, 2004.

BIFFI, C. P.; STEFANI, L. M.; MATTIELLO, C. A.; FERREIRA, P. S. 2011. Diferentes níveis de resistência antimicrobiana em cepas de Salmonellas de origem avícola. Disponível em: http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/354.pdf Acesso em: 12 jul. 2013.

BORSOI, A.; MORAES, H. S.; SALLE, C. T. P. S. Excreção de Salmonella Enteritidis e Heidelberg inoculadas em pintos de corte e avaliadas por suabes de cloaca. **Revista Brasileira de Ciências Avícolas**, v. 10, p. 232, 2008.

BORSOI, A.; MORAES, H. S.; SALLE, C.T. P.S. Protocolo para contagem de Salmonella a partir de suabes de cloaca. **Revista Brasileira de Ciências Avícolas**, v.10, p.233. 2008.

BORSOI, A.; SANTIN, E.; DINIZ, G. S.; NASCIMENTO, V. P. Excreção de *Salmonella* Eneritidis e Heidelberg inoculadas em pintos de corte e avaliada por suabe de cloaca, **Revista Brasileira de Ciências Avícolas**, v.10, p. 232, 2011.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF**. Janeiro. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento , Ofício nº 085/2011/DFIP , Secretaria de Defesa Agropecuária, 10 maio 2011a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ofício nº 097/2011/DFIP Secretaria de Defesa Agropecuária, 13 maio 2011b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Portaria n°808, Secretaria de Defesa Agropecuária, 06 nov. 2003b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Portaria nº40, Secretaria de Defesa Agropecuária, 08 jan. 2006a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Portaria nº428, Secretaria de Defesa Agropecuária, 10 dez. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Instrução Normativa nº11, Secretaria de Defesa Agropecuária, 24 nov. 2004b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Instrução Normativa nº35, Secretaria de Defesa Agropecuária, 14 nov. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Instrução Normativa nº14, Secretaria de Defesa Agropecuária, 17 maio 2012a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Instrução Normativa nº9, Secretaria de Defesa Agropecuária, 27 jun. 2003a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Decreto-Lei nº467, 13 fev. 1969.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Lei n°12.689, 19 jul. 2012b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Lei nº6.198, 26 dez. 1974.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Decreto n°5.053, 22 abr. 2004a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Decreto nº6.296, 11 dez. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Instrução Normativa nº13, Secretaria de Defesa Agropecuária, 30 nov. 2004c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Instrução Normativa nº26, Secretaria de Defesa Agropecuária, 09 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Instrução Normativa nº65, Secretaria de Defesa Agropecuária, 21nov. 2006b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Instrução Normativa nº42, Secretaria de Defesa Agropecuária, 20 dez. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Instrução Normativa nº 78, Secretaria de Defesa Agropecuária, 05 nov. 2003c.

BRASIL. Ministério das Relações Exteriores. Contencioso, 2010. Disponível em: www.itamaraty.gov.br Acesso em: 12 jul. 2013.

BRASIL. SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <<u>www.saude.gov.br</u>> Acesso em: 12 jul. 2013.

BRASIL. SVS. Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimento no Brasil. Disponível em: <www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf> Acesso em: 12 jul. 2013.

CAPITA, R., ALONSO-CALLEJA, C., PRIETO, M. Prevalence of *Salmonella* enterica serovars and genovars from chicken carcasses from slaughterhouses in Spain. **Journal of Applied Microbiology** 103, 1366–1375, 2007.

CARDOSO, A.L.S.P; KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G.F.Z. CASTRO, A.G.M.; LUCIANO, R.L.; TESSARI, E.N.C.. Sorovares de *Salmonella* spp. isolados através de suabes de arrasto provenientes de aves reprodutoras comerciais durante o período de 2006 a 2010. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano XI – Número 20 – Janeiro, 2013.

CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, 2011. Disponível em: www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveilOverview_508.pdf Acesso em: 30 jul. 2012.

CDC. Report of selected *Salmonella* outbreak Investigation. Disponível em: http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html Acesso em: 12 jul. 2013.

CHAIN, E.; FLOREY, H.; GARDNER, A.; HEATLEY, N.; JENNINGS, M.; ORR-EWING, J.; SANDERS, A. Penicillin as a chemotherapeutic agent. **Lancet**. v. 2, p.226-228, 1940.

CHEN, M. H.; HWANG, W. Z.; WANG, S. W.; SHIH, Y. C.; TSEN, H. Y. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis for Multidrug Resistant Salmonella enterica Serovar Schwarzengrund Isolates Collected in Six Years (2000-2005) Retail Chicken Meat in Taiwan. **Food Microbiology**, Londres, v. 28, n. 3, p. 399-405, 2011.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grew aerobically. Approved Standard M7-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.

CORNAGLIA G, MAZZARIO A, LAURETTI L, ROSSOLINI GM, FONTANA R. Hospital outbreak of carbapenêmico-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. **Clin Infect Dis**. v31(5):1119-25, 2000.

EBERLE, K. N.; KIESS, A. S. Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, p. 255-264, 2012.

EFSA, 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2009. **EFSA Journal** 9 (3), 2090–2477 Disponível em: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2090.pdf Acesso em: 12 jul. 2013.EMBRAPA CNPSA, 2001. (Palestra).

EUROPA.EU. Disponível em:

FAKHR, M. K.; NOLAN, L. K.; LOGUE, C. M. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* Serovar typhimurium **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 2215–2219, 2005.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Interim Report**. World Agriculture Towards 2030/2050. Rome, 2006.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. More People Than Ever are Victims of Hunger. Disponível em: www.fao.org Acesso em: 13 abr. 2013.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Mandate.** Disponível em: www.fao.org/about/eng> Acesso em: 13 abr. 2013.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. *Codex Alimentarius*. Food Safety Risk Analysis – A guide for national food safety authorities, Roma: FAO, 2006. Disponível em: <www.codexalimentarius.gov> Acesso em: 20 set. 2011a.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. *Codex Alimentarius*. Report of the Fourth Session of the *Codex AdHoc* Intergovernmental Task Force on Antimicrobial Resistance, Genebra, Suiça: FAO, 2011. Disponível em: www.codexalimentarius.gov> Acesso em: 20 set. 2011b.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. *Codex Alimentarius*. Procedural Manual, 21st Edition, Roma: FAO, 2013. Disponível em: <<u>www.codexalimentarius.gov</u>> Acesso em: 12 jul. 2013c.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. *Codex Alimentarius*. Food Hygiene, CX/FH 08/40/6 "Proposed Draft Guidelines for Control of *Campylobacter* and *Salmonella* spp in Chicken meat at Step 3", 40th, 2008. Disponível em: www.codexalimentarius.gov Acesso em: 20 set. 2011c.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. *Codex Alimentarius*. Code of Practice to Minimize and Contain Antimicrobial Resistance. CAC/RCP61, 2005. Disponível em: www.codexalimentarius.gov Acesso em: 13 abr. 2013d.

FDA. Federal Register. *Rules and regulations. Antibiotic sensitivity discs.* **Federal Registration**. 37:20525-20529 Erratum, 38:2756, 1973.

FDA. NARMS Retail meat report. 2011. Disponível em: http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/ucm334828.htm Acesso em: 12 jul. 2013.

FERREIRA, A. J. P.; ITO, N. M. K.; BENEZ, S. M.; Infecção natural e experimental por *Salmonella enteritidis* em pintos. In: **Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**; Campinas, São Paulo. Brasil. p. 171, 1990.

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: **Microbiologia.** Trabulsi, L.R. & Alterthum. São Paulo, Atheneu, p.329-338, 2008.

FOLEY et al., Rapid Mutation of Endogenous Zebrafish Genes Using Zinc Finger Nucleases Made by Oligomerized Pool Engineering (OPEN), **PLOS ONE**, Volume 4, Issue 2, e4348, Fev 2009.

FOLEY, STEVEN L., RAJESH NAYAK, IRENE B. HANNING, TIMOTHY J. JOHNSON, JING HAN AND STEVEN C. RICKE. Population Dynamics of Salmonella enterica Serotypes in Commercial and Egg Poultry Production **Appl. Environ. Microbiol.** 77(13):4273, 2011.

FOXMAN, B.; ZHANG, L.; KOOPMAN, J.S.; MANNING, S.D.; MARRS, C.F. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. **Epidemiologic Perspectives & Innovations**, v.2, n.10, 2005.

GIBB A.P., TRIBUDDHARAT C., MOORE RA., LOUIE T.J., KRULICKI W., LIVERMORE D.M., et al. Nosocomial outbreak of carbapenêmico-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla(IMP) allele, bla(IMP-7). **Antimicrob Agents Chemother**;46(1):255-8, 2002.

GILPIN, R.; **Global Political Economy** – Understanding the International Economic Order, Princeton University Press, Reino Unido, 2001.

GUIMARÃES, A.R. Resistência aos antimicrobianos, diversidade e relação epidemiológica de bactérias do gênero Salmonella spp. isoladas na granja de terminação e abate de suínos. 56 f. **Disertação (Mestrado em medicina veterinária)** — Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

HACHLER, H., BODROSSY, L.. MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence humans and animals. Ames: Iowa State University Press. p.3-18, 2007.

- HUNTER, P. R. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, v. 28, p. 1903-1906, 1990.
- HUNTER, P.; GASTON, M. Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, v. 26, p. 2465-2466, 1988.
- HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: A review. **Food Research International**, Barking, v. 45, p. 819–830, 2012.
- HURST, S. F.; KIDD, S. E.; MORRISSEY, C. O.; SNELDERS, E.; MELCHERS, W. J. G.; CASTELLI, M. V.; MELLADO, E.; SIMMON, K.; PETTI, C. A.; RICHARDSON, S.; ZHANG, S.; ROMANELLI, A. M.; WICKES, B. L., DE VALK, H. A.; KLAASSEN, C. H. W.; BALAJEE, S. A. Interlaboratory reproducibility of a single-locus sequence-based method for strain typing of Aspergillus fumigatus **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, v. 47, p. 1562–1564, 2009.
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010> Acesso em: 12 jul.2013.

JOINT FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials, **Report of the FAO/WHO/OIE expert meeting**, Roma, Itália, 2007.

KOTETISHVILI, M; COLIN STINE,O; KREGER, A; GLENN MORRIS JR, J; SULAKVELIDZE, A Multilocus Sequence Typing for Characterization of Clinical and Environmental *Salmonella* Strains, **J. Clin. Microbiol**. vol. 40 no. 5 1626-1635. L.R. & Alterthum. São Paulo, Atheneu, 2008. p.329-338, May 2002.

LACONCHA, I.; LÓPEZ-MOLINA, N.; REMENTERIA, A.; AUDICANA, A.; PERALES, I.; GARAIZAR, J. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p. 27-34, 1998.

LE MINOR, L; BOCKEMUHL, J. Au schéma de Kauffmann - White. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, nº 136 B, p.57-61, Supplementum 28, 1985.

- LIM, H.; LEE, K. H.; HONG, C. H.; BAHK, G. J.; CHOI, W. S. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of Salmonella sp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, p. 411 418, 2005.
- LIU, S.; SANDERSON, K.E. A physical map of the Salmonella Typhimurium LT2 genome Made by using XbaI analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 5, p. 1662-1672, 1992.

LIU, W.; ZHU, X. N.; YU, S.; SHI, X. M. Diversity of Salmonella isolates using serotyping and multilocus sequence typing, **Food Microbiology**, Londres, v. 28, n. 6, p. 1182-1189, 2011.

LOVE, D.C.; DAVIS, M.F.; BASSETT, A.; GUNTHER, A., NACHMAN, K.E. Dose Imprecision and Resistance: Free-Choice Medicated Feed in Industrial Food in Animal Production in the United States. **Environ Health Perspect** 119:279-283, 2011.

MAGALHÃES V., LINS A.K., MAGALHÃES M. Metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**; 36(2): 123-125, 2005.

MAGALHÃES, V.D.; FERREIRA, J.C.; BARRELI, C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia- uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.64, n.2, p. 155-161. 2005.

MAJTANOVA, L.; MAJTAN, J.; MAJTAN, V. Trends in phage types of Salmonella enterica serovars Enteritidis and Typhimurium isolated in Slovakia from 1995 to 2009. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Nova Iorque, v. 69, n. 4, p. 454–456, 2011.

MAMMINA, C.; A. ALEO, G. ROMANELLI, P. MARCONI, A.M. DI.NOTO, R. DONATO, A. NASTASI. A foodborne outbreak of Salmonella enterica serotype Brandenburg as a hint to compare human, animal and food isolates identified in the years 2005-2009 in Italy. **J prev med hyg**; 52: 9-11, 2011.

MCDONOUGH, P.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. DNA Sequence-Based Subtyping and evolutionary analysis of selected Salmonella enterica serotypes. **J Clin Microbiol.**, v.43(8):3688-98. Ago, 2005.

MLST, 2005. Disponível em: http://mlst.ucc.ie /mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica html> WebCite Acesso em: 29 maio 2013.

MÜRMANN, L.; SANTOS, M. C.; LONGARAY, S. M.; BOTH, J. M. C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of Salmonella isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 529-534, 2008.

OIE . INTERNATIONAL ORGANIZATION OF ANIMAL HEALTH. Global Conference on the Responsible and Prudent Use of Antimicrobial Agents for Animals, Book of Abstracts, France, 2013.

OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. **Avian Diseases**, Atlanta, v. 45, n. 1, p. 61-69, 2001.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, v. 37, p. 1661–1669, 1999.

OLSEN, J. E.; BROWN, D. J.; SKOV, M. N.; CHRISTENSEN, J. P. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis applications in investigations of salmonellosis among livestock. **Veterinary Quarterly**, Holanda, v. 15, n. 4, p. 125-135, 1993.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÙDE. Global principles for the containt of animicrobial resistance in animals intended for food. WHO/CDS/CSR/DRS 4:1-21, 2004.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÙDE. Ericson, H.M. And J.C. Sherris. *Antibiotic sensivity testing. Report and an international collaborative study.* **Acta Pathol. Microbiol**, Scand. Sec. B.Supply.217:1-90, 1971.

PALERMO-NETO, J; TITZE, R.A. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA, H.S., GÓRNIAK, S.L., BERNARDI, M.M. In:**Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4ª Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 641-658, 2006.

PALERMO-NETO, J. Considerações Gerais sobre o uso de agentes que alteram a produção animal. In. SPINOSA, H.S., GÓRNIAK, S.L., BERNARDI, M.M.In: **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária.** 4ª Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 587-595, 2006.

PALERMO-NETO, J.; TITZE, R. Uso de Antimicrobianos em Avicultura e o Desenvolvimento de Resistência Bacteriana. In: PALERMO-NETO, J, SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L. Farmacologia Aplicada à Avicultura. 1ª Ed. Roca Ed. São Paulo, pp 161-173, 2005.

PHILLIPS, I., M. CASEWELL, T. COX, B. D. GROOT, C. FRIIS, R. JONES, C. NIGHTINGALE, R. PRESTON, AND J. WADDELL. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **J. Antimicrob. Chemother**. 53:28–52, 2004.

POPPE, C. Epidemiology of Salmonella enteric Serovar Enteritidis, In: **Salmonella enteric Enteritidis in Humans and Animals**. Edited by: Saeed A.M., Gast R.K., Potter M.E. & Wall, P.G. Ames, Iowa State University Press; 3-18, 1999.

POUTANEN, SUSAN M; LOW, DONALD E. Is it time to change fluoroquinolone MIC breakpoints for *Salmonella* spp.? **Clinical Microbiology Newsletter** <u>Volume 25, Issue 13</u>, Pages 97-102, 1 July,2003

RABSCH, WOLFGANG; HELENE L. ANDREWS, ROBERT A. KINGSLEY, RITA PRAGER, HELMUT TSCHÄPE, L. GARRY ADAMS, AND ANDREAS J. BÄUMLER. *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium and Its Host-Adapted Variants INFECTION AND IMMUNITY, p. 2249–2255, May, 2002.

RAMOS,D. L. C. F. Molecular typing of portuguese clinical isolates of *Salmonella spp., S.* nteritidis and *S.* Typhimurium. Thesis presented to *Escola Superior de Biotecnologia* of the *Universidade Católica Portuguesa* to fulfill the requirements of Master of Science degree in Food Inovation. 2012. Disponível em:

http://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/10512/1/DR%20tese%20final%2004.08.2012%20CD.pdf Acesso em 12 jul. 2013.

RANDALL LP, COOLES SW, COLDHAM NG, PENUELA EG, MOTT AC, WOODWARD, MJ, et al. Commonly used farm disinfectants can select for mutant Salmonella enterica serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. **J Antimicrob Chemother**; 60:1273-80, 2007.

RODRIGUES, L.B. Levantamento sorológico e detecção de Salmonella spp. em granjas de postura comercial de pequeno porte em municípios do estado do RS.Act. SCi. Vet, v.3. p.71-72. 2003.

RUTZ, F.; LIMA, G.J.M.M. O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, **Anais**... Porto Alegre: ABRAVES, 2001.

SCHÜRCH, A. C.; SOOLINGEN, D. V. DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis: From phage typing to whole-genome sequencing. Infections, Genetic and Evolution, Amsterdam, v. 12, p. 602-609. Serovar *Typhimurium* **J. Clin. Microbiol**.43, 2215-2219, 2012.

SILVA E.N., BOSQUIROLI S.L. Epidemiological occurence of *Salmonella* in a broiler integrated company. In: **World Poultry Congress**; New Delhi, India. p.385-389, 1996.

SILVA, E.N. and DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Avic.** [online]. vol.4, n.2, pp. 85-100. ISSN 1516-635X, 2002.

SILVA, EN and DUARTE, A. Salmonella Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Avic.** . 2002, vol.4, n.2 [cited 2013-07-15], pp. 85-100 . Disponível em:

- <www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2002000200001&lng=en&nrm=iso.> Acesso em: 12 jul. 2013.
- SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. J Bras Patol Med Lab v. 48; n. 2; p. 91-99; abril 2012.
- SILVA, K. C.; FONTES, L. C.; MORENO, A. M.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S., FERREIRA, A. J. P.; LINCOPAN, N. Emergence of Extended-Spectrum-!-Lactamase CTX-M-2-Producing *Salmonella enterica* Serovars Schwarzengrund and Agona in Poultry Farms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy v. 57, n. 7, p. 3458–3459, Jul 2013.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. Salmonella. In: **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, Cap. 19, p. 253-285, 2007.
- SLAVIC, D.; BOERLIN, P.; FABRI, M.; KLOTINS, K.C.; ZOETHOUT, J.K., WEIR, P.E. Antimicrobial susceptibilitry of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, 75:89-97, 2001.
- SPINOSA,H.S.; KATAYAMA, N.M.I.; MYIAJI, C.I.; LIMA, E.A.; OKABAYASHI S. Antimicrobianos: Considerações gerais. In: PALERMO-NETO, J, SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L. Farmacologia Aplicada à Avicultura. 1ª Ed. Roca Ed. São Paulo, pp 87-104, 2006.
- STEFANI, L. M.; BIFFI, C.P.; MATIELLO, C.A.; ALMEIDA, J. e BACKES, R. Isolados de Salmonella Typhimurium e Salmonella Enteritidis de origem avícola resistentes aos antimicrobianos gentamicina, enrofloxacina e ceftiofur. Disponível em: <www.udesc.br/arquivos/id_submenu/1149/2.lenita_moura_stefani___lenita_moura_stefani> Acesso em: 12 jul. 2013.
- SUKHNANAND et al., 2005 S. Sukhnanand, S. Alcaine, L.D. Warnick, W.-L. Su, J. Hof, M.P.J. Craver, P. McDonough, K.J. Boor, M. Wiedmann DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected *Salmonella enterica* Serotypes **J. Clin. Microbiol.**, 43, pp. 3688–3698, 2005.
- TANKOUO-SANDJONG B., SESSITSCH A., LIEBANA E., KORNSCHOBER C., ALLERBERGER F., HACHLER H., BODROSSY L. MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence genes, for molecular typing of *Salmonella* enterica subsp. Enterica serovars. **J Microbiol Meth.** 69:23-36, 2007.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 18, p. 426-439, 1997.

TENOVER, F.C.; ARBEIT,R.D.; GOERING, R.V. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns procedure by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.sep, p. 2233-2239. 1995.

TOZETTO, S.M. Sorotipos e tipagem molecular de isolados de Salmonella entérica no Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004. 83 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

UBABEF, Relatório Anual 2010/2011 União Brasileira de Avicultura UBABEF. Disponível em: <www.ubabef.com.br> Acesso em: 20 set. 2011.

VALDEZATE, S., M. ARROYO, R. GONZALEZ-SANZ, R. RAMIRO, S. HERRERA-LEON, M. A. USERA, M. DE LA FUENTE, AND A. ECHEITA. Antimicrobial resistance and phage and molecular typing of *Salmonella* strains isolated from food for human consumption in Spain.**J. Food Prot**. 70:2741–2748, 2007.

VOSS-RECH, CSL VAZ, L ALVES, A COLDEBELLA, JA LEÃO, D RODRIGUES, A BACK. Caracterização fenotipica e genotipica de *Salmonella* spp. isoladas de aviários de frangos de corte no brasil entre 2009 e 2010. Disponível em: http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/914349/1/caracterizacaofenotipicaegenptipica.pdf Acesso em: 12 jul. 2013.

WATSON, CINDY K.; JOHN R. COLE, JR. AND ALFRED R. PURSE II. Agar Diffusion Procedure for Antimicrobic Susceptibility Testing Comparison of a Veterinary Breakpoint Minimal Inhibitory Concentration System and a Standardized Disk. **J VET Diagn Invest** 3: 66, 1991.

XIA, X.; ZHAO, S.; SMITH, A.; MCEVOY, J.; MENG, J.; BHAGWA, A. A. Characterization of Salmonella isolates from retail foods based on serotyping, pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic properties. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, p. 93–98, 2009.

XIA, X.; ZHAO, S.; SMITH, A.; MCEVOY, J.; MENG, J.; BHAGWA, A. A. Characterization of Salmonella isolates from retail foods based on serotyping, pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic properties. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, p. 93–98, 2009.

YAN, S. S.; PENDRAK, M. L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, J. W.; FEDORKO, D. P.; FOLEY, S. L. An overview of Salmonella typing: Public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 189-204, 2003.

YANG, B.; QU, D.; ZHANG, X.; SHEN, J.; CUI, S.; SHI, Y.; XI, M.; SHENG, M.; ZHI, S.; MENG, J. Prevalence and characterization of Salmonella serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, p. 63-72, 2010.

APÊNDICE A

Quadro 9 - Resultado de provas bioquímicas para as amostras de *Salmonella* com perfil de resistência ou resistência intermediária aos antimicrobianos

Amostra	Gás	H2S	LTD	Urease	Motili//	Indol	Lisina	Citrato
416	-	+	-	+	+	-	+	+
430	-	+	-	+	-	-	+	+
432	-	+	-	+	-	-	+	+
436	+	+	-	+	+	-	+	+
423	+	+	-	+	+	-	+	+
429	-	+	-	+	-	-	+	+
417	+	+	-	-	-	-	+	+
418	-	+	-	+	+	-	+	+
418B	-	+	-	+	+	-	+	+
431	-	+	-	+	+	-	+	+
434	-	+	-	+	+	-	+	+
487	-	+	-	+	+	-	+	+
670	-	+	-	+	+	-	+	+
672	-	+	+	+	+	-	+	-
673	-	+	-	-	+	-	+	+
676	-	+	-	+	+	-	+	-
683	+	+	-	-	+	-	+	+
687	+	+	-	-	+	-	+	+
682	-	+	-	+	+	-	+	+
696	-	+	-	+	+	-	+	-
698	-	+	-	+	+	-	+	+
699	-	+	-	+	+	-	+	+
705	-	+	-	+	+	-	+	+
710	-	+	-	+	+	-	+	-
713	-	+	-	+	+	-	+	-
702	-	+	-	+	+	-	+	+
706	-	+	-	-	+	-	+	-
707A	-	+	+	-	s/c	-	s/c	-

707B	-	+	-	+	+	-	+	+
712	-	+	-	+	+	-	+	+
975	-	+	-	-	+	-	+	+
978	-	+	-	-	+	-	+	+
980	-	+	-	-	+	-	+	+
983	-	+	-	+	+	-	+	+
713	-	+	-	+	+	-	+	+

s/c=sem crescimento

APÊNDICE B

Resultado da sequência de alelos dos genes utilizados no MLST.

Gene aroC = alelo 43

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCG
ATTACCGTGGCGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGC
AGGGGCGATTGCCAAGAAATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGG
CTGCCTGACCCAGATGGGCGACATTCCGCTGGAGATTAAAGACTGGCGTCAGGTT
GAGCTTAATCCGTTCTTTTGTCCCGATGCGGACAAACTTGACGCGCTGGACGAAC
TGATGCGCGCGCTGAAAAAAAGAGGGTGACTCCATCGGCGCAAAGTGACGGTGA
TGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCGGTTTTTTGACCGACTGGATGC
GGACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAAGGCGTGGAGATCGG
CGAAGGATTTAACGTGGTGGCGCTGCGCGCGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCAC
GGCGCAGGGT

Gene dnaN = alelo 47

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCAGGCGCCACTA
CCGTGCCGGCGCGGAAATTCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGA
GATTGCCGTTCAGTTGGAAGGCGATCGGATGCTGGTGCGTTCTGGCCGTAGCCGC
TTCTCGCTGTCTACACTGCCTGCCGCCGATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAG
CGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAAGCGCCTGATTGAAGCGACC
CAGTTTTCGATGGCTCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTATGCTGTTTGA
AACGGAAGGCAGCGAACTGCGCACTGTTGCGACCGACCGCCACCGTCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAGGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGT
AAAGGCGTGATTGAACTGATGCGTATGCTTTGACGGTGGCGAAAACCCGCTGCGC
GTGCAG

Gene hemD = alelo 49

Gene hisD = alelo 49

Gene purE = alelo 41

Gene thrA = alelo 3

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACG
CGCTGACTGCTGTAAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCG
CGCCAGGTGCCGGACGCCAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATG
GAACTCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTCCTTCACCCTCGCACCATAACGCCTATCGC
CCAGTTCCAGATCCCCTGTCTGATTAAAAAATACCGGCAATCCGCAGGCGCCAGGA
ACGCTGATCGGCGCATCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTTAAAGGGATCTCTA
ACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGGAATGAAAGGGATGAT
TGGGATGGCGGCGCGTGTTTTCGCCGCCATGTCTCGCGCCGGGATCTCGGTGGTG
CTCATTACCCAGTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGCTTCTGTGTGCCGCAGAGTGA
CTGC