

KETRIN CRISTINA DA SILVA

**MONITORAMENTO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA
EM *Salmonella* spp. E *Escherichia coli* ISOLADAS DE ANIMAIS
DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA E ALIMENTOS DERIVADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo
2011**

Ketrin Cristina da Silva

**MONITORAMENTO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM *Salmonella*
spp. E *Escherichia coli* ISOLADAS DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
AGROPECUÁRIA E ALIMENTOS DERIVADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Nilton Lincopan

“Versão Corrigida. Versão original se encontra arquivada no serviço de comunicação do ICB.”

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Silva, Ketrin Cristina da.

Monitoramento dos mecanismos de resistência em *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de animais de produção agropecuária e alimentos derivados / Ketrin Cristina da Silva. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Nilton Lincopan.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Resistência bacteriana.

Versão do título para o inglês: Antimicrobial resistance surveillance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from food-producing animals and related products.

Descritores: 1. Ceftiofur 2. Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) 3. AmpC 4. Resistência bacteriana 5. Enterobacteriaceae 6. Fluoroquinolonas I. Lincopan, Nilton II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0148/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ketrin Cristina da Silva.

Título da Dissertação: Monitoramento dos mecanismos de resistência em *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de animais de produção agropecuária e alimentos derivados.

Orientador(a): Nilton Lincopan.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

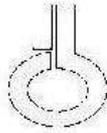
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Presidente: Nome completo:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lúcio Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail : icb@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **94** nas fls. **73** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Nilton Lincopan**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Monitoramento dos mecanismos de resistência aos antibióticos em enterobacteriaceae isolados de animais de criação agropecuária e alimentos derivados** do qual participaram o(s) aluno(s) **Ketrin Cristina da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **25.08.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 26 de agosto de 2009.

Prof. Dr. WOTEAR CAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Dedico esse trabalho à minha mãe e ao meu pai, pessoas responsáveis por todo o meu sucesso e formação. Dedico também à minha irmã, que acabou de ingressar na universidade, com o desejo de que ela usufrua de toda satisfação que só o conhecimento e a educação pode proporcionar.

AGRADECIMENTOS

Em tudo dai graças. I Tessalonicenses 5.18

A Deus pelo fôlego, pela força diária e por todas as oportunidades que surgiram. Agradeço também pelas dificuldades, pois foi através delas que obtive crescimento.

Aos meus pais, pelo apoio imensurável. E a minha irmã e sobrinha, pelas alegrias compartilhadas.

Ao Prof. Nilton Lincopan, por toda orientação, oportunidade e aprendizado.

Ao estatístico Douglas Ernesto Fazoni Sousa pela dedicação e apoio nesse período.

Às meninas que moraram comigo: Juliana Jamilles, a quem tanto estimo e de quem sinto saudades; Claudia Emanuelle, pelos tantos problemas que enfrentamos juntas; Maisa Costa, pelos conselhos sábios; Natália Moraes, nossa *personal style*, pelas tantas risadas; Lívia Clemente, por toda prudência e Danielle Vega, por todo aprendizado. Agradeço também a todas as demais meninas que passaram pela república e que deixaram boas lembranças, dentre elas Natália Covre, Cíntia, Dani e Eliz.

Ao colega Edelvan Gabana, pelo constante exemplo de determinação e superação, que me ajudou em um dos momentos mais difíceis desse mestrado.

Às colegas de laboratório por todo aprendizado que tivemos juntas e pela convivência diária, especialmente a Emanuelle Gaspar e Lívia de Carvalho Fontes, que entraram na mesma época que eu no laboratório e com quem eu tive uma convivência maior.

À Laís Marconato, aluna de iniciação científica, que me ajudou na realização de experimentos.

À Maria Jacinta, técnica do laboratório, pelos tantos momentos de alegria e conversas diárias. Agradeço também à Selminha pela ajuda durante esses anos.

Ao Prof. Benedito Correa, pela ajuda durante esse período.

À Prof. Andrea Micke Moreno, por conceder as linhagens de origem suína e por todo auxílio prestado.

Ao Prof. Antonio Piantino Ferreira e Dra. Claudete Astolfi Ferreira por concederem as cepas oriundas da cadeia avícola.

À Prof. Elsa Mamizuka por abrir as portas de seu laboratório e a toda sua equipe pela ajuda nos experimentos, especialmente à Lara Mendes de Almeida, por me auxiliar com sequenciamentos.

À toda equipe dos laboratórios dos professores: Jorge Timenetsky, Antonio Pestana, Carlos Taborda, Mario Henrique e Irma Nelly G. Rivera e a todos quantos contribuíram com o empréstimo de equipamentos e reagentes, sem os quais a realização desse trabalho seria quase impossível.

Ao Prof. Ribamar pela ajuda com os experimentos e direcionamento.

À Cefar, por doar os discos de antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade.

À banca de qualificação e à banca presente na defesa.

Agradeço imensamente à FAPESP (Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de Mestrado e também a CAPES.

Agradeço, por fim, a todos que contribuíram de alguma maneira para a concretização desse trabalho.

Minha gratidão!

Eu espero que eu sempre possua firmeza e virtude suficientes para manter o que eu considero o mais invejável de todos os títulos, o caráter de um homem honesto.

George Washington

Se soubesse que o mundo se desintegraria amanhã, ainda assim plantaria a minha macieira. O que me assusta não é a violência de poucos, mas a omissão de muitos. Temos aprendido a voar como os pássaros, a nadar como os peixes, mas não aprendemos a sensível arte de viver como irmãos.

Martin Luther King

RESUMO

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

Enterobactérias são importantes agentes de infecções humanas e veterinárias, de origem zoonótica, alimentar ou nosocomial. *Salmonella* é uma causa comum de gastroenterite associadas a surtos de origem alimentar. *Escherichia coli* integra a microbiota residente do intestino de diferentes espécies animais, podendo produzir infecções intestinais e extra-intestinais. Para ambos agentes, a antibioticoterapia tem sido uma prática comum que tem contribuído para um prognóstico favorável. Assim, a emergência de fenótipos resistentes, tanto na clínica humana e veterinária quanto na agropecuária, constitui uma urgência epidemiológica. O objetivo do presente trabalho foi monitorar os mecanismos de resistência em amostras de *Salmonella* spp. e *E. coli* isoladas de animais de produção agropecuária (aves e suínos) e fontes relacionadas, com ênfase na caracterização da produção de beta-lactamases e resistência a fluoroquinolonas de origem plasmidial. De 2005-2010, isolados de *E. coli* e *Salmonella* foram recuperados de diferentes granjas no Brasil. Os testes de suscetibilidade e determinação da CIM foram realizados de acordo com os padrões estabelecidos pelo CLSI (2009). Fenótipos de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC foram detectados por métodos fenotípicos, sendo confirmados pela pesquisa dos genes *bla*_{ESBL} e *bla*_{AmpC} por PCR. A determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli* e a pesquisa de integrons classe 1 e outros genes de resistência também foram realizadas por PCR. A avaliação da clonalidade foi realizada por ERIC-PCR (*E. coli*) ou PFGE (*Salmonella* spp.). Do total de 143 amostras de *Salmonella* spp., 9% (3 *S. Thyphimurium*, 7 *S. Schwarzengrund* e 2 *S. Agona*) eram resistentes a cefalosporinas de amplo espectro pela produção de ESBL do tipo CTX-M-2, prevalecendo dois *clusters* disseminados clonalmente no ciclo de produção avícola. Em *E. coli*, a resistência às cefalosporinas de amplo espectro foi associada com a presença do gene *bla*_{CTX-M-2} (n=24), *bla*_{CMY-2} (n=2) e *bla*_{CTX-M-15} (n=1, novo ST, complexo clonal 206), não existindo relação clonal no ciclo de produção suína. Genes codificando ESBLs do tipo CTX-M foram transferidos para a cepa *E. coli* Top 10, sendo associados a presença de plasmídeos de aproximadamente 24 Kb. Em 5 amostras de *E. coli* (suínos) resistentes a fluoroquinolonas foi confirmada a presença de genes do tipo *qnr*, os quais foram co-transferidos juntamente com genes *bla*_{CTX-M/CMY-2} para *E. coli* Top 10. Dentre as *E. coli*

produtoras de CTX-M-2, 46% e 29% dos isolados pertenciam aos grupos de baixa virulência B1 e D, respectivamente. Por outro lado, 25% pertenciam ao grupo D, altamente virulento. A cepa produtora de CTX-M-15 pertencia ao grupo de alta virulência B2, associado a infecções extra-intestinais. A aquisição e disseminação de genes conferindo resistências a cefaloporinas de amplo espectro e quinolonas, em isolados de origem animal, pode ter impacto em saúde pública uma vez que os produtos derivados podem constituir uma fonte potencial para a mobilização de genes de resistência e/ou disseminação de bactérias multirresistentes, demandando estratégias adequadas a fim de fornecer produtos com segurança e qualidade ao consumidor.

Palavras chave: Ceftiofur. Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). AmpC. Resistência bacteriana. *Enterobacteriaceae*. Fluoroquinolonas.

ABSTRACT

SILVA, K. C. da. **Antimicrobial Resistance Surveillance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from food-producing animals and related products.** 2011. 84 p. Masters Thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Enterobacteriaceae are important agents of infection to human and animals, being associated with zoonotic, food-borne and nosocomial diseases. *Salmonella* spp. is a major cause of bacterial gastroenteritis most often related to foodborne outbreaks. *Escherichia coli* colonize the gastrointestinal tract of different animal species, producing intestinal and extra-intestinal infections. For both bacterial agents, antibiotic therapy has contributed to favorable outcomes. Thus, the emergence of drug-resistant phenotypes in human and veterinary medicine, and in the animal husbandry has epidemiological significance. The aim of this study was to investigate the resistance mechanisms of *Salmonella* and *E. coli* strains isolated from food-producing animals (poultry and swine) and related sources, with emphasis on beta-lactamase production and plasmid-mediated fluoroquinolone resistance. From 2005-2010, *E. coli* and *Salmonella* strains were recovered from farms in Brazil. Susceptibility profiles and MIC determinations were performed in accordance with CLSI (2009). Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC phenotypes were detected by using phenotypic methods, which were confirmed by PCR screening of *bla*_{ESBL} and *bla*_{AmpC} genes. Phylogenetic groups of *E. coli*, class 1 integrons and further antimicrobial resistance genes were also screened by PCR. Finally, the clonal relationship was evaluated by ERIC-PCR (*E. coli*) and PFGE (*Salmonella* spp.). Among 143 *Salmonella* spp. strains, 9% strains (3 *S. Thyphimurium*, 7 *S. Schwarzengrund* and 2 *S. Agona*) exhibited resistance to extended-spectrum cephalosporins, which was associated to the presence of the *bla*_{CTX-M-2} gene. These strains were clonally related being grouped in two major clusters. On the other hand, resistance to extended-spectrum cephalosporins among clonally unrelated *E. coli* strains from swine was associated to the presence of *bla*_{CTX-M-2} (n=24), *bla*_{CMY-2} (n=2) and *bla*_{CTX-M-15} (n=1, a new ST belonging to the clonal complex 206) genes. CTX-M-like ESBL-encoding genes were successfully transformed into *E. coli* Top10 recipient strain, being associated with the presence of 24Kb-size plasmids. Five *E. coli* strains (from swine) resistant to fluoroquinolones carried *qnr* genes, which were co-transferred along with *bla*_{CTX-M/CMY-2}-like genes into *E. coli* Top 10. Forty-six and 29% CTX-M-2-producing *E. coli* strains belonged to low-virulence phylogroups B1 and D, respectively. On the other hand, 25% strains belonged to high-

virulence phylogroup D. The CTX-M-15-producing *E. coli* belonged to the high-virulence phylogenetic group B2, associated to extra-intestinal infections. Acquisition and spread of genes conferring resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones among *Salmonella* spp. and *E. coli* strains from food-producing animals is worrisome and it should be considered a public health issue, since related products can constitute a potential source of antimicrobial resistance genes and/or multi-drug resistant bacteria, requiring adequate strategies to offer safe and quality products.

Key Words: Ceftiofur. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL). AmpC. Antimicrobial resistance. *Enterobacteriaceae*. Fluoroquinolones.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg- Micrograma

µL-Microlitro

AmC- Amoxicilina + Ácido clavulânico

Amp- Ampicilina

ATCC- American Type Culture Collection

bla- Gene codificador de β-lactamases

Caz- Ceftazidima

Cft- ceftiofur

CIM- Concentração inibitória mínima

Cip- ciprofloxacina

Clo- cloramphenicol

CLSI- Clinical and Laboratory Standard Institute

Cpm- Cefepime

Cro- ceftriaxona

Ctx- cefotaxima

DDST- Método da dupla difusão em disco

DNA- Ácido desoxiribonucleico

dNTPp- Deoxinucleotideo trifosfato

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

Eno- enrofloxacin

Gen- gentamicina

IntI- Gene codificador de integrase, constituinte do elemento genético móvel *integron*

IRAS- Infecções relacionadas a assistência a saúde

Kan- canamicina

ml- Mililitro

mm- Milímetro.

mM- Milimolar

Nal- ácido nalidíxico

PCR- Reação em cadeia pela polimerase (“Polymerase Chain Reaction”)

PFGE- Eletroforese em gel de campo pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”)

RNA- Ácido ribonucleico (“Ribonucleic Acid”)

Str-estreptomicina

Sut- sulfametoxazol-trimetoprim

Tet-tetraciclina

Tris- Tris-hidroximetilaminometano (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol)

UV- Ultra violeta

μM- Micromolar

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Sistemas de bombas de efluxo já descritos em <i>Salmonella enterica</i>	24
Figura 2. Esquema utilizado para a determinação dos grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> baseado na amplificação dos genes <i>chuA</i>, <i>yjaA</i> e <i>TspE4.C2</i> proposto por Clermont et al. (2000).....	26
Figura 3. Algumas vias de transmissão de patógenos ou microbiota entre animais, ecossistemas e seres humanos.....	27
Figura 4. Mecanismo de hidrólise de antibiótico beta-lactâmico por ESBL.....	28
Figura 5. Métodos fenotípicos para detecção de beta-lactamases de amplo espectro.....	30
Figura 6. Epidemiologia das ESBL no Brasil segundo as diferentes unidades federais.....	32
Figura 7. Dendrograma dos isolados de <i>Escherichia coli</i> produtoras de CTX-M-2 gerado a partir dos fragmentos amplificados por ERIC-PCR.....	44
Figura 8. Dendrograma dos isolados de <i>Salmonella enterica</i> produtoras de ESBL gerado a partir dos padrões de macrorrestrição obtidos por PFGE.....	48
Figura 9. Dendrograma dos isolados de <i>Escherichia coli</i> produtora de CTX-M-15 e AmpC gerado a partir dos fragmentos amplificados por ERIC-PCR.....	49
Figura 10. Dendrograma dos isolados de <i>Escherichia coli</i> carregando genes do tipo <i>qnr</i> gerado a partir dos fragmentos amplificados por ERIC-PCR.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista dos aditivos proibidos na alimentação animal e legislação correspondente.....	28
Tabela 2- Iniciadores utilizados na amplificação dos genes <i>bla</i> _{ESBL}	39
Tabela 3- Resistência antimicrobiana em <i>Salmonella</i> spp. isoladas (N = 93) do ciclo de produção avícola, frequência dos genes de resistência e valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	44
Tabela 4- Resistência antimicrobiana em cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas (N = 50) de suínos comerciais, frequência dos genes de resistência e valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	46
Tabela 5- Características epidemiológicas, grupo filogenético, perfil de suscetibilidade antimicrobiana e genótipos de beta-lactamases em isolados de <i>Escherichia coli</i> resistentes ao ceftiofur, recuperados de suínos comerciais de Minas Gerais, Brasil.....	48
Tabela 6- Características epidemiológicas e microbiológicas de <i>Salmonella enterica</i> multirresistentes carregando o gene <i>bla</i> _{CTX-M-2} isoladas do ciclo de produção avícola.....	50
Tabela 7- Perfil fenotípico e genotípico de <i>Escherichia coli</i> produtora de CTX-M-15 e AmpC de origem animal e comparação com isolados clínicos.....	53
Tabela 8- Perfil fenotípico e genotípico de <i>Escherichia coli</i> carregando genes do tipo <i>qnr</i>	54

SUMÁRIO

1.1 <i>Salmonella</i> : veiculação em alimentos e resistência bacteriana	19
1.2 <i>Escherichia coli</i> : importância na cadeia de produção animal	25
1.3 Epidemiologia da resistência aos antibióticos: fatores clínicos e ambientais.....	26
1.3.1 Resistência mediada por <i>Beta-lactamases</i>	28
1.3.1.1 ESBL: histórico	30
1.4 Resistência a quinolonas mediada por plasmídeos.....	33
1.5 Objetivos gerais	35
1.5.1 Objetivos específicos	35
2 MATERIAIS E MÉTODOS	36
2.1 Microorganismos estudados	36
2.1.1 <i>Salmonella</i> spp.	36
2.1.2 <i>Escherichia coli</i>	36
2.2 Testes de susceptibilidade	37
2.3 Detecção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC	37
2.4 Extração de DNA, detecção dos genes de resistência e integrons de classe 1.....	37
2.5 Sorotipagem de <i>Salmonella</i> spp.....	39
2.6 Extração de DNA plasmidial e ensaios para transferência de plasmídeos.....	39
2.7 Análise filogenética das cepas de <i>Escherichia coli</i> e determinação do perfil genotípico por ERIC-PCR.....	40
2.8 Tipagem de <i>Escherichia coli</i> por Multilocus Sequence Typing (MLST).....	40
2.9 Determinação do perfil genotípico de <i>Salmonella</i> spp. por Eletroforese de campo pulsado (PFGE)	41
3 RESULTADOS	42
3.2 Determinação do perfil de suscetibilidade antibacteriana frente a antibióticos de uso clínico humano e veterinário, e identificação de genes de resistência, nos isolados de <i>Salmonella</i> spp. recuperados de amostras coletadas de suínos comerciais	45

3.3 Características epidemiológicas e genóticas, grupo filogenético, perfil de suscetibilidade antimicrobiana e produção de ESBL em isolados de <i>Escherichia coli</i> recuperados de suínos comerciais	46
3.4 Caracterização fenotípica e genotípica de <i>Salmonella enterica</i> produtoras de ESBL do tipo CTX-M-2 isoladas de aves e fontes relacionadas.....	49
3.5 Caracterização fenotípica e genotípica de <i>Escherichia coli</i> produtora de CTX-M-15 e AmpC de origem animal e comparação com isolado clínico	51
3.6 Perfil fenotípico e genotípico de amostras de <i>E. coli</i> carregando genes do tipo <i>qnr</i> ...	52
4 DISCUSSÃO	55
4.1 Perfil de suscetibilidade em <i>Salmonella</i> spp. isoladas de aves, fontes relacionadas e suínos comerciais	55
4.2 Genes de resistência em <i>Salmonella</i> spp. isoladas de aves e suínos.....	59
4.3 Produção de ESBL do tipo CTX-M-2.....	61
4.3.1 <i>Escherichia coli</i>	61
4.3.2 <i>Salmonella enterica</i>	62
4.4 Produção de AmpC e ESBL do tipo CTX-M-15.....	64
4.5 Resistência fluoroquinolonas: genes <i>qnr</i>	66
4.6 Transferência plasmidial (transformação) dos genes do tipo <i>bla</i> _{beta-lactamase} e/ou <i>qnr</i> .	67
5 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio é fundamental para a economia do Brasil, pois representa cerca de um terço do PIB nacional, contribuindo significativamente para as exportações de *commodities* e produtos agro-industriais (Confederação de Agricultura e Agropecuária do Brasil). O caminho do Brasil na busca da liderança mundial no agronegócio e consolidação dessa atividade depende da ampliação de sua competência para atuar de modo eficiente no controle das cadeias de produção agropecuária, de modo a garantir a qualidade e a segurança dos produtos e das cadeias de produção. O abuso no uso de antimicrobianos tem contribuído com a seleção de resistência em diversas espécies bacterianas. Por outro lado, a resistência bacteriana em patógenos entéricos de origem alimentar tem sido inevitável, sendo uma consequência direta do uso de antimicrobianos em animais produtores de alimentos. Assim, o monitoramento fenotípico e genotípico da resistência bacteriana aos antibióticos em enteropatógenos isolados de animais de criação agropecuária e alimentos derivados é de importância para a proteção da saúde humana e animal e pode auxiliar no estabelecimento de parâmetros mais rígidos quanto ao uso de aditivos nas rações animais como também o uso de antimicrobianos para outras finalidades (preventiva e curativa).

1.1 *Salmonella*: veiculação em alimentos e resistência bacteriana

Dentre a família *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp. tem assumido importância epidemiológica devido ao grande número de surtos e infecções relacionadas ao consumo de água e alimentos contaminados (AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006; BRASIL, 2009; CENTER FOR DISEASE CONTROL, 2010; PERESI et al., 1998). Além disso, a emergência de fenótipos resistentes a antimicrobianos de uso clínico e veterinário tem se tornado um grave problema de saúde pública (ANTUNES; MACHADO; PEIXE, 2006; CALIXTO et al., 2002; CHEN et al., 2004; ETHELBERG et al., 2005; HELMS et al., 2002; OLIVEIR; BRANDELL; TONDO, 2006).

Taxonomicamente, o esquema atual de classificação de *Salmonella* spp. divide o gênero em duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, essa última subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (POPOFF;

BOCKEMUHUL; GHEESLING, 2004; POPOFF e MINOR, 2005). No entanto, as salmonelas tem sido comumente reportadas de acordo com a caracterização dos sorotipos.

A sorotipagem baseia-se na variação antigênica dos antígenos somáticos (antígeno O) e flagelares (antígeno H) (87, 88), sendo descritos 2501 sorotipos até o ano de 2004, em sua maioria pertencentes a *Salmonella enterica* subespécie *enterica*. Dessa maneira, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis tem sido denominada apenas como *Salmonella* Enteritidis, omitindo-se o táxon referente a espécie e subespécie (BRENNER et al., 2000).

Alguns sorotipos são hospedeiro-específico, tais como *Salmonella* Typhi e Paratyphi em primatas; *Salmonella* Dublin em gado e *Salmonella* Choleraesuis em suínos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010), porém, a maioria tem como reservatório uma ampla variedade de espécies animais e podem ser transmitidas ao homem, causando doença de origem zoonótica (TRABULSI et al., 2008; WHO, 2010). Nesse sentido, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium constituem os sorotipos mais frequentemente relacionados a salmonelose humana (CORTEZ et al., 2006; GLYINN et al., 1998; HUEHN et al., 2010; VAZ et al., 2000).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divide as patologias causadas pelo gênero *Salmonella* em dois grupos. O primeiro grupo inclui a febre tifóide e as febres entéricas, causadas por *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi (A, B e C), respectivamente. Já o segundo grupo constitui doenças causadas pelas salmonelas não tifóides, ou seja, enterocolites ou salmoneloses (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS, 2000; TRABULSI et al., 2008). A febre tifóide é uma infecção grave cujos sintomas incluem septicemia, febre alta, diarreia, vômitos e cefaléia, podendo levar a óbito (SHINOHARA et al., 2008; MURRAY et al., 2010). Na febre entérica os sintomas são mais brandos, podendo evoluir para septicemia. Já as infecções causadas por salmonelas não-tifóides são geralmente autolimitadas e não requerem antibioticoterapia. Por outro lado, infecções extraintestinais, como bacteremias e meningites, podem acometer grupos mais sensíveis da população, tais como imunocomprometidos, neonatos e idosos, necessitando de tratamento antimicrobiano (LEE et al., 1994; SIRINAVIN; CHIEMCHANYA; VORACHIT, 2001).

Um ponto de importância epidemiológica é que os indivíduos continuam a excretar a bactéria através das fezes mesmo após o desaparecimento dos sintomas, tornando-se fonte para veiculação contínua do patógeno por via fecal-oral, o que define um estado de portador assintomático (SHINOHARA et al., 2008). De qualquer maneira, a ingestão de alimentos e água contaminados é a principal via de transmissão da bactéria, situando *Salmonella* spp. como o principal agente bacteriano causador de Doença Transmitida por Alimentos (DTAs) tanto em países desenvolvidos quanto subdesenvolvidos (AMSON et al., 2006; BRASIL, 2009; NUNES et al., 2010; WHO, 2010; VALDEZATE et al., 2007).

Nos Estados Unidos, são registrados de 800.000 a 4 milhões de casos de infecção por *Salmonella* spp. anualmente, sendo que aproximadamente 580 casos evoluem para óbito (GLYINN et al., 1998, WHO, 2010). As altas taxas de morbidade são acompanhadas de alto custo em gastos médicos, por exemplo, nos EUA, no ano de 2010, os gastos devido a salmonelose foram de 2,708,292,046 de dólares, gastos os quais derivaram de hospitalizações, medicamentos, consultas médicas e outros gastos (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2011).

No Brasil, nem todas as unidades federais dispõem de dados concisos de vigilância epidemiológica quanto a Doenças Transmitidas por Alimentos. Porém, a Secretaria de Vigilância em Saúde afirma terem ocorrido 1275 surtos por *Salmonella* no período de 1999 a 2008, correspondendo a 42,9% do total de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no país (BRASIL, 2009). No Rio Grande do Sul, de 99 surtos de DTAs notificados no ano 2000, 74 deles foram ocasionados por *Salmonella* spp. (NADVORNY; FIGUEIREIDO; SHIMIDT, 2004). Considerando o estado do Paraná, no período de 1978 até o ano 2000, foram notificados 404 surtos de DTAs envolvendo *Salmonella* spp., correspondendo a 33,8% do total de surtos de DTAs no período considerado (AMSON et al., 2006). Apesar dos números serem altos, é importante salientar que nem sempre é feita a pesquisa para constatação do agente infeccioso, de modo que o número de casos de salmonelose ainda é subnotificado.

Embora água, frutas e verduras contaminadas possam estar envolvidas na transmissão de *Salmonella* spp., e a transmissão por contato direto seja importante no ambiente hospitalar (SHINOHARA et al., 2008), alimentos de origem animal são os principais veículos do agente infeccioso, dentre eles ovos, leite, carnes e produtos derivados (CORTEZ, 2006; NADVORNY; FIGUEIREIDO; SHIMIDT, 2004; RIBEIRO et al., 2007; ROCHA et al.,

2003; SHINOHARA et al., 2008). Nesse sentido, produtos oriundos da cadeia avícola assumem posição de destaque nas toxinfecções alimentares causadas por *Salmonella* spp. (GOUWS e BRÖZ, 2000; HERNÁNDEZ et al., 2002).

A contaminação do produto final depende das condições de manejo e abate das aves. No Brasil, tem sido frequente o isolamento de *Salmonella* spp. em toda a linha de produção avícola, desde ovos, pintos de um dia, aves pré-abate, ambiente de produção, utensílios, abatedouros e produto final. (CALIXTO et al., 2002; CORTEZ et al., 2006; FERNANDES et al., 2009; DIAS DE OLIVEIRA et al., 2005; NUNES et al., 2010; MARTINS et al., 2000; MOREIRA E MORAES, 2002; SANTOS et al., 2000; SILVA e DUARTE, 2002).

Além das características de endemicidade, morbidade e especial dificuldade no controle da disseminação de *Salmonella* spp. que tem preocupado os órgãos de vigilância sanitária, o ponto de urgência clínica e epidemiológica tem sido a emergência de cepas resistentes a antibióticos de diversas classes (BERTRAND et al., 2006; FERNANDES et al., 2009; KIESSLING et al., 2002; MCEWEN e FEDORKA-CRAY, 2002; ORMAN et al., 2002; PEIRANO et al., 2006; THAKUR et al., 2007; VAZ et al., 2010; WEGENER et al., 1999), especialmente pelo risco potencial de infecções extraintestinais que acometem grupos mais sensíveis da população, assim como, a possibilidade de transferência de genes de resistência à microbiota residente no intestino (MCEWEN e FEDORKA-CRAY, 2002; PESSANHA e GONTIJO FILHO, 2001; PHILLIPS et al., 2004).

Dentre os fatores que favorecem a aquisição de resistência por enterobactérias, destaca-se o uso constante de antimicrobianos na produção animal, seja terapêutica e profilaticamente, ou mesmo como promotores de crescimento (aditivo de ração) (ARAUJO et al., 2007; PALERMO NETO; ALMEIDA, 2006; RUTZ; LIMA, 2001; WATERS et al., 2011). Conseqüentemente, a emergência de resistência aos antibacterianos em *Salmonella* spp. isoladas de carnes e subprodutos tem sido inevitável (CHEN et al., 2004; DECHET et al., 2004; ETHELBERG et al., 2005). De fato, o isolamento de fenótipos multirresistentes (MRs) tem sido bastante documentado em amostras clínicas e na produção de alimentos de origem animal, incluindo o ciclo de produção avícola e suína, além de alimentos derivados (CARRAMIÑANA et al., 2004; FONSECA et al., 2006; GLYINN et al., 2000; KRAULAND et al., 2009; SPRICIGO et al., 2008; TESSMANN et al., 2008). Assim, vários surtos de infecção alimentar por fenótipos MRs têm sido relatados na literatura (DECHET et al., 2004;

ETHELBERG et al., 2005; MCLAUGHLIN et al., 2006; WEGENER et al., 1999), sendo a principal preocupação a emergência de isolados resistentes a cefalosporinas de amplo espectro e fluoroquinolonas, drogas de escolha no tratamento de salmonelose sistêmica (BERTRAND et al., 2006; GIRAUD et al., 1999).

Como mecanismos de resistência, a aquisição de genes codificadores de beta-lactamases, e transferases modificadoras de aminoglicosídeos e fencóis tem sido associados a fenótipos de MR em *Salmonella* spp. Além disso, a super expressão de bombas de efluxo tem sido descritas como um mecanismo de resistência que reconhece um amplo espectro de antibióticos independente da sua composição química (Figura 1).

De modo geral, as bombas de efluxo constituem complexos protéicos que formam um canal pelo qual o antibiótico é expulso para o ambiente externo, diminuindo sua acumulação no interior da célula bacteriana. Em *Salmonella enterica* já foram descritos nove complexos de bombas de efluxo pertencentes a quatro famílias: *major* facilitator-MF (EmrAB and MdfA); *resistance nodulation division*-RND family (AcrAB, AcrD, AcrEF, MdtABC and MdsAB); *multidrug and toxic compound extrusion*-MATE (MdtK) e *ATP-binding cassette*-ABC (MacAB) (NISHINO; LATIFI; GROISMAN., 2006; HORIYAMA et al., 2010) (Figura 1).

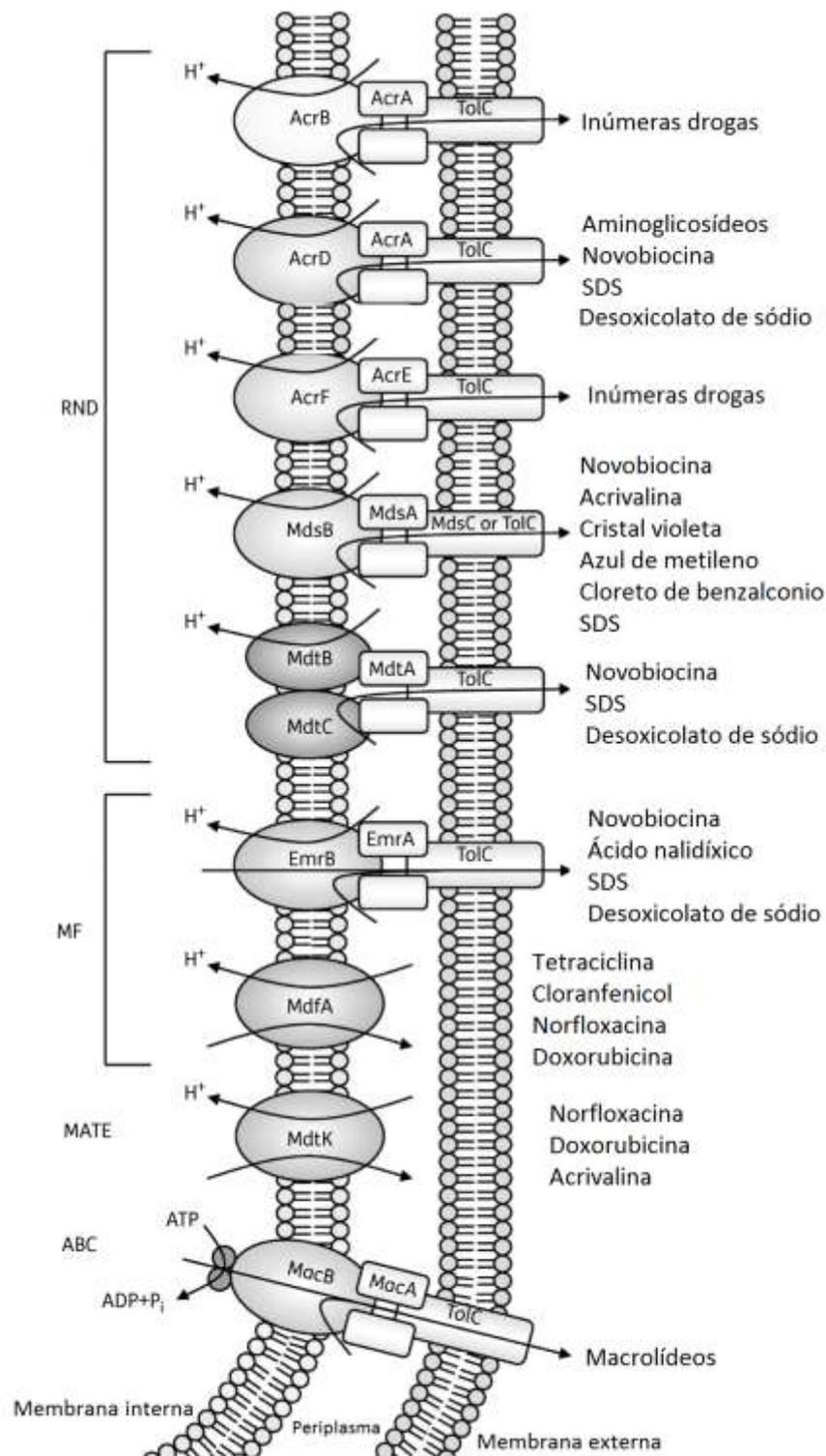


Figura 1. Sistemas de bombas de efluxo já descritos em *Salmonella enterica*

Fonte: Modificado de Horiyama et al., 2010.

1.2 *Escherichia coli*: importância na cadeia de produção animal

Uma das maiores dificuldades no manejo da produção animal é o controle das infecções, responsáveis por inúmeras perdas e aumento do custo de produção decorrente da administração de antibióticos. Nesse cenário, *Escherichia coli* ocupa posição de destaque, uma vez que coloniza o intestino de diversas espécies animais (QUINN et al., 2005). A colonização do trato intestinal de mamíferos ocorre logo após o nascimento e persiste durante toda a vida, podendo desenvolver-se um estado patológico com sintomas e prognóstico dependentes do grau de patogenicidade da linhagem de *E. coli* (patótipo) e da pré-disposição do hospedeiro, instaurando-se doenças intestinais e/ou extra-intestinais, tais como, diarreias, meningite, septicemia, síndrome hemolítica urêmica e infecções urinárias.

Sob esse aspecto, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é o principal agente bacteriano associado à diarreia em suínos, especialmente nos períodos neonatal e imediatamente posterior ao desmame de leitões (COSTA et al., 2006). A ETEC adere ao epitélio intestinal, produzindo enterotoxinas que ocasionam um desequilíbrio eletrolítico no intestino delgado, resultando em diarreia secretora (KARCH; MELLMANN; BIELASZEWSKA, 2009; MARQUARDT et al., 1999).

Em aves, APEC é um termo geral utilizado comumente para designar as linhagens de *E. coli* isoladas de colibacilose aviar, podendo ser a causa de inúmeros quadros patológicos, incluindo infecção do trato respiratório, septicemia, síndrome da cabeça inchada e enterites, sendo responsável por inúmeras perdas econômicas na produção avícola (CAMPOS, 2008; NAKAZATO et al., 2009).

Além de ETEC, são descritos outros patótipos de *E. coli*, os quais variam em fatores de virulência e patogenicidade, sendo eles: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), que inclui o subgrupo EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) (MURRAY et al., 2010; QUINN et al., 2005). Dentre estas categorias, as STEC destacam-se devido ao seu potencial zoonótico emergente (BRANDT et al., 2001) e também pela gravidade do quadro patológico causado por esse patótipo, que inclui a síndrome hemolítica urêmica, caracterizada por insuficiência renal, anemia hemolítica e trombocitopenia (BRANDT et al., 2001; MURRAY et al., 2010; KARCH; MELLMANN; BIELASZEWSKA, 2009).

A análise filogenética tem demonstrado que as linhagens de *E. coli* podem ainda ser agrupadas em quatro principais grupos (A, B1, B2 e D), sendo que a maioria das linhagens capazes de produzir infecção extraintestinal pertencem ao grupo B2 e, em menor escala, ao grupo D, considerados de alta virulência. Por outro lado, linhagens comensais pertencem aos grupos A e B1, de baixa virulência. Assim, para identificar esses diferentes grupos filogenéticos, Clermont et al. (2000) desenvolveram um método rápido baseado na identificação de três genes: *chuA*, *yjaA* e *TspE4.C2* (Figura 2).

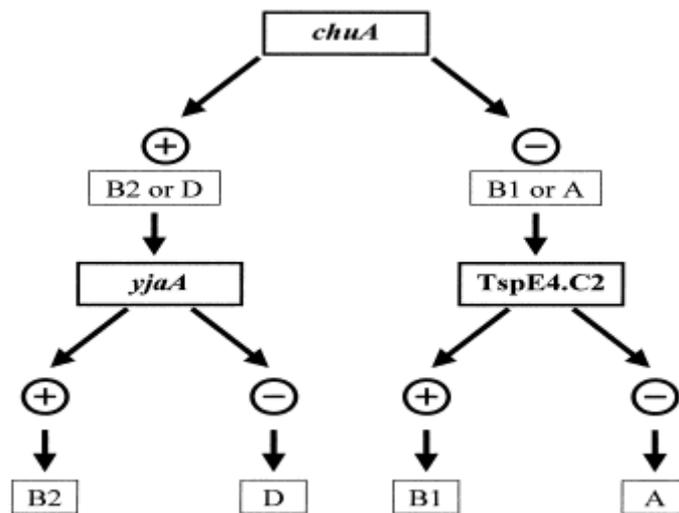


Figura 2. Esquema utilizado para a determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli* baseado na amplificação dos genes *chuA*, *yjaA* e *TspE4.C2* proposto por Clermont et al. (2000)

Além de sua importância na produção animal, *E. coli* é o principal agente associado a infecções do trato urinário de origem nosocomial e comunitária, de maneira que fenótipos de *E. coli* resistentes a antibióticos tem sido um fator preocupante saúde pública, especialmente devido à produção de beta-lactamases e determinantes de resistência a quinolonas mediada por plasmídeos.

1.3 Epidemiologia da resistência aos antibióticos: fatores clínicos e ambientais

Enteropatógenos são comumente veiculados pelo consumo de água e alimentos contaminados. Nesse cenário, os alimentos de origem animal assumem importância primordial, especialmente quando a sua preparação não é feita de maneira adequada. Por outro lado, o uso indiscriminado de antibióticos na produção agropecuária e na clínica humana e veterinária tem contribuído com a emergência e disseminação de bactérias MRs com potencial para colonizar o trato intestinal de diversas espécies de animais por diferentes vias, sendo que no caso de infecção endógena a falha terapêutica é um fator a ser considerado (Figura 3). Assim, vários países tem restringido o uso de antibióticos como promotores de crescimento na produção animal, seja por resguardar a inocuidade dos alimentos, seja pela pressão exercida por mercados importadores exigentes. Sob esse ponto de vista, a Europa banuiu o uso de antibióticos como promotor de crescimento na produção animal e tem monitorado a ocorrência de fenótipos resistentes em produtos de origem animal importados de outros continentes (CASEWELL et al., 2003; WARREN et al., 2008). Com relação ao Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é o órgão responsável por padronizar o uso dos promotores de crescimento na produção animal, restringindo o uso de algumas classes antimicrobianas (Tabela 1).

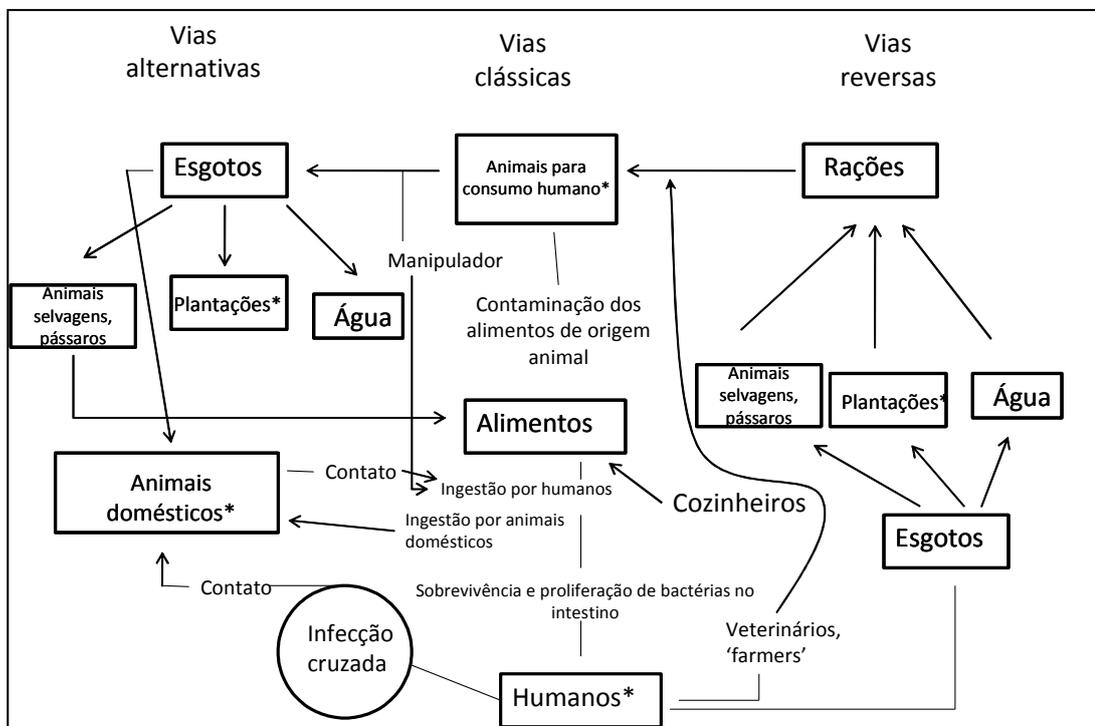


Figura 3. Algumas vias de transmissão de patógenos ou microbiota entre animais, ecossistemas e

seres humanos. *Administração de antimicrobianos

Fonte: Adaptado de Phillips et al., 2004

Tabela 1 - Lista dos aditivos proibidos na alimentação animal e legislação correspondente

Aditivo	Legislação
Avoparcina	Of. Circular DFPA Nº 047/98
Cloranfenicol e Nitrofuranos	Instrução Normativa 09, 27/06/2003
Arsenicais e antimoniais	Portaria 31, 29/01/2002
Penicilina, tetraciclina, sulfonamidas sistêmicas	Portaria 193, 12/05/1998
Olaquinox	Instrução Normativa 11, 24/11/2004
Violeta de Genciana	Instrução Normativa 34, 13/09/2007
Carbadox	Instrução Normativa 35, 14/11/2005
Anabolizantes para bovinos	Instrução Normativa 10, 27/04/2001
Hormônios como aditivos alimentar em aves	Instrução Normativa 17, 18/06/2004

Fonte: BRASIL, 2011.

1.3.1 Resistência mediada por Beta-lactamases

A produção de beta-lactamases constitui o principal mecanismo associado à resistência aos antibióticos beta-lactâmicos: penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens (Figura 4). Essas enzimas são diversas em estrutura e preferência de substrato e, diante da multiplicidade de beta-lactamases descritas, existem dois esquemas de classificação.

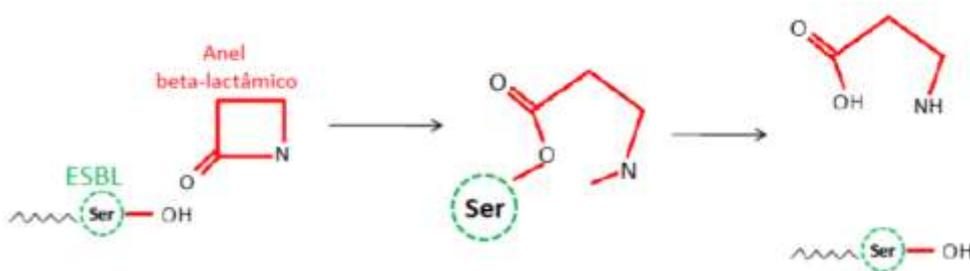


Figura 4. Mecanismo de hidrólise de antibiótico beta-lactâmico por ESBL. A enzima associa-se não covalentemente ao anel beta-lactâmico. O anel é então atacado pela hidroxila livre do lado do sítio ativo do resíduo de serina, resultando na formação de um grupo acil-éster. A hidrólise finalmente libera a enzima ativa e o antibiótico hidrolisado inativo, formando-se água e ácido penicilóico. Ser, serina.

O esquema proposto por Bush-Jacoby-Medeiros se baseia na preferência de substrato da enzima e inativação frente a inibidores específicos (BUSH, 1995; BUSH e JACOBY, 2010). Nessa classificação, as ESBL pertencem ao grupo 2be (enzimas do tipo TEM, SHV e CTX-M) ou grupo 2d (ESBL do tipo OXA). Já o esquema de classificação de Ambler considera a similaridade entre a cadeia de aminoácidos das enzimas, agrupando-as em quatro tipos: A, B, C e D; de modo que as enzimas do tipo ESBL pertencem à classe A de Ambler, exceto aquelas da família OXA, as quais pertencem à classe D. Atualmente, são descritas 203 enzimas do tipo OXA, das quais algumas são classificadas como ESBL: OXA-11, OXA-14, OXA-15, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA-28, OXA-32, OXA-34, OXA-35, OXA-36, OXA-53, OXA-141, OXA-142, OXA-145, OXA-147 e OXA-161 (BUSH e JACOBY, 2011). De qualquer maneira, as enzimas pertencentes às classes A e D são reconhecidas por possuírem um resíduo de serina em seu sítio ativo.

Outro grupo de enzimas com sítio ativo de serina e capazes de hidrolisar cefalosporinas são as beta-lactamases do tipo AmpC, as quais são resistentes aos inibidores clavulanato, sulbactam e tazobactam e, portanto, não são classificadas como ESBL. Essas enzimas podem ser cromossomais ou plasmidiais, e pertencem ao grupo 1 na classificação de Bush-Jacoby-Medeiros e ao grupo C na classificação de Ambler (JACOBY, 2009).

Os métodos para identificação fenotípica de ESBL incluem a utilização de fitas comerciais de E-test ESBL (AB Biodisk, Solna, Sweden), no qual a queda de pelo menos três vezes na Concentração Inibitória Mínima do antibiótico quando o mesmo é associado a um inibidor indica a produção de ESBL (FERNANDES et al., 2009; HARADA et al., 2008). Outro método é o teste de aproximação de discos (sigla em inglês, DDST), no qual discos de cefalosporinas são colocadas a 30 mm de distância de disco com inibidor (clavulanato, tazobactam, sulbactam), havendo sinergismo entre os substratos e o inibidor, a produção de ESBL é confirmada (RADICE et al., 2002). A zona de sinergismo é comumente denominada de “zona fantasma” (Figura 5). Geralmente, utilizam-se várias cefalosporinas no teste, incluindo cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina e cefepime. Quando há resistência à cefoxitina e ao inibidor e sensibilidade a cefepime, infere-se a produção de AmpC. Nesse caso, é preciso um pouco de cautela, uma vez que a resistência à cefoxitina pode ser mediada por outros mecanismos, tais como bombas de efluxo, perda da expressão de porinas e produção de

determinadas carbapenemases (JACOBY, 2009). O teste do disco combinado também é uma alternativa para a triagem de ESBL. Nesse teste, quando há uma diferença de 5 mm do diâmetro do halo de inibição entre o disco de cefalosporina e seu respectivo disco combinado com inibidor infere-se a produção de ESBL (CARTER et al., 2000).

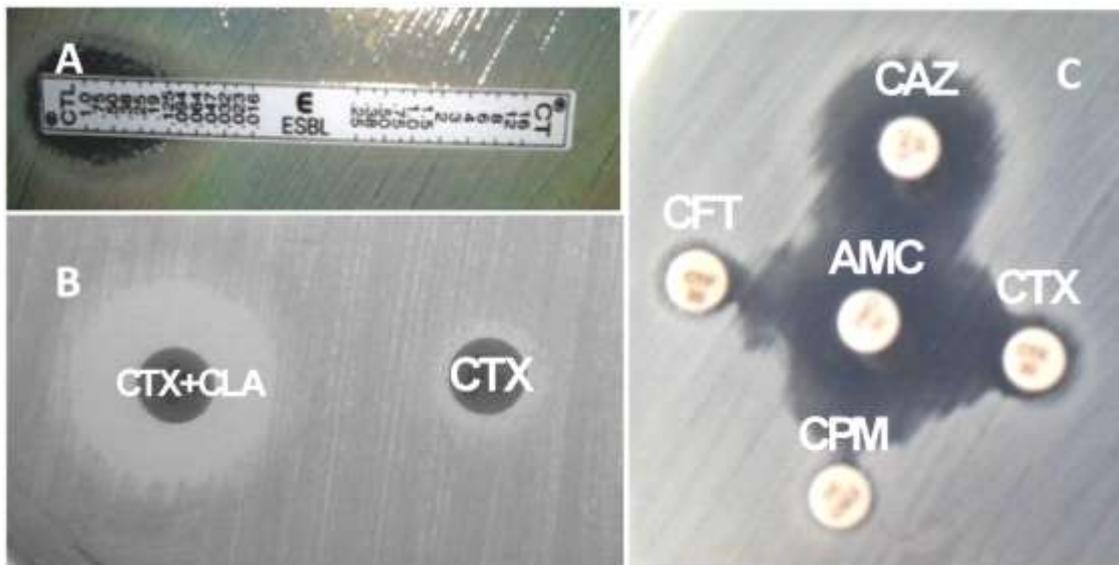


Figura 5. Métodos fenotípicos para detecção de beta-lactamases de amplo espectro. A. ESBL E-test. **B.** Teste do disco combinado. **C.** Teste da aproximação de discos. AMC, amoxicilina+ácido clavulânico; CTX, cefotaxima; CLA, ácido clavulânico; CAZ, ceftazidima; CFT, ceftiofur; CPM, cefepime.

1.3.1.1 ESBL: histórico

A primeira beta-lactamase codificada por elemento genético móvel foi identificada em *Escherichia coli* isolada de um paciente chamado Temoniera, o qual originou o nome da enzima, TEM-1 (DATTA e KONTOMICHALOU, 1965). A localização em plasmídeos e transposons de TEM-1 possibilitou sua disseminação por transferência horizontal, além de outras espécies de *Enterobacteriaceae*, em *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (PELLEGRINO et al., 2002; RADICE et al., 2002). Da mesma maneira, SHV-1 tornou-se mundialmente disseminada.

Devido a prevalência e disseminação das beta-lactamases, as cefalosporinas de terceira geração foram introduzidas na prática médica na década de 1980, tendo estrutura molecular

resistente à ação das enzimas descritas até então. Porém, a pressão seletiva exercida pelo uso intensivo dessas novas drogas ocasionou a emergência de cefalosporinases com espectro de atividade estendido, de modo que em 1983 foi feita a primeira descrição de uma ESBL, denominada SHV-2 por diferir em apenas um aminoácido da enzima SHV-1 (KNOTHE, 1983). Na América Latina, a primeira descrição de ESBL foi feita no Chile, sendo reportada a presença de SHV-5 em *K. pneumoniae* (GUTMANN et al., 1989).

Já em 1990, Bauerfeind reportou na Alemanha a produção de uma cefalosporinase não pertencente às famílias TEM ou SHV, denominada de CTX-M-1 (BAUERNFEIND, 1990), idêntica à enzima MEN-1, identificada na França (BAUERNFEIND, 1996; BERNARD et al., 1992). No mesmo período, vários relatos da enzima CTX-M-2 ocorreram na Argentina (BAUERFEIND, 1990, 1992; QUINTEIROS et al., 2003). Posteriormente, o sequenciamento do gene codificador da enzima FEC-1 (número de acesso no Genbank AB098539) descrita no Japão em 1986 demonstrou sua similaridade com outras enzimas do tipo CTX-M (MARTINS et al., 2007), sendo esta a primeira descrição de enzima do tipo CTX-M (QUINTEIROS et al., 2003). Desde então, as enzimas da família CTX-M disseminaram-se de forma acelerada nos cinco continentes, sendo que dados presentes na literatura sugerem que elas se tornaram mais prevalentes que as enzimas do tipo TEM e SHV. No Brasil, a primeira enzima do tipo CTX-M foi identificada na década de 1990 (BONNET et al., 2000).

Outras famílias de ESBL tem sido identificadas em menor número: PER, GES, VEB, BES, TLA, SFO e IBC (BUSH e JACOBY, 2011; RADICE et al., 2002).

1.3.1.1.1 ESBL no Brasil

As beta-lactamases de espectro estendido tornaram-se o principal problema de saúde pública no que diz respeito às infecções nosocomiais e comunitárias por membros da família *Enterobacteriaceae*, destacando-se a rápida disseminação dessas enzimas e o surgimento constante de novas variantes. No Brasil, a produção de ESBL em *Enterobacteriaceae* também é alarmante, uma vez que variantes do tipo TEM, SHV, CTX-M, OXA, BES, GES e VEB tem sido descritas (Figura 6).

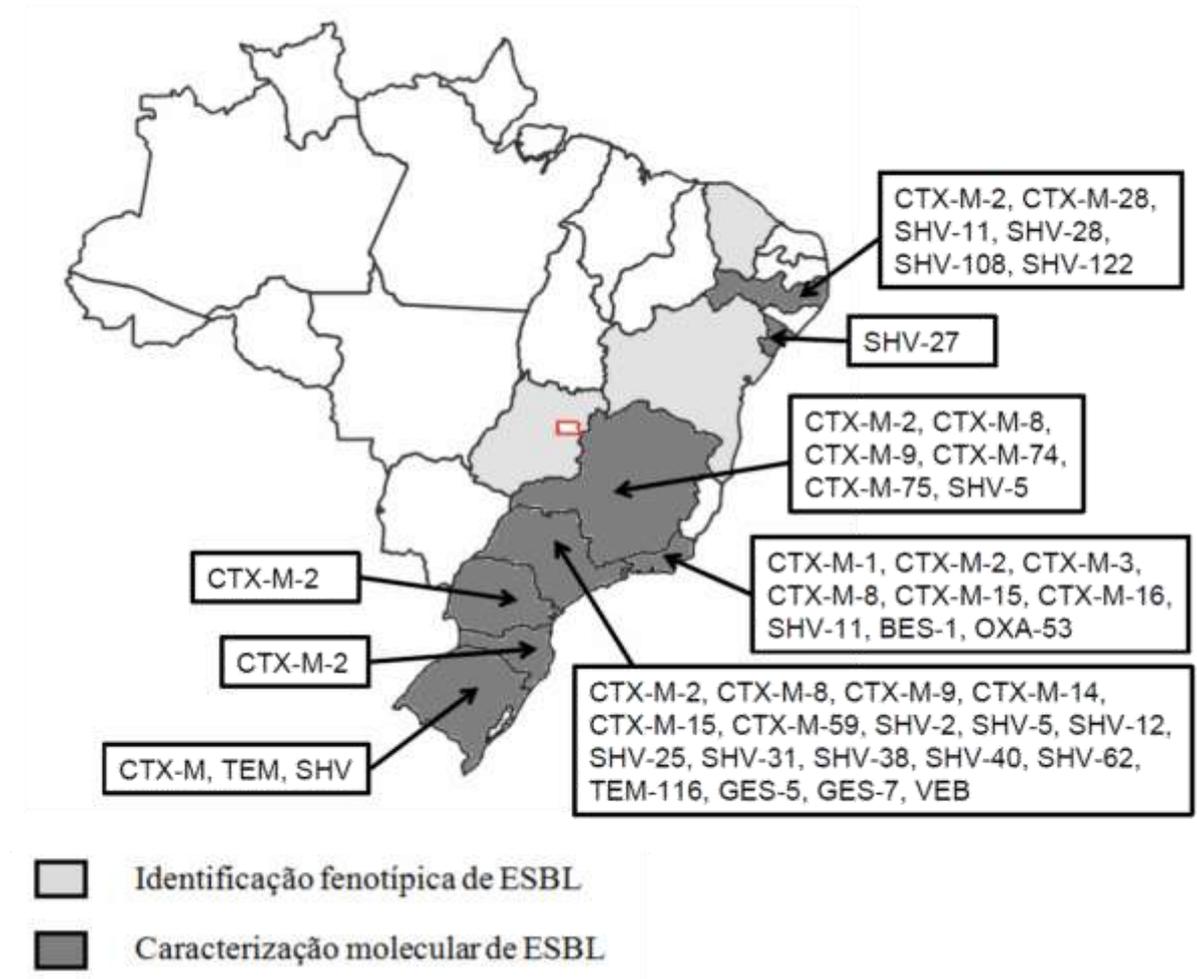


Figura 6. Epidemiologia das ESBL no Brasil segundo as diferentes unidades federais

Fonte: Bonnet et al. 2000 a,b, 2001); Cergole-Novella et al. (2010); Corkill et al. (2001); Dropa (2006); Dropa et al. (2010); Fernandes et al. (2009); Garcia. et al.(2008); Brasil, 2011; Minarini et al. (2007a, b, 2008, 2009); Murley et al. (2004) ; Oliveira et al.(2009); Picão et al.(2010) ; Santos (2006); Santos et al. (2008); Silva et al. (2006); Silva et al. (2010); Tollentino et al. (2011); Veras et al. (2011).

Infelizmente, não existem programas de vigilância de abrangência nacional no que diz respeito a resistência bacteriana e seus mecanismos, sendo difícil estimar a proporção de produtores de ESBL na federação.

Por outro lado, as enzimas pertencentes à família CTX-M tem sido predominantes na América do Sul, assim como na Espanha e leste europeu (MINARINI et al., 2009; QUINTEIROS et al., 2003; VILLEGAS et al., 2011). Dessa maneira, segundo o número crescente de descrições dessas enzimas no Brasil, infere-se que variantes do tipo CTX-M também sejam predominantes no país em comparação às enzimas do tipo TEM e SHV, prevalentes na América do Norte e oeste europeu, respectivamente (MINARINI, 2009). Ainda dentro da família CTX-M, as beta-lactamases mais frequentemente isoladas em território brasileiro incluem os grupos CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 (BONNET et al., 2000; CLIMACO et al., 2010; FERNANDES et al., 2009; GARCIA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; PICÃO et al., 2010).

Com relação à família *Enterobacteriaceae*, o isolamento de ESBL tem sido descrito em diversos patógenos de origem hospitalar e comunitária, incluindo *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus mirabilis* e *Serratia marcescens* (BONNET et al., 2000; CASSETARI et al., 2009; CERGOLE-NOVELLA et al., 2010; CLIMACO et al., 2010; CORKILL et al., 2001 ; MINARINI et al., 2008; MURLEY et al., 2004 ; TOLLENTINO et al., 2011) . Porém, o ponto de urgência clínica tem sido a alta prevalência de ESBL em *Klebsiella* e *Escherichia coli*, os principais enteropatógenos associados a infecções relacionadas a assistência a saúde (IRAS). Além disso, a promiscuidade de plasmídeos carregando genes *bla*_{ESBL} tem sido retratada na identificação de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* carregando enzimas do tipo CTX-M-2 em integron de classe 1 (PICÃO et al., 2010).

1.4 Resistência a quinolonas mediada por plasmídeos

No ano de 1962 foi introduzida na clínica médica a primeira quinolona, o ácido nalidíxico. Em meados da década de 80, foi lançada a ciprofloxacina, a primeira fluoroquinolona com amplo espectro de atividade, desde então, surgiram outras quinolonas, cuja adição de flúor tornava a molécula mais estável e com maior espectro de atividade.

Atualmente, as quinolonas são drogas usadas largamente na clínica médica e em medicina veterinária para controlar infecções por Gram-negativos (CATTOIR V, NORDMANN, 2009). Na clínica médica constituem uma alternativa no tratamento de diversas infecções, incluindo infecções extra-intestinais por *Escherichia coli* e *Salmonella*

spp., especialmente por estirpes produtoras de ESBL. Em medicina veterinária, o ácido nalidíxico e a enrofloxacin são amplamente utilizados para controlar a presença de agentes bacterianos na produção animal, especialmente *Escherichia coli*, um dos principais patógenos em aves e suínos (PHILIPS et al., 2004).

As quinolonas associam-se as enzimas DNA gyrase e Topoisomerase IV, impedindo o enovelamento da molécula de DNA, tendo efeito bactericida. Originalmente, mutações acumuladas no sítio ativos das enzimas DNA gyrase e Topoisomerase IV constituíam o principal mecanismo de resistência as quinolonas (JACOBY, 2005). Em 1998 genes do tipo *qnr* foram descobertos, os quais codificam pentapeptídeos repetidos que protegem a enzima DNA gyrase da ação dos antibióticos, ligando-se ao sítio ativo da enzima em vez do DNA. Essa ligação entre proteínas do tipo Qnr e a enzima DNA gyrase ocorre independentemente do complexo enzima-DNA, DNA livre ou concentração de quinolonas (ROBICSEK, JACOBY, HOOPER, 2006). Os genes *qnr* agrupam cinco famílias: *qnrA*, *qnrS*, *qnrB*, *qnrC* e *qnrD*.

Considerando a origem dos genes *qnr*, acredita-se que *Shewanella algae* seja o reservatório de genes do tipo *qnrA*, pois foram encontrados variantes desses genes em seu cromossomo, além disso, proteínas de pentapeptídeos repetidos com 40 a 67% de similaridade com *qnrA* foram identificadas em outras espécies de *Shewanellai* (NORDMANN e POIREL, 2005). Os genes *qnrB* foram identificados em espécies bacterianas marinhas e os genes *qnrS* também tem sido encontrados em microorganismos aquáticos, tais como *Aeromonas* spp. (POIREL et al., 2008) A integração dos genes *qnr* em diferentes plasmídeos proporcionou a rápida disseminação desse mecanismo de resistência a quinolonas (POIREL; CATTOIR; NORDMANN, 2006).

Além dos genes *qnr*, a resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) pode ser devido a presença do gene *aac6Ib-cr*, um variante do gene *aac6Ib*, que leva a acetilação das moléculas de fluoroquinolonas, tornando-as inativas (NORDMANN e POIREL, 2005; PARK, C. H. et al., 2006). Outros mecanismos também podem estar envolvidos na resistência a quinolonas, tais como superexpressão de bombas de efluxo e perda da expressão de porinas (JACOBY, 2005; LUNN et al. 2010; NORDMANN e POIREL, 2005).

1.5 Objetivos gerais

Caracterizar os mecanismos de resistência em isolados de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de animais de produção agropecuária e alimentos derivados com ênfase na resistência às cefalosporinas de amplo espectro e fluoroquinolonas de uso clínico e veterinário.

1.5.1 Objetivos específicos

- Determinar o perfil de suscetibilidade antibacteriana em isolados de *Salmonella* spp. recuperadas de amostras coletadas em aves e suínos, frente a antibióticos de uso clínico humano e veterinário;
- Caracterizar os genes de resistência antibacteriana carregados por isolados de *Salmonella* spp. recuperadas de amostras coletadas de aves, suínos e fontes relacionadas;
- Pesquisar a produção de beta-lactamases de amplo espectro e AmpC, e seus determinantes genéticos nos isolados de *Salmonella* spp. e *E. coli*;
- Pesquisar determinantes de resistência a quinolonas mediados por plasmídeos;
- Determinar o grupo filogenético nos isolados de *E. coli*;
- Investigar a similaridade genética entre os isolados produtores de ESBL e/ou AmpC e entre os isolados com resistência adquirida às quinolonas;
- Investigar a transferência horizontal de genes codificadores de ESBL, AmpC e proteínas Qnr.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microorganismos estudados

2.1.1 *Salmonella spp.*

Um total de 93 amostras de *Salmonella spp.* foram coletadas do ciclo de produção aviária, pelo laboratório de Ornitologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em cinco estados brasileiros (Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Paraná e Santa Catarina) no período 2005-2009. Todas as linhagens foram ativadas em MacConkey, identificadas por série bioquímica (BERGEY'S MANUAL, 1994) e conservadas em glicerol 20% (-20 °C) e TSA semi-sólido.

As 50 amostras de suínos foram cedidas pelo laboratório de Sanidade Suína da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, todas provenientes de granjas de suínos comerciais do estado de Minas Gerais no período de 2005 a 2008. Essas amostras foram triadas previamente pela FMVZ (USP) quanto a sensibilidade a antimicrobianos utilizados em medicina veterinária e apenas as amostras resistentes a antibióticos das classes quinolonas (ácido nalidíxico, enrofloxacina) e/ou beta-lactâmicos (ampicilina, cefalosporinas) foram cedidas para a caracterização dos mecanismos de resistência.

2.1.2 *Escherichia coli*

As cepas de *Escherichia coli* foram triadas quanto a resistência a cefalosporinas de terceira geração e fluoroquinolonas pela FMVZ (USP) e apenas as amostras resistentes foram cedidas pelos laboratórios de Ornitologia e de Sanidade Suína da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Assim, foram incluídas no trabalho um total de 27 cepas de *E. coli* resistentes ao ceftiofur e 47 resistentes a fluoroquinolonas. As amostras são provenientes de granjas de aves ou suínos comerciais do estado de Minas Gerais e São Paulo coletadas no período de 2008 a 2010. Os isolados clínicos de *E. coli* foram cedidos por colaboradores que realizaram pesquisas anteriores. Todas as amostras foram

ativadas em MacConkey, identificadas por série bioquímica (BERGEY'S MANUAL, 1994) e conservadas em glicerol 20% (-20 °C) e TSA semi-sólido.

2.2 Testes de susceptibilidade

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinado pelo método de Kirby-Bauer, seguindo as normas padronizadas pelo CLSI (2009 a, b) com os seguintes discos de antibióticos: ácido nalidíxico (30 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg), amicacina(30 µg), ampicilina (32 µg), cefepime (30 µg), cefoxitina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ceftiofur (uso veterinário) (30 µg) , ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (32 µg), enrofloxacina (uso veterinário) (2 µg) (23), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), sulfametoxazol/trimetroprima (4 µg) e tetraciclina (16 µg). A Concentração Inibitória Mínima foi determinada para cujos antibióticos as linhagens mostraram-se resistentes, utilizando-se o método de diluição em ágar ou E-test seguindo as recomendações do CLSI (2009) e do fabricante (AB Biodisk Solna, Sweden). A cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade dos testes.

2.3 Detecção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC

A detecção de ESBL e AmpC foi realizada através do teste de dupla difusão do disco utilizando discos de cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina e ceftiofur, como substratos, e amoxicilina/ácido clavulânico como inibidor (DROPA et al. 2006; RAWAT; NAIR 2010). Posteriormente, fitas de E-test com cefotaxima como substrato e clavulanato como inibidor (RAWAT, NAIR, 2010) foram utilizadas para confirmar a produção de ESBL. A produção de AmpC foi inferida mediante resistência a cefoxitina ao inibidor ácido clavulânico.

2.4 Extração de DNA, detecção dos genes de resistência e integrons de classe 1

O DNA de todas as cepas resistentes a pelo menos um antibiótico foi extraído pelo método da fervura (CHAPMAN et al., 2001), que consistiu em alíquotar 2 ml de cultura bacteriana e centrifugá-la durante 3 minutos a 4000 rpm a 4 °C. O precipitado foi

ressuspendido em 100 µl de água destilada estéril e submetido à fervura por 10 minutos e depois deixado em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 10000rpm a 4 °C e o sobrenadante contendo DNA foi aliquoteado e armazenado a -20 °C.

Os genes de resistência foram pesquisados por PCR com volume final da reação 50 µL contendo: 100 ng DNA; 10X PCR buffer [Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl] (Fermentas, USA), 1,5 mM MgCl₂ (Fermentas); 200 µM de cada dNTP (Fermentas); 25 pmol de cada iniciador, e 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas). O produto de PCR foi detectado após eletroforese em gel de agarose 1%, correndo em paralelo um marcador de DNA de peso molecular de 100bp (New England Biolabs, UK) . A pesquisa por integrons de classe 1 também foi realizada por PCR. A sequência dos iniciadores e temperatura de anelamento utilizados na pesquisa de ESBL são descritos na Tabela 2. Os genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetG* (resistência a tetraciclinas); *sul1*, *sul2* e *sul3* (resistência a sulfonamidas), *floR* (resistência ao cloranfenicol); *ant2* , *ant4*, *aac6*, *aadD*, *aadB*, *aadA*, *aadA1* (resistência a aminoglicosídeos), *qnrB*, *qnrA*, *qnrS* (fluoroquinolonas), *bla_{CMY-2}* (produção de AmpC) e integrons de classe 1 foram amplificados utilizando primers e condições descritos previamente (PEIRANO et al. 2006; RIBEIRO et al.2011; PAVEZ et al., 2008; ROBICSEK, JACOBY, HOOPER, 2006; PARK et al. 2006). Foram utilizados controles positivos de cada gene para validar as reações de PCR.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados na amplificação dos genes *bla*_{ESBL}

Gene	Iniciadores (5' → 3')	Anelamento (°C)	Amplicon
<i>bla</i> _{TEM}	F: ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT G R: TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA G	51	861
<i>bla</i> _{SHV}	F: ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG R: GTT AGC GTT GCC AGT GCT CG	53	573
<i>bla</i> _{CTX-M}	F: TTT GCG ATG TGC AGT ACC AGT AA R: CGA TAT CGT TGG TGG TGC CAT A	55	544
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	F: GCG ACC TGG TTA ACT ACA ATC R: CGG TAG TAT TGC CCT TAA GCC	55	351
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	F: GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC R: AGC CGC CGA CGC TAA TAC A	56	499
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	F: CAC ACG TGG AAT TTA GGG ACT R: GCC GTC TAA GGCGAT AAA CA	56	564

2.5 Sorotipagem de *Salmonella* spp.

A sorotipagem das cepas de *Salmonella* foi realizada pelo Instituto Adolfo Lutz, baseada na variação antigênica dos antígenos somáticos “O” e flagelar “H” seguindo o esquema de Kauffmann-White para sorotipagem de *Salmonella* spp. (POPOFF et al., 2004). Apenas as amostras de *Salmonella* produtoras de ESBL foram sorotipadas.

2.6 Extração de DNA plasmidial e ensaios para transferência de plasmídeos

A extração de plasmídeos foi realizada segundo protocolo previamente descrito (BIRBOIM e DOLY, 1979). A mobilização genética dos genes determinantes da produção de ESBL e AmpC, além dos genes do tipo *qnr*, foi avaliada mediante ensaios de transformação utilizando a cepa *E. coli* Top 10 como linhagem receptora. Assim, cultura de 18h da linhagem receptora em meio Luria-Bertani foi submetida a centrifugação e o *pellet* ressuspendido em 30ml de solução contendo 80mM de cloreto de magnésio e 20mM de

cloreto de cálcio. A suspensão foi novamente centrifugada e o *pellet* ressuspendido em 2ml de cloreto de cálcio 10mM. Posteriormente, 5µl do plasmídeo extraído foi adicionado a 50µl de suspensão de células competentes. A mistura foi submetida a incubação a 0°C por 30min seguida de incubação em banho-maria 42°C por 90s e uma segunda incubação de 2min a 0°C. Logo após as incubações, a suspensão foi plaqueada em meio Mueller Hinton contendo 0,8µg/ml de cefotaxima para selecionar as colônias que adquiriram genes codificadores de beta-lactamases e 0,03µg/ml de ciprofloxacina para selecionar colônias que adquiriram genes do tipo *qnr*. Para avaliar o sucesso da transformação, foi extraído DNA das linhagens *E. coli* TOP 10, previamente transformadas, e a confirmação da aquisição dos genes de resistência foi feita por análise do produto de PCR. Além disso, foi realizada extração do DNA plasmidial de *E. coli* Top 10 após a transformação para avaliar o tamanho do plasmídeo transferido.

2.7 Análise filogenética das cepas de *Escherichia coli* e determinação do perfil genotípico por ERIC-PCR

O grupo filogenético dos isolados de *E. coli* foi determinado segundo o esquema proposto por Clermont et al. (2000). Para avaliar a disseminação clonal dos isolados de *E. coli*, os padrões genotípicos obtidos por ERIC-PCR(5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3') (LIPMAN, 1995; SYRMIS et al., 2004) foram comparados mediante a construção de dendrograma utilizando o software Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), coeficiente de Dice 1%. Os perfis que apresentaram coeficiente de similaridade igual ou superior a 90% foram considerados clonais.

2.8 Tipagem de *Escherichia coli* por Multilocus Sequence Typing (MLST)

Para ambas as linhagens de *E. coli* produtoras de CTX-M-15, sete genes conservados (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* and *recA*) foram amplificados e sequenciados de acordo com o protocolo descrito no web site para *E. coli* MLST (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>). Os perfis alelicos da sequencia dos sete genes, e os tipos de sequencia (STs) e a sequencia dos complexos foram obtidos da database para MLST de *E. coli* disponível no site (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>).

2.9 Determinação do perfil genotípico de *Salmonella* spp. por Eletroforese de campo pulsado (PFGE)

O perfil genotípico das amostras de *Salmonella* spp. foi avaliado por PFGE utilizando a enzima *XbaI*-*digested* genomic DNA segundo o protocolo proposto pela National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance (PulseNet) (CDC, 1999, 2000) (PETERS, 2009). Os diferentes perfis de macrorestrição foram comparados e agrupados utilizando o coeficiente de Dice com tolerância de 2% com apresentação gráfica em dendrograma, mediante a utilização do software Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os perfis que apresentaram coeficiente de similaridade igual ou superior a 90% foram considerados clonais. A cepa *Salmonella* Thyphimurium LT2 foi utilizada como controle de qualidade.

3 RESULTADOS

No presente estudo, foram encontradas altas taxas de resistência a antibióticos de diferentes classes, nos isolados de *Salmonella* spp. recuperados de amostras coletadas de ambientes de criação de aves e alimentos relacionados, assim como, de amostras de fezes de suínos comerciais. A produção de beta-lactamases foi identificada em 13 isolados de *Salmonella enterica*, que foram agrupados em dois principais *clusters*, após análise dos padrões de macrorestrição gerados a partir do PFGE. Considerando *E. coli*, 24 amostras eram produtoras de CTX-M-2, duas de CMY-2 e uma amostra era produtora de CTX-M-15. Este último isolado foi comparado a uma cepa clínica de *E. coli* produtora de CTX-M-15, recuperada de um caso inédito de infecção urinária, no Brasil (LENA, 2011). Além disso, a presença de genes *qnr* foi identificada em 5 isolados de *E. coli*. Ainda em relação aos isolados de *E. coli*, foi caracterizada uma grande diversidade clonal, por ERIC-PCR, entre os isolados MRs. Os ensaios de transferência de plasmídeos foram realizados com sucesso para as amostras que carregavam genes do tipo *bla*_{ESBL} e *bla*_{CMY-2}, de modo que as cepas de *E. coli* Top 10 transformadas apresentaram fenótipo e genótipo compatíveis com o respectivo fenótipo de beta-lactamase da cepa doadora. Adicionalmente, para alguns isolados, genes do tipo *qnr* foram co-transferidos com os genes *bla*_{CTX-M/CMY-2}.

3.1 Determinação do perfil de suscetibilidade antibacteriana frente a antibióticos de uso clínico humano e veterinário, e identificação de genes de resistência, nos isolados de *Salmonella* spp. recuperados de amostras coletadas de aves e fontes relacionadas

Na Tabela 3 são apresentadas as taxas de resistência aos diferentes antimicrobianos testados, os respectivos valores da CIM e os genes de resistência identificados em 93 isolados de *Salmonella* spp. recuperadas das amostras coletadas de aves e fontes relacionadas.

Os maiores percentuais de resistência foram para o ácido nalidíxico (45,16%), tetraciclina (32,25%), ampicilina (26,88%) e estreptomicina (26,88%), observando-se altos valores de CIM. Considerando as fluoroquinolonas e as cefalosporinas, as taxas de resistência foram ligeiramente altas, sendo identificados os mesmos percentuais de resistência frente a cefalosporinas de uso clínico (i. e. cefotaxima, ceftriaxona, cefepime, ceftazidima) e veterinário (i. e. ceftiofur). Da mesma maneira, as amostras resistentes à enrofloxacin (uso

veterinário) eram também resistentes à ciprofloxacina (uso humano). Quanto aos mecanismos de resistência, foram identificados os genes *tetA* (n=8) e *tetB* (n=6) conferindo resistência à tetraciclina enquanto os genes *sul1* (n=1) e *sul2* (n=1) foram identificados em cepas resistentes à sulfametoxazol/trimetoprim. A resistência aos aminoglicosídeos frequentemente esteve associada a presença do gene *aadA1* (n=6), *aadA* (n=5) e *ant2* (n=4). Por outro lado, não foram identificados genes do tipo *qnr* nas amostras resistentes às quinolonas.

Tabela 3 - Resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp. isoladas (N = 93) do ciclo de produção avícola, frequência dos genes de resistência e valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Antibiótico	Amostras resistentes n(%)	Gene de resistência (n)	CIM (µg/ml)	
			CMI ₅₀	CMI ₉₀
Ácido nalidíxico	42 (45,16)		>512	>512
Ciprofloxacina	17 (18,27)		4	16
Enrofloxacina	17 (18,27)		4	16
Tetraciclina	30 (32,25)	<i>tetA</i> (8), <i>tetB</i> (6)	>64	>64
Ampicilina	25 (26,88)		>256	>256
Cefepime	13 (13,97)	<i>bla</i> _{CTX-M-2} (13)	>512	>512
Cefotaxima	13 (13,97)		>256	>256
Ceftriaxona	13 (13,97)		>256	>256
Ceftazidima	13 (13,97)		16	32
Ceftiofur	13 (13,97)		>256	>256
Estreptomicina	25 (26,88)	<i>aadA</i> (5), <i>aadA1</i> (6)	>256	>256
Canamicina	5 (5,37)	<i>ant2</i> (4)	>512	>512
Gentamicina	4 (4,30)		>64	>64
Sulfametoxazol-trimetoprim	5 (5,37)	<i>sul1</i> (1), <i>sul2</i> (1)	>32	>32
Cloranfenicol	3 (3,22)		64	>256
Amicacina	0 (0)		<64	<64
Imipenem	0 (0)		<4	<4

3.2 Determinação do perfil de suscetibilidade antibacteriana frente a antibióticos de uso clínico humano e veterinário, e identificação de genes de resistência, nos isolados de *Salmonella* spp. recuperados de amostras coletadas de suínos comerciais

Na Tabela 4 são apresentadas as taxas de resistência aos diferentes antimicrobianos, os respectivos valores da CIM e os genes de resistência identificados em 50 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de suínos comerciais no estado de Minas Gerais. Os maiores percentuais de resistência foram encontrados para ampicilina (90%), tetraciclina (80%), sulfametoxazol (60%) e ácido nalidíxico (52%) apresentando altos valores de CIM. Não foram identificadas cepas resistentes a amicacina, carbapenens e cefalosporinas. Por outro lado, a resistência a fluoroquinolonas foi ligeiramente alta, não sendo identificada a presença de genes do tipo *qnr*. A resistência a tetraciclina foi mediada principalmente pelos genes *tetA* (n=20) e *tetB* (n=17) enquanto os genes *sul1* (n=23), *sul2* (n=16) e *sul3* (n=2) estiveram relacionados a resistência ao sulfametoxazol. As amostras resistentes aos aminoglicosídeos carregavam principalmente o gene *aadA1* (n=22) e, em menor frequência, o gene *ant2* (n=4). Por sua vez, o gene *floR* foi identificado em três cepas resistentes ao cloranfenicol.

Tabela 4 - Resistência antimicrobiana em amostras de *Salmonella enterica* isoladas (N = 50) de suínos comerciais, frequência dos genes de resistência e valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Antibiótico	Amostras resistentes n (%)	Gene de resistência por classe de antibióticos (n)	CIM (µg/ml)	
			CMI ₅₀	CMI ₉₀
Ácido nalidíxico	26 (52)		>512	>512
Ciprofloxacina	9 (18)		4	4
Enrofloxacina	9 (18)		16	32
Tetraciclina	40 (80)	<i>tetA</i> (20), <i>tetB</i> (17)	>128	>128
Ampicilina	45 (90)		>256	>256
Estreptomicina	21 (42)	<i>aadA1</i> (22), <i>ant2</i> (4)	>256	>256
Canamicina	8 (16)		>512	>512
Gentamicina	21 (42)		>64	>64
Sulfametoxazol	30 (60)	<i>sul1</i> (23), <i>sul2</i> (16), <i>sul3</i> (2)	>1024	>1024
Cloranfenicol	18 (36)	<i>floR</i> (3)	>256	>256
Amicacina	0 (0)		<64	<64
Imipenem	0 (0)		<4	<4

3.3 Características epidemiológicas e genóticas, grupo filogenético, perfil de suscetibilidade antimicrobiana e produção de ESBL em isolados de *Escherichia coli* recuperados de suínos comerciais

Na Tabela 5, são apresentados os perfis de resistência de 24 amostras de *E. coli* resistentes ao ceftiofur isoladas de suínos comerciais com quadro diarréico. Todos os isolados carregaram genes codificadores de beta-lactamases do tipo CTX-M-2 e SHV-1. Do total dessas 24 amostras, 22 eram MRs e 17 carregavam integron de classe 1. Do total de 24 cepas, 46% e 29% pertenciam aos grupos de baixa virulência B1 e D, respectivamente. Por outro lado, 25% dos isolados pertenciam ao grupo D, altamente virulento. A análise dos fragmentos amplificados por ERIC-PCR demonstrou uma grande variabilidade genotípica entre os isolados de *E. coli* produtoras de CTX-M-2, não havendo relação clonal entre os mesmos. Para as cepas de *E. coli* foi utilizada a técnica de ERIC-PCR, pois a mesma já está bem padronizada para essa espécie enquanto o PFGE apresentou inconsistentes por dificuldades na padronização do método.

Figura 7. Dendrograma dos isolados de *Escherichia coli* produtoras de CTX-M-2 gerado a partir dos fragmentos amplificados por ERIC-PCR

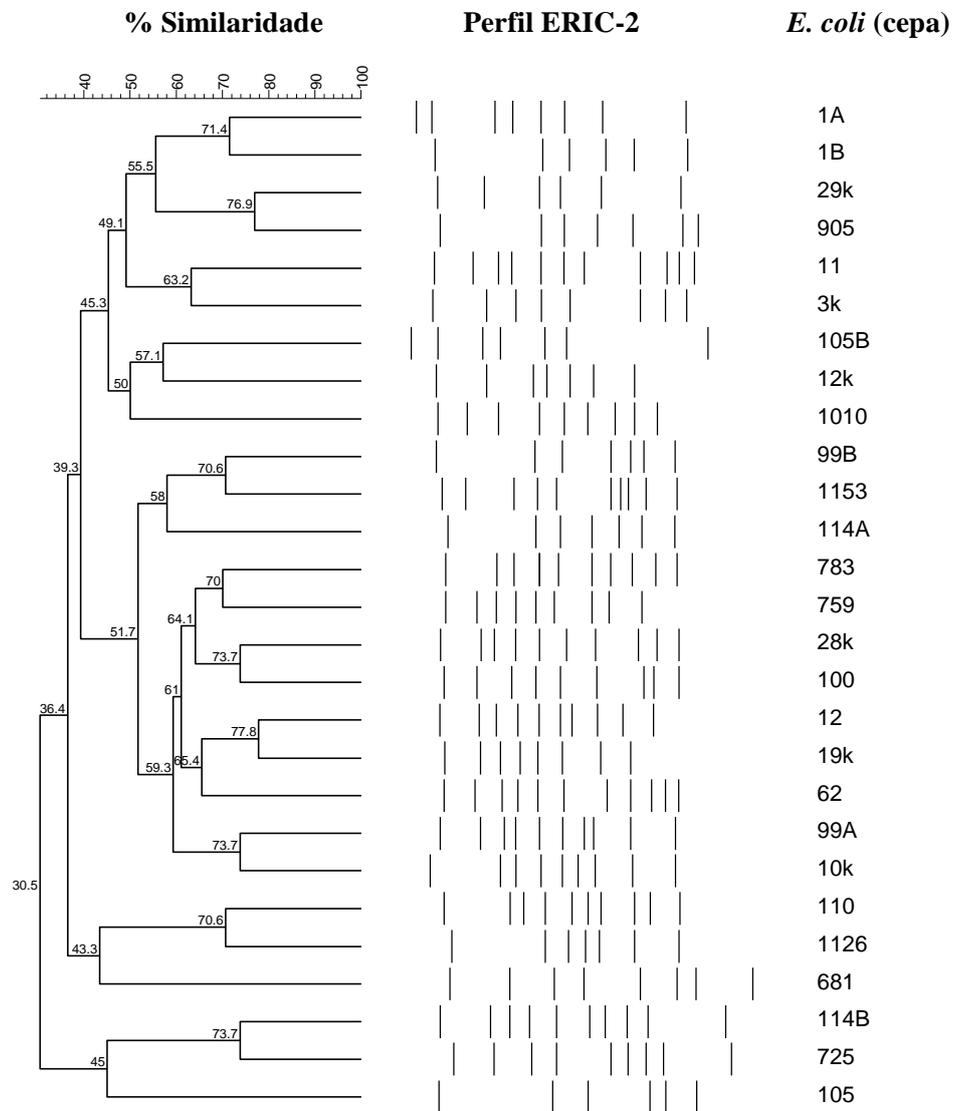


Tabela 5 - Características epidemiológicas, grupo filogenético, perfil de suscetibilidade antimicrobiana e genótipos de beta-lactamases em isolados de *Escherichia coli* resistentes ao ceftiofur, recuperados de suínos comerciais de Minas Gerais, Brasil

Cepa	Ano	Grupo filogenético	Perfil ERIC	Suscetibilidade antimicrobiana						Perfil de resistência	<i>bla</i> _{beta-lactamase}
				Ctx	Cro	CIM (µg/ml)		Eno	Cip		
01A	2008	D	I	4	8	1	32	16	16	Amp, Nal, Str, Tet	CTX-M-2, SHV-1
01B	2008	B1	II	128	16	1	256	16	16	Amp, Nal, Str, Tet	CTX-M-2, SHV-1
011	2008	D	III	>256	16	128	512	0,125	<0,125	Amp, Str, Kan, Sut, Tet	CTX-M-2, SHV-1
012	2008	A	IV	>256	16	128	512	>64	32	Amp, Clo, Kan, Nal, Str, Sut, Tet	CTX-M-2, SHV-1
99A	2008	B1	V	>256	8	64	512	16	16	Amp, Gen, Nal, Str, Sut, Tet	CTX-M-2, SHV-1
99B	2008	B1	VI	>256	16	64	512	32	16	Amp, Gen, Nal, Str, Sut, Tet	CTX-M-2, SHV-1
100	2008	A	VII	>256	16	256	512	4	2	Amp, Clo, Gen, Kan, Nal, Str, Sut, Tet	CTX-M-2, SHV-1
105	2008	A	VIII	>256	8	128	256	16	16	Amp, Clo, Nal, Str, Sut	CTX-M-2, SHV-1
109	2008	B1	IX	128	128	32	128	16	8	Amp, Clo, Gen, Kan, Nal, Str, Sut, Tet	CTX-M-2, SHV-1
110	2008	B1	X	256	16	32	128	16	16	Amp, Clo, Nal, Sut, Tet	CTX-M-2, SHV-1
114	2008	D	XI	64	4	32	128	0,125	0,125	Amp, Gen, Kan, Nal, Str, Sut, Tet	CTX-M-2, SHV-1
12K	2009	D	XII	64	2	0,06	128	>64	16	Amp, Nal, Str, Sut, Tet	CTX-M-2, SHV-1
3K	2010	B1	XIII	4	4	0,06	16	64	>32	Amp, Cip, Eno, Nal,	CTX-M-2, SHV-1
19K	2010	B1	XIV	16	4	0,06	64	>64	16	Amp, Clo, Gen, Kan, Nal, Str, Sut, Tet	CTX-M-2, SHV-1
28k	2010	A	XV	64	4	0,06	64	64	8	Amp, Nal	CTX-M-2, SHV-1
29K	2010	A	XVI	4	2	0,06	32	0,25	0,125	Amp, Clo, Kan, Nal, Str, Sut, Tet	CTX-M-2, SHV-1
10K	2010	B1	XVII	16	16	4	64	>64	32	Amp, Clo, Nal, Str, Sut, Tet	CTX-M-2, SHV-1
905	2010	D	XVIII	64	4	8	64	16	4	Amp, Clo, Kan, Nal, Str, Sut, Tet	CTX-M-2, SHV-1
062	2010	D	XIX	16	4	4	64	1	0,25	Amp, Kan, Sut	CTX-M-2, SHV-1
759	2010	B1	XX	16	4	2	64	>64	32	Amp, Nal	CTX-M-2, SHV-1
1153	2010	A	XXI	4	2	0,06	64	>64	4	Amp, Kan, Nal, Str, Tet	CTX-M-2, SHV-1
783	2010	A	XXII	4	4	8	64	0,5	0,125	Amp, Nal, Sut, Tet	CTX-M-2, SHV-1
1126	2010	B1	XXIII	16	16	2	64	>64	4	Amp, Clo, Nal, Str, Sut	CTX-M-2, SHV-1
1010	2010	B1	XIV	1	4	0,06	64	32	16	Amp, Clo, Gen, Nal, Str	CTX-M-2, SHV-1

3.4 Caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella enterica* produtoras de ESBL do tipo CTX-M-2 isoladas de aves e fontes relacionadas

A Tabela 6 apresenta o perfil multirresistente e o sorotipo das 13 cepas de *Salmonella enterica* produtoras de CTX-M-2 isoladas de aves comerciais, fontes relacionadas e alimentos derivados (ovos). Todas as 13 amostras carregavam integrons de classe 1, apresentando altos valores de CIM frente a cefalosporinas de uso clínico (cefotaxima, cefepime, ceftriaxona; CIM>256 µg/ml) e veterinário (ceftiofur, CIM>256 µg/ml), fluroquinolonas (CIM₉₀=4 µg/ml), tetraciclina (CIM>128 µg/ml) e estreptomicina (CIM>256 µg/ml). A análise do padrão de macrorrestrição gerados a partir do PFGE revelou a existência de dois principais *clusters* disseminados clonalmente (Figura 8). A transferência de plasmídeos para *E. coli* Top 10 foi positiva para sete isolados que cotinham plasmídeos de 24 kb, os quais conferiram genótipo de CTX-M-2 a cepa *E. coli* Top 10 transformada, a qual apresentou valor de CIM cinco vezes superior a cepa *E. coli* Top 10 não transformada.

Tabela 6- Características epidemiológicas e microbiológicas de *Salmonella enterica* multirresistentes carregando o gene *bla*_{CTX-M-2} isoladas do ciclo de produção avícola

Cepa	Sorotipo	Ave	Origem ^a	Mês/Ano (Estado)	PFGE	CIM (µg/ml)											
						Amp	Caz	Cro	Cpm	Ctx	Cft	Nal	Cip	Eno	Tet	Sut	Str
721A	Schwarzengrund	Peru	Swab arraste	07/08/SC	A	>256	32	>256	>512	>256	>256	>512	4	4	>128	0.12	>256
721B	Schwarzengrund	Peru	Swab arraste	07/08/SC	A	>256	64	>256	>512	>256	>256	>512	4	4	>128	0.12	>256
778	Schwarzengrund	Frango	Swab arraste	09/08/PR	A	>256	16	>256	>512	>256	>256	>512	4	4	>128	0.12	>256
783	Não tipada	Frango	Swab arraste	09/08/PR	A	>256	32	>256	>512	>256	>256	>512	4	4	>128	0.12	>256
779	Schwarzengrund	Frango	Swab arraste	09/08/PR	A1	>256	16	>256	>512	>256	>256	>512	4	4	>128	0.12	>256
776	Schwarzengrund	Frango	Swab arraste	09/08/PR	A2	>256	16	>256	>512	>256	>256	>512	4	4	>128	0.12	>256
780	Schwarzengrund	Frango	Swab arraste	09/08/PR	A2	>256	16	>256	>512	>256	>256	>512	4	4	>128	0.12	>256
782	Schwarzengrund	Frango	Swab arraste	09/08/PR	A2	>256	32	>256	>512	>256	>256	>512	4	4	>128	0.12	>256
784	Schwarzengrund	Frango	Swab arraste	09/08/PR	A2	>256	32	>256	>512	>256	>256	>512	4	4	>128	0.12	>256
785	Schwarzengrund	Frango	Swab arraste	09/08/PR	A2	>256	32	>256	>512	>256	>256	>512	4	4	>128	0.12	128
791	Schwarzengrund	Frango	Carcaça	12/08/SC	A3	>256	32	>256	>512	>256	>256	>512	4	2	>128	0.12	>256
769	Agona	Peru	Carcaça	10/08/SC	B	>256	1.0	>256	>512	>256	>256	>512	8	16	>128	>32	>256
770	Agona	Frango	Ovos	10/08/SC	B1	>256	4.0	>256	128	>256	>256	>512	16	16	>64	>32	>256

Amp, Ampicilina; Ctx, cefotaxima; Cro, ceftriaxona; Cpm, cefepima; Cft, ceftiofur; Cip, ciprofloxacina; Clo, cloramphenicol; Eno, enrofloxacin; Gen, gentamicina; Nal, ácido nalidíxico; Kan, canamicina; Str, estreptomycin; Sut, sulfametoxazol-trimetoprim, Tet, tetraciclina. PR,Paraná; SC, Santa Catarina. * CIM determinada por E-test apenas para as cepas resistentes a Sut; ^a Swab de arraste foi coletado da cama das matrizes.

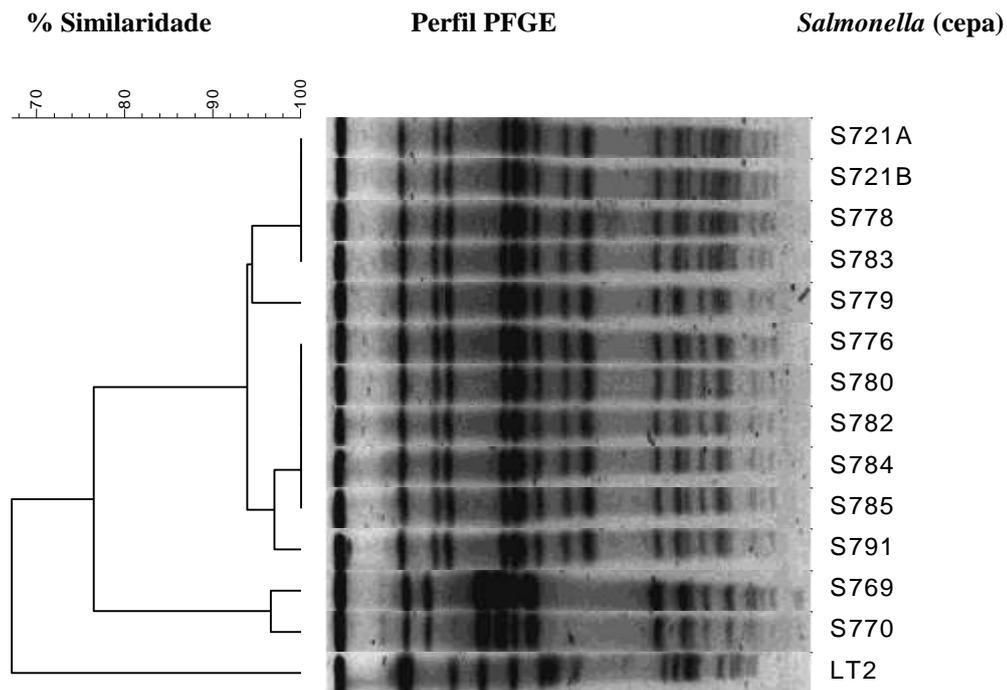


Figura 8. Dendrograma dos isolados de *Salmonella enterica* produtoras de ESBL gerado a partir dos padrões de macrorrestricção obtidos por PFGE

3.5 Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* produtora de CTX-M-15 e AmpC de origem animal e comparação com isolado clínico

Uma cepa de origem suína era produtora de ESBL do tipo CTX-M-15, pertencendo ao grupo filogenético de alta virulência B2 e a um novo ST (submetido para depósito no banco de dados <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>), o qual integra o complexo clonal 206 de *E. coli*. Por outro lado, a amostra de origem clínica, utilizada para comparação e também produtora da mesma enzima, pertencia ao grupo filogenético B1 de baixa virulência e ao ST648 (Tabela 7). Ambas as cepas continham plasmídeos, os quais foram extraídos e transferidos para a linhagem *E. coli* Top10. Os experimentos de transformação foram positivos, demonstrando que ambas amostras produtoras de CTX-M-15 carregavam plasmídeos de mesmo tamanho (24 kb) contendo o gene *bla*_{CTX-M-15}, uma vez que apenas um plasmídeo foi transferido para a cepa receptora, conferindo o fenótipo e genótipo de ESBL da cepa doadora. Por outro lado, os padrões gerados a partir dos fragmentos amplificados por ERIC-PCR revelam que essas duas cepas não estavam clonalmente relacionadas. Duas amostras de origem animal, uma isolada de frango e outra isolada de suíno, carregavam o gene *bla*_{CMY-2} e foram comparadas a uma

amostra clínica também portadora do mesmo gene. Nenhuma relação foi encontrada entre essas amostras.

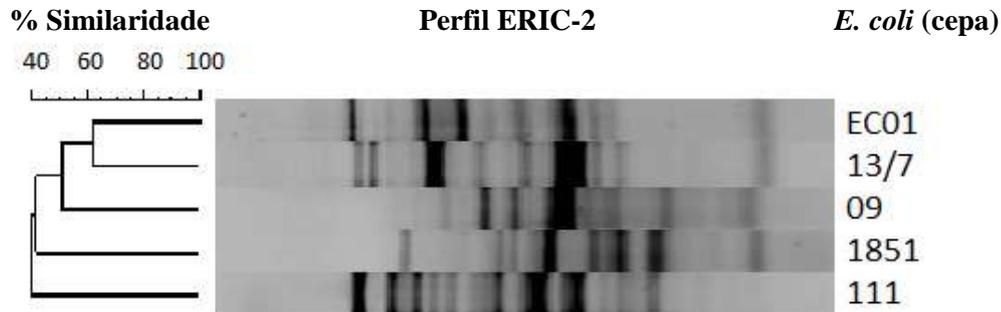


Figura 9. Dendrograma dos isolados de *Escherichia coli* produtora de CTX-M-15 e AmpC gerado a partir dos fragmentos amplificados por ERIC-PCR

3.6 Perfil fenotípico e genotípico de amostras de *E. coli* carregando genes do tipo *qnr*

Do total de amostras de enterobactérias incluídas nesse trabalho, 26 cepas de *Salmonella* spp. e 19 cepas de *E. coli* eram resistentes a fluoroquinolonas, sendo que 5 cepas de *E. coli* possuíam genes do tipo *qnr* (Tabela 7), das quais três também possuíam genes codificadores de beta-lactamases (cepa 111 = *bla*_{CTX-M-15}; cepa 99B = *bla*_{CTX-M-2}; cepa 09 = *bla*_{CMY-2}). Os plasmídeos das 5 cepas carregando genes do tipo *qnr* foram extraídos e transformados utilizando a linhagem *E. coli* Top10 como cepa receptora. Os ensaios de transformação foram positivos para as cepas 111, 99B e 09, as quais carregavam um plasmídeo de 24 Kb, porém a CIM de *E. coli* Top10 transformada foi de 0,25 µg/ml, não apresentando, portanto, fenótipo resistente. Uma das cepas pertencia ao grupo filogenético altamente virulento B2, enquanto as demais pertenciam aos grupos de baixa virulência A e B1 (Tabela 8).

Tabela 7 - Perfil fenotípico e genotípico de *Escherichia coli* produtora de CTX-M-15 e AmpC de origem animal e comparação com isolados clínicos

Cepa	Amostra	Origem	Ano/ Estado	ERIC-PCR	Grupo filogenético	Perfil de resistência	<i>bla</i> gene	CIM (µg/ml)					
								CTX	CFO	CPM	CFT	ENO	CIP
111	Suíno	Fezes	2008/MG	A	B2	Amp, Str, Kan, Gen, Sut, Clo, Tet	CTX-M-15, SHV-1	>256	8	64	128	16	16
13/7 ^a	Humano	Urina	2007/SP	B	B1	Amp, Clo, Gen, Nal, Sut, Tet, Str	CTX-M-15	256	16	24	>256	>32	>32
09	Suíno	Fezes	2008/MG	C	B1	Amc, Amp, Nal, Str, Kan, Gen, Sut, Clo, Tet	CMY-2	128	>256	1	128	16	8
1851	Frango	Pulmao	2010/SP	D	D	Amc, Amp, Clo, Kan, Nal, Str, Tet	CMY-2	128	128	8	128	0.25	0.25
EC01 ^b	Humano	Sangue	2007/SP	E	A	AmC, Amp, Imp, Kan, Nal, Sut, Tet, Str	CMY-2	>256	>256	24	256	64	>32

Amp, ampicilina; Caz, ceftazidima; Cro, ceftriaxone; Cpm, cefepime; Ctx, cefotaxima; Cft, ceftofur; Nal, ácido nalidíxico; Cip, ciprofloxacina; Eno, enrofloxacina; Tet, tetraciclina; Sut, sulfametoxazol-trimetropim; Str, estreptomicina; MG, Minas Gerais. ^aLena, 2011; ^b Pavez et al, 2008.

Tabela 8- Perfil fenotípico e genotípico de *Escherichia coli* carregando genes do tipo *qnr*

Cepa	Origem	Ano/Estado	Eric-PCR	Grupo filogenético	<i>qnr</i> gene	Perfil de resistência	CIM (µg/ml)	
							CIP	ENO
09	Fezes	2008/MG	A	B1	<i>qnrS</i>	Amp, AmC, Clo, Gen, Kan, Nal, Str, Tet, Cft, Ctx	8	16
2kB	Fezes	2010/MG	B	A	<i>qnrS</i>	Nal, Tet	4	>64
99B	Fezes	2008/MG	C	B1	<i>qnrB</i>	Amp, Gen, Nal, Sut, Tet, Str, Cft, Ctx	16	32
111	Fezes	2008/MG	D	B2	<i>qnrB</i>	Amp, Str, Kan, Gen, Sut, Clo, Tet, Nal, Cft, Ctx	16	16
7K	Fezes	2009/MG	D	A	<i>qnrB</i>	Amp, Clo, Nal, Str, Sut, Tet	16	64

Amp, ampicilina; Caz, ceftazidima; Cro, ceftriaxone; Cpm, cefepime; Ctx, cefotaxima; Cft, ceftofur; Nal, ácido nalidíxico; Cip, ciprofloxacina; Eno, enrofloxacina; Tet, tetraciclina; Sut, sulfametoxazol-trimetropim; Str, estreptomicina

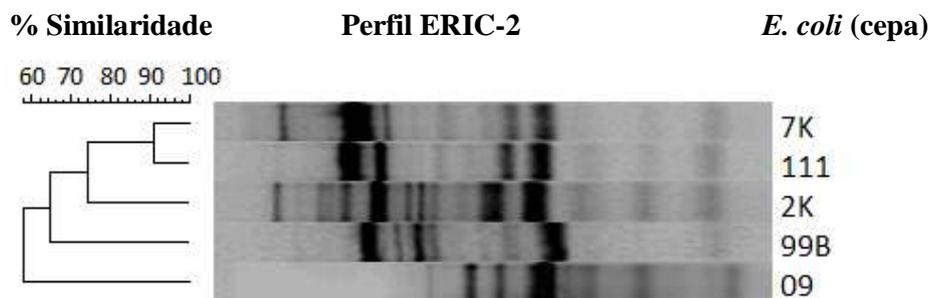


Figura 10. Dendrograma dos isolados de *Escherichia coli* carregando genes do tipo *qnr* gerado a partir dos fragmentos amplificados por ERIC-PCR

4 DISCUSSÃO

4.1 Perfil de suscetibilidade em *Salmonella* spp. isoladas de aves, fontes relacionadas e suínos comerciais

A resistência aos antimicrobianos em *Salmonella* spp. tem sido relatada em diversos setores, especialmente na clínica humana e na produção animal, demonstrando a necessidade da vigilância epidemiológica direcionada a avaliar o panorama atual da resistência para estabelecer medidas de intervenção para o uso racional dos antibióticos.

Do total de 93 isolados de *Salmonella* spp. oriundos do ciclo de produção avícola, 69,89% apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado, sendo que 25 cepas eram multirresistentes, ou seja, apresentaram resistência a antibióticos de pelo menos três classes (AMATO NETO; NICODEMO; LOPES, 2007). Ambos os testes, combinação de discos e E-test revelaram que 13,97% das cepas de *Salmonella* spp. eram produtoras de ESBL. Todas as cepas produtoras de ESBL foram recuperadas de granjas de dois estados, Santa Catarina e Paraná, atualmente os maiores exportadores de carne de frango no Brasil (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE FRANGO, 2009). Foram encontradas cepas resistentes a todas as classes de antibióticos, sendo altas as taxas de resistência para o ácido nalidíxico e tetraciclina. Por outro lado, não foram detectadas cepas resistentes a amicacina, cefoxitina e imipenem.

Considerando a amicacina, dados presentes na literatura brasileira tem relatado alta resistência de *Salmonella* spp. oriundas do ciclo de produção avícola (CORTEZ, 2006) a esse aminoglicosídeo, contrariamente aos nossos resultados. Muito provavelmente, esta diferença pode ser governada pela conduta profilática e regime de alimentação associado com o uso de antibióticos, o qual, aparentemente não segue normas estabelecidas. Da mesma maneira, as taxas de resistência a outros antibióticos, descritas no presente trabalho, diferem daquelas relatadas por Santos et al. (2000), em que todas as 96 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango congeladas eram sensíveis a ampicilina, ciprofloxacina, ceftazidima e cloranfenicol. No mesmo trabalho, acima citado, é relatado o isolamento de apenas 3/96 cepas de *Salmonella* spp. multirresistente. Vaz et al. (2010) também reportaram recentemente uma baixa resistência de *Salmonella* spp. a alguns antibióticos testados. Dentre os possíveis fatores

relacionados às discrepâncias entre esses e os nossos resultados, estão a origem das amostras, o ano de coleta, as drogas antimicrobianas testadas e até mesmo as técnicas empregadas nos testes de suscetibilidade.

O aumento da incidência de *fenótipos* de *Salmonella* spp. multirresistente no Brasil, parece ser um evento recente, tanto na clinica humana como no ciclo de produção aviária (FERNANDES et al., 2009). Dias de Oliveira et al. (2005) relataram 8 padrões distintos de multirresistência em *Salmonella* spp. isoladas de diversas fontes. No presente estudo, os fenótipos multirresistentes foram bastante diversos, não havendo predominância considerável de um ou outro fenótipo de resistência.

O maior percentual de resistência foi encontrado frente as quinolonas, classe de antibióticos largamente utilizada na produção animal (PHILLIPS et al., 2004). Assim, um total de 45,16% das amostras foram resistentes ao ácido nalidíxico. Embora o isolamento de *Salmonella* spp. resistentes ao ácido nalidíxico seja freqüente no Brasil, o percentual de resistência encontrado neste trabalho foi superior aos dados contidos na literatura (DIAS DE OLIVEIRA et al., 2005; PEIRANO et al., 2006), demonstrando o aumento da incidência de cepas resistentes a quinolonas, nos últimos anos. Em contrapartida, o percentual de resistência frente a tetraciclina (32,25%) foi inferior ao encontrado por Cortez et al. (2006) quando avaliaram a sensibilidade de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves, em que 72.43% das amostras eram resistentes a tetraciclina. Além disso, mais de 50% das amostras de *Salmonella* spp. em um estudo sobre a resistência de bactérias Gram-negativas isoladas de carcaças de frango foram resistentes a esse antibiótico (MOREIRA e MORAES 2002). Adicionalmente, Peirano et al. (2006) relataram grande número de amostras de *Salmonella* spp., isoladas de várias fontes, resistentes a tetraciclina. É importante destacar que a tetraciclina era utilizada como promotor de crescimento ate a década de 90 (MOREIRA e MORAES, 2002) (Tabela 1), quando seu uso foi proibido para essa finalidade, o que pode estar relacionado à diminuição no número de isolados resistentes à tetraciclina.

Após as quinolonas e tetraciclinas, a maior percentagem de resistência foi encontrada frente aos aminoglicosídeos, seguida dos beta-lactâmicos. Destaca-se a estreptomicina, para a qual 26,88% das amostras eram resistentes, e a ampicilina, com um percentual de resistência de 26,88%. A estreptomicina é utilizada como promotor de crescimento, enquanto a ampicilina é usado apenas terapeuticamente na produção animal (RIBEIRO et al., 2011).

Embora alguns estudos demonstrem uma frequência de cepas resistentes a esses antibióticos inferior ao que foi encontrado neste trabalho (DIAS DE OLIVEIRA, 2005; VAZ et al., 2010), Peirano et al. (2006) relataram um percentual de resistência de *Salmonella* spp. a ampicilina e à estreptomicina superior ao encontrado neste estudo, demonstrando que as taxas de resistência aos aminoglicosídeos são bem variáveis, o que pode estar relacionado à origem e ano de coleta das amostras.

Os demais aminoglicosídeos testados, gentamicina e canamicina, apresentaram atividade antimicrobiana contra mais de 90% dos isolados. Esses dados estão de acordo com relatos presentes na literatura (CORTEZ et al., 2006; DIAS DE OLIVEIRA, 2005; VAZ et al., 2010), de modo que essas drogas podem constituir uma alternativa no tratamento de infecções por *Salmonella* spp. multirresistente.

Comparativamente a dados contidos na literatura, foram baixas as taxas de resistência ao cloranfenicol e à associação sulfametoxazol-trimetropim (DIAS DE OLIVEIRA, 2005; PEIRANO, 2006; VAZ et al., 2010). O uso do cloranfenicol na produção animal foi proibido desde a década de 70 e o uso das sulfonamidas como promotores de crescimento foi proibido em 1998 (Tabela 1), o que pode ter contribuído para o decréscimo de *Salmonella* spp. resistentes a esses antibióticos.

O ponto de urgência epidemiológica foi a identificação de 13 cepas resistentes a cefalosporinas de terceira e quarta gerações, cujos testes fenotípicos e PCR comprovaram a produção de ESBL. No Brasil, poucos estudos contemplam os mecanismos associados a resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp., de modo que há relatos de cepas resistentes a cefotaxima isoladas no ano de 2003 e 2004 (CORTEZ et al., 2006), porém, sem elucidar os determinantes de resistência. Desse modo, os relatos de *Salmonella* produtoras de ESBLs são significativamente inferiores aos trabalhos que reportam a produção de ESBL por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (LINCOPAN et al., 2006; LOPES et al., 2010; MINARINI et al., 2008).

Vários autores têm atribuído a resistência aos antimicrobianos ao constante uso de desses fármacos na produção animal. Estudos realizados na Europa demonstram alta resistência de *E. faecium* à avoparcina durante o período em que esse antimicrobiano era utilizado na produção de frangos. Já no ano 2000, após a proibição da avoparcina como promotor de crescimento observou-se um decréscimo de 75% para 5% no número de cepas

isoladas resistentes a avoparcina (PHILLIPS et al., 2004). O mesmo pode ser observado quando fazemos uma retrospectiva das taxas de resistência em *Salmonella* spp. isoladas do ciclo de produção avícola no Brasil. Em trabalhos anteriores, nos quais os isolados datavam da década de 1990 (DIAS DE OLIVEIRA et al., 2005), o percentual de resistência as sulfonamidas foi muitas vezes superior aos resultados deste trabalho, em que as cepas foram coletadas após uma década da proibição do uso das sulfonamidas como promotor de crescimento.

A presença de enteropatógenos no intestino de aves voltadas para o consumo humano acarreta a contaminação de ovos e da carne de frango na hora do abate. Embora, a maior parte da produção seja comercializada na forma congelada, o congelamento não é suficiente para eliminar toda a carga microbiana presente no produto (Santos, 2000), de modo que o consumo de carne de frango é frequentemente associado a infecções por *Salmonella* spp. Assim, fenótipos resistentes são veiculados através dos alimentos, podendo colonizar o intestino, que pode tornar-se um reservatório desses genes resistentes, tornando tratamentos futuros ineficazes, pelo risco de transfêrencia horizontal dos mecanismos de resistência (NOVAS). Nesse sentido, a presença de linhagens resistentes a antibióticos agrava o impacto em saúde pública, primeiro pelas limitações na escolha do antibiótico; segundo pelo fato do intestino dos animais e dos seres humanos (após ingestão de alimentos de origem animal contaminados) servirem de reservatórios dos genes de resistência (LEVERSTEIN-VAN HALL et al., 2011; PESSANHA e GONTIJO FILHO, 2001; PHILLIPS et al., 2004, OVERDEVEST et al., 2011) e, terceiro, devido à possibilidade de transferência horizontal dos mecanismos de resistência a importantes patógenos, tais como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, uma vez que a transferência de elementos genéticos móveis (integrons, transposons e plasmídeo) é bem esclarecida entre membros da família *Enterobacteriaceae* (DATTA e KONTOMICHALOU, 1965; OVERDEVEST et al., 2011).

Em uma etapa adicional, 50 cepas de *Salmonella enterica* resistentes a antibióticos de pelo menos duas classes diferentes foram cedidas pelo laboratório de Sanidade Suína da FMVZ-USP para caracterização dos mecanismos de resistência. Essas cepas foram recuperadas das fezes de suínos comerciais e haviam sido previamente testadas quanto a sensibilidade a alguns antibióticos pela FMVZ-USP. Nesse sentido, os testes de sensibilidade qualitativos (antibiograma) foram repetidos, ampliando a quantidade de antibióticos testados,

especialmente aqueles utilizados na clínica humana e, posteriormente foram realizados testes quantitativos de suscetibilidade, ou seja, determinação dos valores de CIM. Os testes de sensibilidade demonstraram que todas as amostras de origem suína foram sensíveis a amicacina, cefalosporinas, cefamicinas e carbapenêmicos. Outros trabalhos também tem relatado a eficácia desses antibióticos no controle de *Salmonella* spp. isoladas da cadeia de produção animal (RIBEIRO et al., 2011). Por outro lado, a resistência a cefalosporinas tem sido documentada em amostras de origem clínica e aviar (FERNANDES et al., 2009).

De fato, no presente estudo, as taxas de resistência a ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol foram superiores àquelas relatadas em outros estudos, o que pode ter sido uma consequência da pré-seleção de cepas resistentes para a inclusão nesse estudo. Por outro lado, ficam evidentes as discrepâncias entre as taxas de resistência encontradas na produção avícola e suína, o que pode estar relacionado às diferenças de manejo na criação de aves e porcos, tais como: tempo e antibióticos utilizados como promotores de crescimento, profilática e terapêuticamente, uma vez que a administração de antimicrobianos varia segundo a espécie animal (GOMES, 2004).

4.2 Genes de resistência em *Salmonella* spp. isoladas de aves e suínos

Do total de 30 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de aves resistentes a tetraciclina, 8 isolados carregavam o gene *tetA* e 6 carregavam o gene *tetB*. Nenhum dos genes pesquisados associados a resistência a tetraciclina foram identificados em 16 isolados. Nas cepas de origem suína, foi identificado o gene *tetA* em 20 isolados e o gene *tetB* foi identificado em 17 isolados, sendo que não foi identificado nenhum gene pesquisado em 3 isolados resistentes à tetraciclina. Peirano *et al* relatam que os genes que conferem resistência a tetraciclina mais frequentemente isolados em *Salmonella* de origem aviária são os genes *tetB*, *tetA* e *tetC*. Em suínos, Michael et al. (2005) tem relatado também a alta frequência do gene *tetB*. Por outro lado, Ribeiro et al. (2011) não identificou os genes *tetB*, *tetC* ou *tetG* em *Salmonella enterica* isoladas de embutidos cárneos.

Nenhuma das linhagens apresentava mais de um gene de resistência contra tetraciclinas, como relatam outros autores. A resistência a tetraciclinas pode ser mediada também por outros genes do tipo *tet* os quais não foram incluídos nesse estudo (PEIRANO et al., 2006). Assim, cepas com mecanismo de resistência à tetraciclina não elucidado poderiam

carregar outros genes, os quais não foram pesquisados. Por exemplo, é sabido que bombas de efluxo do tipo MdfA, pertencente à família MF, conferem resistência às tetraciclinas (Figura 1).

Considerando os aminoglicosídeos, vários genes tem sido associados a resistência aos diversos antibióticos dessa classe. Na presente investigação, 26,88% das amostras de *Salmonella* de origem aviária e 42% das amostras isoladas de suínos foram resistentes a pelo menos um antibiótico aminoglicosídeo. Essa resistência pode ser atribuída principalmente ao gene *aadA1*, seguido do gene *aadA* e *ant2*. Outros autores também relatam alta frequência do gene *aadA* em isolados de *Salmonella* resistentes aos aminoglicosídeos. Os genes *aadA* e *aadA1* codificam para aminoglicosídeo adenil-transferases enquanto o gene *ant2* codifica nucleotidiltransferases, ambas enzimas modificam a molécula de aminoglicosídeo, tornando-a inativa. Além desses genes, inúmeros outros estão associados a resistência aos aminoglicosídeos. Foi feita pesquisa também dos genes do tipo *aadB*, *aadD*, *aac6* e *ant4*, porém, nenhum deles foi identificado nas amostras aqui estudadas. Por outro lado, outros autores descrevem a identificação de outros genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos. Entre eles, Michael et al (2005) relataram a presença de *aphA1* em *Salmonella* resistentes a canamicina e, *strA*, em isolados resistentes à estreptomicina. Logo, as demais cepas resistentes aos aminoglicosídeos para os quais não foram identificados nenhum dos genes de resistência pesquisados podem conter esses outros genes de resistência que não foram incluídos nesse estudo. Além disso, bombas de efluxo do tipo AcrD, da Família RND, tem sido associada a resistência aos aminoglicosídeos.

No que diz respeito a resistência às sulfonamidas, apenas 5 amostras de origem aviária e 30 amostras de origem suína foram resistentes a essa classe de antibióticos. Considerando as cepas de origem aviária, uma carregava o gene *sul1* e outra o gene *sul2*. Nas demais não foram encontrados nenhum dos três genes testados. Por outro lado, para as amostras do ciclo de produção avícola foi testada a susceptibilidade a associação sulfametoxazol-trimetoprim, para a qual a resistência pode ser atribuída a presença do gene *dfrA*, o qual confere resistência ao trimetoprim, tornando a associação desses antibióticos inativa, como tem sido relatado na literatura. Quanto aos isolados oriundos das fezes de suínos, todos eles carregavam um gene do tipo *sul*, sendo que 5 amostras carregavam ambos genes *sul1* e *sul2*, o que já tem sido relatado por outros autores. De qualquer maneira, o gene *sul1* foi mais frequentemente

identificado, em conformidade com dados presentes na literatura. É importante esclarecer que para as amostras de suínos foi testada exclusivamente a sulfa e não a combinação sulfametoxazol/trimetoprim, uma vez que o uso das sulfas na produção suína, não é combinada ao trimetopim.

Com relação ao cloranfenicol, a frequência do gene *floR* foi baixa neste estudo. Do total de 21 amostras resistentes ao fenicol, apenas três carregavam o gene *floR*. Por outro lado, outros autores revelam genes do tipo *cat1* e *cat2* associados a resistência aos fenicois em enterobactérias (LI et al, 2007). Além disso, bombas de efluxo do tipo Mdfa também podem mediar a resistência ao cloranfenicol.

Fenótipos de resistência tem sido associados frequentemente a elementos genéticos móveis do tipo integron, os quais carregam diversos genes cassetes de resistência. Michael et al. (2005) tem relatado a inserção de vários genes cassetes em integrons de *Salmonella* multirresistentes. Além dos integrons, a super expressão de bombas de efluxo, também poderia estar associada a resistência a varios antibióticos.

4.3 Produção de ESBL do tipo CTX-M-2

4.3.1 Escherichia coli

Os testes fenotípicos para detecção de ESBL identificaram 25 amostras de *E. coli* produtoras de ESBL. Das amostras de *E. coli* produtoras de ESBL, 24 carregavam o gene *bla*_{CTX-M-2} e uma única cepa carregava o gene *bla*_{CTX-M-15}. O primeiro caso de produção de CTX-M-2 reportada no Brasil ocorreu no ano de 2000, em cepas de *Proteus mirabilis* isoladas em hospitais (BONNET et al., 2000) e, no ano de 2007, foi reportado pela primeira vez cepas *Escherichia coli* de origem comunitária produtoras de CTX-M-2 (MINARINI et al. 2007). No mesmo ano, um estudo europeu identificou o gene *bla*_{CTX-M-2} em *E. coli* isolada de frangos importados do Brasil (WARREN, 2008). Diante dos relatos presentes na literatura, acredita-se que as enzimas do grupo CTX-M-2 sejam prevalentes dentre membros da família *Enterobacteriaceae*, sendo descritas em vários estados, dentre eles São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, especialmente em *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Assim, a presença de

*bla*_{CTX-M-2} em *E. coli* tem sido intensamente relatada no Brasil, tanto em amostras de origem clínica, comunitária e animal (Figura 6).

Além do gene *bla*_{CTX-M-2}, as amostras de *E. coli* produtoras de ESBL carregavam também genes do tipo SHV-1. Enzimas do tipo SHV tem sido bastante documentadas em *E. coli* nos diversos estados brasileiros, incluindo Pernambuco, Sergipe, Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul (Figura 6).

Considerando os grupos filogenéticos, 46% e 29% dos isolados de *E. coli* produtores de CTX-M-2 pertenciam aos grupos de baixa virulência, B1 and A, respectivamente, enquanto 25% dos isolados pertenciam ao grupo D, de alta virulência.

A análise dos perfis obtidos por ERIC-PCR revelou a disseminação multiclonal dos isolados de *E. coli* produtores de CTX-M-2, sugerindo um alto grau de transferência horizontal do plasmídeo.

4.3.2 *Salmonella enterica*

Contrariamente a *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, relatos de *Salmonella* produtoras de ESBLs são incomuns, uma vez que a maioria dos estudos incluindo *Salmonella* spp. relatam resistência, mas não contemplam os mecanismos envolvidos. Porém, dentre as ESBLs já descritas em salmonelas não-tifóides no Brasil, estão as enzimas OXA-53, CTX-M-8 e CTX-M-9 (FONSECA et al., 2006; MURLEY et al., 2004; PEIRANO et al., 2006).

Recentemente, a produção de CTX-M-2 foi descrita em espécimes de *Salmonella* Typhimurium recuperadas de produtos de origem aviária e fontes relacionadas, como também pacientes pediátricos no Brasil (FERNANDES et al., 2009). Por outro lado, *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves resistente à cefotaxima tem sido descrita no Brasil desde 2003, sugerindo a aquisição de ESBL em salmonelas de origem animal antes desses relatos recentes (CORTEZ et al., 2009). Sob esse aspecto, esse trabalho confirma a aquisição e disseminação do gene *bla*_{CTX-M-2} em *Salmonella enterica* isoladas da cadeia de produção avícola, tornando esses dados uma urgência epidemiológica (OVERDEVEST et al., 2011)

Além da resistência a cefalosporinas, mais de 90% das amostras de *E. coli* e todas as cepas de *Salmonella* produtoras de CTX-M-2 apresentaram resistência a antibióticos de várias classes, incluindo quinolonas, tetraciclinas, aminoglicosídeos e inibidores da via do folato, exibindo altos valores de CIM. Com relação a isso, os determinantes de resistência adicional podem estar localizados no mesmo elemento móvel que carrega os genes que codificam ESBLs, o que contribui para o fenótipo de multirresistência (FERNANDES et al., 2009). Sob esse aspecto, elementos móveis do tipo integron tem sido frequentemente relacionados a fenótipos de multirresistência. A pesquisa de integrons em *Salmonella enterica* produtora CTX-M-2 identificou a presença de integron de classe 1 em todas as amostras. No entanto, o gene *bla*_{CTX-M-2} não estava localizado nesse tipo de elemento. O mapeamento dos demais genes de resistência que poderiam estar localizados dentro do integron não foi realizado nesse trabalho.

A análise mediante a construção de dendrograma dos padrões de macrorrestrição obtidos por PFGE agrupa as cepas de *Salmonella* produtoras de ESBL em dois principais *clusters* (A e B) disseminados clonalmente, havendo pequenas diferenças entre os perfis de um mesmo *cluster*. A presença de *Salmonella* em caixas de transporte, roedores e as próprias rações contaminadas com o agente infeccioso tem sido descritas como possíveis vias de contaminação das aves de produção (CALIXTO et al., 2002; HOFER et al., 1998; ROCHA et al.; TESSARI et al., 2003), contribuindo para a disseminação de cepas resistentes, ainda mais se considerarmos que as diferentes granjas podem ter obtido ração e até mesmo pintos de um mesmo distribuidor. Por outro lado, os ensaios de transformação sugeriram a transferibilidade do gene *bla*_{CTX-M-2} entre cepas de diferentes origens e de ambos os *clusters*, uma vez que plasmídeos de mesmo tamanho foram encontrados em todas as amostras.

Nesse sentido, uma vez que o primeiro caso de produção de CTX-M-2 ocorreu no ano de 2000, em cepas de *Proteus mirabilis* isolada em laboratórios de hospitais brasileiros, infere-se que a produção dessa enzima surgiu no ambiente hospitalar e, sob a pressão seletiva do uso do ceftiofur na produção animal, se estabeleceu no ciclo de produção animal no país.

Finalmente, além de todas as implicações sanitárias e em saúde pública da disseminação de cepas multirresistentes e estirpes produtoras de enzimas do tipo ESBL, deve-se considerar os prejuízos econômicos acarretados pelo isolamento de bactérias resistentes oriundas da cadeia avícola. O Brasil é terceiro maior produtor mundial de carne de frango, com mercados importadores em ascensão, de modo que a receita gerada pelas exportações de

carne de frango somaram 5,814 bilhões de dólares no ano de 2009 (ABEF, 2011). O isolamento de amostras resistentes nos produtos de origem avícola, tal como ocorreu no ano de 2007, quando estudos europeus revelaram a produção de CTX-M-2 por *Escherichia coli* isolada de frangos importados do Brasil (WARREN et al., 2008; DHANJI et al., 2010), pode prejudicar as exportações brasileiras frente a importadores exigentes cuja legislação é rigorosa quanto ao uso de antimicrobianos na produção animal, tais como países europeus (MILLET e MAERTENS, 2011).

4.4 Produção de AmpC e ESBL do tipo CTX-M-15

Os testes fenotípicos para detectar a produção de ESBL revelaram que 25 amostras de *E. coli* eram produtoras desse tipo de enzima e que dois isolados, resistentes à cefoxitina e ao inibidor ácido clavulânico, poderiam ser produtores de beta-lactamase do tipo AmpC plasmidial. A análise do produto de PCR revelou que 24 cepas de *E. coli* carregavam o gene *bla*_{CTX-M-2}, altamente disseminado na América Latina. Uma cepa foi identificada como produtora da enzima CTX-M-15, descrita recentemente no Brasil (CERGOLE-NOVELLA, 2010).

A enzima CTX-M-15 foi detectada pela primeira vez na Índia, no ano de 2001. Desde então, surtos por enterobactérias produtoras de CTX-M-15 tem sido relatados em diversos países, principalmente na Europa, onde a enzima tem se tornado altamente prevalente, havendo relatos de *E. coli* produtora da enzima isolada de ambientes aquáticos, animais de companhia e animais de produção, além dos inúmeros relatos clínicos. Ainda com relação a produção dessas ESBL, os estudos tem revelado a disseminação de um clone de *Escherichia coli* pertencente ao ST131, associado ao sorogrupo O25, carregando o gene *bla*_{CTX-M-15}. Esse clone tem sido associado a infecções nosocomiais e comunitárias em diversos países desde o ano de 2003, incluindo incluindo Espanha, França, Canadá, Portugal, Suíça, Líbano, Índia, Kuwait, Korea, Reino Unido, Itália, Turquia, Croácia, Japão, Estados Unidos e Noruega (CLERMONT et al., 2008, 2009; KARISIK et al., 2008; NICOLAS-CHANOINE et al., 2008; LAU et al., 2008).

No Brasil, a CTX-M-15 tem sido identificada em *K. pneumoniae* e *E. coli* (CERGOLE-NOVELLA et al., 2010; TOLLENTINO et al., 2011), sendo a última espécie pertencente ao grupo filogenético B2, considerado o mais virulento segundo o esquema

proposto por Clermont et al (2000). Como a maior preocupação no que diz respeito a essa enzima é a rápida disseminação mundial do clone *E. coli* O25b ST131, a tipagem de ambas as amostras, de origem clínica e suína, produtoras de CTX-M-15 através do MLST foi realizada para possível identificação desse clone. No entanto, a cepa 13/7 (Tabela 8) isolada da urina de um paciente hospitalizado pertence ao ST648. Já a cepa de origem animal pertence a um novo ST, o qual faz parte do complexo clonal 206. Assim, as sequências obtidas a partir do produto de PCR dos genes utilizados no MLST foram submetidas para apreciação e depósito no banco de dados <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>. Esse dado possui grande importância epidemiológica, uma vez que demonstra a disseminação de CTX-M-15 para uma variedade de STs.

A comparação entre os perfis genotípicos da *E. coli* produtora de CTX-M-15 isolada de suínos e da cepa 13/7 de origem clínica também portadora do gene *bla*_{CTX-M-15} demonstra que essas cepas não pertencem a um mesmo clone, inferindo na possibilidade da transferência horizontal do gene *bla*_{CTX-M-15} entre cepas de diferentes origens. Em contrapartida, a análise plasmidial das amostras transformadas mostra que ambas as amostras carregam plasmídeos do mesmo tamanho, demonstrando que a aquisição do plasmídeo tem sido um evento favorável a disseminação do gene *bla*_{CTX-M-15}. Além disso, a CIM da linhagem *E. coli* Top 10 para a cefotaxima aumentou de 0,025 µg/ml para 256 µg/ml após adquirir o gene *bla*_{CTX-M-15}.

As beta-lactamases do tipo AmpC são caracterizadas por serem resistentes a inibidores do tipo clavulanato, tazobactam e sulbactam. No Brasil, o único relato até o momento da produção de enzimas AmpC do tipo CMY-2 ocorreu no ano de 2007, em cepas de *E. coli* de origem nosocomial. Neste estudo, uma amostra de origem suína e outra de origem aviária (Tabela 8) eram produtoras de CMY-2, sendo essa a primeira descrição de AmpC em cepas de origem animal, o que demonstra que essas enzimas estão se disseminando em território nacional. A produção de beta-lactamases do tipo AmpC é preocupante do ponto de vista de que a cefoxitina podia ser uma alternativa terapêutica contra produtores de ESBL. No entanto, as enzimas AmpC conferem resistência a algumas oyminocefalosporinas e também à cefoxitina.

Assim como ocorre com as amostras produtoras de CTX-M-15, os isolados de *E. coli* produtores de CMY-2 não apresentam relação clonal entre si. A comparação entre os perfis genotípicos das amostras de origem animal e da amostra de origem clínica revela que elas pertencem a clones distintos. Diante disso, percebe-se que a mobilização horizontal do

gene *bla*_{CMY}, o que foi comprovado pela transferência do gene *bla*_{CMY-2} para *E. coli* Top 10, tendo a CIM da cefotaxima elevado de 0,025 µg/ml a 128 µg/ml após a incorporação do plasmídeo portador do gene *bla*_{CMY-2}.

4.5 Resistência fluoroquinolonas: genes *qnr*

Do total de 47 enterobactérias resistentes a ciprofloxacina e/ou enrofloxacin, três carregavam o gene *qnrB* e duas carregavam o gene *qnrS*. Nenhuma delas carregava os genes *qnrA* ou *aacIb-cr*, que também conferem resistência a quinolonas.

Os genes *qnr* codificam pentapeptídeos que exercem efeito protetor contra a ação das fluoroquinolonas, resultando em baixo nível de resistência a esses antibióticos. Outros mecanismos de resistência, especialmente a ocorrência de mutações nos genes *gyrA* e *parC* conferem alta resistência às quinolonas, tornando os antibióticos inativos. As amostras que carregam tanto os genes *qnrB* quanto *qnrS* apresentam altos valores da Concentração Inibitória Mínima, sugerindo que possuam outro mecanismo de resistência, além dos genes *qnr*, uma vez que outros trabalhos tem relatados CIM de até 2µg/ml em isolados carregando genes do tipo *qnr*, enquanto isolados com mutação nas QRDRs apresentavam altos níveis de resistência (CAVACO e AARESTRUP, 2009). Diante disso, acredita-se que essas amostras apresentam mutações nos genes *gyrA* e *parC*, o que resulta em enzimas com conformação incapaz de se ligar a fluoroquinolonas, tornando o tratamento com esses antibióticos ineficaz.

Para a confirmação da presença dos genes *qnrB* e *qnrS* foi feito o sequenciamento parcial desses genes, ratificando os resultados obtidos por PCR. Essas sequencias foram submetidas ao GenBank para apreciação e depósito na base de dados. Embora o percentual da resistência a quinolonas mediada por plasmídeo pesquisada nesse estudo (i. e. genes do tipo *qnr*) seja relativamente baixo, 31 cepas, incluindo *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, também foram resistentes a cefalosporinas e produziam algum tipo de beta-lactamase (ESBL ou AmpC). A esse respeito, a emergência de plasmídeos que carregam determinantes da produção de ESBL e genes de resistência a fluoroquinolonas (*qnr* genes), dentre membros da família *Enterobacteriaceae*, tem sido descrita como um fator preocupante devido as implicações no tratamento de infecções humanas (CASTANHEIRA et al., 2007; CRÉMET et al., 2009; MINARINI et al., 2007, 2008).

Por outro lado, na produção animal, uma das aplicações das fluoroquinolonas é o controle das infecções causadas por *Escherichia coli* (MCEWEN e FEDORKA-CRAY, 2002). Em estudo conduzido na Europa, observou-se um acréscimo significativo no número de isolados com sensibilidade reduzida à ciprofloxacina após a permissão do uso da enrofloxacina na produção animal, sugerindo que o desenvolvimento de resistência a ciprofloxacina foi consequência direta do uso intensivo da enrofloxacina na produção animal (ANGULO et al., 2000; PHLLIPS et al., 2004). Adicionalmente, os valores da CIM₅₀ e CIM₉₀ para enrofloxacina e ciprofloxacina nesse trabalho foram muito semelhantes, o que pode ser considerado uma evidência de resistência cruzada governada por um mesmo mecanismo, inclusive com relação aos isolados que carregavam genes do tipo *qnr*.

4.6 Transferência plasmidial (transformação) dos genes do tipo *bla*_{beta-lactamase} e/ou *qnr*

Os ensaios de transformação tiveram como objetivo elucidar a mobilização horizontal dos determinantes de resistência a cefalosporinas e quinolonas. Assim, os tamanhos plasmidiais da cepa *E. coli* Top 10 que recebeu os respectivos plasmídeos extraídos das linhagens produtoras de ESBL e AmpC, como também genes do tipo *qnr*, foram comparados para tentar compreender a disseminação dos genes de resistência entre as amostras de diferentes origens.

A análise do perfil plasmidial entre as amostras de *Salmonella enterica* produtoras de CTX-M-2 isoladas de aves demonstra a existência de plasmídeos do mesmo tamanho (24kb) em todas as 13 cepas. Os testes para transferência dos plasmídeos foram positivos para 8/13 cepas, confirmando que o gene *bla*_{CTX-M-2} está localizado em plasmídeos de mesmo tamanho em todas as cepas. A eficiência da transformação foi menor para as cepas de *E. coli* que carregavam o gene *bla*_{CTX-M-2}. De qualquer maneira, as cepas para as quais foi obtido sucesso nos ensaios de transferência plasmidial demonstraram possuir plasmídeos de mesmo tamanho entre si e entre os isolados de *Salmonella enterica*, o que confirma a transferência horizontal de material genético entre as diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae*. Ainda é importante destacar que a CIM de *E. coli* Top 10 aumentou de 0,025µg/ml para >256µg/ml após a incorporação do plasmídeo carregando o gene *bla*_{CTX-M-2}.

A transferência plasmidial do gene *bla*_{CTX-M-15} demonstrou que esse gene estava inserido em um plasmídeo de 24Kb tanto na cepa de origem suína quanto na cepa de origem

clínica, sugerindo a possibilidade da disseminação horizontal das ESBLs entre bactérias de diferentes origens.

Além disso, os ensaios de transformação de plasmídeos comprovaram que genes *bla*_{CTX-M-2}/*qnrB* (cepa EC 99B); *bla*_{CTX-M-15}/*qnrB* (cepa EC111) e *bla*_{CMY-2}/*qnrS* (cepa EC 09) estavam localizados em um mesmo plasmídeo. A associação de genes do tipo *qnr* e determinantes de beta-lactamases em um mesmo elemento genético móvel tem sido frequentemente relatado na literatura como um ponto de *urgência* epidemiológica, uma vez que as fluoroquinolonas constituem uma alternativa terapêutica a produtores de beta-lactamases e a existência concomitante desses dois mecanismos de resistência restringe as alternativas terapêuticas no tratamento de infecções por fenótipos resistentes (DAMIAN et al., 2010; DOLEJSKA et al., 2011; ROBICSEK et al., 2006).

Para as demais amostras portadoras de genes *qnr* não foi obtido sucesso na tentativa de transferir os plasmídeos. O insucesso dos ensaios de transformação podem ser atribuídos à incompatibilidade da linhagem *E. coli* Top 10 em receber os plasmídeos, a possível produção de endonucleases por essa linhagem, que podem digerir o DNA plasmidial antes de sua transferência ou a concentração dos plasmídeos extraídos (TANG; STRATTON, 2006). O insucesso também poderia ser atribuído à baixa eficiência da técnica utilizada.

O isolamento de cepas produtoras de ESBL e AmpC, resistentes às fluoroquinolonas, tem sido associado a um alto risco de falha terapêutica, o que tem levado a um maior uso de antibióticos carbapenêmicos (PITOUT, 2010), consequentemente, carbapenemases do tipo KPC-2, SPM-1, OXA-23, IMP-1 e OXA-143 tem se disseminado no país, especialmente em patógenos associados a IRAS (ANTONIO et al., 2011; BEIRÃO et al., 2011; GROSSO et al., 2011; LINCOPAN et al., 2006; MARTINS et al., 2007; PEIRANO et al., 2009).

5 CONCLUSÕES

- Cepas de *Salmonella* spp. isoladas de ambientes de produção avícola, produtos relacionados, e de amostras de fezes coletadas em suínos, apresentaram altas taxas de resistência a antimicrobianos de uso clínico e veterinário;

- Dentre 47 cepas de *Salmonella* spp. e *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas, 31 apresentavam co-resistência a cefalosporinas de amplo espectro, caracterizando fenótipos MRs;
- Considerando os genes de resistência a tetraciclina, *tetA* e *tetB* foram os mais frequentes, tanto nos isolados de origem suína quanto aviária. Os genes *sul1* e *sul2* foram comumente identificados nos isolados resistentes a sulfas, especialmente suínos. Já a resistência aos aminoglicosídeos pode ser atribuída principalmente à presença dos genes *aadA1* e *aadA*;
- No total, 13/143 (9%) cepas de *Salmonella* spp. (avícola/suína) eram produtoras de ESBL do tipo CTX-M-2.
- Dos 27 isolados de *E. coli* suína resistentes ao ceftiofur, 24 (88%) eram produtores de ESBL do tipo CTX-M-2, e um único isolado produzia a enzima CTX-M-15. Já, a produção de AmpC do tipo CMY-2 foi detectada em duas cepas;
- A resistência as fluoroquinolonas nos isolados de *Salmonella* spp. não foi associada com a presença de genes do tipo *qnr* ou *aac6Ib-cr*.
- Dentre os isolados de *E. coli* (suína) produtores de ESBL do tipo CTX-M-2, o grupo filogenético de baixa virulência B1 foi o mais prevalente. Por outro lado a cepa carregando o gene *bla*_{CTX-M-15} pertenceu ao grupo filogenético B2, de alta virulência;
- Dentre os isolados de *E. coli* resistentes as fluoroquinolonas, três cepas carregavam o gene *qnrB* e duas cepas carregavam o gene *qnrS*,
- Dentre os isolados de *E. coli* resistentes as fluoroquinolonas, uma das cepas carregando o gene *qnrB* pertenceu ao grupo de alta virulência B2, enquanto que as demais cepas carregando genes do tipo *qnr* pertenciam aos grupos filogenéticos B1 e A, de baixa virulência;
- Plasmídeos extraídos de *Salmonella enterica* e *E. coli*, contendo genes do tipo *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY-2}, e/ou genes *qnr*, foram transformados com êxito em *E. coli* Top 10.
- Cepas de *Salmonella enterica* produtoras de ESBL do tipo CTX-M-2 foram clonalmente relacionadas, enquanto que, cepas de *E. coli* produtoras de beta-

lactamases CTX-M, CMY-2, na presença/ausência de genes *qnr*, apresentaram diversidade clonal;

- A variabilidade genotípica entre isolados de *E. coli* produtores de ESBL do tipo CTX-M, na presença/ausência de genes do tipo *qnr*, sugere que a transferência horizontal mediada por plasmídeos pode ser um evento genético que contribui com a seleção de cepas MR, com impacto clínico e epidemiológico para a medicina humana e veterinária, assim como para o agronegócio;
- A identificação de cepas de *Salmonella enterica*, clonalmente relacionadas, produtoras de ESBL do tipo CTX-M-2, confirma a endemicidade de um fenótipo MR e uma possível fonte de disseminação em comum;

REFERÊNCIAS

- AMATO NETO, V., NICODEMO, A. C.; LOPES, H. V. **Antibióticos na prática Médica**. 6 ed. São Paulo: Sarvier, 2007.
- AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciênc. Agrotec.**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.
- ANGULO, F. J. et al. Origins and consequences of antimicrobial-resistant non-typhoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. **Microb. Drug Resist.**, v. 6, n. 1, p. 77-83, 2000.
- ANTONIO, C. S. et al. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*_{OXA-143} gene in Brazilian hospitals. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 3, p. 1322-1323, 2011.
- ANTUNES, P.; MACHADO, J.; PEIXE, L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, p. 297-304, 2006.
- ARAUJO, J. A. et al. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Vet. Bras.**, v. 1, n.3, p. 69-77, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE FRANGO. Exportações 2009. São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/Estatisticas/MercadoExterno/Atual.php>> Acesso em: 20 jun. 2010.
- BACCARO, M.R., MORENO, A. M., CORRÊA, A., FERREIRA, A. P., CALDERARO, F. F Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 15-18, 2002.
- BAUERFEIND, A. J. M. et al. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella* Typhimurium. **Infection**, v. 20, p. 158-163, 1992.
- BAUERNFEIND, A. J. M. et al. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v. 18, p. 294-298, 1990.
- BAUERNFEIND, A. J. M. Sequences of β -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, n. 2, p. 509-513, 1996.

*De acordo com ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) - **NRB6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEIRÃO, E. M. et al. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 1, p. 69-73, 2011.

BERNARD, H. et al. A novel plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 29, p. 590–592, 1992.

BERTRAND, S. et al. Clonal emergence of extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 8, p. 2897-2903, 2006.

BIRBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BONNET, R. et al. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, n. 7, p. 1936-1942, 2000.

BONNET, R. et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240 \rightarrow Gly. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 8, p. 2269-2275, 2001.

BRANDT, S. M. et al. Molecular risk assessment and epidemiological typing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using a novel PCR binary typing system. **Appl. Environ. Microbiol.** v.77, n.7, p. 2458-2470, 2011.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Mapa político do Brasil. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>> Acesso em: 29 mar. 2011.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-proibidos>>. Acesso em: 20 jul. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmissíveis por alimentos no Brasil. Ministério da saúde. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/DTA.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2009.

BRENNER, F. W. et al. *Salmonella* nomenclature. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

BUSH, K. et al. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Update functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. β -lactamases classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. 2011. Available from: <<http://www.lahey.org/studies/>>. Acesso em: 03 abr. 2011.

CALIXTO, A. E. R. et al. Prevalência de *Salmonella* e ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos em insumos de rações para aves produzidos por um matadouro-frigorífico com fiscalização permanente, em Goiânia, GO. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p. 56-62, 2002.

CAMPOS, T. A. de et al. Occurrence of virulence-related sequences and phylogenetic analysis of commensal and pathogenic avian *Escherichia coli* strains (APEC) **Pesq. Vet. Bras.**, v. 28, n. 10, p. 533-540, 2008.

CARRAMIÑANA, J. J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, I.; HERRERA, A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Vet. Microbiol.**, v. 104, n. 1-2, p. 133-139, 2004.

CARTER, M. W. et al. Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid combination disk method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 11, p. 4228-4232, 2000.

CASEWELL, C. F. et al. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health **Mark. J. Ant.Chemother.**, v. 52, p. 159–161, 2003.

CASSETARI, V. C. et al. Risk factors for colonisation of newborn infants during an outbreak of extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit. **J. Hosp. Infec.**, v. 71, p. 340-347, 2009.

CASTANHEIRA, M. et al. First report of plasmid-mediated qnrA1 in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 4, p. 1527-1529, 2007.

CATTOIR V, NORDMANN P. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. **Curr. Med. Chem.**, v. 16, n. 8, p. 1028-1046, 2009.

CAVACO, L. M.; AARESTRUP, F. M. Evaluation of Quinolones for Use in Detection of Determinants of Acquired Quinolone Resistance, Including the New Transmissible Resistance Mechanisms *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, and *aac(6_)Ib-cr*, in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and Determinations of Wild-Type Distributions. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 9, p. 2751–2758, 2009.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks-United States, 2007**. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2007. Available from: <http://www.cdc.gov/outbreaknet/surveillance_data.html>. Acesso em: 12 out. 2010.

CERGOLE-NOVELLA, M. C. et al. First description of *bla*_{CTX-M-14} and *bla*_{CTX-M-15}-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 16, n. 3, p. 177-184, 2010.

CHAPMAN P. A. et al. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated rae meat products. **Int. J. Food Microbiol.** v. 68, p. 11-20, 2001.

CHEN, S. et al. Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Meats. **App. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 1, p. 1-7, 2004.

CLERMONT, O et al. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 10, p. 4555-4558, 2000.

CLERMONT, O. et al. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 64, n. 2, p. 274-277, 2009.

CLERMONT, O. et al. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 61, n. 5, p. 1024-1028, 2008.

CLIMACO, E. C. et al. CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 68, p. 186-189, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agents antimicrobianos por diluição para crescimento de bactérias aeróbias. 21st suplemento informativo. **CLSI document M100-S21**, USA, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agents antimicrobianos por diluição para crescimento de bactérias aeróbias. 15th suplemento informativo. **CLSI documento M100-S19**. 29(3), USA, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Disk Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard-Third Edition. **CLSI Document M31-A3**, USA, 2009.

CORKILL, J. E. et al. SHV-27, a novel cefotaxime-hydrolysing β -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 47, p. 463-465, 2001.

CORTEZ, A. L. L. Disseminação de bactérias dos gêneros *Campylobacter* e *Salmonella* em linhas de abate de aves. 2006. 80 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

CORTEZ, A. L. L.; DE CARVALHO, A. C. DE F. B.; IKUNO, A. A.; BURGER, K. P.; VIDAL-MARTINS A. M. C. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. **Arq. Inst. Biol.**, v. 73, n. 2, p. 157-163, 2006.

COSTA, M. M. et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, n. 1, p. 5-8, 2006.

CRÉMET, L. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL *Enterobacteriaceae* clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. **Pathol. Biologie**, v. 59, n.3, p151-156., 2009.

DAMIAN, M. et al. Bacterial enteric pathogens' resistance to fluoroquinolones and last generation cephalosporins, **Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol.**, v. 55, n.2, p.121-129. 2010.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. **Nature**, v. 208, p. 239-241, 1965.

DECHET, A. M. et al. Multistate Working Group. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Definitive Type 104 infection linked to commercial ground beef, northeastern United States, **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, p. 747-752, 2004.

DIAS DE OLIVEIRA, S. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **Int. J. Microbiol.**, v. 97, n. 3, p. 297-305, 2005.

DOLEJSKA M. et al. Plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. **J. Antimicrob Chemother.**, v. 66, n. 4, p. 757-764, 2011.

DROPA, M. **Caracterização genotípica de cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo.** 2006. 116f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DROPA, M. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants bla_{SHV-40}, bla_{TEM-116} and the class 1 integron-associated bla_{GES-7}, Brazil. **Clin. Microbiol. and Infect.**, v. 16, p. 630-632, 2010.

ETHELBERG, S. et al. Outbreak with multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 linked to carpaccio, Denmark. **Epidemiol. Infect.**, v. 135, p. 900-907, 2005.

FERNANDES, S. A. et al. CTX-M-2- producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 15, n. 4, p. 317-321, 2009.

FONSECA, E. L. et al. Clonality and antimicrobial resistance genes profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 2767-2772, 2006.

GARCIA, D. O. et al. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, n. 5, p. 1790-1793, 2008.

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

GLYINN, M. K. et al. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the united states. **New England**, v. 338, n. 19, p. 1333-1338, 1998.

GOMES, D. de M. **Resíduos de antibióticos promotores de crescimento em produtos de origem animal**. 2004. 75f. Monografia (Especialização em Qualidade de Alimentos) – Centro de Excelência em turismo, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

GOUWS, P. A.; BRÖZEL, V. S.; Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates associated with retail chickens and a poultry abattoir. **South African J. Sci.**, v. 96, p. 254–256, 2000.

GROSSO, F. et al. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 66, n. 1, p. 62-65, 2011.

GUTMANN, L. et al. SHV-5, a novel SHV-type β -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 33, n. 6, p. 951-956, 1989.

HARADA, S. et al. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. **Korean J. Lab. Med.**, v. 28, p. 401-412, 2008.

HELMS, M et al. Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella* Typhimurium. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 490-495, 2002.

HERNÁNDEZ, T. et al. Antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serovars isolated from chickens in Spain, **J. Chemother.**, v.14, p. 346–350, 2002.

HOFER, E. et al. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias primas e ração para aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, n. 1, p. 21-27, 1998.

HORIYAMA, T. et al. TolC dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium **J Antimicrob Chemother.**, v. 65, p. 1372–1376, 2010.

HUEHN, S. et al. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. **Foodborne pathog. Dis.**, v. 7, n. 5, p. 523-535, 2010.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS, 2000. Available from: <<http://www.icmsf.iit.edu/main/home.html>> Acesso em: 19 abr. 2011.

JACOBY, G. A. AmpC β -lactamases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 22, n.1, p. 161-182, 2009.

JACOBY, G. A. Mechanisms of **resistance** to quinolones. **Clin. Infect. Dis.**, v. 15, n. 41, p. 120-6, 2005. Suppl 2.

JACOBY, G. A., MUNOZ-PRICE, L. S. The new beta-lactamases. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, n. 4, p. 380-391, 2005.

KAKU, M. et al. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pub.**, v. 29, n. 2, p. 127-131, 1995.

KARCH, H.; MELLMANN, A.; BIELASZEWSKA, M. Epidemiology and pathogenesis of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.**, v. 122, n. 11-12, p. 417-424, 2009.

KARISIK, E. et al. Virulence factors in *Escherichia coli* with CTX-M-15 and other extended-spectrum β -lactamases in the UK. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 61, n. 1, p. 54-58, 2008.

KIESSLING, C. R.; CUTTING, J. H.; LOFTIS, M.; KIESSLING, W. M. ; DATTA, A. R.; SOFOS, J. N. Antimicrobial resistance of food-related *Salmonella* isolates 1999–2000. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 603–608, 2002.

KNOTHE, H. et al. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, p. 315-317, 1983.

KRAULAND, M. G. et al. Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 15, n. 3, p. 388-396, 2009.

LAU S. H. et al. UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 lactamases, all belong to the O25:H4 ST 131 clone. **J. Antimicrob Chemother.**, v. 62, n. 6, p. 1241-2144, 2008.

LEE, L. et al. Increase in antimicrobial-resistant *Salmonella* infections in the United States, 1989-1990. **J. Infect. Dis.**, v. 170, p.128-134, 1994.

LENA, A. P. B. C. **Caracterização de beta-lacmases de espectro estendido e determinação de grupos filogenéticos em isolados de *Escherichia coli* recuperados de pacientes em Hospital Universitário de São Paulo.** 2011. 100f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A. et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, n. 6, 2011.

LI, X. S. et al. Antimicrobial susceptibility and molecular detection of chloramphenicol and florfenicol resistance among *Escherichia coli* isolates from diseased chickens. **J Vet Sci.** v. 8, n. 3, p.243-7, 2007.

LINCOPAN, N. et al. Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, n. 11, p. 1611-1613, 2006.

LIPMAN, L. J. A. Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. **Vet. Microbiol.**, v. 43, n. 1, p. 13-19, 1995.

LOPES, A. C. et al. *bla*(CTX-M-2) and *bla*(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 163-167, 2010.

LUNN, A. D. et al. Prevalence of mechanisms decreasing quinolone-susceptibility among *Salmonella* spp. clinical isolates. **Int. Microbiol.**, v. 13, p. 15-20, 2010.

MARTINS R. P. et al. Prevalence of **enterotoxigenic** and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in pigs slaughtered in Mato Grosso, Brazil. **Infect Dev Ctries J.**, v. 5, n. 2, p. 123-127, 2011.

MARTINS, A. F. et al. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. **Infection**, v. 35, n. 6, p. 457-460, 2007.

MARTINS, S. C. S.; SERIO, J.; MATTEI, A. C. M.; ALBUQUERQUE, L. M. B. *Salmonella* em miúdos de aves – Resistência a antibióticos. **Higiene Alimentar**, v.14, n. 78-79, p. 74-76, 2000.

- MCEWEN S. A.; FEDORKA-CRAY P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 93-106, 2002. Suppl. 3.
- MCLAUGHLIN, J. B. et al. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium associated with ground beef served at a school potluck. **J. Food Protect.**, v. 69, p. 666-670, 2006.
- MICHAEL, G. B. et al. Class 1 integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from pig carcasses in Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 55, n. 5, p. 776-779, 2005.
- MILLET, S.; MAERTENS, L. The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: from challenges to opportunities. **Vet. J.**, v. 187, n. 2, p. 143-144, 2011.
- MINARINI, L. A. et al. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 65, n. 2, p. 202-206, 2009.
- MINARINI, L. A. R. et al. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. at a university hospital in Brazil. **Curr. Microbiol.**, v. 56, p. 587-591, 2008.
- MINARINI, L. A. R. et al. Multilocus sequence typing of uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* isolated in a Brazilian community. **Curr. Microbiol.**, v. 55, p. 524-529, 2007.
- MLST DATABASES AT THE ERI, UNIVERSITY COLLEGE CORK. *Escherichia coli* **MLST Database**. Available from: < <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>>. Acesso em: 10 jun. 2011.
- MOREIRA, M. A. S.; MORAES, C. A. Resistance to antibiotics in Gram-negative bacteria isolated from broiler carcasses. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 54, n. 1, p. 1-7, 2002.
- MURLEY, M. R. et al. Characterization of a *Salmonella* enteric serovar Agona strain harbouring a class 1 integron containing novel OXA-type β -lactamase (*bla*_{OXA-53}) and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase genes [*aac*(6')-130]. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 54, p. 354-359, 2004.
- MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia Médica**. Madri: Elsevier, 2010.
- NADVORNY, A., FIGUEIREDO, D.M.S., SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scient. Vet.**, v. 32, n. 1, p. 47-51, 2004.
- NAKAZATO, G. et al. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 7, p. 479-486, 2009..

NISHINO, K., LATIFI, T., GROISMAN, E. A. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium **Mol. Microbiol.** v. 59, n. 1, p. 126–141, 2006.

NORDMANN P., POIREL L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. **J Antimicrob Chemother.** v. 56, n. 3, p. 463-469, 2005.

NUNES, I.; OSUGUI, S. K.; ANDRADE, M. A. ; RIVERA, I. N. G.; RAUECKER, U. N.; FERREIRA, A. J. P. Susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de diferentes fontes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 166-173, 2010.

OLIVEIRA, C. F. et al. Prevalência das famílias TEM, SHV, CTX-M de β -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no hospital universitário de Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 5, p. 556-560, 2009.

OLIVEIRA, F. A. DE; BRANDELLI A.; TONDO, E. C. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. **New Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 49-54, 2006.

ORMAN, B. E. et al. Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 12, p. 3963-702, 2002.

OVERDEVEST, I et al. Extended-Spectrum β -Lactamase Genes of *Escherichia coli* in Chicken Meat and Humans, the Netherlands. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 17, n. 7, p. 1216-1222, 2011.

PALERMO NETO, J.; ALMEIDA, R. T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 640-658.

PARK, C. H. et al. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin modifying enzyme. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, p. 3953–3955, 2006.

PAVEZ, M. et al. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC beta-lactamase in Brazil. **J Med Microbiol.** v.57, p.1590-1592, 2008.

PEIRANO, G. et al. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 63, n. 2, p. 265-258, 2009.

PEIRANO, G. et al. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, p. 305-309, 2006.

PELLEGRINO, F. L. et al. *bla*GES carrying *Pseudomonas aeruginosa* from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 10, n. 4, p. 251-253, 2006.

PERESI, J.T.M. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Rev. Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 477-483, 1998.

PESSANHA, R.P.; GONTIJO FILHO, P.P.. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e *Enterobacteriaceae* lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n. 1, p. 111-115, 2001.

PETERS, T. M. Pulsed-Field Electroforesis for molecular epidemiology of food pathogens. **Methods Mol. Biol.** v. 551, p. 59-70, 2009.

PHILLIPS, I. et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 53, p. 28-52, 2004.

PICÃO, R. C. et al. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, p. 796-807, 2010.

PITOUT, J. D. Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: changing epidemiology and drug treatment choices. **Drugs**, v. 70, n. 3, p. 313-333, 2010.

POIREL, L.; CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? **Clin. Microbiol. and Infect.**, v. 14, n. 4, p. 295-297, 2008.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. The genus *Salmonella*. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2005. p. 764-799.

POPOFF, M.Y., BOCKEMUHUL, J., GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (número 46) to the Kauffmann-White scheme. **Res. Microbiol.**, v. 155, n. 7, p. 568-570, 2004.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

QUINTEIROS, M. et al. Extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 9, 2864-2867, 2003.

RADICE, M. et al. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 2, p. 602-604, 2002.

RAWAT, D.; NAIR, D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram negative Bacteria. **J. Glob. Infect. Dis.**, v. 2, n. 3, p. 263-274, 2010.

RIBEIRO, V. B. et al. Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in multidrugresistant *Salmonella enterica* isolates from foodstuff and related sources. **Braz. J. Microbiol.** v. 42, p. 685-692, 2011.

RIBEIRO, V. B. et al. Serological and genetic diversity amongst *Salmonella* strains isolated in a salami processing line. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, p. 178-182, 2007.

ROBICSEK A, JACOBY GA, HOOPER DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **Lancet Infect Dis.**, v. 6, n. 10, p. 629-640, 2006.

ROBICSEK, A. et al. qnr Prevalence in Ceftazidime-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates from the United States. **Ant. Agents and Chemother.**, v. 50, n. 8, p. 2872-2874, 2006.

ROCHA, P. T. et al. *Salmonella* spp. em forros de caixa de transporte e órgãos de pintos de um dia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 55, n. 6, p. 672-676, 2003.

RUTZ, F.; LIMA, G. J. M. M. O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no Brasil. 2001. Disponível em: <www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/pdf/Palestras2001/Fernando_Rutz.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2011.

SANTOS, C. D. M. *Staphylococcus* sp. e enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia-MG: perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. 2006. 120f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

SANTOS, D. F. et al. Extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in two hospitals in Goiânia/Brazil: detection, prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, p. 608-612, 2008.

SANTOS, D. M. S et al. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 39-42, 2000.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp., importante patógeno veiculado em alimentos. **Rev. Ciênc. e Saúde Col.**, v. 113, n. 5, p. 1676-1683, 2008.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Avic.**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

SILVA, N. et al. Risk factors for infection by extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Salvador, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 10, n. 3, 191-193, 2006.

- SIRINAVIN S.; CHIEMCHANYA S.; VORACHIT, M. Systemic nontyphoidal *Salmonella* infection in normal infants in Thailand. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 20, n. 6, p. 581-587, 2001.
- SPRICIGO, D. A., MATSUMOTO, S. R., ESPÍNDOLA, M. L., FERRAZ, S. M. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiça frescal suína **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, n.4, p. 779-785, 2008.
- SYRMIS, M. W. et al. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. **J Med. Microbiol.**, v.53, p.1089-1096, 2004.
- TANG, Y.; STRATTON, C. W. **Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology.** 6 ed. Nashville: Springer-Verlag, 2006.
- TESSARI, E. N. C. et al. Incidência de *Salmonella* spp. em pintos de corte recém-nascidos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 70, n. 3, p. 279-281, 2003.
- TESSMANN, C. et al. Ocorrência e perfil de sensibilidade a antibióticos de *Salmonella* spp. isolada em cortes de carne suína comercializados em feiras-livres de Pelotas-RS **Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment.**, v. 26, n. 2, p. 307-313, 2008.
- THAKUR, S.; TADESSE, D. A.; MORROW, M.; GEBREYES, A. W. Occurrence of multidrug resistant *Salmonella* in antimicrobial-free (ABF) swine production systems. **Vet. Microbiol.**, v. 125, p. 362–367, 2007.
- TOLLENTINO, F. M. et al. High prevalence of *bla*_{CTX-M} extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{SHV-38} and *bla*_{CTX-M-15} in Brazil. **Microb. Drug. Resist.**, v. 17, n. 1, p. 7-16, 2011.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE-ECONOMIC RESEARCH SERVICE. Foodborne Illness Cost Calculator: *Salmonella*. 2011. Available from: <http://www.ers.usda.gov/data/foodborneillness/salm_Intro.asp>. Acesso em: 05 ago. 2011.
- VALDEZATE, S. et al. Antimicrobial resistance and phage and molecular typing of *Salmonella* strains isolated from food for human consumption in Spain. **J. Food Prot.**, v. 70, n. 12, p. 2741-2748, 2007.
- VAZ, C. S. L. et al. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* sorovar Enteritidis from human outbreaks and poultry in southern Brazil. **Poultry Science**, v. 89, p. 1530-1536, 2010.

VERAS, D. L. et al. Prevalence of the *bla*_{SHV} gene in *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from hospital and community infections and from the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil. **Curr. Microbiol.**, v. 62, n. 5, p. 1610-1616, 2011.

VILLEGAS, M. et al. Increasing prevalence of extended-spectrum-betalactamase among Gram-negative bacilli in Latin America: 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 1, p. 34-39, 2011.

WARREN, R. E. et al. Chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 61, p. 504-508, 2008.

WATERS, A. E. et al. Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* in US Meat and Poultry. **Clin. Infect. Dis.**, v. 52, n. 10, p. 1227-1230, 2011.

WEGENER et al. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, p. 1420-1425, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Drug resistant *Salmonella*. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/> Acesso em: 10 out. 2010.