UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Estudo comparativo de métodos fenotípicos e biomoleculares
para determinação de resistência a antibióticos em cepas de
Salmonella spp isoladas de couro e carcaça de bovinos e
produtos cárneos

Verena Sant'Anna Cabral Capuano

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Bernadette Dora G. de Melo Franco

São Paulo
2012

Verena Sant'Anna Cabral Capuano

Estudo comparativo de métodos fenotípicos e biomoleculares
para determinação de resistência a antibióticos em cepas de
Salmonella spp isoladas de couro e carcaça de bovinos e
produtos cárneos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profª Drª Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

D. J. P. 13/11/2012

São Paulo, 13 de novembro de 2012.

*A Deus, o Pai, criador, que me
concedeu o dom da vida e me permitiu
seguir por este caminho.*

*A Jesus, meu Senhor, minha luz e meu
guia.*

*Ao meu marido e a minha família, que
me apoiaram para tornar possível a
realização desse trabalho.*

Agradecimentos

À Prof^a Dr^a Bernadette D.G.M. Franco, pela oportunidade, pela orientação, paciência, compreensão, apoio, ensinamentos e amizade.

À Prof^a Dr^a Maria Teresa Destro e Prof^a Dr^a Mariza Landgraf pelo apoio, ensinamentos e amizade.

À Prof^a Dr^a Maria Teresa Destro, pelas sugestões feitas na qualificação.

À Dr^a Christiane Asturiano Ristori Costa, pelas sugestões feitas na qualificação.

Ao Dr Rafael Chacon Ruiz Martinez, pelas sugestões feitas na qualificação e pela amizade.

À Prof^a MS Denize Aparecida Rodrigues pelo incentivo, apoio, confiança, ensinamentos e amizade.

À Dr^a Christiane Asturiano Ristori Costa, Janaina Thais Lopes e Angela Palamin Azevedo pelo fornecimento das cepas de *Salmonella* spp utilizadas neste estudo.

Ao Vinicius Buccelli Ribeiro por todo ensinamento, paciência, ajuda prestada e principalmente pela amizade.

À Vanessa Biscola por todo incentivo, confiança, ensinamento, paciência e amizade.

À Kátia Leani pelo ensinamento amizade e serviços prestados durante o trabalho e principalmente durante o PAE.

À Thaisla por toda ajuda prestada e amizade.

Aos colegas de laboratório de microbiologia de alimentos: Adriana, Ana Carolina, Anderson, Angela, Aline, Danielle, Fabiana, Isabela, Janaína, Kátia Leani, Lúcia, Maria Crystina, Maria Fernanda, Martha, Matheus, Patrícia, Priscila, Rafael, Rita, Slavi, Vinicius e Thaisla, pelo convívio, amizade e troca de conhecimentos.

À Cleonice, Essy e à Mônica da secretaria do departamento, pela atenção e serviços prestados.

Ao Edilson por toda paciência, atenção, ajuda, dedicação e serviços prestados.

Ao Jorge e Elaine, da secretaria de Pós- Graduação, pela atenção e serviços prestados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Aos meus pais Maria Angélica, Januário, Oséias e Ana Maria, por todo apoio, incentivo, confiança e principalmente pelo amor.

Ao meu marido Maurício por todo apoio, carinho e amor.

Aos meus irmãos Túlio e Giulia, e a minha cunhada Carol pelo apoio, amor e pela paciência em ouvir tantas vezes as minhas apresentações.

À minha avó Irene por todo amor e carinho.

Aos meus amigos Gisele, Cláudia, Marina, Mara, Elaine, Maria Fernanda, Adriana, Rafael, Martha, Diogo, Vinicius, Vanessa, Thais, Andréia, Carolina Zanco, pela amizade, carinho e pelos momentos agradáveis.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE QUADROS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 <i>Salmonella</i> sp: Características Gerais	2
1.2 Salmoneloses	3
1.3 Resistência antimicrobiana em <i>Salmonella</i> sp.....	5
1.4 Mecanismo de ação dos antibióticos	7
1.4.1 Antibióticos que atuam através da alteração da permeabilidade da parede celular microbiana	7
1.4.1.1 β lactâmicos	7
1.4.2 Antibióticos que atuam através da inibição da síntese proteica	9
1.4.2.1 Aminoglicosídeos	9
1.4.2.2 Tetraciclina	9
1.4.2.3 Cloranfenicol	10
1.4.3 Antibióticos que atuam através da inibição da síntese de ácido nucléico	10
1.4.3.1 Quinolonas	10
1.4.3.2 Trimetoprima	11
1.5 Métodos laboratoriais para diagnóstico de resistência a antibióticos	11

1.5.1.1 Métodos fenotípicos qualitativos	11
1.5.1.2 Métodos fenotípicos quantitativos	12
1.5.2 Métodos biomoleculares	13
1.6 Avaliação dos métodos para determinação de resistência a antibióticos	14
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Cepas de <i>Salmonella</i> spp.	19
3.2 Métodos fenotípicos para determinação da resistência antimicrobiana das cepas de <i>Salmonella</i> spp.	19
3.2.1 Método de Difusão do Disco	19
3.2.2 Método de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	23
3.3 Métodos Biomoleculares.....	27
3.3.1 Pesquisa de genes cromossomais de resistência a antimicrobianos.....	27
3.3.2 Pesquisa de genes plasmidiais de resistência a antibióticos	30
3.3.3 Pesquisa de integrons classe 1.....	30
4. RESULTADOS	32
4.1 Resistência antimicrobiana das 107 cepas de <i>Salmonella</i> sp	32
4.2 Resistência antimicrobiana determinada através dos métodos fenotípicos.....	34
4.2.1 Método de difusão do disco de resistência antimicrobiana	34
4.2.2 Método de determinação da CIM	36
4.2.3 Métodos fenotípicos em conjunto.....	39

4.3 Métodos biomoleculares para determinação da resistência antimicrobiana de <i>Salmonella</i> spp	43
4.4 Características das cepas de <i>Salmonella</i> resistentes a antibióticos	51
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

	pg.
Figura 1. Princípio do método difusão do disco empregado para determinação da resistência de cepas de <i>Salmonella</i> sp. a antibióticos.....	12
Figura 2. Princípio do método da determinação da CIM (concentração inibitória mínima) por macrodiluição em caldo para determinação da resistência antimicrobiana.....	13
Figura 3. Princípio do método da determinação da CIM concentração inibitória mínima utilizando kits comerciais.....	13
Figura 4. Esquema do método de difusão do disco empregado para determinação da resistência de cepas de <i>Salmonella</i> sp. a antibióticos.....	21
Figura 5. Fitas plásticas MICE™ (Oxoid do Brasil Ltda) usadas para determinação de Concentração Mínima Inibitória.....	23
Figura 6. Esquema dos métodos utilizados para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de antibióticos, para cepas de <i>Salmonella</i> spp.....	25
Figura 7. Gel de agarose 1% (p/v) exibindo o DNA plamideal das cepas de <i>Salmonella</i> . Marcador peso molecular: DNA/hindIII de 23,1 Kb Fermentas.....	47
Figura 8. Gel de agarose 1% (p/v) exibindo fragmentos de amplificação de integrons classe I nas cepas de <i>Salmonella</i> sp. Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas, EUA) C- = controle negativo.....	50

LISTA DE QUADROS

	pg.
Quadro 1. Interpretação dos resultados de resistência aos antibióticos empregando-se o método de difusão do disco, segundo CLSI 2010.....	22
Quadro 2. Interpretação dos resultados de resistência aos antibióticos empregando-se o método CIM, segundo CLSI 2010.....	26
Quadro 3. Cepas de <i>Salmonella</i> sp. que apresentaram resistência a antibióticos, determinada através do método de difusão do disco....	35
Quadro 4. Cepas de <i>Salmonella</i> sp. que apresentaram resistência a antibióticos, determinada utilizando a técnica de microdiluição em caldo e tiras MICE.....	37
Quadro 5. Cepas de <i>Salmonella</i> sp. que apresentaram resultados divergentes na determinação da CIM utilizando a técnica de microdiluição em caldo e tiras MICE.....	38
Quadro 6. Cepas de <i>Salmonella</i> spp. que apresentaram resultados divergentes de resistência antimicrobiana quando testados empregando-se os métodos de difusão do disco e de determinação da CIM.....	40
Quadro 7. Cepas de <i>Salmonella</i> sp. resistentes a pelo menos um dos antibióticos em pelo menos um dos métodos avaliados que apresentaram divergência de resultado.....	42

LISTA DE TABELAS

	pg.
Tabela 1. <i>Primers</i> usados na PCR para detecção de genes de resistência nas cepas de <i>Salmonella</i>	28
Tabela 2. Resistência antimicrobiana das 107 cepas de <i>Salmonella</i> sp determinada através de métodos fenotípicos.....	32
Tabela 3. Características das cepas de <i>Salmonella</i> sp. que apresentaram resistência antimicrobiana.....	33
Tabela 4. Concordância de resultados obtidos na determinação da resistência antimicrobiana de cepas de <i>Salmonella</i> sp., através do método de difusão do disco, empregando-se discos de duas marcas diferentes.....	36
Tabela 5. Concordância de resultados obtidos na determinação da resistência antimicrobiana de cepas de <i>Salmonella</i> sp. empregando-se os métodos de microdiluição em caldo e fitas MICE.....	39
Tabela 6. Concordância entre os resultados de resistência antimicrobiana nas cepas de <i>Salmonella</i> empregando-se os métodos de difusão do disco e de determinação da CIM.....	41
Tabela 7. Detecção de genes de resistência em cepas de <i>Salmonella</i> sp. que apresentaram resistência a algum antimicrobiano detectado pelos métodos fenotípicos testados.....	45
Tabela 8. Detecção de genes de resistência em cepas de <i>Salmonella</i> sp. que apresentaram divergência de resultados a algum método fenotípico testado.....	49
Tabela 9. Resistência antimicrobiana das cepas de <i>Salmonella</i> de acordo com os sorovares.....	52
Tabela 10. Origem das cepas de <i>Salmonella</i> sp. resistentes a antimicrobianos.....	52

RESUMO

CAPUANO, V.S.A.C. **Estudo comparativo de métodos fenotípicos e biomoleculares para determinação de resistência a antibióticos em cepas de *Salmonella* spp isoladas de couro e carcaça de bovinos e produtos cárneos.** 2012. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012.

Esse estudo comparou diferentes métodos fenotípicos e biomoleculares para avaliação da resistência antimicrobiana de 107 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças e couro de bovinos e de produtos cárneos. Os antimicrobianos testados foram ampicilina, cefotaxima, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, tetraciclina e trimetoprima. Os testes fenotípicos empregados foram: difusão do disco em ágar, utilizando discos produzidos por duas empresas diferentes e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), realizada em placas de microtitulação e empregando tiras comerciais de antibióticos. O método biomolecular (PCR) objetivou a pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos (*bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{PSE-1}, *cat1*, *cat2*, *floR*, *cmlA*, *cmlB*, *aac(3)IVa*, *aadB*, *aadD*, *aphA1*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG* e *dhfr1*), localizados no cromossomo, plasmídeos e integrons classe 1, e foi aplicado para as cepas que apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos testados por algum dos testes fenotípicos e para as cepas que apresentaram resultados contraditórios nos testes fenotípicos. Todos os métodos foram executados de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Foi detectada resistência a pelo menos um antibiótico em 26 cepas (24%), sendo que 20 (77%) dessas foram multirresistentes. A correlação de resultados obtidos pelo método de difusão de discos empregando os discos de duas marcas diferentes foi de 99,7%, enquanto a correlação dos resultados obtidos pelos dois métodos de determinação da CIM foi de 98,6%. Para os resultados obtidos pelos métodos de difusão de discos e determinação da CIM a correlação foi de 98,4%. Não foi observada uma boa correlação entre a presença dos genes detectados e o resultado apresentado pelos métodos fenotípicos.

Palavras-chave: *Salmonella*, resistência antimicrobiana, métodos fenotípicos, métodos biomoleculares

ABSTRACT

CAPUANO, V.S.A.C. **Comparative study of phenotypic and biomolecular methods for determination of the antimicrobial resistance in *Salmonella* spp strains isolated from hides and carcasses of cattle and meat products.** 2012. Dissertação (Mestrado) –Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, 2012.

This study compared different phenotypic and molecular methods for the evaluation of antimicrobial resistance of 107 strains of *Salmonella* spp. isolated from hides and carcasses of cattle and meat products. The antimicrobials tested were ampicillin, cefotaxime, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, tetracycline and trimethoprim. Phenotypic tests included agar disk diffusion, using disks produced by two different companies and determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) conducted in microtiter plates and commercial antibiotic strips. The biomolecular method (PCR) focused antimicrobial resistance genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{PSE-1}, *cat1*, *cat2*, *floR*, *cmlA*, *cmlB*, *aac(3)IVa*, *aadB*, *aadD*, *aphA1*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG* e *dhfrI*) located on chromosomes, plasmids and class 1 integrons, and was applied to the strains that were resistant to at least one of the antibiotics tested as detected by the phenotypic tests and to strains that showed contradictory results in the phenotypic tests. All methods were performed according to the standards of the Clinical and Laboratory Standards Institute. Resistance to at least one antibiotic was detected in 26 strains (24%), and 20 (77%) of these were multidrug-resistant. The correlation between results obtained by disk diffusion method using discs of two different brands was 99.7%, while the correlation of the results obtained by the two methods of determining the MIC was 98.6 %. For the results of the methods of disc diffusion and MIC determination the correlation was 98.4%. There was no good correlation between the presence of genes detected and the result presented by phenotypic methods.

Key-words: *Salmonella*, antimicrobial resistance, phenotypic methods, molecular methods

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Salmonella* sp: Características Gerais

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e consiste de bacilos Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos e geralmente móveis devido à presença de flagelos peritríquios, com exceção da *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. As salmonelas fermentam glicose e outros carboidratos com produção de gás, mas em sua maioria são incapazes de fermentar lactose e sacarose (Jay, 2005; Ferreira e Campos, 2008; Loureiro *et al.*, 2010). Esses micro-organismos são capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono, não produzem indol, são oxidase negativos e catalase positivos, não produzem acetoína, sintetizam ácido sulfídrico, não hidrolisam uréia e descarboxilam lisina e ornitina (Le Minor, 1984).

As salmonelas são micro-organismos mesófilos cuja temperatura ideal de multiplicação encontra-se entre 35°C e 37°C. Porém, são capazes de se multiplicar em uma faixa bem mais ampla de temperatura, havendo relatos da multiplicação a 5,5°C e 49,5°C. O pH ótimo para multiplicação deste micro-organismo é 7,0 sendo que valores superiores a 9,0 e abaixo de 4,0 são considerados bactericidas (Rhoades; Duffy; Koutsoumanis, 2009).

Atualmente o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies e 2.610 sorovares: *Salmonella enterica* (subsp. *Enterica* com 1547 sorovares; subsp. *salamae* com 513 sorovares; subsp. *arizonae* com 100 sorovares; subsp. *diarizonae* com 341 sorovares; subsp. *houtenae* com 73 sorovares e subsp. *indica* com 13 sorovares) e *Salmonella bongori* (23 sorovares) (Guibourdenche *et al.*, 2010). Shelobolina *et al.* (2004) isolaram uma bactéria de sedimento aquífero nos Estados Unidos que possui a sequência de DNA ribossômico 16S com 96,4% de similaridade à *Salmonella bongori* e 96,3% de similaridade à *Enterobacter cloacae* e propuseram uma terceira espécie, denominada *S. subterranea*. Porém, de acordo com WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, esta bactéria não pertence ao gênero *Salmonella*, tendo sido inserida como pertencente à espécie *bongori* (Grimont e Weill, 2007, Guibourdenche *et al.*, 2010).

Para a classificação da *Salmonella* sp. utiliza-se o esquema de Kauffmann-White, que divide o gênero em tipos sorológicos baseando-se no perfil antigênico,

que inclui antígenos somáticos (O) presentes na parede celular, constituídos de cadeias de lipopolissacarídeos; antígenos flagelares (H), de natureza proteica, e antígenos capsulares (Vi), de natureza polissacarídica. A revisão deste esquema taxonômico ocorre a cada cinco anos pelo *WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella* (Popoff e Le Minor, 2005).

A grafia mais utilizada para descrever as diferentes salmonelas é a proposta pelo Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC), dos Estados Unidos, na qual gênero, espécie e subespécie são escritos em letras itálicas e o sorovar é escrito em letras romanas como, por exemplo: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium. Por questões práticas, é comum grafar-se apenas *Salmonella* Typhimurium (Grimont e Weill, 2007; CDC, 2010a).

As salmonelas têm como habitat primário o trato intestinal de mamíferos, anfíbios, répteis, aves e insetos. A transmissão deste micro-organismo para o homem geralmente ocorre pelo consumo de água e alimentos contaminados (CDC, 2008; CDC, 2010b; CDC, 2011a).

1.2 Salmoneloses

Entre as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), as salmoneloses são as mais importantes, sendo consideradas um problema de saúde pública em todo mundo, gerando grandes prejuízos sociais e econômicos (WHO, 2012).

Nos Estados Unidos, estima-se que ocorram 42.000 casos de salmonelose por ano, sendo os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* os mais frequentemente isolados em surtos envolvendo humanos. Segundo o CDC (2012), entre 2008 e 2012, surtos envolvendo cepas de *Salmonella* sp. foram causados por diversos tipos de alimentos, como ovos (*S. Enteritidis*), carne moída (*S. Typhimurium*), frango Kosher (*S. Heidelberg*), atum (*S. Bareilly* e *S. Nchanga*), manteiga de amendoim (*S. Tennessee* e *S. Typhimurium*), melões cantaloupes (*S. Panama*), pimenta vermelha e preta (*S. Montevideo*) e hambúrguer de peru (*S. Hadar*).

Anualmente são registrados aproximadamente 100.000 casos de salmonelose na União Européia, causando um prejuízo econômico de até 3 bilhões de euros por ano com tratamentos médicos, despesas hospitalares, recolhimento de lotes de

alimentos contaminados, reprocessamento ou destruição de alimentos (EFSA, 2012).

No Brasil, entre 2000 e 2011, foram identificados 1.660 surtos causados por *Salmonella* sp. (SVS, 2011).

É importante salientar que o número real de surtos deve ser muito maior do que o descrito, pois a maioria dos casos, principalmente os mais brandos, não são diagnosticados ou notificados (CDC, 2012).

As doenças causadas por *Salmonella* sp. em humanos podem ser divididas em três grupos: a febre tifóide, cujo agente etiológico é *S. Typhi*; as febres paratífóides, causadas pelos sorovares *S. Paratyphi* A, B e C e as enterocolites, que correspondem à manifestação clínica mais comum, causadas pelos sorovares não tifóides e ubíquos (CDC, 2011b; EFSA, 2012).

- a) **Febre tifóide:** ocorre somente em humanos e normalmente é transmitida por água e alimentos contaminados por material fecal humano. De gravidade variável, os sintomas aparecem, em geral, em 14 dias e são caracterizados por febre alta, diarreia, vômitos, letargia, dor abdominal, cefaleia, erupções cutâneas e septicemia, com duração de uma a oito semanas. A taxa de letalidade está em torno de 10% (Forsythe, 2002; Jay, 2005);
- b) **Febres paratífóides:** são semelhantes à febre tifóide, mas com sintomas mais brandos. Geralmente estão presentes quadros de febre, vômitos, diarreia e septicemia, com duração máxima de três semanas. Também só ocorrem em seres humanos, sendo igualmente transmitidas por água e alimentos contaminados (Jay, 2005);
- c) **Gastroenterite ou enterocolite:** os sintomas são febre, cefaleia, calafrios, dor abdominal, diarreia, náuseas e vômito (Jay, 2005). O período de incubação é de 12 a 36 horas e a doença apresenta duração de quatro a cinco dias. A dose infectante varia de acordo com o hospedeiro, o sorovar e o alimento envolvido (Forsythe, 2002).

De modo geral, as enterocolites por *Salmonella* são auto-limitadas, não necessitando de tratamento com antibióticos. Para determinados grupos de risco,

tais como crianças, idosos e imunodeprimidos, a enfermidade pode se agravar, já que as salmonelas podem atingir a corrente sanguínea e provocar infecção e lesões em outros órgãos, sendo necessária a intervenção com antibióticos (Butaye *et al.*, 2006; CDC, 2010c). Cloranfenicol, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprima e tetraciclina foram os antibióticos de primeira escolha empregados durante muitos anos, mas com o surgimento de cepas resistentes a estes antibióticos, o uso de fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, se tornou comum. Como este antibiótico passou a ser utilizado também no tratamento de animais, a ocorrência de cepas de *Salmonella* resistentes à ciprofloxacina tem aumentado (WHO, 1998; EFSA, 2008; CDC, 2010b; Van *et al.*, 2012).

1.3 Resistência antimicrobiana em *Salmonella* sp.

A resistência antimicrobiana e especialmente a multirresistência em *Salmonella* sp. são comuns e um grande problema em todo o mundo, sendo resultado do uso excessivo e inadequado de antibióticos. A maioria dos antibióticos usado na criação de gado não é empregada no tratamento de doenças em humanos, mas como promotores do crescimento dos animais ou para prevenir possíveis problemas decorrentes de falta de higiene e superlotação de animais (Collignon *et al.*, 2009; CSPI, 2011; FDA 2012a; Van *et al.*, 2012).

A ocorrência de cepas multirresistentes é um problema para o tratamento de casos de infecção por *Salmonella*, nos quais a intervenção com antibióticos se faz necessária.

Vários problemas causados por salmonelas resistentes aos antibióticos em alimentos já foram relatados. Nos Estados Unidos, em outubro de 2011, carne moída contaminada por uma cepa de *S. Typhimurium* multirresistente causou um surto de salmonelose em sete estados e infectou 20 pessoas (CDC, 2012). Na Turquia, Arslan e Eyi (2010) verificaram que 62% dos isolados de *Salmonella* de produtos cárneos (carne de frango, carne moída e carne bovina) apresentaram resistência a três ou mais antibióticos.

No Brasil, diversos estudos indicam a ocorrência de cepas de *Salmonella* multirresistentes em produtos cárneos. Tessmann *et al.* (2008) relataram que

isolados de *S. Typhimurium*, *S. Infantis* e *S. Panama* provenientes de carne suína apresentaram resistência a três ou mais antibióticos. Ribeiro *et al.* (2006) relataram que todas as cepas de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango apresentaram perfil de multirresistência, resultado semelhante ao observado por Murmann *et al.* (2008), que verificaram que 85,9% dos isolados de *Salmonella* provenientes de salsichas frescas apresentaram resistência a mais de um antibiótico.

Nos Estados Unidos, o uso de antibióticos é pouco regulamentado, porém o FDA recomenda que os agropecuaristas substituam os antibióticos utilizados na produção animal e na promoção do crescimento por supervisão veterinária adequada (FDA, 2012b).

Na União Europeia, a utilização de qualquer antimicrobiano como promotor de crescimento na produção animal é proibida desde 2006 (Gyles, 2008).

No Brasil, a utilização de anfenicóis, tetraciclinas, β lactâmicos (benzilpenicilâmicos, cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas na cadeia produtiva de alimentos de origem animal é proibida desde 2009 pela Instrução Normativa nº 26, 9/07/2009, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O uso de avilamicina, bacitracina, colistina, clorexidina, enramicina, eritromicina, espiamicina, flavomicina, clorohidroxiquinolina, lasalocinda, monensina, salinomina, tiamulina, tilosina, lincomicina e virginamicina é permitido desde que respeitado o período de carência antes do abate (Brasil, 2009).

Na maioria dos casos, a resistência antimicrobiana de *Salmonella* sp. é mediada por genes de resistência presentes em plasmídeos ou integrons. Por serem móveis, estas unidades genéticas exercem um importante papel na disseminação de resistência, não só entre os sorovares de *Salmonella* sp., mas também entre diferentes espécies bacterianas (Hawkey e Jones, 2009; Pignato *et al.*, 2010).

Plasmídeos são pequenas estruturas circulares de DNA extracromossômico, comuns em espécies da família Enterobacteriaceae como *Salmonella* (Bennett, 2008). Estes plasmídeos podem ser transferidos de uma célula para outra através

de conjugação, transdução mediada por bacteriófagos, e transformação, que é a endocitose de material genético livre no meio (Carattoli, 2003).

Os integrons são pequenas sequências móveis de DNA, que podem estar localizadas tanto no cromossomo bacteriano como em plasmídeos. Os integrons podem ser capturados por estas estruturas, que passam expressar os genes de resistência presentes nos integrons. Esses elementos móveis têm um papel muito importante como disseminadores de resistência e multirresistência entre bactérias Gram-negativas (Carattoli, 2001; Gillings *et al.*, 2008; Meng, *et al.*, 2011; Soulfy *et al.*, 2012).

Existem quatro diferentes classes de integrons (1, 2, 3 e 4), sendo que os de classe 1 são os mais comuns em *Salmonella* (Khemtong e Chuanchuen, 2008; Thong e Modarressi, 2011). Estruturalmente, os integrons classe 1 contêm duas regiões conservadas: a região da extremidade 5' e a região da extremidade 3'. A região entre as duas extremidades é variável, e pode abrigar diferentes cassetes gênicos, incluindo genes de resistência a antibióticos (Carattoli, 2001; Krauland *et al.*, 2009). Soulfy *et al.* (2012) observaram a presença de integrons classe 1 em 41% das cepas de *Salmonella* multirresistentes isoladas de carne de frango na Tunísia.

1.4 Mecanismo de ação dos antibióticos

Os antibióticos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação sobre diferentes alvos na célula bacteriana, como a parede celular, a síntese de proteica, a síntese de DNA, e ainda a membrana celular (Alterthum, 2008).

1.4.1. Antibióticos que atuam através da alteração da permeabilidade da parede celular microbiana

1.4.1.1. β lactâmicos

Os antibióticos β lactâmicos são classificados de acordo com sua estrutura química e resistência à ação de β lactamases (Tortora, 2005; Alcaine *et al.*, 2007; Alterthum, 2008). Estes antibióticos possuem uma estrutura central formada por um anel β lactâmico que se liga às *penicillin-binding proteins* (PBP), presentes na

membrana citoplasmática bacteriana, bloqueando a etapa final da síntese do peptidoglicano, causando a morte celular.

O mecanismo mais comum de resistência a esses antibióticos é a secreção de β -lactamases que hidrolisam o anel β lactâmico, inativando o antimicrobiano e impedindo sua ação contra a parede celular bacteriana (Alcaine *et al.*, 2007; Alterthum, 2008). Normalmente esta resistência está associada à presença dos genes TEM, SHV, CTX, PSE e OXA, que conferem não só resistência a penicilinas, mas também à cefalosporinas de outras gerações (Olesen *et al.*, 2004, Arlet *et al.*, 2006; Alcaine *et al.*, 2007). Olesen *et al.* (2004), na Dinamarca, verificaram que 94% das cepas de *Salmonella* resistentes a ampicilina, isoladas de suínos, bovinos e aves, continham o gene *Bla*_{TEM}.

A ampicilina foi durante muitos anos, o β lactâmico de primeira escolha no tratamento de salmoneloses. Porém, o surgimento de cepas resistentes têm dificultado o tratamento de infecções por *Salmonella* invasiva, fazendo com que as cefalosporinas de terceira geração, como a cefotaxima, sejam uma opção terapêutica, especialmente em crianças e adolescentes, nos quais o tratamento com fluoroquinolonas não é recomendado devido à elevada toxicidade destes compostos (Hohmann, 2001; Su *et al.*, 2004). Infelizmente, a resistência a cefalosporinas também está aumentando, principalmente em relação a *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (Arlet *et al.*, 2006).

Por conseguinte, os carbapenêmicos, como o imipenem, podem representar o último recurso terapêutico em pacientes com infecção por *Salmonella* multirresistente (Jean *et al.*, 2005). No entanto, deve-se atentar para o surgimento de cepas de *Salmonella* resistentes aos carbapenêmicos, pois não existe outra droga para substituir estes antibióticos na prática médica (Su *et al.*, 2012).

1.4.2. Antibióticos que atuam através da inibição da síntese proteica

1.4.2.1. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos descobertos em 1943, com a produção de estreptomicina por *Streptomyces griseus*. Outros antibióticos que fazem parte deste grupo são: neomicina, amicacina e gentamicina (Alcaine *et al.*, 2007).

Os aminoglicosídeos, frequentemente utilizados para tratar infecções causadas por bacilos Gram-negativos (Shaw *et al.*, 1993; Galimand *et al.*, 2003), ligam-se irreversivelmente à subunidade 30S ribossômica, interferindo na tradução. O resultado é a formação de proteínas defeituosas que alteram o funcionamento da membrana celular, causando a morte bacteriana (Alcaine *et al.*, 2007).

O principal mecanismo de resistência a aminoglicosídeos é a produção de enzimas que modificam as moléculas dos aminoglicosídeos, impedindo sua ligação com os ribossomos. Três famílias de enzimas têm sido frequentemente relacionadas com resistência a aminoglicosídeos em bactérias gram negativas: acetiltransferases (AACs), fosfotransferases (APHs) e nucleotidiltransferases (AAD) (Shaw *et al.*, 1993; Alcaine *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2010).

1.4.2.2. Tetraciclinas

As tetraciclinas, descobertos na década de 1940, são antibióticos de amplo espectro, eficazes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A primeira tetraciclina descrita foi produzida por *Streptomyces aureofaciens* (Chopra e Roberts, 2001; Melchor *et al.*, 2010).

As tetraciclinas atuam através da ligação com a porção 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a fixação do RNA transportador e assim, inibindo a síntese de proteínas (Chopra e Roberts, 2001; Alcaine *et al.*, 2007).

As salmonelas podem apresentar três mecanismos de resistência às tetraciclinas: 1. síntese de proteínas que protegem o ribossomo, impedindo a ligação do antibiótico; 2. produção de enzimas que inativam o antibiótico; 3. ativação da bomba de efluxo, responsável pela remoção do antibiótico da célula para o meio

extracelular, sendo este o mecanismo mais comumente reportado (Chopra e Roberts, 2001). Existem pelo menos 32 genes associados à resistência à tetraciclina, dos quais os genes *tet(A)* e *tet(B)* são frequentemente encontrados em *Salmonella* (Chopra e Roberts, 2001; Carattoli, 2001; Alcaine *et al.*, 2007).

1.4.2.3. Cloranfenicol

O cloranfenicol foi descoberto em 1947 e é produzido por *Streptomyces venezuelae*. Durante anos esta foi a droga de primeira escolha para tratamento da febre tifoide (Alcaine *et al.*, 2007).

O cloranfenicol inibe a síntese proteica através do bloqueio da enzima peptidil-transferase, impedindo o alongamento da cadeia polipeptídica (Alcaine *et al.*, 2007; Alterthum, 2008).

Normalmente, a resistência ao cloranfenicol ocorre por meio de dois mecanismos: produção da enzima cloranfenicol acetil transferase (CAT), que inativa o antibiótico; e a ativação de uma bomba de efluxo, que remove o antibiótico de dentro da célula. A resistência a cloranfenicol está associada à presença dos genes *cmIA* e *floR* (Arcangioli *et al.*, 2000).

1.4.3. Antibióticos que atuam através da inibição da síntese de ácido nucléico

1.4.3.1. Quinolonas

As quinolonas, descobertas em 1962, apresentam diferentes propriedades bioquímicas e antimicrobianas. As quinolonas interferem na síntese de DNA através da inibição das enzimas DNA girase e topoisomerase IV, responsáveis pelo enrolamento e desenrolamento da molécula de DNA (Alterthum, 2008).

A ciprofloxacina é a quinolona mais ativa contra bacilos Gram-negativos. Este antibiótico pertence à classe das quinolonas de segunda geração, correspondentes a quinolonas modificadas através da adição de um átomo de flúor (fluoroquinolonas), o que ampliou o seu espectro de ação (Alterthum, 2008).

1.4.3.2. Trimetoprima

A trimetoprima é um antibiótico frequentemente utilizado no tratamento de febre entérica causada por *Salmonella* sp. Este composto atua inibindo a enzima diidrofolato redutase (DHFR), responsável pela redução do ácido fólico a ácido folínico, necessário para a síntese de purinas e pirimidinas, fundamentais para formação dos ácidos nucleicos (Alcaine *et al.*, 2007; Alterthum, 2008).

A resistência de *Salmonella* à trimetoprima ocorre devido à ativação do gene *dhfr*, responsável pela alteração estrutural da enzima diidrofolato redutase (Alcaine *et al.*, 2007; Alterthum, 2008).

1.5 Métodos laboratoriais para diagnóstico de resistência a antibióticos

A resistência de micro-organismos a antibióticos pode ser avaliada utilizando-se diferentes métodos qualitativos e quantitativos. Os mais empregados são os métodos fenotípicos, nos quais se avalia a capacidade dos micro-organismos se multiplicarem na presença do(s) antibiótico(s) testado(s). Os métodos fenotípicos mais utilizados são a difusão do disco em ágar, indicado para bactérias com multiplicação rápida e alguns micro-organismos fastidiosos, e a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que pode ser feita de maneira tradicional em placas de microtitulação ou com o emprego de kits comerciais (CLSI, 2005a). Além dos métodos fenotípicos, existem também os métodos biomoleculares, para detecção dos genes de resistência a antimicrobianos, geralmente empregando-se a técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR).

1.5.1.1. Métodos fenotípicos qualitativos

O método de difusão do disco, padronizado por Kirby-Bauer em 1966, é o método fenotípico mais conhecido e mais utilizado para determinar se o micro-organismo é resistente ou sensível a determinado antimicrobiano. Este método apresenta características que facilitam sua implantação em laboratórios de rotina, como praticidade, baixo custo e rapidez na execução (Maeda *et al.*, 2011).

Este teste baseia-se na difusão do antibiótico contido em um disco de papel, depositado sobre a superfície de um meio sólido previamente inoculado com o

micro-organismo a ser testado. Após a incubação, observa-se a presença/ausência de halo de inibição do micro-organismo ao redor do disco impregnado com o antibiótico. Para a obtenção de resultados confiáveis, o teste deve seguir todas as recomendações indicadas pela CLSI em relação ao meio de cultura, (espessura e pH), concentração do inóculo, tempo e temperatura de incubação e mensuração e interpretação do diâmetro do halo de inibição obtido (Figura 1) (CLSI, 2005b, CLSI, 2005c).

Figura 1- Princípio do método de difusão do disco empregado para determinação da resistência de cepas de *Salmonella* sp. a antibióticos

1.5.1.2. Métodos fenotípicos quantitativos

Os métodos fenotípicos quantitativos são utilizados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), podendo ser empregadas diferentes técnicas. Uma delas é a macrodiluição em tubos, na qual a cultura microbiana em teste é cultivada em tubos de ensaio contendo concentrações seriadas do antibiótico em teste, determinando qual a concentração que inibe a multiplicação microbiana (Figura 2). Trata-se de uma técnica trabalhosa, que requer muita vidraria e preparação de muitos reagentes (Jorgensen e Ferraro, 2009). Uma alternativa é a utilização de placas de microtitulação (método de microdiluição), que requer menos reagentes e é passível de automação.

Figura 2- Princípio do método da determinação da CIM (concentração inibitória mínima) por macrodiluição em caldo para determinação da resistência antimicrobiana

Alternativamente, podem ser utilizados kits comerciais, como as tiras plásticas ETest (Biomerieux Brasil) e MICE (Minimal Inhibitory Concentration EvaluatorTM) (Oxoid Brasil Ltda). Estas tiras são impregnadas com concentrações crescentes dos antibióticos, devendo ser aplicadas à superfície das placas contendo o meio de cultura previamente inoculado com a cultura em teste (Figura 3).

Figura 3- Princípio do método da determinação da CIM concentração inibitória mínima utilizando kits comerciais

1.5.2. Métodos biomoleculares

No estudo de resistência antimicrobiana por métodos biomoleculares, investiga-se a presença de genes de resistência a antibióticos no cromossomo, plasmídeos ou integrons do micro-organismo analisado, através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica da PCR tem como finalidade amplificar um

determinado fragmento gênico e consiste na alternância de ciclos, os quais são caracterizados pela sucessão de três etapas básicas, conforme descrito a seguir:

Fase de desnaturação: nesta etapa ocorre a abertura da dupla fita de DNA através do emprego de calor (normalmente acima de 90°C);

Fase de anelamento: nesta fase os iniciadores (*primers*) se ligam de maneira específica à uma sequência homologa na fita simples do DNA;

Fase de extensão: nesta etapa ocorre a produção de nova fita complementar à fita anteriormente desnaturada, através da atuação da enzima Taq Polimerase (Sambrook, 1989).

Vale ressaltar que a presença de algum gene de resistência não necessariamente significa que o micro-organismo expressará a proteína promotora da resistência, pois ele pode conter o gene, mas este pode estar inativo, e a bactéria será sensível ao antibiótico testado.

1.6 Avaliação dos métodos para determinação de resistência a antibióticos

Os métodos fenotípicos para determinação de resistência a antibióticos, descritos no item 1.5, possuem diferentes graus de precisão e confiabilidade.

Campana *et al.* (2011) compararam o método de microdiluição em caldo com a fita ETest para avaliação da resistência de *E.coli*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus* spp e enterococos e observaram boa correlação entre os resultados obtidos. Resultado semelhante foi observado por Luber *et al.* (2003), que compararam os métodos de microdiluição em caldo, diluição em ágar e Etest para avaliar a resistência de *Campylobacter* sp. a gentamicina, eritromicina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, tetraciclina e trimetoprima/sulfametoxazol.

Maeda *et al.* (2011) compararam o método de microdiluição em caldo com o teste de difusão do disco para verificar a resistência de *Streptococcus* spp. a penicilina, ciprofloxacina e eritromicina. Os resultados obtidos em relação à ciprofloxacina e eritromicina foram equivalentes; entretanto, houve resultados discrepantes em relação à penicilina.

Sejas *et al.* (2001) avaliaram a qualidade de discos de 18 antimicrobianos de cinco marcas comerciais diferentes comercializados no Brasil para determinação da resistência de quatro cepas bacterianas de referência (ATCC), através do emprego do método de difusão em ágar, de acordo com a CLSI 2005a. Os autores observaram que nenhuma das marcas testadas apresentou resultados satisfatórios para utilização na rotina de um laboratório de microbiologia.

Dada a escassez de estudos que tenham avaliado a eficiência de diferentes métodos de determinação de resistência a antibióticos de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos, idealizou-se este estudo, no qual 107 cepas de *Salmonella*, provenientes de couro e carcaça de bovinos e de diversos produtos cárneos foram submetidas a determinação da resistência aos antibióticos ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, imipenem, tetraciclina e trimetoprima, empregando-se simultaneamente diferentes métodos fenotípicos e biomoleculares.

2. OBJETIVOS

Esse projeto teve como objetivo realizar um estudo comparativo de diferentes métodos fenotípicos e biomoleculares para a determinação de resistência a antibióticos de cepas de *Salmonella* isoladas do couro e carcaças de bovinos de um abatedouro que produz carne bovina para exportação e de produtos cárneos comercializados na cidade de São Paulo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cepas de *Salmonella* spp.

O trabalho foi realizado com 107 cepas de *Salmonella* spp., com as seguintes origens:

- a) 48 cepas isoladas de couro bovino;
- b) 22 cepas isoladas de carcaça de bovino;
- c) 24 cepas isoladas de linguiça crua;
- d) 13 cepas isoladas de coxa de frango crua.

Essas cepas foram isoladas durante o desenvolvimento de diferentes projetos de pesquisa do laboratório de microbiologia de alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

3.2. Métodos fenotípicos para determinação da resistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp

3.2.1. Método de Difusão do Disco

Para este método foram utilizados discos de papel contendo os antibióticos ampicilina (Amp) (10µg/ml); cefotaxima (Ctx) (30µg/ml); ciprofloxacina (Cip) (5µg/ml); cloranfenicol (C) (30µg/ml); gentamicina (Gm) (10µg/ml); imipenem (Imp) (10µg/ml); tetraciclina (Te) (30µg/ml); trimetoprima (Tmp) (5 µg/ml), pertencentes a duas marcas comerciais distintas (Oxoid Brasil Ltda e Cefar Diagnostica Ltda).

Os testes foram realizados de acordo com a técnica clássica de Bauer *et al.* (1966). Para os testes, as cepas foram inicialmente inoculadas em meio Caldo Soja Tripton (TSB) e incubadas a 37°C por 24h. Após esse período, alíquotas (10µl) das culturas bacterianas foram semeadas na superfície de placas contendo Ágar Tripton Soja (TSA) e incubadas a 37°C por 24h. Com o auxílio de uma alça esterilizada, algumas colônias isoladas presentes nas placas TSA foram transferidas para tubos de ensaio contendo solução salina a 0,85% para obtenção de uma suspensão com turvação padrão 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC/ml). Em seguida, introduziu-se um *swab* esterilizado no tubo, e após a remoção do excesso de líquido por compressão contra a parede do tubo, o *swab* foi estriado em três direções na superfície de placas de plástico (150 mm de diâmetro) contendo 50 ml de ágar Müeller-Hinton. Após a absorção do inóculo (aproximadamente 3 a 5 min), os discos (Oxoid Brasil Ltda e Cefar Diagnostica Ltda) contendo os agentes

antimicrobianos foram adequadamente posicionados na superfície do ágar e as placas foram incubadas a 37°C. Após 24h, observou-se a formação de halos de inibição do micro-organismo em teste ao redor dos discos impregnados com os antibióticos. O diâmetro do halo de inibição foi medido com uma régua milimetrada posicionada no fundo da placa. O esquema deste método está representado na Figura 4. Para interpretação dos resultados, foram empregadas as normas do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”, conforme Quadro 1 (CLSI 2010). Os métodos foram repetidos nas cepas em que os resultados obtidos através dos métodos fenotípicos apresentaram divergência. *Escherichia coli* ATCC 25922, sensível a todos antibióticos, foi utilizada como controle da atividade dos antimicrobianos.

Figura 4-Esquema do método de difusão do disco empregado para determinação da resistência de cepas de *Salmonella* sp. a antibióticos.

Quadro 1- Interpretação dos resultados de resistência aos antibióticos empregando-se o método de difusão do disco, segundo CLSI 2010

Agentes Antimicrobianos	Ampicilina (mm)	Cefotaxima (mm)	Ciprofloxacina (mm)	Cloranfenicol (mm)	Gentamicina (mm)	Imipenem (mm)	Tetraciclina (mm)	Trimetoprima (mm)
Sensível	>17	≥ 26	≥ 21	≥ 18	≥ 15	≥ 16	≥ 15	≥ 16
Intermediário	14-16	23- 25	16-20	13-17	13-14	14-15	12-14	11-15
Resistente	< 13	< 22	≤ 15	≤ 12	≤ 12	≤13	≤11	≤ 10

3.2.2. Método de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada através de microdiluição em caldo (MDC) e fitas plásticas MICE (Oxoid do Brasil Ltda) (Figura 5).

Figura 5- Fitas plásticas MICE™ (Oxoid do Brasil Ltda) usadas para determinação de Concentração Mínima Inibitória

O teste de microdiluição em caldo (MDC) foi realizado empregando-se placas de microtitulação de 96 cavidades (12 colunas e 8 linhas), conforme as recomendações do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI 2005a), empregando-se os antibióticos ampicilina (Amp), cefotaxima (Ctx), ciprofloxacina (Cip), gentamicina (Gm), imipenem (Imp) e tetraciclina (Te), todos da marca Sigma Aldrich Brasil Ltda.

As soluções dos antibióticos foram preparadas a partir dos produtos suspensos nos diluentes especificados nos certificados de análise, de forma a obter a concentração final de 2.056 µg/mL. A quantidade necessária de antibiótico e solvente foi calculada através da fórmula (CLSI 2005a):

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potência (}\mu\text{g/mg)}}$$

As soluções dos antibióticos foram submetidas a diluições seriadas no mesmo diluente em que foram preparadas, em número que seguiu o *breakpoint* descrito no CLSI (CLSI 2010).

As suspensões bacterianas para estes testes foram preparadas conforme já descrito no item 3.2.1.

Para os testes com as placas de microtitulação (Figura 6), adicionou-se 50µL de Caldo Muller Hinton em todas as cavidades da placa exceto as da primeira coluna empregando-se uma pipeta multicanal apropriada. Às cavidades da primeira

coluna adicionou-se 100 µL da solução do antibiótico e com a pipeta multicanal foi realizada a diluição seriada do antimicrobiano pipetando 50 µL da primeira coluna para segunda, realizando a homogeneização, da segunda para terceira e assim sucessivamente, pulando a penúltima coluna, que correspondeu a um controle do crescimento microbiano. No passo seguinte, adicionou-se à todas as colunas, exceto a última, 50 µL da suspensão bacteriana. Deixando a última coluna sem inoculação para ser utilizada como controle de esterilidade. A concentração final da suspensão bacteriana em cada cavidade foi de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 16-20 h (CLSI, 2005a).

Para interpretação dos resultados, considerou-se como CIM a menor concentração do antibiótico que inibiu completamente a multiplicação do micro-organismo, ou seja, a cavidade onde não havia crescimento bacteriano visível (CLSI, 2005a, CLSI, 2005b).

Para o teste MICE™ foram seguidas as instruções fornecidas do fabricante, ou seja, as fitas foram colocadas na superfície de placas com Agar Mueller Hinton, previamente inoculadas com uma cultura da bactéria em teste, ajustada na escala 0,5 de McFarland, conforme descrito no item 3.2.1 (Figura 6). Para a interpretação dos resultados foram empregadas as normas do CLSI conforme descrito no Quadro 2 (CLSI, 2010). *Escherichia coli* ATCC 25922, sensível a todos antibióticos, foi utilizada como controle da atividade dos antimicrobianos.

Figura 6- Esquema dos métodos utilizados para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de antibióticos, para cepas de *Salmonella* spp

Quadro 2- Interpretação dos resultados de resistência de bactérias aos antibióticos empregando-se o método CIM, segundo CLSI, 2010

Agentes Antimicrobianos	Ampicilina (µg/ml)	Cefotaxima (µg/ml)	Ciprofloxacina (µg/ml)	Cloranfenicol (µg/ml)	Gentamicina (µg/ml)	Imipenem (µg/ml)	Tetraciclina (µg/ml)	Trimetoprima (µg/ml)
Sensível	< 8	≤ 1	≤ 1	≤ 8	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 8
Intermediário	16	2	2	16	8	8	8	----
Resistente	≥ 32	> 4	≥ 4	≥ 32	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16

3.3. Métodos Biomoleculares

3.3.1. Pesquisa de genes cromossomais de resistência a antimicrobianos

As cepas de *Salmonella* que apresentaram resistência ou divergência de resultados, em pelo menos um antibiótico testado em algum dos métodos testados, foram submetidas à extração de DNA cromossômico empregando-se o *kit GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA* (GE Healthcare, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. A concentração do DNA do extrato ($\mu\text{g/ml}$) foi determinada no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Wilmington, U.S.A.). O DNA total de cada uma das cepas foi submetido à amplificação dos seguintes genes de resistência a antibióticos: *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} e *bla*_{PSE-1} (ampicilina); *cat1*, *cat2*, *floR* e *cmlA*, *cmlB* (cloranfenicol); *aac*(3)IVa, *aadB*, *aadD* e *aphA* (gentamicina); *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG* (tetraciclina) e *dhfrI* (trimetoprima). Nas reações de amplificação, empregou-se a técnica da PCR utilizando a seguinte solução: 1 μL do DNA teste, 0,2 U de Taq DNA polimerase, 0,25 mM de DNTP, 1,5mM de MgCl_2 e 50 pmol de cada iniciador. Os parâmetros de temperatura foram: aquecimento inicial (desnaturação) 95°C a 10min, seguido por 30 ciclos (anelamento) de 30s de 95°C, 1 min na temperatura adequada para cada *primer* utilizado (Tabela 1) e 1 min 72°C e um ciclo de extensão à 72°C durante 7 min (Chen *et al.*, 2004).

Depois de realizada a PCR, alíquotas de 5 μl do produto amplificado foram aplicadas em gel de agarose 1% (p/v) em tampão 0,5xTBE (Tris-Borato-EDTA), e submetidas a eletroforese em cuba horizontal por 30 min a 100 V, empregando-se um marcador de peso molecular de 100 bp (Fermentas, EUA). O gel foi corado com brometo de etídio ($1\mu\text{g/ml}^{-1}$) por 30 min e as imagens foram registradas com o auxílio do sistema Doc-It®LS (UVP Life science software, EUA), visualizadas sob transluminação em UV 320nm.

Tabela 1- Primers usados na PCR para detecção de genes de resistência nas cepas de *Salmonella*

Antibiótico	Gene	Sequência do Primer	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento	Referência
B lactâmicos	<i>bla</i> _{TEM-1}	F- CAG CGG TAA GAT CCT TGA GA	643	58°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- ACT CCC CGT CGT GTA GAT AA			
	<i>bla</i> _{OXA-1}	F- AAT GGC ACC AGA TTC AAC TT	595	57°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- CTT GGC TTT TAT GCT TGA TG			
Aminoglicosídeo	<i>bla</i> _{PSE-1}	F- TGC TTC GCA ACT ATG ACT AC	438	54°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- AGC CTG TGT TTG AGC TAG AT			
	<i>aac</i> (3)- <i>IVa</i>	F- GAT GGG CCA CCT GGA CTG AT	462	65°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- GCG CTC ACA GCA GTG GTC AT			
	<i>aabB</i>	F- TCC AGA ACC TTG ACC GAA C	700	59°C	Poppe <i>et al.</i> (2006)
		R- GCA AGA CCT CAA CCT TTT CC			
Cloranfenicol	<i>aadD</i>	F- ATA TTG GAT AAA TAT GGG GAT	161	59°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- TCC ACC TTC CAC TCA CCG GTT			
	<i>Apha1</i>	F- TTA TGC CTC TTC CGA CCA TC	417	60°C	Poppe <i>et al.</i> (2006)
		R- GAG AAA ACT CAC CGA GGC AG			
	<i>cat1</i>	F- CTT GTC GCC TTG CGT ATA AT	508	59°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- ATC CCA ATG GCA TCG TAA AG			
	<i>cat2</i>	F- AAC GGC ATG ATG AAC CTG AA	547	60°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- ATC CCA ATG GCA TCG TAA AG			
	<i>cmIA</i>	F- CGC CAC GGT GTT GTT GTT AT	394	62°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- GCG ACC TGC GTA AAT GTC AC			
	<i>cmIB</i>	F- ACT CGG CAT GGA CAT GTA CT	840	60°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- ACG GAC TGC GGA ATC CAT AG			
	<i>floR</i>	F- CTG AGG GTG TCG TCA TCT AC	673	70°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- GCT CCG ACA ATG CTG ACT AT			

(cont)

Tabela 1-Primers usados na PCR para detecção de genes de resistência nas cepas de *Salmonella* (cont)

Antibiótico	Gene	Sequência do <i>Primer</i>	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento	Referência
Tetraciclina	<i>tetA</i>	F- GCG CCT TTC CTT TGG GTT CT	831	65°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- CCA CCC GTT CCA CGT TGT TA			
	<i>tetB</i>	F- CCC AGT GCT GTT GTC AT	723	60°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- CCA CCA CCA GCC AAT AAA AT			
	<i>tetC</i>	F- TTG CGG GAT ATC GTC CAT TC	1019	65°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- CAT GCC AAC CCG TTC CAT GT			
<i>tetD</i>	<i>tetD</i>	F- CTG GGC AGA TGG TCA GAT AA	832	59°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- TGA CCA GCA CAC CCT GTA GT			
	<i>tetE</i>	F- CGT CGC CCT GTA TTG TTA CT	814	59°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- TGG TCA GCA CCC CTT GTA AT			
<i>tetG</i>	<i>tetG</i>	F- AGC AGG TCG CTG GAC ACT AT	623	62°C	Chen <i>et al.</i> (2004)
		R- CGC GGT GTT CCA CTG AAA AC			
	<i>dhfrI</i>	F- TGG CTG TTG GTT GGA CGC	256	65°C	Poppe <i>et al.</i> (2006)
		R- TCA CCT TCC GGC TCG ATG TC			

3.3.2. Pesquisa de genes plasmidiais de resistência a antibióticos

As cepas de *Salmonella* sp foram investigadas quanto à presença de plasmídeos contendo genes de resistência a antibióticos. Para extração dos plasmídeos, empregou-se o *kit Plasmid Mini Kit 100* (Qiagen Biotecnologia Brasil Ltda), seguindo-se as instruções do fabricante. As amostras foram submetidas à técnica de PCR para detecção dos genes de resistência descritos no item 3.3.1, empregando-se a metodologia e *primers* específicos também descritos no item 3.3.1.

3.3.3. Pesquisa de integrons classe 1

As cepas *Salmonella* foram testadas quanto à presença de integrons classe 1, utilizando a técnica da PCR empregando os seguintes parâmetros: um ciclo inicial de 5 min a 94°C, seguido por 30 ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C por 30 s e 72°C durante 2 min e um ciclo final de 72°C durante 5 min. Os *primers* utilizados foram: 5'CS Forward- GGC ATC CAA GCA GCA AG; 3'CS Reverse- AAG CAG ACT TGA CCT GA , de acordo com Levesque *et al.* (1995).

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese, coloração com brometo de etídio e observação sob luz ultravioleta, conforme descrito em 3.3.1.

Os produtos amplificados da PCR foram sequenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano – Setor de Sequenciamento de DNA – USP, e os resultados foram comparados à sequências disponíveis na base de dados *Genbank*, utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível online em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

4. RESULTADOS

4.1. Resistência antimicrobiana das 107 cepas de *Salmonella* sp

Os resultados de resistência das cepas de *Salmonella* sp. aos oito antibióticos testados, determinada através dos métodos fenotípicos, estão apresentados na Tabela 2. Foram consideradas resistentes as cepas que apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado. Do total de 107 cepas estudadas, 26 (24,3%) apresentaram resistência a, no mínimo, um dos antibióticos avaliados, enquanto que 10 (9%) apresentaram resistência intermediária. Todas as cepas foram sensíveis a ciprofloxacina, imipenem e cefotaxima.

Tabela 2- Resistência antimicrobiana das 107 cepas de *Salmonella* sp determinada através de métodos fenotípicos

Antibiótico	Resistente	Intermediário	Sensível
	n (%)	n(%)	n(%)
Ampicilina	18 (16,8)	4 (3,7)	85 (79,4)
Cefotaxima	0	0	107 (100)
Ciprofloxacina	0	0	107 (100)
Cloranfenicol	8 (7,4)	0	100 (92,5)
Gentamicina	6 (5,6)	4 (3,73)	101 (94,3)
Imipinem	0	0	107 (100)
Tetraciclina	24 (22,4)	2 (1,8)	83(77,5)
Trimetoprima	4 (3,7)	0	103 (96,2)

As características das 26 cepas resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados (perfil de resistência, origem e sorovar) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3– Características das cepas de *Salmonella* sp. que apresentaram resistência antimicrobiana

Cepa	Perfil de resistência	Origem	Sorovar
27	Amp Te	Couro	S. Infantis
28	Amp	Linguiça	S. Typhimurium
33	Te	Linguiça	S. Derby
34	C Te	Linguiça	S. Infantis
36	TeTnp	Linguiça	S. Typhimurium
37	AmpCTe	Linguiça	S. Typhimurium
42	Te	Linguiça	S. Typhimurium
45	Amp	Linguiça	S. Typhimurium
46	Amp C Te	Linguiça	S. Typhimurium
48	Amp Te	Linguiça	S. I 4,[5],12:i:-
50	Amp C G Te	Linguiça	S. I 4,[5],12:i:-
52	Amp G te	Linguiça	S. Typhimurium
54	Amp G Te	Coxa de frango	S. Enteritidis
55	Amp C G Te	Coxa de frango	S. I 4,[5],12:i:-
56	Te	Linguiça	S. Derby
57	Amp C Te	Linguiça	S. Typhimurium
58	Amp C G Te Tnp	Linguiça	S. I 4,[5],12:i:-
59	C Te	Linguiça	S. Derby
60	Te	Linguiça	S. I 4,[5],12:i:-
63	Amp G Te	Linguiça	S. Typhimurium
64	Te Tnp	Linguiça	S. Derby
96	Amp Te	Couro	S. Enteritidis
97	Amp Te	Couro	S. Enteritidis
98	Amp Te	Couro	S. Infantis
101	Amp Te	Couro	S. Enteritidis
104	AmpTe	Carcça após esfolia	S. Muenster

Amp - ampicilina, Te- tetraciclina, G- gentamicina, C- cloranfenicol e Tnp- trimetoprima

4.2. Resistência antimicrobiana determinada através dos métodos fenotípicos

4.2.1 Método de difusão do disco de resistência antimicrobiana

Os resultados obtidos empregando-se os discos de antibióticos das duas empresas estudadas estão apresentados no Quadro 3. De um total de 749 testes realizados [107 cepas e sete antibióticos (ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, imipenem, tetraciclina)] apenas dois resultados divergentes foram obtidos: duas cepas (n^{os} 58 e 63) diferiram no resultado de resistência à gentamicina (Tabela 4), indicando 99,7% de concordância de resultados. Considerando-se apenas as cepas que apresentaram resistência a algum antibiótico (n=26), a porcentagem de concordância entre os resultados foi 98,9%, correspondentes aos dois resultados divergentes nos 182 testes realizados (26 cepas, sete antibióticos).

Quadro 3- Cepas de *Salmonella* sp. que apresentaram resistência a antibióticos, determinada através do método de difusão do disco

Cepa	AGENTES ANTIMICROBIANOS														Trimetoprima			
	Ampicilina		Cefotaxima		Ciprofloxacina		Cloranfenicol		Gentamicina		Imipenem		Tetraciclina					
	DC	DO	DC	DO	DC	DO	DC	DO	DC	DO	DC	DO	DC	DO	DC	DO	DC	DO
27	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
28	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
33	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
34	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S
36	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
37	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
42	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
45	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
46	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
48	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
50	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
52	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
54	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
55	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
56	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
57	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
58	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
59	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
60	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
63	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
64	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
96	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
97	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
98	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
101	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
104	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
*não realizado																		

DC- Disco Cefar
DO- Disco Oxid
*-Não foi realizado devido à indisponibilidade de discos Trimetoprima pelo fornecedor.

Tabela 4- Concordância de resultados obtidos na determinação da resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* sp., através do método de difusão do disco, empregando-se discos de duas marcas diferentes

Antibiótico	nº de cepas testadas	nº de cepas com resultados iguais pelos discos das duas marcas	Concordância (%)
Ampicilina	107	107	100
Cefotaxima	107	107	100
Ciprofloxacina	107	107	100
Cloranfenicol	107	107	100
Gentamicina	107	105	98,1
Imipinem	107	107	100
Tetraciclina	107	107	100

4.2.2. Método de determinação da CIM

Os resultados obtidos para determinação da CIM empregando-se a técnica de microdiluição em caldo (MDC) e as fitas MICE estão apresentados no Quadro 4. De um total de 642 testes realizados (107 cepas e seis antibióticos), houve divergência de resultados em nove testes (Quadro 5 e Tabela 5). Quatro cepas (n^{os} 16, 60, 61 e 62) foram sensíveis à ampicilina de acordo com as fitas MICE, mas apresentaram resistência intermediária pela técnica de microdiluição em caldo. Três cepas (n^{os} 50, 54 e 58) foram resistentes à gentamicina com as fitas MICE, mas apresentaram resistência intermediária pela técnica de microdiluição em caldo e, finalmente, duas cepas (n^{os} 61, 62) apresentaram resistência intermediária à tetraciclina com as fitas MICE e foram sensíveis quando aplicada a técnica de MDC. Considerando-se somente as cepas que apresentaram resistência a algum antibiótico (n=26) a concordância foi de 97,5%, uma vez que foram obtidos quatro resultados discordantes em 156 testes (26 cepas e seis antibióticos). Os antibióticos cloranfenicol e trimetoprima não foram utilizados nos método de tira MICE devido à indisponibilidade destes antibióticos pelo fornecedor.

Quadro 4- Cepas de *Salmonella* sp. que apresentaram resistência a antibióticos, determinada utilizando a técnica de microdiluição em caldo e tiras MICE™

Cepa	AGENTES ANTIMICROBIANOS													
	Ampicilina		Cefotaxima		Ciprofloxacina		Cloranfenicol		Gentamicina		Imipenem		Tetraciclina	
	MDC	MICE™	MDC	MICE™	MDC	MICE™	MDC	MICE™	MDC	MICE™	MDC	MICE™	MDC	MICE™
27	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
28	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
33	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
34	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S
36	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S
37	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
42	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
45	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
46	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
48	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
50	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
52	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
54	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
55	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
56	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
57	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S
58	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
59	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
60	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
63	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S
64	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
96	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
97	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
98	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
101	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
104	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S

MDC- microdiluição em caldo

MICE- tiras Oxoid

*-Não foi realizado devido a indisponibilidade de discos Trimetoprima e de tiras MICE de trimetoprima e cloranfenicol pelo fornecedor.

Quadro 5- Cepas de *Salmonella* sp. que apresentaram resultados divergentes na determinação da CIM utilizando a técnica de microdiluição em caldo e tiras MICE™

Cepa	AGENTES ANTIMICROBIANOS					
	Ampicilina		Gentamicina		Tetraciclina	
	MDC	MICE™	MDC	MICE™	MDC	MICE™
16	I	S	S	S	S	S
50	R	R	I	R	R	R
54	R	R	I	R	R	R
58	R	R	I	R	R	R
60	I	S	S	S	R	R
61	I	S	S	S	S	I
62	I	S	S	S	S	I

MDC - microdiluição em caldo

MICE- tiras Oxoid

Tabela 5- Concordância de resultados obtidos na determinação da resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* sp. empregando-se os métodos de microdiluição em caldo e fitas MICE

Antibiótico	nº de cepas testadas	nº de cepas com resultados iguais nos métodos comparados	Concordância (%)
Ampicilina	107	103	96,3
Cefotaxima	107	107	100
Ciprofloxacina	107	107	100
Gentamicina	107	104	97,2
Imipinem	107	107	100
Tetraciclina	107	105	98,1

4.2.3 Métodos fenotípicos em conjunto

Os resultados obtidos para determinação da resistência antimicrobiana através dos métodos fenotípicos avaliados já foram apresentados nos Quadros 3 e 4. No Quadro 6 estão destacados os resultados divergentes. Como a resistência ao cloranfenicol e a trimetoprima não pode ser avaliada por todos os métodos simultaneamente, a porcentagem de concordância foi calculada apenas para seis antibióticos. Estes resultados apresentaram concordância de 98,4%, pois de 642 testes realizados (107 cepas, seis antibióticos), foram observados apenas 10 resultados divergentes (Quadro 6 e Tabela 6).

Quadro 6- Cepas de *Salmonella* spp. que apresentaram resultados divergentes de resistência antimicrobiana quando testados empregando-se os métodos de difusão do disco e de determinação da CIM

Cepa	AGENTES ANTIMICROBIANOS														
	Ampicilina			Cloranfenicol			Gentamicina			Tetraciclina			Trimetoprima		
	DC	DO	MDC	MICE	DC	DO	MDC	MICE	DC	DO	MDC	MICE	DC	DO	MDC
	DC	DO	MDC	MICE	DC	DO	MDC	MICE	DC	DO	MDC	MICE	DC	DO	MDC
16	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		S
45	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R		S
50	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S		S
54	R	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	S		S
58	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R		R
59	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S		S
60	S	S	I	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S		S
61	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S		S
62	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S		S
63	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S		S

DC- disco Cefar

DO- disco Oxoid

MDC- microdiluição em caldo

MICE- tiras da Oxoid

*-Não foi realizado devido a indisponibilidade de discos Trimetoprima e de tiras MICE de trimetoprima e cloranfenicol pelo fornecedor.

Tabela 6- Concordância entre os resultados de resistência antimicrobiana nas cepas de *Salmonella* empregando-se os métodos de difusão do disco e de determinação da CIM

Antibiótico	nº de cepas testadas	nº de cepas com resultados iguais nos métodos comparados	Concordância (%)
Ampicilina	107	103	96,2
Cefotaxima	107	107	100
Ciprofloxacina	107	107	100
Gentamicina	107	103	96,2
Imipinem	107	107	100
Tetraciclina	107	105	98,1

Levando-se em conta apenas os resultados das cepas resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados ou multirresistentes (n=26), houve concordância de 95,5% entre os resultados obtidos nos métodos avaliados. Foram observados apenas 5 resultados divergentes (sensível/ intermediário ou resistente/intermediário) e dois resultados discrepantes (sensível/ resistente) dentre 156 testes (26 cepas, seis antibióticos), conforme descrito no Quadro 7.

Quadro 7- Cepas de *Salmonella* sp. resistentes a pelo menos um dos antibióticos em pelo menos um dos métodos avaliados que apresentaram divergência de resultado

Cepa	AGENTES ANTIMICROBIANOS																			
	Ampicilina				Cloranfenicol				Gentamicina				Tetraciclina				Trimetoprima			
	DC	DO	MDC	MICE™	DC	DO	MDC	MICE™	DC	DO	MDC	MICE™	DC	DO	MDC	MICE™				
45	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R		S					
50	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S		S					
54	R	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	S		S					
58	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R		R					
59	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S		S					
60	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S		S					
63	R	R	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	S		S					

DC- disco Cefar

DO- disco Oxoid

MDC- microdiluição em caldo

MICE- tiras da Oxoid

*-Não foi realizado devido a indisponibilidade de discos Trimetoprima e de tiras MICE de trimetoprima e cloranfenicol pelo fornecedor.

4.3 Métodos biomoleculares para determinação da resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp

Os métodos biomoleculares foram realizados nas cepas que apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos testados em pelo menos algum dos métodos testados e nas cepas que apresentaram divergências de resultados obtidos pelos métodos fenotípicos testados.

Os resultados da pesquisa dos genes de resistência a antimicrobianos nas cepas de *Salmonella* spp que apresentaram resistência detectada por algum dos métodos fenotípicos empregados estão apresentados na Tabela 7. A Figura 7 apresenta os resultados da detecção de plasmídeos nestas cepas.

O gene *Bla*_{TEM} foi detectado em cromossomo das 16 das 18 (83,3%) cepas resistentes à ampicilina por pelo menos um dos métodos fenotípicos utilizados. Esse gene foi também localizado em plasmídeo em 8 (44,4%) dessas cepas. As cepas n^{os} 48 e 54, embora tenham sido classificadas como resistentes à ampicilina por algum dos métodos fenotípicos empregados, não apresentaram o gene *Bla*_{TEM}, por outro lado 4 cepas (n^{os} 34, 36, 59 e 60), não resistentes a ampicilina foram positivas para esse gene tanto em cromossomo como em plasmídeo. Nenhuma das cepas foi positiva para os genes *Bla*_{OXA} e *Bla*_{PSE}.

Entre os genes associados à resistência a cloranfenicol, o gene *cat1* foi detectado no cromossomo de todas as cepas resistentes ao cloranfenicol (n^{os} 34, 37, 46, 50, 55, 57, 58 e 59), conforme determinado pelos métodos fenotípicos. Na cepa n^o 34 o este gene foi localizado tanto em cromossomo como em plasmídeo. O gene *cat1* foi detectado também em cromossomo de 14 cepas não resistentes ao cloranfenicol pelos métodos fenotípicos. O gene *cat2* foi detectado somente em duas cepas (n^{os} 34 e 36), sendo que apenas uma delas (n^o 34) apresentou resistência ao cloranfenicol pelos métodos fenotípicos. Na cepa n^o 34 esse gene foi detectado tanto em cromossomo como em plasmídeo. O gene *cmiA* foi detectado em 12 cepas, mas destas apenas três (n^{os} 34, 50 e 59) foram resistentes ao cloranfenicol pelos métodos fenotípicos. Em todas as cepas que foram positivas para esse gene ele estava localizado em plasmídeo. Os genes *cmiB* e *floR* não foram detectados em

nenhuma cepa. A única cepa positiva para os genes *cat1*, *cat2* e *cmlA* simultaneamente foi a cepa nº 34.

O gene *aac(3')/Va* que confere resistência a gentamicina foi detectado em quatro cepas (nºs 50, 52, 58 e 63) das seis cepas que apresentaram resistência a gentamicina pelos métodos fenotípicos. Esse gene foi detectado em uma cepa (nº 64) não resistente a gentamicina. Quando presente, o gene *aac(3')/Va* estava localizado no cromossomo. O gene *aadA* foi detectado em duas cepas (nºs 50 e 58) resistentes a gentamicina pelos métodos fenotípicos e em oito cepas (nºs 27, 33, 34, 37, 45, 50, 56, 57, 58 e 59) não resistentes a este antibiótico. Na cepa nº 50 o gene foi detectado tanto em cromossomo como em plasmídeo, enquanto que na cepa 58 ela foi detectada somente em cromossomo. Em relação as cepas não resistentes aos métodos fenotípicos observou-se que em três (nºs 34, 45 e 59) o gene *aadA* foi detectado tanto no cromossomo quanto em plasmídeo. O gene *aadB* foi detectado na cepa nº 50 e estava localizado em plasmídeo. O gene *apha1* foi detectado em 21 cepas, das quais apenas quatro resistentes a gentamicina (nºs 50, 52, 58 e 63). Na cepa nº 52 ele foi detectado tanto em cromossomo como em plasmídeo.

O gene *tetA* que confere resistência a tetraciclina foi observado em todas as 24 cepas resistentes a tetraciclina conforme detectado pelos métodos fenotípicos. Esse gene foi detectado também em duas cepas (nºs 28 e 45) não resistentes a tetraciclina pelos métodos fenotípicos. Em treze cepas esse gene foi detectado tanto em cromossomo como em plasmídeo. O gene *tetB* foi observado em 18 das 24 cepas que mostraram resistência a tetraciclina através dos métodos fenotípicos. Este gene foi detectado em cromossomo de treze cepas e em plasmídeos de onze cepas que mostraram resistência a tetraciclina pelos métodos fenotípicos. Os genes *tetC*, *tetD*, *tetE* e *tetG* não foram detectados.

O gene *dhfrI* responsável pela resistência a trimetoprima foi detectado em 23 das 26 cepas testadas, das quais apenas três cepas (nºs 36, 58 e 64) eram resistentes a este antibiótico. Este gene foi detectado tanto em cromossomo como em plasmídeos.

Tabela 7-Detecção de genes de resistência em cepas de *Salmonella* sp. que apresentaram resistência a algum antimicrobiano detectado pelos métodos fenotípicos testados

Cepa	Resistencia detectada pelo método fenotípico	Genes de resistência a antimicrobianos detectados no cromossomo	Genes de resistência a antimicrobianos detectados no plasmídeo	Integron Classe I
27	Amp Te	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>cat2</i> , <i>aadA</i> , <i>apha1</i> , <i>tetA</i> , <i>dhfrI</i>	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cmIA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	N/D
28	Amp	<i>Bla_{tem}</i> , <i>tetA</i> , <i>dhfrI</i>	<i>cmIA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	N/D
33	Te	<i>cat1</i> , <i>aadA</i> , <i>apha1</i> , <i>tetA</i> , <i>dhfrI</i>	N/D	1000pb
34	C Te	<i>cat1</i> , <i>cat2</i> , <i>aadA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>cat2</i> , <i>cmIA</i> , <i>aadA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	1000pb
36	TeTmp	<i>cat1</i> , <i>cat2</i> , <i>apha1</i> , <i>tetA</i> , <i>dhfrI</i>	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cmIA</i> , <i>aadA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	N/D
37	AmpCTe	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>aadA</i> , <i>apha1</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i>	N/D	2000pb
42	Te	<i>tetA</i> , <i>dhfrI</i>	N/D	N/D
45	Amp	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>aadA</i> , <i>apha1</i> , <i>tetA</i> , <i>dhfrI</i>	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cmIA</i> , <i>aadA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	2000pb
46	Amp C Te	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>apha</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	N/D	N/D
48	Amp Te	<i>cat1</i> , <i>apha</i> , <i>tetA</i> , <i>dhfrI</i>	N/D	N/D
50	Amp C G Te	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>aac(3')IVa</i> , <i>aadA</i> , <i>apha1</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cmIA</i> , <i>aadA</i> , <i>aadB</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	N/D
52	Amp G te	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>aac(3')IVa</i> , <i>apha1</i> , <i>tetA</i> , <i>dhfrI</i>	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cmIA</i> , <i>apha1</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	N/D
54	Amp G Te	<i>cat1</i> , <i>tetA</i>	N/D	N/D

(cont)

Tabela 7 - Detecção de genes de resistência em cepas de *Salmonella* sp. que apresentaram resistência a algum antimicrobiano detectado pelos métodos fenotípicos testados (cont)

Cepa	Resistência detectada pelo método fenotípico	Genes de resistência a antimicrobianos detectados no cromossomo	Genes de resistência a antimicrobianos detectados no plasmídeo	Integron Classe I
55	Amp C G Te	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	N/D	N/D
56	Te	<i>aadA</i> , <i>aphA</i> , <i>tetA</i> , <i>dhfrI</i>	N/D	1000pb
57	Amp C Te	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>aadA</i> , <i>aphA1</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i>	N/D	N/D
58	Amp C G Te Tmp	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>aac(3'')IVa</i> , <i>aadA</i> , <i>aphA1</i> , <i>tetA</i> , <i>dhfrI</i> ,	N/D	1500pb
59	C Te	<i>cat1</i> , <i>aadA</i> , <i>aphA</i> , <i>tetA</i> , <i>dhfrI</i>	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cmlA</i> , <i>aadA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	1000pb
60	Te	<i>Bla_{tem}</i> , <i>aphA1</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	<i>Bla_{tem}</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	N/D
63	Amp G Te	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>aac(3'')IVa</i> , <i>aphA1</i> , <i>tetA</i> , <i>dhfrI</i>	N/D	N/D
64	Te Tmp	<i>cat1</i> , <i>aac(3'')IVa</i> , <i>aphA1</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i> ,	N/D	N/D
96	Amp Te	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>aphA1</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	N/D	N/D
97	Amp Te	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>aphA1</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cmlA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	N/D
98	Amp Te	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>aphA1</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cmlA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	N/D
101	Amp Te	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>aphA1</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cmlA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	N/D
104	AmpTe	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cat1</i> , <i>aphA1</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	<i>Bla_{tem}</i> , <i>cmlA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfrI</i>	N/D

Amp - ampicilina, Te- tetraciclina, G- gentamicina, C- Cloranfenicol e Tmp- trimetoprima

Figura 7- Gel de agarose 1% (p/v) exibindo o DNA plasmideal das cepas de *Salmonella* (27, 28, 34, 36, 45, 50, 52, 59, 60, 61, 62, 97, 98, 101 e 104).
(M) - Marcador peso molecular: DNA/hindIII de 23,1 Kb Fermentas.

As cepas que apresentaram divergência de resultados em relação à gentamicina quando testadas nos diferentes métodos fenotípicos são: cepa n° 58 que apresentou resistência a gentamicina com o emprego do disco Cefar e apresentou resistência intermediária com o disco Oxoid, e a cepa n° 63 que apresentou resistência intermediária a gentamicina com o disco Cefar e se mostrou resistente com o disco Oxoid (Quadro 3). Quando utilizado o método biomolecular observou-se que ambas as cepas foram positivas para o gene *aac(3)-IVa*, responsável pela resistência a gentamicina, que nas duas cepas foi detectado no cromossomo (Tabela 8).

As cepas que apresentaram divergência de resultados em relação à ampicilina quando testadas pelos métodos fenotípicos CIM são as cepas n°s 16, 60, 61 e 62 que apresentaram resistência intermediária a ampicilina pela técnica de microdiluição em caldo e apresentaram sensibilidade pela tira MICE (Quadro 4). O gene *Bla_{TEM}*, responsável pela resistência a ampicilina, foi detectado apenas em duas cepas (n°s 60 e 62), sendo que na cepa n° 62 o gene foi detectado somente no plasmídeo e na cepa n° 60 o gene foi detectado em cromossomo e em plasmídeo. Nenhum gene relacionado a resistência a ampicilina foi detectado nas cepas n°s 16 e 61 (Tabela 8).

As cepas que apresentaram divergência de resultados em relação à gentamicina quando testadas pelos métodos fenotípicos CIM são as cepas n°s 50, 54 e 58 que apresentaram resistência intermediária pela técnica de microdiluição em caldo e se mostraram resistentes pela tira MICE (Quadro 4). O gene *aac(3)-IVa* responsável pela resistência a gentamicina foi detectado apenas nas cepas n°s 50 e 58 e localizados em cromossomo (Tabela 8).

As cepas que mostraram resultados divergentes em relação à tetraciclina quando testadas pelos métodos fenotípicos CIM são as cepas n°s 61 e 62, que se mostraram sensíveis na técnica de microdiluição em caldo e apresentaram resistência intermediária pela tira MICE (Quadro 4). Os genes *tetA* e *tetB*, responsáveis pela resistência a tetraciclina, foram detectados em plasmídeo em ambas as cepas e no cromossomo da cepa n° 62 (Tabela 8).

As cepas com resultados divergentes quando analisadas pelo método de difusão do disco e pela técnica de microdiluição em caldo são: cepa n° 45, que foi sensível à trimetoprima quando testada pela técnica de microdiluição em caldo e resistente com o disco Cefar e a cepa n° 59 que foi resistente ao cloranfenicol com a técnica de microdiluição em caldo e apresentou sensibilidade quando testada empregando-se os discos Cefar e Oxoid (Quadro 3). O gene *dhfrI*, responsável pela resistência a trimetoprima, foi localizado no cromossomo e em plasmídeo da cepa 45. Na cepa n° 59 o gene *cat1* foi detectado no cromossomo e o gene *cmla* foi detectado em plasmídeo, ambos responsáveis pela resistência a cloranfenicol (Tabela 8).

Tabela 8- Detecção de genes de resistência em cepas de *Salmonella* sp. que apresentaram divergência de resultados a algum método fenotípico testado

Cepa n°	Sorovar	Antibiótico em que apresentou divergência de resultado pelos métodos fenotípicos	Genes de resistência a antimicrobianos detectados
16	S. Typhimurium	Ampicilina	N/D
45	S. Typhimurium	Trimetoprima	<i>dhfrI</i>
50	S. I 4,[5],12:i:-	Gentamicina	<i>aac(3)IV-</i>
54	S. Enteritidis	Gentamicina	N/D
58	S. I 4,[5],12:i:-	Gentamicina	<i>aac(3)IV-</i> , <i>apha1</i>
59	S. Derby	Cloranfenicol	<i>cat1</i> , <i>cmla</i>
60	S. I 4,[5],12:i:-	Ampicilina	<i>Bla_{TEM}</i>
61	S. Typhimurium	Ampicilina e Tetraciclina	<i>tetA</i> , <i>tetB</i>
62	S. 4,5,12:i:-	Ampicilina e Tetraciclina	<i>Bla_{tem}</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i>
63	S. Typhimurium	Gentamicina	<i>aac(3)IV-</i>

N/D – não detectado

Entre as 26 cepas de *Salmonella* spp que apresentaram resistência antimicrobiana quando testadas quanto à presença de integrons classe I, sete (27,0%) foram positivas (n°s 33, 34, 37, 45, 56, 58 e 59), apresentando integrons com peso molecular estimado entre 1000bp e 2000bp (Tabela 8 e Figura 8). De acordo com o *Genbank*, verificou-se que:

- I) o integron detectado na cepa nº 33 apresentou 97% de homologia com o gene *aadA2* (nº de acesso *Genbank*: DQ238100.1);
- II) o integron detectado na cepa nº 34 apresentou 99% de homologia com os genes *aadA1* (nº de acesso *Genbank*: AB126599.1), *aacC1* (nº de acesso *Genbank*: EF015496.1), *blaVIM-1* e *dhfrI* (nº de acesso *Genbank*: EF078697.1);
- III) o integron detectado na cepa nº 37 apresentou 99% de homologia com os genes *aadA2* (nº de acesso *Genbank*: AB571791.1);
- IV) o integron detectado na cepa nº 45 apresentou 93% homologia com os genes *dhfrXII* e *aadA2* (nº de acesso *Genbank*: EF550586.1);
- V) o integron detectado na cepa nº 56 apresentou 96% de homologia com o gene *aadA2* (nº de acesso *Genbank*: DQ238100);
- VI) o integron detectado na cepa nº 58 apresentou 92% de homologia com o gene *aadA1* (nº de acesso *Genbank*: AM746675.2)
- VII) o integron detectado na cepa nº 59 apresentou 95% de homologia com os genes *aadA2* (nº de acesso *Genbank*: DQ238098.1) e *sul1* (nº de acesso *Genbank*: AM234698.1).

Figura 8- Gel de agarose 1% (p/v) exibindo fragmentos de amplificação de integrons classe I nas cepas de *Salmonella* sp (33, 34, 37, 45, 56, 58 e 59) (M)-Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas, EUA) (C)- = controle negativo.

4.4 Características das cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos

A distribuição de cepas *Salmonella* spp resistentes em relação aos sorovares foi a seguinte:

- S. Typhimurium - nove cepas, correspondente a 34,6% das cepas de *Salmonella* spp resistentes detectadas e a 75% do total de cepas de S. Typhimurium testadas.
- S. I4,5,12:i:- - cinco cepas, correspondente a 19,2% das cepas de *Salmonella* spp resistentes detectadas e a 83,3% do total de cepas de S. I4,5,12:i:- testadas.
- S. Enteritidis - quatro cepas, correspondente a 15,4% das cepas de *Salmonella* spp resistentes detectadas e a 40% do total de cepas de S. Enteritidis testadas.
- S. Derby - quatro cepas, correspondente a 15,4% das cepas de *Salmonella* spp resistentes detectadas e a 100% do total de cepas de S. Derby testadas.
- S. Infantis - três cepas, correspondente a 11,5% das cepas de *Salmonella* spp resistentes detectadas e a 11,5% do total de cepas de S. Infantis testadas.
- S. Muenster - uma cepa, correspondente a 3,9% das cepas de *Salmonella* spp resistentes detectadas e a 100% do total de cepas de S. Muenster testadas.

Cinco cepas de S. Typhimurium foram resistentes a três ou mais antibióticos, e três cepas S. I4,5,12:i:- foram resistentes a quatro antibióticos (Tabela 9).

Tabela 9- Resistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* de acordo com os sorovares

Antibiótico	Sorovares					
	S.Typhimurium	S.Infantis	S.Enteritidis	S.Derby	S.14,5,12:i:-	S.Muenster
	n= 9	n= 3	n= 4	n= 4	n= 5	n=1
Ampicilina	7 (77,7)	2 (66,6)	4 (100)	0	5 (80)	1 (100)
Cloranfenicol	3 (33,3)	1 (33,3)	0	1 (25)	3 (75)	0
Gentamicina	2 (22,2)	0	1 (25)	0	3 (60)	0
Tetraciclina	7 (77,7)	3 (100)	4 (100)	4 (100)	5(100)	1 (100)
Trimetoprima	2 (22,2)	0	0	0	0	0

Das 26 cepas que apresentaram resistência a algum dos antibióticos testados, 18 (69%) foram isoladas de linguiça, cinco (19%) do couro de bovinos, duas (7%) de coxa de frango e uma (3%) de carcaça bovina, conforme indicado nas Tabelas 3 e 10. Entre as cepas resistentes a antibióticos, verificou-se multirresistência em 20 delas (76,9%), sendo que destas, 12 haviam sido isoladas de linguiça (60%), cinco do couro de bovinos (25%), duas de coxa de frango (10%) e uma de carcaça de bovinos (5%).

Tabela 10- Origem das cepas de *Salmonella* sp. resistentes a antimicrobianos

Antibiótico	Carcaça	Couro	Linguiça	Coxa de Frango
	n= 1	n= 5	n=18	n= 2
Ampicilina	1 (100)	5 (100)	11 (61,1)	2 (100)
Cloranfenicol	0	0	7 (38,8)	1 (50)
Gentamicina	0	0	4	2 (100)
Tetraciclina	1 (100)	5 (100)	17 (94,4)	2 (100)
Trimetoprima	0	0	4 (22,2)	0

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados diferentes métodos fenotípicos e biomoleculares para a determinação do perfil de resistência a agentes antimicrobianos em diferentes cepas de *Salmonella* sp isoladas de couro e carcaça de bovinos e produtos cárneos. Os resultados obtidos com o emprego de método qualitativo (difusão do disco – Cefar e Oxoid) para determinação do perfil de resistência a diferentes antibióticos indicaram elevada concordância entre eles determinada em 99,7%, contrastando com os resultados do estudo realizado por Sejas *et al.* (2003), os quais avaliaram seis marcas de discos de difusão e constataram importante discrepância de resultados. Aqueles autores observaram que a melhor concordância de resultados foi 90,8% determinada a partir da utilização de discos da marca Cefar.

Com os resultados advindos do emprego de métodos quantitativos, observou-se uma elevada concordância (98,6%) entre eles, uma vez que houve divergência apenas em relação aos perfis de resistência obtidos com os antibióticos ampicilina, gentamicina e tetraciclina (Quadro 5). Esta elevada concordância observada é superior àquela determinada por Campana *et al.* (2011), os quais compararam os resultados obtidos com o emprego de tiras comerciais MICE e Etest e utilizaram o método de microdiluição em caldo como referência. Aqueles autores observaram 93,7% e 96,1% de concordância, respectivamente. Baker *et al.* (1991) testaram a tira Etest, e compararam com o método de microdiluição em caldo e observaram concordância de resultados variando entre 87% (imipenem) a 98% (ampicilina), demonstrando uma divergência maior entre os métodos do que aquele observado neste estudo; porém, é importante ressaltar que no trabalho de Baker *et al.* (1991) foi utilizada uma marca de tira plástica distinta daquela empregada no presente estudo.

A fim de permitir a comparação em termos de precisão e confiabilidade dos métodos antimicrobianos frente ao método padrão de referência, são empregados os seguintes termos: I) “erro menor”, quando o método referência apresenta um resultado intermediário e o método teste resultado sensível ou resistente; II) “erro grave”, quando o método referência indica sensibilidade e o método teste resistência e III) “erro muito grave” quando o método referência demonstra resistência e o

método teste sensibilidade (Steward *et al.*, 2003; FDA, 2007). Nos Estados Unidos, para ser liberado um novo método empregado na realização de antibiograma, o órgão FDA exige que os “erros muito graves” não sejam superiores a 1,5% e que os “erros graves” não excedam 3%; além disso, deve apresentar > 90% de concordância com a concentração inibitória mínima obtida em caldo ou ágar, quando realizado de acordo com as normas presentes na CLSI (2005a) (FDA 2007; Anvisa, 2008; Jorgensen e Ferraro, 2009). Utilizando estes critérios do FDA, Stone *et al.* (2007) compararam os resultados do emprego do método de difusão do disco com o método de microdiluição em caldo para a avaliação do perfil de resistência de 61 isolados da família Enterobacteriaceae frente a 12 antibióticos. Aqueles autores observaram grande concordância entre ambos; porém, detectaram 12 erros, dentre os quais sete foram “erros menores”, exibindo perfil de sensibilidade à ampicilina no método de disco enquanto que foi observado perfil de resistência intermediária com a utilização do método de microdiluição em caldo. No entanto, Stone *et al.* (2007) também observaram quatro cepas que exibiram perfil de sensibilidade com o emprego do método de disco e apresentaram perfil de resistência intermediária com a utilização do método de microdiluição em caldo, quando o antibiótico ampicilina foi testado.

Resultado semelhante foi descrito por Maeda *et al.* (2011), que observaram discordâncias de resultados obtidos com a utilização do método de disco e microdiluição em caldo na avaliação do perfil de resistência de isolados de *Streptococcus* spp à penicilina.

No presente estudo também foram observados 12 resultados discordantes, obtidos através dos métodos fenotípicos para os antibióticos: ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina e trimetoprima (Quadro 6). Com base nos critérios do FDA acima mencionados (FDA, 2007) observou-se no presente estudo um resultado com “erro muito grave” para uma cepa e outro resultado com “erro grave” para outra cepa. Os demais resultados foram classificados com “erro menor”, indicando que todos os métodos atendem os critérios do FDA e são adequados para o emprego na rotina de pesquisa em laboratórios.

A elevada prevalência de cepas de *Salmonella* resistentes e multirresistentes a antibióticos é uma realidade mundial (Hur *et al.*, 2012) e contrasta com os

resultados obtidos no presente estudo, uma vez que 24,3% das cepas aqui testadas exibiram tal perfil de resistência antimicrobiana. Dentre as cepas resistentes, 20 (76%) apresentaram resistência a dois ou três antibióticos, sendo a resistência a tetraciclina e ampicilina mais frequentes, com prevalência de 92% e 69%, respectivamente. Estes dados são semelhantes aos encontrados por Bessa *et al.* (2007), que isolaram 66 cepas de *Salmonella* de suínos de 37 fazendas do Rio Grande do Sul e observaram que 90% delas apresentaram resistência à tetraciclina. Arslan e Eyi (2010) analisaram o perfil de resistência antimicrobiana de 50 cepas de *Salmonella* isoladas de produtos cárneos e detectaram 64% de cepas resistentes à ampicilina, enquanto que todas as cepas avaliadas foram sensíveis à ciprofloxacina e à cefotaxima, resultado também condizente com aqueles obtidos no presente estudo.

Miranda *et al.* (2009) também obtiveram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo em relação aos antibióticos testados. Aqueles autores isolaram 93 cepas de *Salmonella* originárias de produtos carneos, vegetais e queijos no México e detectaram altos níveis de resistência à ampicilina, tetraciclina, e cloranfenicol e baixos níveis de resistência à gentamicina e sensibilidade a cefotaxima. Esses autores detectaram que 18% das cepas mostraram resistência a ciprofloxacina, o que não foi observado no presente estudo.

No Brasil Medeiros *et al.* (2011), avaliaram o perfil de resistência antimicrobiana de 250 cepas de *Salmonella* isoladas de carcaças de frangos e observaram que das cepas testadas 13,2% apresentaram resistência à cefotaxima e 4% à ciprofloxacina, contrastando com os resultados obtidos neste trabalho. Tal fato sugere que, apesar de não terem sido encontradas cepas do patógeno resistentes à cefotaxima e ciprofloxacina no presente estudo, a ocorrência de micro-organismos com tais características é preocupante, pois restringe ainda mais as opções terapêuticas utilizadas no tratamento de *Salmonella* invasiva.

Neste trabalho, o sorovar que apresentou maior número de cepas com resistência e multirresistência a antimicrobianos foi o Typhimurium, com nove cepas resistentes e cinco multirresistentes, entre as 12 cepas testadas. Resultados semelhantes foram observados por diversos pesquisadores que avaliaram diferentes grupos de alimentos, tais quais carcaça e miúdos de frango no Marrocos (Abdellah

et al., 2009), carne moída nos Estados Unidos (CDC, 2012) e carne bovina no Japão (Shahada *et al.*, 2007).

A multirresistência de cepas de *S. Typhimurium* é alarmante, visto que este sorovar é um dos mais importantes agentes causadores de salmonelose em todo mundo, atrás apenas da *S. Enteritidis*, que normalmente é menos propensa a resistência antimicrobiana (Álvares *et al.*, 2012); mas neste estudo, *S. Enteritidis* exibiu resistência à ampicilina, à tetraciclina e à gentamicina.

Embora a maioria das cepas de *Salmonella* (70 – 65%) tenha sido isolada de couro e carcaça de bovinos, foi detectada uma baixa prevalência (apenas 6 isolados) que apresentaram resistência aos agentes antimicrobianos testados. Este resultado é semelhante àquele obtido por Beach *et al.* (2002), os quais avaliaram o perfil de resistência a agentes antimicrobianos de cepas isoladas de couro e carcaça de bovinos confinados e observaram que a maior parte delas apresentou sensibilidade aos sete antibióticos testados; além disso, aqueles autores observaram que apenas 21% de cepas testadas foram resistentes à tetraciclina.

Neste estudo observou-se que as cepas de *Salmonella* obtidas a partir de coxas de frango eram sensíveis aos antibióticos testados uma vez que, nesse alimento, apenas duas cepas de um total de 13 analisadas apresentaram resistência aos antimicrobianos avaliados. Estes resultados são semelhantes a aqueles observados por Duarte *et al.* (2009), os quais isolaram 26 cepas de *Salmonella* de carcaças de frango de um frigorífico no Nordeste do Brasil e observaram baixa prevalência de cepas resistentes à cefotaxima, ciprofloxacina, ampicilina, gentamicina, trimetoprima e ao cloranfenicol; porém, foi detectada alta ocorrência de cepas resistentes à tetraciclina.

No presente trabalho, houve uma elevada prevalência de cepas de *Salmonella* originárias de linguiça resistentes aos agentes antimicrobianos testados (18 de um total de 26, ou seja, 70%) (Tabela 3), sendo que dentre aquelas nove cepas – 50% corresponderam ao sorovar Typhimurium que, conforme citado anteriormente, é o sorovar que apresenta maior prevalência de resistência antimicrobiana (Hu *et al.*, 2012). Kich *et al.* (2011) isolaram 572 cepas de *Salmonella* de fezes, linfomas e carcaças de suínos originários de 12 rebanhos no Estado de

Santa Catarina e observaram que 83% delas foram resistentes a pelo menos um dos 15 antibióticos testados, enquanto que 43% das cepas foram resistentes a quatro ou mais antimicrobianos, resultado condizente com aquele observado no presente estudo.

Através do emprego de métodos biomoleculares (reação PCR), o gene *Bla*_{TEM} foi detectado em 80% das cepas de *Salmonella* avaliadas, mas foi detectado tanto em cepas resistentes como em cepas não resistentes a ampicilina. É interessante ressaltar, contudo, que duas cepas apresentaram resistência através do emprego de métodos fenotípicos, embora tais resultados não tenham sido confirmados com o método biomolecular. Soulfy *et al.* (2012) avaliaram o perfil de resistência a antibióticos em 37 cepas de *Salmonella* originárias de frango e observaram que, das 21 cepas resistentes à tetraciclina, apenas 15 apresentaram o gene *tetA*. Entretanto, Anand *et al.* (2009) compararam os resultados obtidos através do emprego dos métodos de difusão do disco e a técnica de PCR na determinação do perfil de resistência de 50 cepas de *Staphylococcus aureus* à cefoxitina e oxacilina e observaram 100% de concordância para ambos antibióticos. Estes resultados indicam que a concordância entre resultados obtidos através de métodos fenotípicos e biomoleculares depende de diferentes fatores, como micro-organismo testado, antibiótico avaliado e genes investigados. A divergência de resultados observada pode ser decorrente do envolvimento de genes diferentes dos investigados associados a resistência antimicrobiana, não testados neste estudo.

De acordo com os resultados, sete das 26 cepas de *Salmonella* spp resistentes a algum antibiótico apresentaram integrons classe 1, sendo três delas pertencentes ao sorovar Derby, duas ao sorovar Typhimurium, uma ao sorovar Infantis e uma ao sorovar I 4,[5],12:i:-. Além disso, os genes *aadA* 1 e *aadA* 2, que conferem resistência a aminoglicosídeos, foram detectados em todos os integrons. Dahshan *et al.* (2010) detectaram integrons classe 1 em nove cepas de *Salmonella* spp isoladas de suínos no Japão, sendo sete pertencentes ao sorovar Typhimurium e duas ao sorovar Infantis e em todas foi encontrado o gene *aadA*1.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Os métodos fenotípicos empregados para a determinação da resistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. apresentaram desempenho semelhante, com correlação elevada para todos os resultados obtidos.
- Os métodos biomoleculares detectaram genes de resistência antibióticos em cepas de *Salmonella* spp que não apresentaram resistência a estes antibióticos quando testadas pelos métodos fenotípicos, sugerindo uma limitada aplicação na rotina de pesquisa em laboratórios. Por outro lado os métodos fenotípicos podem ter apresentado uma sensibilidade insuficiente para detectar uma possível resistência detectada pelo método biomolecular.
- A frequência de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos entre as cepas estudadas é preocupante, pois 24,3% destas apresentaram resistência a pelo menos um de oito antibióticos testados. A ocorrência de resistência antimicrobiana nas cepas provenientes de produtos cárneos coletados no varejo foi superior a detectada nas cepas provenientes do couro e carcaça de bovinos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELLAH, C., FOUZIA, R.F., ABDELKADER, C., RACHIDA, S.B., MOULOUD, Z., Prevalence and anti-microbial susceptibility of *Salmonella* isolates from chicken carcasses and giblets in Meknès, Morocco. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, 215–219 2009.
- ALCAINE, S. D.; WARNICK, L. D., WIEDMANN, M. Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, v.70, n. 3, p. 780–790, 2007.
- ALTERTHUM, F. Mecanismos de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 Ed – São Paulo: Atheneu, cap 9, p.79- 85, 2008.
- ANAND, K.B.; AGRAWAL, P.; KUMAR, S.; KAPILA, K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 27-29, 2009.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Uso racional de Antimicrobiano e a Resistência Microbiana- Interpretação de Dados Microbiológicos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/acuracia.htm, 2008.
- ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E.; ALONSO-CALLEJA, C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, C.; CAPITA, R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, p.281-287, 2012.
- ARCANGIOLI, M. A., LEROY-SETRIN, S., MARTEL, J.L, CHASLUS-DANCLA, E. Evolution of chloramphenicol resistance, with emergence of cross-resistance to florfenicol, in bovine *Salmonella* Typhimurium strains implicates definitive phage type (DT) 104. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 103–110, 2000.
- ARLET, G. BARRETT, T. J., BUTAYE, P., CLOECKAERT, A. MULVEY, M. R. WHITE, D. G. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. **Microbes and Infection** v.8, p. 1945 – 1954, 2006.
- ARSLAN, S. AND EYI, A. Occurrence and Antimicrobial Resistance Profiles of *Salmonella* Species in Retail Meat Products. **Journal Food Protection**, v. 73, n. 9, p.1613–1617, 2010.
- BAKER, C.N.; STOCKER, S.A.; CULVER, D.H.; THORNSBERRY, C. Comparison of the E Test to Agar Dilution, Broth Microdilution, and Agar Diffusion Susceptibility Testing Techniques by Using a Special Challenge Set of Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.3, p. 533-538, 1991.
- BAUER AW, KIRBY WM, SHERRIS JC, TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45 n.4, p.493-6, 1966.

BEACH, J.C.; MURANO, E.A.; ACUFF, G.R.; Serotyping and Antibiotic Resistance Pro. ling of *Salmonella* in Feedlot and Nonfeedlot Beef Cattle. **Journal of Food Protection**, v. 65, n.11, p.1694–1699, 2002.

BENNETT, P.M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal of Pharmacology** 153, p.347–357, 2008.

BESSA, M. C., MICHAEL, G. B. CANU, N, CANAL, C. W., CARDOSO, M., RABSCH, W., RUBINO, S. Phenotypic and genetic Characterization of *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio Grande do Sul, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.83, p. 302–310, 2007.

BRASIL 2009 – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº26, de 9 de julho de 2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. D.O.U. 10/07/2009.

BUTAYE, P.; MICHAEL, G.B.; SCHWARZ, S.; BARRETT, T.J.; BRISABOIS, A.; WHITE, D.G. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. **Microbes and Infection**, v.8, p.1891-97, 2006.

CAMPANA, E. H.; CARVALHAES, C. G.; BARBOSA3, P. P.; MACHADO, A. M. O.; PAULA, A. M.; GALES, A. C. Avaliação das metodologias M.I.C.E.®, Etest® e microdiluição em caldo para determinação da CIM em isolados clínicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 2, p. 157-164, 2011.

CARATTOLI, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. **Veterinary Research**, v.32, n.3/4, p.243-59, 2001.

CARATTOLI, A. Plasmid-Mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* **Current Issues in Molecular Biology**, n.5, p.113-122, 2003.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention (2008) National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Salmonellosis. United States, May, 21, 2008. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonellosis/> Acesso: fev 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention (2010) Scientific Nomenclature-United States, 2010. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/pages/scientific-nomenclature.htm>. Acesso: fev 2012 a

CDC. Centers for Disease Control and Prevention (2010) Diagnosis and Treatment - United States, Sep 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/Salmonella/general/diagnosis.html>. Acesso: fev 2012 b.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention (2010) Surveillance for foodborne disease outbreaks --- United States, 2007 13;59 (31):973-9 Aug 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5931a1.htm> c

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2011). Outbreak of Human *Salmonella* Typhimurium Infections Associated with Contact with Water Frogs. Disponível online em: <http://www.cdc.gov/Salmonella/water-frogs-0411/040711/index.html>. Acesso: fev 2012 a

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2011). Infectious Diseases Related To Travel- Typhoid & Paratyphoid Fever. Disponível online em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/typhoid-and-paratyphoid-fever.htm> July 01,2011. b

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2012) Reports of Selected *Salmonella* Outbreak Investigations. Disponível online em: <http://www.cdc.gov/Salmonella/outbreaks.html>. Acesso: fev 2012.

CENTER FOR SCIENCE IN THE PUBLIC INTEREST USDA Urged to Prohibit Antibiotic-Resistant *Salmonella* in Ground Meat and Poultry Dangerous Strains Make Foodborne Illnesses Harder to Treat, Says CSPI May 25, 2011 <http://www.cspinet.org/new/201105251.html>

CHEN, S.; ZHAO, S.; WHITE, D.G.; SCHROEDER, C.M.; LU, R.; YANG, H.; MCDERMOTT, P.F.; AYERS, S.; MENG, J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1-7, 2004.

CHOPRA, I. E ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n.2, p. 232-260, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Metodologia dos testes de sensibilidade antimicrobiana. Sexta edição. **CLSI documento M07-A06**, v.23,n.2, 2005. a

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos: 15º suplemento informativo. **CLSI documento M100-S15**, v.25, n.1, p.2-177, 2005 b.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada - Oitava Edição. **CLSI documento M2-A8**, v.23, n.1, p.2-58, 2005c.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20, v. 30, 2010.

COLLIGNON, P., POWERS, J.H., CHILLER, T.M., KANE-AIDARA, A., ARESTRUP, F. World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies for the Use of Antimicrobials in Food Production Animals. **Clinical Infectious Diseases**, v.49, p.132-41, 2009.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J. *Salmonella* Species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; eds. **Food Microbiology**: Fundamentals and Frontiers, 3.ed. Washington, p.187-236- 2007.

DAHSHAN, H.; CHUMA, T.; SHAHADA, F.; AKIBA, M.; FUJIMOTO, H.; AKASAKA, K.; KAMIMURA, Y.; OKAMOTO, K. Characterization of Antibiotic Resistance and the Emergence of AmpC-Producing *Salmonella* Infantis from Pigs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n.11, p. 1437–1442, 2010.

DAVIS, M. A., BAKER, K. N. K., ORFE, L. H., SHAH, D. H., BESSER, T. E., CALL, D. R. Discovery of a Gene Conferring Multiple-Aminoglycoside Resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p. 2666–2669, 2010.

DUARTE, D.A.M.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A.M.M.; SANTOS, S.B.; SILVA, J.V.D.; ANDRADE, P.L.A.; FALCÃO, L.S.P.C.A. Occurrence of *Salmonella* spp. in Broiler Chicken Carcasses and Their Susceptibility to Antimicrobial Agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.569-573, 2009.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2009). Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard¹ Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards annual report. *Euro Surveill.* 2008 april 17 Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/765.pdf>

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2012). Food-borne zoonotic diseases- *Salmonella*. 2012 april 13 Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/Salmonella.htm>

FERREIRA, E.O.; CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 Ed – São Paulo: Atheneu, cap. 43, p.329-338, 2008.

Food and Drug and Administration (2007). Class II special controls guidance document: antimicrobial susceptibility test (AST) systems; guidance for industry and FDA. Rockville, MD: US Food and Drug Administration, 2007.

Food and Drug Administration (2012). The Judicious Use of Medically Important Antimicrobial Drugs in Food-Producing Animals. Guidance for Industry. 2012 April 13 Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM216936.pdf>. Acesso: fev 2012 a.

Food and Administration (2012) FDA takes steps to protect public health. Fda News Release- April 11, 2012. Disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm299802.htm>. Acesso: ago 2012 b.

FORSYTHE, S.J. Microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. In: **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, p.162-64, 2002.

GALIMAND, M., COURVALIN, P., LAMBERT, T. Plasmid-Mediated High-Level Resistance to Aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* Due to 16S rRNA Methylation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2565–2571, 2003.

GILLINGS, M., BOUCHER, Y., LABBATE, M., HOLMES, A., KRISHNAN, S., HOLLEY, M., STOKES, H.W. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. **Journal of Bacteriology**, 190, 5095–5100, 2008.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Collaborating center for Reference and Research on (Salmonella)*, 9ed., 2007. Disponível em: <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms-index.html>. Acesso em: jul. 2012.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.I. BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A. D.; WEILL, F.-X., 2010 supplement 2003-2007 N 47 to the Kauffmann- Le minor scheme. **Research in microbiology**, v. 161, p 26-29, 2010.

GYLES, C.L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. **Animal Health Research Reviews**, v.9(2), p.149-158, 2008.

HAWKEY PM AND JONES AM. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 2009;64 (Suppl 1):i3–i10

HOHMANN, E.L. Nontyphoidal Salmonellosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p. 263-9, 2001.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research International**, v.45, p.819–830, 2012.

JAY, M.J. Gastroenterites de origem alimentar causadas por *Salmonella* e *Shigella*. In: **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, p.543-57, 2005.

JEAN, S. S., LEE, Y. T, GUO, S. M., HSUEH, P. R. Recurrent infections caused by cefotaxime- and ciprofloxacin-resistant *Salmonella* enterica serotype choleraesuis treated successfully with imipenem. **Journal of Infection** v. 51, p. 163–165, 2005.

JORGENSEN, J.H. AND FERRARO, M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. **Medical Microbiology-Clinical Infectious Diseases**, v.49, p.1749-55, 2009.

KICH, J.D.; COLDEBELLA, A.; MORÉS, N.; NOGUEIRA, M.G.; CARDOSO, M.; FRATAMICO, P.M.; CALL, J.E.; FEDORKA-CRAY, P.; LUCHANSKY, J.B. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p.307-313, 2011.

KHEMTONG, S. AND CHUANCHUEN, R.; Class 1 Integrons and *Salmonella* Genomic Island 1 Among *Salmonella* enterica Isolated from Poultry and Swine. **Microbial Drug Resistance** v.14, n.1, 2008.

KRAULAND, M.G.; MARSH, J.W.; PATERSON, D.L.; HARRISON, L.H. Integron-mediated Multidrug Resistance in a Global Collection of Nontyphoidal *Salmonella* enterica Isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, N^o. 3, 2009.

Le MINOR, L. *Salmonella*. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G., eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 8 ed. Baltimore/London: Williams & Wilkins, 1984, v.1, p.427-458.

LEVESQUE C, PICHE L, LAROSE C, ROY PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.1, p.185-91,1995.

LOUREIRO, E.C.B.; MARQUES, N.D.B.; RAMOS, F.L.P.; REIS,E.M.F.; RODRIGUES, D.P.; HOFER,E.; *Salmonella* serovars of human origin identified in Pará State, Brazil from 1991 to 2008. **Revista Pan-Amazônica de Saúde, Manaus** v.1, n.1, p. 93-100, 2010.

LUBER, P.; BARTELT, E.; GENSCHOW, E.; WAGNER, J.; HAHN, H. Comparison of Broth Microdilution, E Test, and Agar Dilution Methods for Antibiotic Susceptibility Testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.3, p. 1062–1068, 2003.

MAEDA, Y., GOLDSMITH, C. E., COULTER, W. A., MASON, C., DOOLEY, J. S.G., Lowery, C. J., Millar, B. C., Moore, J. E. Comparison of minimum inhibitory concentration by broth microdilution testing versus standard disc diffusion testing in the detection of penicillin, erythromycin and ciprofloxacin resistance in viridans group streptococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 1782–1786, 2011.

MEDEIROS, M.A.N.; OLIVEIRA, D.C.N.; RODRIGUES, D.P.R.; FREITAS, D.R.C.; Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Rev Panam Salud Publica*. v.30, n.6, p. 555–60, 2011.

MELCHOR, Y. L., QUINONES, B., LÓPEZ, B. A. A., FELIX, J.L., ESTRADA, R. G., CHAIDEZ, C. Characterization of Tetracycline Resistance in *Salmonella* enterica Strains Recovered from Irrigation Water in the Culiacan Valley, Mexico. **Microbial Drug Resistance**, v. 16, N. 3, 2010.

MENG , H., ZHANG, Z., CHEN , M., SU, Y., LI, L., MIYOSHI, S., YAN, H., SHI, L. Characterization and horizontal transfer of class 1 integrons in *Salmonella* strains isolated from food products of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.149 , p. 274–277, 2011.

MIRANDA, J.M.; MONDRAGÓN, A.C.; MARTINEZ, B.; GUARDDON, M.; RODRIGUEZ, J.A. Prevalence and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* from Different Raw Foods in Mexico. **Journal of Food Protection**, v.72, n.5, p.966-971, 2009.

MÜRMANN, L.; SANTOS, M.C.; CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, 2008.

SOULFI, L., SÁENZ, Y., TORO, M., ABBASSI, M. S., ROJO-BEZARES, B., VINUE, L., BOUCHAMI, O., TOUATI, A., HASSEN, A. B., HAMMAMI, S., TORRES, C. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Salmonella* enterica Recovered from Poultry Meat in Tunisia and Identification of New Genetic Traits. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, 2012.

STEWART, C.D.; MOHAMMED, J.M.; SWENSON J.M.; STOCKER, S.A.; WILLIAMS, P.P.; GAYNES, R.P.; MCGOWAN, JR, J.E.; TENOVER, F. Antimicrobial Susceptibility Testing of Carbapenems: Multicenter Validity Testing and Accuracy Levels of Five Antimicrobial Test Methods for Detecting Resistance in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.1, p. 351-358, 2003.

SU, L.H.; CHIU, C. H.; CHU, C.; OU, J. T. Antimicrobial Resistance in Nontyphoid *Salmonella* Serotypes: A Global Challenge. **Clinical Infectious Diseases**, v.39, pg 546-51, 2004.

SU, L. H., WU, T. L., CHIU, C. H. Development of carbapenem resistance during therapy for non-typhoid *Salmonella* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18: p. E91–E94, 2012.

SVS. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS – DTA período de 2000 a 2011. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Disponível em: www.saude.gov.br/svs. 2011.

TESSMANN, C. ZOCHE, F. LIMA, A. S.; BASSANI, M; LOPES, G. V.; SILVA, W. P. Ocorrência e perfil de sensibilidade a antibióticos de *Salmonella* spp. Isolada em cortes de carne suína comercializados em feiras-livres de Pelotas (RS) **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos** Curitiba v. 26, n. 2, p. 307-313, 2008.

THONG, K. L., MODARRESSI, S. Antimicrobial resistant genes associated with *Salmonella* from retail meats and street foods. **Food Research International** v.44 pag 2641–2646, 2011.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; Case, C.L. **Microbiology an introduction**. 5th edition; ed. Benjamin/Cummings, 2005.

VAN, T.T.H., NGUYEN, H.N.K., SMOOKER, P.M., COLOE, P.J. The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal *Salmonella* enterica isolated from food-producing animals, retail meat and humans in South East Asia. **International Journal of Food Microbiology**, 2012 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.032.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- Use of Quinolones in Food Animals and Potential Impact on Human Health 1998. Disponível em: <http://www.who.int/emc>. Acesso: fev 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- *Salmonella*. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/topics/Salmonella/en/>. Acesso: mar 2012.