

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

JORGE AUGUSTO DO AMARAL WERLICH

**Pesquisa de genes relacionados aos fatores de resistência bacteriana em
cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isoladas em material avícola**

SÃO PAULO

2023

JORGE AUGUSTO DO AMARAL WERLICH

Pesquisa de genes relacionados aos fatores de resistência bacteriana em cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isoladas em material avícola

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Departamento:

Departamento de Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Terezinha Knöbl

São Paulo

2023

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

Catálogo na Publicação

Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo
Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Werlich, Jorge Augusto do Amaral
Pesquisa de genes relacionados aos fatores de resistência
bacteriana em cepas de Salmonella enterica subsp. enterica
isoladas em material avícola / Jorge Augusto do Amaral Werlich ;
orientador Terezinha Knöbl .-- São Paulo, 2023.
38 f. : il.

Dissertação (Mestrado em ciências - Programa de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada -
Departamento de Patologia) - Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Avicultura. 2. Salmonella. 3. Int11. 4. qacE. 5. frmA. I.
Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 30th March 2021

CERTIFIED

We certify that the Research "Search for genes related to resistance to quaternary ammonia compounds in strains of Salmonella enterica subsp. enterica isolated from poultry material", protocol number CEUAX 7188031120 (ID 001683), under the responsibility Terezinha Knöbl, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day December 09, 2020.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Pesquisa de genes relacionados à resistência aos compostos quaternários de amônia em cepas de Salmonella enterica subsp. enterica isoladas em material avícola", protocolado sob o CEUAX nº 7188031120, sob a responsabilidade de Terezinha Knöbl, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 09 de dezembro de 2020.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: WERLICH, Jorge Augusto do Amaral

Título: Pesquisa de genes relacionados à fatores de resistência bacteriana em cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isoladas em material avícola

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a todos amigos e colegas, que em algum momento desta jornada, me concederam uma palavra de apoio e incentivo. Seria difícil citar todos com quem pude aprender e compartilhar de inúmeros conhecimentos que me ajudaram na construção de novos pontos de vista.

Aos mestres, brilhantes professores, que doaram seu tempo para me ensinar e desenvolver um senso crítico construtivo, sempre com muita didática, paciência e experiência.

Aos meus familiares, que me permitiram se fazer ausente por vários momentos, cientes da missão a qual me propus a conquistar.

À minha orientadora, Terezinha, por ser uma constante inspiração e por compartilhar seu vasto conhecimento, com toda humildade e paciência.

À colega Fernanda Borges Barbosa, que não mediu esforços e se dedicou por inúmeros momentos apoiando a construção deste trabalho.

À MSD Saúde Animal, por me permitir, apoiar e estimular a obter este grande passo na minha vida pessoal e profissional.

RESUMO

WERLICH, J.A.A. **Pesquisa de genes relacionados aos fatores de resistência bacteriana em cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isoladas em material avícola.** 2023. 38 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O Brasil destaca-se no cenário mundial da produção de carne de frango, sendo atualmente o segundo maior produtor e maior exportador desta proteína. Diante deste cenário, sob grande importância econômica, social e objetivando a oferta de alimento seguros e saudáveis, a preocupação com o controle de *Salmonella* torna-se assunto de grande relevância para o setor. O surgimento de cepas de *Salmonella* multirresistentes vem sendo apontado, porém poucos trabalhos relatam a ocorrência de resistência aos compostos desinfetantes, como o quaternário de amônio e a formalina. O presente trabalho teve como objetivo pesquisar por meio de PCR a presença dos genes *Int1*, *qacE*, *sugE* e *frmA* em isolados de *Salmonella* obtidos da cadeia avícola e traçar as correlações entre a presença destes genes e a resistência a agentes antimicrobianos utilizados na avicultura. Das 36 amostras analisadas, 56% eram *S. Heidelberg*, 28% *S. Minnesota*, 13% *S. spp* e 3% *S. Mbandaka*. Destas, 34 (94,44%) apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos, sendo que os maiores índices de resistência foram à tetraciclina (83%), ampicilina (72%) e amoxicilina (64%). Na pesquisa de genes de resistência, nenhuma amostra foi positiva para o gene *sugE*, 33% apresentaram o gene *qacE*, seguido de 33% do gene *Int1* e 17% do gene *frmA*. A presença desses genes teve significância estatística ($p < 0.05$) quando correlacionado às cepas que apresentaram resistência a 4 ou mais classes de antimicrobianos. Esses achados reforçam a ideia de que as práticas atuais de uso de medicamentos e desinfetantes na avicultura possam atuar na seleção destes patógenos.

Palavras-chave: Avicultura, *Salmonella*, PCR, *qacE*, *sugE*, *Int1*, *frmA*, Antibiograma

ABSTRACT

WERLICH, J.A.A. **Search for genes related to bacterial resistance factors in strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from poultry material.** 2023. 38 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Brazil stands out on the world stage of chicken meat production, being currently the second largest producer and largest exporter of this protein. Given this scenario, under great economic and social importance and aiming to offer safe and healthy food, the concern with *Salmonella* control becomes a matter of great relevance for the sector. The emergence of multiresistant *Salmonella* strains has been pointed out, but few report the occurrence of resistance to disinfectant compounds, such as quaternary ammonium and formalin. The objective of this work was to investigate, using PCR, the presence of the genes *Int11*, *qacE*, *sugE* and *frmA* in *Salmonella* strains obtained from the poultry chain and trace the correlations between the presence of these genes and the resistance to antimicrobial agents used in poultry farming. Of the 36 samples analyzed, 56% were *S. Heidelberg*, 28% *S. Minnesota*, 13% *S. spp* and 3% *S. Mbandaka*. Of these, 34 (94.44%) showed resistance to 01 or more antimicrobials, with the greatest resistance being tetracycline (83%), ampicillin (72%) and amoxicillin (64%). In the search for resistance genes, no sample was positive for the *sugE* gene, 33% had the *qacE* gene, followed by 33% for the *Int11* gene and 17% for the *frmA* gene. The presence of these genes was statistically significant ($p < 0.05$) when correlated with strains that showed resistance to 4 or more classes of antimicrobials. These findings reinforce the idea that current practices in the use of drugs and disinfectants can act in the selection of these pathogens.

Keywords: Poultry, *Salmonella*, PCR, *qacE*, *sugE*, *Int11*, *frmA*, antibiogram.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal

AMC – Amoxicilina

AMI – Amicacina

AMP – Ampicilina

BHI – *Brain Heart Infusion*

BP – *Base pairs*

CDC – *Center of Disease Control and Prevention*

CFIA – *Canadian Food Inspection Agency*

CFT – Ceftiofur

CLO – Cloranfenicol

CTX – Clortetraciclina

DIPOA - Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ENO – Enrofloxacin

ESG - *Environmental, social, and governance*

EST – Estreptomicina

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA – *Food and Drug Administration*

FOS – Fosfomicina

GEN – Gentamicina

GFA – *Glutathione-dependent Formaldehyde Dehydrogenase*

LPS – Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF-MS – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MDR – *Multi-drug Resistant*

NARMS - *National Antibiotic Resistance Monitoring System*

NEO – Neomicina

OMC – Organização Mundial do Comércio

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PNSA – Plano Nacional de Sanidade Avícola

QAC – *Quaternary ammonium compounds*

TET – *Tetracyclina*

WHO – *World Health Organization*

WOAH – *World Organisation for Animal Health*

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Formas e mecanismos de resistência bacteriana.....	21
Tabela 02. Isolamento de <i>Salmonella</i> (Portaria 126 de 1995 do MAPA).....	25
Tabela 03. Sequência de <i>primers</i> para detecção dos genes de resistência.....	26
Tabela 04. Percentual de resistência dos sorovares obtidos.....	26
Tabela 05. Perfil de resistência das cepas de <i>Salmonella</i> spp.	27
Tabela 06. Resultado da pesquisa de genes de resistência.....	27
Tabela 07. Significância estatística.....	28
Tabela 08. Frequência de detecção dos genes <i>qacE</i> e <i>sugE</i>	30

SUMÁRIO

1.Introdução	13
1.1.Normas Sanitárias do Mercado Internacional	14
1.2.Impacto na Economia nos Sistemas Agroindustriais causado pela <i>Salmonella</i>	15
1.2.1.Impacto na Qualidade e Confiabilidade dos produtos	15
1.2.2.O Controle da <i>Salmonella</i> , Normativas e Organizações envolvidas	16
2.Revisão da Literatura.....	18
2.1. <i>Salmonella</i>	18
2.2.Resistência Bacteriana	19
2.3.Quaternários de amônio e resistência a estes compostos.....	22
2.4.Formol e a resistência a este composto	23
3.Objetivos	24
3.1.Objetivos Específicos.....	24
4.Material e Métodos.....	24
4.1.Amostras.....	24
4.2.Isolamento e Identificação das amostras.....	24
4.3.Caracterização do Perfil de Resistência aos Antimicrobianos	25
4.4.Pesquisa dos genes de resistência	25
5.Resultados	26
6.Discussão.....	28
7.Conclusões	31
8.Referências	31

1. Introdução

O Brasil, destaca-se no cenário internacional como o segundo maior produtor de aves, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, produzindo no ano de 2022, 14.524 milhões de toneladas de carne de frango, o que o torna o maior exportador de frangos de corte no mundo, exportando 33,20% de sua produção total, chegando ao volume de 4.822 milhões de toneladas vendidas ao redor do mundo. Dessa produção, 66,8% são destinados ao mercado interno, suprimindo um consumo *per capita* de 45,2 kg/ano (ABPA, 2023).

Diante deste cenário, sob a importância econômica da atividade, denota-se a responsabilidade do setor avícola nacional, nos aspectos direcionados ao controle sanitário dos plantéis, para estabelecer medidas que proporcionem a adequada biossegurança, garantindo assim, o *status* de um país apto a atender as exigências sanitárias dos países importadores, assegurando parte da demanda de proteína animal do mundo (BRASIL, 1994).

A oferta de alimentos saudáveis e seguros, sob o ponto de vista de saúde pública, tornou-se um compromisso dos produtores e uma grande exigência dos consumidores. Nos Estados Unidos, a *Salmonella* é uma das principais causas de doenças de origem alimentar. Segundo o CDC estima-se que a *Salmonella* seja a responsável por mais casos de infecção alimentar do que qualquer outra bactéria, e que a cada 25 embalagens de carne de frango 1 esteja contaminada por algum tipo de *Salmonella* (CDC, 2022). De acordo com o FDA, ao ano, cerca de 1.35 milhões de casos de *Salmonella* são detectados, com uma média de 26.500 hospitalizações e 420 mortes somente nos Estados Unidos (FDA, 2022). Apenas no mês de junho de 2022, o CDC apontou que 219 pessoas foram infectadas por *Salmonella*, resultando em 27 hospitalizações e 1 morte. Em diversos outros países, os casos de Salmonelose são subnotificados, porém há uma estimativa da ocorrência de 93 milhões de casos ao ano (MAJOWICZ et al., 2010).

Segundo a Organização das Nações Unidas, estima-se que em 2050 a população global atinja os 9.7 bilhões de habitantes, tornando a escassez de alimentos a pauta mais preocupante a ser debatida, seguida do aumento da geração de poluentes e cuidados com os ecossistemas naturais. Diante deste cenário, a livre oferta de alimentos nutritivos e saudáveis, potencializa a preocupação com o controle dos patógenos envolvidos na cadeia avícola.

1.1. Normas Sanitárias do Mercado Internacional

Para o atender os requisitos de qualidade dos produtos exportados, proteção sanitária dos plantéis, dos países e principalmente a saúde da população consumidora, normas são estabelecidas por diferentes órgãos de normatização como a OMC, OMS e FAO, com objetivos de unificar a comunicação entre os países membros.

Para evitar a propagação de patógenos infecciosos que possam acometer outros animais ou seres humanos, são criadas restrições sanitárias seguindo regras da OMC por meio da WOA, essas restrições previstas dão origem as barreiras para o comércio de animais e seus produtos, com objetivo de preservar a biossegurança e a segurança do alimento no país importador, assim como trazer uma maior segurança aos trâmites comerciais entre os países.

O *Codex Alimentarius*, desenvolvido pelo consórcio da OMS e FAO, harmoniza as normas como as de resíduos químicos, terapêuticos, aditivos e biológicos entre os países membros da OMC. Entretanto, para *Salmonella*, os países importadores têm autonomia para adotarem políticas sanitárias de forma a elevar o nível de exigência, estabelecendo regras específicas para seus fornecedores quanto à presença ou ausência de *Salmonella*, variando em nível de criticidade conforme o tipo de sorovar circulante. Como exemplo, podemos citar o Regulamento (CE) nº 853/2004 que estabelece os requisitos para higiene dos alimentos, incluindo certas medidas contra *Salmonella*, e a CFIA que é o órgão regulamentador para produtos de origem animal.

No ano de 2018, estudos do FDA apontaram que 46% (399 amostras positivas de 869 amostras analisadas) das aves vivas, atestaram positividade para *Salmonella* spp., denotando a prevalência desta bactéria nos sistemas de produção avícolas. Segundo NARMS do FDA, 81% das *Salmonella* isoladas de seres humanos infectados não apresentam resistência aos antibióticos comumente utilizados para o tratamento, um número estável quando comparado aos dados históricos entre 2006-2017, onde este percentual foi de 76-85% (FDA, 2018).

Porém, análises do NARMS apontam um aumento do número de cepas resistentes ao ceftriaxone e ciprofloxacina, detectando também um aumento das cepas MDR, quando as mesmas apresentam resistência a três ou mais antimicrobianos de classes distintas. Outros estudos apontam a resistência a antimicrobianos em sorovares de *Salmonella* obtidas em amostras de aves

(ANTUNES, et al., 2003, PANDINI, et al., 2014, BATISTA, et al., 2018). Todavia, pouco se fala sobre a resistência a outros agentes antimicrobianos, como os desinfetantes.

Dentro do grupo de bactérias entéricas que contempla a *Salmonella* spp, *Echerichia coli*, *Pasteurella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, e vários outros gêneros, a transferência horizontal de material genético entre elas tem facilitado a emergência de cepas resistentes em todo o mundo. Presentes em muitos isolados clínicos, estruturas chamadas integrons de classe 1 codificam genes que conferem resistência a múltiplos antibióticos, antissépticos e desinfetantes (WELDHAGEN, 2004).

O estudo de fatores de resistência em cepas de *Salmonella* isoladas da cadeia avícola tem uma importância não somente do ponto de vista de controle do patógeno, mas também na compreensão da dinâmica de aquisição de genes de resistência, a fim de determinar as estratégias adequadas de controle do patógeno, reduzindo a prevalência e o surgimento de subpopulações multirresistentes aos agentes antimicrobianos, trazendo maior eficiência no controle e uma maior segurança do alimento para os consumidores.

1.2. Impacto na Economia nos Sistemas Agroindustriais causado pela *Salmonella*

A preocupação do controle de *Salmonella* na cadeia agroindustrial de proteína avícola, vai além dos aspectos de segurança do alimento e impactos na cadeia. A economia das agroindústrias produtoras de proteínas avícolas é impactada diretamente pela ocorrência deste patógeno.

1.2.1. Impacto na Qualidade e Confiabilidade dos produtos

A construção de uma organização passa por diversas etapas, envolvendo inúmeros atores com os objetivos comuns de atingir a alta eficiência com que os projetos são conduzidos, a sua capacidade de manter resultados de alta performance, assim como o estabelecimento de políticas de governança tanto para os atores internos (como o conhecimento é disseminado e aplicado), como o atendimento de normas e exigências oriundas de mercados internos e externos. Após a definição de bem produzir/fornecer, e de ter identificado a natureza do seu mercado, as estratégias competitivas podem ser definidas, a organização estabelece os termos em que os

recursos serão utilizados e como as informações serão divididas entre os atores pela empresa.

Ela também determina as metas dos indivíduos da empresa alinhadas com as metas gerais da companhia. Todas estas definições e agentes envolvidos impactam no custo da agência. Quando há ocorrência de um desequilíbrio, seja em uma organização a montante, elevando o custo dos seus insumos ou a jusante, diminuindo a compra, pagando um valor mais baixo ou na pior das hipóteses, recusando-se a comprar, o impacto na rentabilidade pode levar uma empresa à um endividamento pela busca de recursos para manter seu capital de giro, ou até mesmo, o fechamento de alguns setores ou da própria organização (BESANKO, et al., 2012).

As agroindústrias produtoras de carne de frango, possuem uma longa cadeia, dotadas de normas de Biossegurança (ABPA, 2021), que tem como objetivo único, a mitigação de riscos para entrada de patógenos em seu meio. Fragilidades neste sistema podem favorecer a introdução de cepas de *Salmonella*, que podem apresentar diferentes perfis de resistência (PANDINI, et al., 2014) elevando o risco da presença deste patógeno em produtos acabados.

Em 2017, o Brasil surpreendeu-se com a Operação Carne Fraca da Polícia Federal, na qual grandes corporações, por meio de investigações, protagonizaram um dos maiores escândalos associados à adulteração de certificados de qualidade e de presença de *Salmonella* (G1.com).

O resultado imediato para uma das empresas investigadas foi um prejuízo acumulado de R\$1,1 bilhão no ano de 2017, sendo boa parte efeito da operação Carne Fraca. No mesmo período, o governo brasileiro informou que 57 grandes importadores endureceram os controles para o embarque de produtos ocasionando assim uma redução de 22,1% nas exportações de carnes brasileiras no mesmo ano (Portal UOL Economia).

A perda de credibilidade na marca e o impacto direto na saúde econômica de uma organização, também é uma das consequências que envolve o patógeno em estudo.

1.2.2. O Controle da *Salmonella*, Normativas e Organizações envolvidas

No Brasil, o MAPA, por meio do DIPOA, é o órgão responsável pela normatização, cumprimento e fiscalização das normas especificadas pelo *Codex*

Alimentarius e as determinações dos países importadores. Sendo assim, por meio de suas normativas, o MAPA busca integrar sob seu gerenciamento os aspectos mercadológicos, tecnológicos, científicos, ambientais e organizacionais do setor produtivo, sendo ele, a autoridade maior no estabelecimento dos requisitos mínimos para que uma organização produza alimentos.

Em decorrência dos riscos de perdas econômicas e de saúde pública, o MAPA, estabeleceu por meio da Portaria nº 193 de 19 de setembro de 1994, o PNSA com a finalidade de:

- a) Prevenir e controlar as enfermidades de interesse em avicultura e saúde pública;
- b) Definir ações que possibilitem a certificação sanitária do plantel avícola nacional;
- c) Favorecer a elaboração de produtos avícolas saudáveis para o mercado interno e externo.

Alinhado com o Código Sanitário para Animais Terrestres da OIE e em harmonia com o setor produtivo, o PNSA busca uma constante evolução estabelecendo medidas de prevenção, controle e vigilância das principais doenças avícolas de impacto, tanto à saúde animal como saúde pública.

O MAPA, por meio da Instrução Normativa nº 20 de 21 de outubro de 2016, atualizou e intensificou o plano de monitoramento de *Salmonella* nos plantéis avícolas, determinando as medidas de destinação de lotes positivos conforme o tipo de sorovar identificado (BRASIL, 2016), sendo essa a norma vigente atualmente.

Essa normativa, determina as agroindústrias produtoras de proteína animal de origem avícola, as medidas que devem ser tomadas na ocorrência de determinadas cepas de *Salmonella*.

A maior preocupação em saúde alimentar, está no controle da *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Thyphimurium e as salmonelas monofásicas (fórmulas antigênicas 1,4,[5],12:-:1,2 e 1,4,[5],12:i:- orientando que os produtos de lotes positivos para estes sorovares sejam processados termicamente antes da comercialização, impossibilitando a oferta de cortes *in natura* (BRASIL, 2016).

Sob o ponto de vista da saúde das aves, a preocupação se limita à *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum, e as aves das linhas de corte são abatidas sanitariamente para evitar a propagação destes patógenos (FACTA, 2020).

Mais recentemente, novas organizações, alinhadas às exigências de ESG e o conceito de One Health entraram em cena. A ampliação dos mercados globais, o maior acesso às informações e crises climáticas, tornaram-se pautas entre as agroindústrias em busca da expansão dos seus negócios (OCDE, 2022).

A agenda ESG traz benefícios na redução de custos, maior controle organizacional e um maior poder na atração de investimentos, sendo estes benéficos quando se aborda o tema de controle de patógenos na cadeia avícola.

A correta destinação dos recursos e a agregação de novas metodologias de análises laboratoriais, permite que os investimentos e gestão no controle de patógenos se direcionem de maneira mais adequada para a prevenção ao invés de arcar apenas com as perdas econômicas.

Segundo análises da EMBRAPA, os custos dos insumos utilizados para sanidade variaram entre 0,12% e 0,36% do custo total do frango, no decorrer do ano de 2022.

Já Lagatta e Gameiro, (2014) estimaram que o investimento estrutural para atender as normas de biossegurança giraram em torno 1,61% a 2,09% do custo total da produção, segundo o autor, um custo relativamente baixo diante dos riscos e perdas envolvidos em episódios de problemas sanitários. As adequações de biossegurança foram normatizadas pelo MAPA sob a Instrução Normativa 56 de 2007 (BRASIL, 2007).

2. Revisão da Literatura

Inúmeras pesquisas ao longo dos anos, vem sendo realizadas a fim de aprofundar a compreensão e alternativas para controlar a *Salmonella* na cadeia avícola. Isso nos permite compreender por várias diferentes óticas, como este patógeno interage com o meio ambiente, outras populações bacterianas, produtos químicos e agentes antimicrobianos.

2.1. Salmonella

Bastonetes Gram negativos, pertencente à família Enterobacteriaceae, o gênero *Salmonella*, possui duas diferentes espécies causadoras de doenças em humanos e animais, a *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo essa

segunda, dividida em seis sub. espécies, das quais a *Salmonella enterica* sub. *enterica* é a de maior interesse em saúde animal e saúde pública (PERIN, 2017).

Salmonella enterica sub. *enterica* possui mais de 2600 sorovares, que são distinguidos por vários métodos de identificação, incluindo:

Características bioquímicas, como a fermentação de açúcares, produção de ácidos hidrólise de substâncias específicas, que permitem diferenciar alguns grupos de *Salmonella*;

Serotipagem, que consiste na utilização de anticorpos específicos aos antígenos somáticos, flagelares e capsulares, permitindo classificá-las em diferentes grupos e diferentes sorovares, sendo este o meio mais difundido;

Caracterização genética, que pode ser feita pelo sequenciamento completo do genoma da *Salmonella* ou por meio de técnicas de PCR.

Por convecção, os sorovares podem ser identificados abreviadamente, como por exemplo, a *Salmonella enterica* sub. *enterica* sorovar Enteritidis, apenas como *Salmonella* Enteritidis (RYAN; O'DWYER; ADLEY, 2017).

Estas bactérias são bastante resistentes no meio ambiente, podendo crescer entre temperaturas de 5°C a 46°C, sendo 37°C a temperatura de desenvolvimento ideal. São facilmente desnaturadas quando submetidas ao calor, acima dos 70°C, mas são resistentes ao resfriamento e congelamento. Não resistem à extremos de pH (abaixo de 3,8 e acima de 9,5) mas apresentam bom crescimento entre pH de 6,6 a 8,2 (RYAN; O'DWYER; ADLEY, 2017). Apresentam um bom desenvolvimento em atividade de água próximos a 0,94 a 0,99, podendo variar conforme o sorovar (FORSYTHE, 2002).

2.2. Resistência Bacteriana

A resistência das *Salmonella* é uma questão complexa que pode ser causada por diversos fatores, sendo a transferência de genes uma das formas mais dinâmicas e amplamente pesquisadas (DURMIC, et al, 2021, GOMES-LOPES, et al. 2021).

Segundo Didelot e Maiden (2010), a recombinação é uma fonte importante de variabilidade genética e evolução em bactérias, e que pode levar à disseminação de genes responsáveis por características importantes, como a resistência aos antibióticos. A recombinação pode permitir que bactérias adquiram novos genes responsáveis pela resistência aos antibióticos, especialmente em ambientes onde o

uso de antibióticos é comum, como em hospitais ou na agricultura. Além disso, a recombinação também pode ajudar a disseminar esses genes entre diferentes cepas bacterianas, tornando mais difícil o seu tratamento.

A recombinação genética é um processo no qual os genes de duas ou mais células diferentes se juntam para formar uma célula híbrida com combinações únicas de genes. Em micro-organismos, como *Salmonella*, a recombinação genética pode ocorrer por meio de diversos mecanismos, incluindo a transferência horizontal de material genético. Isso pode ser importante para a evolução da *Salmonella*, pois permite que a bactéria adquira novas características, como resistência a antibióticos, virulência e capacidade de colonização de novos hospedeiros. Além disso, também pode contribuir para a propagação de genes responsáveis por essas características entre diferentes cepas de *Salmonella* (DIDELOT e MAIDEN, 2010, RASKO, et al., 2008, WIRT, et al., 2006).

Gilings (2014) aborda em seu estudo, a aquisição de resistência por meio dos Integrons de Classe 1, que inclui o gene *Int1*, que codifica enzimas pertencentes à família das integrases de transposição e está envolvido na transferência horizontal de genes. É um elemento genético móvel encontrado em várias bactérias, incluindo patógenos humanos e animais, e tem sido associado à disseminação de genes de resistência a antibióticos. A *int1* pode estar presente em plasmídeos, integrons ou na forma livre no cromossomo bacteriano.

A aquisição de genes por meio dos integrons de classe 1 é importante para a evolução bacteriana, pois permite que as bactérias adquiram novas características genéticas rapidamente, como a capacidade de resistir aos antibióticos ou outros compostos (MAZEL, 2006).

A aquisição de genes, pode conferir às bactérias, diferentes formas de desenvolver resistência, conforme observamos na tabela 01.

Tabela 01. Formas e mecanismos de resistência bacteriana.

Forma de resistência	Mecanismo	Fonte
Modificação do alvo do antimicrobiano	Alteração molecular do alvo de atuação do antimicrobiano, inibindo ou reduzindo a afinidade da molécula ao seu sítio natural, afetando seu efeito antibiótico.	Wright, 2005
Inativação enzimática do antimicrobiano	Característica comum às bactérias resistentes aos compostos β -lactâmicos pelo efeito das β -lactamases em hidrolisar e inativar diferentes tipos de antimicrobianos pertencentes à essa classe.	Bush, 2010
Diminuição da permeabilidade da membrana celular	Característica comum em bactérias Gram negativas, desenvolvida por mecanismos que reduzem, por exemplo, a quantidade de porinas na camada LPS, reduzindo a permeabilidade da membrana celular.	Hancock, 1988
Bomba de efluxo	Caracterizado por um sistema de transporte ativo, capaz de extrudar diversos princípios ativos com ação antibiótica, para fora de célula bacteriana. Este mecanismo pode ser modulado por estímulos ambientais ou níveis de antimicrobianos.	Li, 2015
Formação de Biofilme	Capacidade de formação de comunidades bacterianas complexas, aderidas à estruturas bióticas ou abióticas conferindo assim maior capacidade em sobreviver à variadas condições externas. Os biofilmes também facilitam a troca de genes entre os grupos bacterianos presentes.	Flemming, 2016

2.3. Quaternários de amônio e resistência a estes compostos

O quaternário de amônio é um tipo de composto orgânico que é formado por um grupo amônio, ou grupo $N(CH_3)_3$, ligado a uma molécula orgânica. São tensoativos catiônicos, conhecidos pelas suas propriedades biocidas, utilizados em uma ampla variedade de aplicações, incluindo limpeza doméstica, cosméticos, agricultura, medicina e indústria.

Os quaternários de amônio são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas, antivirais e antifúngicas. Eles são amplamente utilizados como conservantes em alimentos, produtos de higiene pessoal e farmacêuticos, para prevenir o crescimento de bactérias e fungos. Eles também são usados como ingredientes ativos em sabões, desinfetantes e outros produtos de limpeza para ajudar a remover gorduras, proteínas e outras sujidades. (VRIENS, 2013, MARTELLI, 2012).

Os quaternários de amônio atuam como agentes antimicrobianos, matando bactérias e outros microrganismos ao perturbar a permeabilidade da parede e da membrana celular. Eles fazem isso interagindo com a camada externa lipídica da membrana celular, levando a uma desestabilização dela, o que resulta na perda de íons e outras moléculas importantes, e eventual morte celular.

Além disso, os QAC podem também inibir a síntese proteica e interferir com a reprodução celular, o que leva a uma supressão adicional do crescimento bacteriano. O mecanismo exato pelo qual os QAC exercem seu efeito antimicrobiano pode variar de acordo com o tipo de bactéria, a concentração do QAC e as condições do meio ambiente. No entanto, também existe preocupação com o desenvolvimento de resistência bacteriana a estes compostos, o que pode limitar sua eficácia a longo prazo (GERBA, et. al. 2015, SHTYRLIN, et. al. 2016).

Os genes *qacE* e *sugE* são genes que codificam para proteínas que pertencem à família de transportadores de efluxo do tipo Proteína de Transporte de Multidrogas. Essas proteínas são encontradas em muitas bactérias, e são responsáveis pela resistência a múltiplas drogas, incluindo compostos quaternários de amônio, que são frequentemente utilizados como desinfetantes em hospitais e outras instituições de saúde (BRAGG et. al. 2014).

San Millan et al. (2015) realizaram um estudo sobre a evolução e disseminação do gene *sugE* em bactérias Gram-negativas, enquanto Wang et al. (2016)

investigaram a presença dos genes *qacE* e *qacEΔ1* em cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a múltiplas drogas.

A proteína codificada pelo gene *qacE* é um transportador de efluxo que confere resistência a compostos de amônio quaternário, como o cloreto de benzalcônio, enquanto a proteína codificada pelo gene *sugE* confere resistência a compostos de amônia quaternária. Esses genes são frequentemente encontrados em plasmídeos, que são elementos genéticos móveis que podem ser transferidos de uma célula para outra. Como resultado, a resistência a múltiplos compostos pode espalhar-se rapidamente entre diferentes cepas bacterianas (BHAGWAT, et al., 2016, CHIRITA, 2019).

2.4. Formol e a resistência a este composto

O formol, também conhecido como formaldeído, é um composto químico com fórmula química CH_2O . Ele é amplamente utilizado na indústria química, farmacêutica, têxtil, de cosméticos, bem como na agroindústria, entre outras áreas.

A resistência ao formol está relacionada aos genes *frmR* e os genes de resposta ao estresse oxidativo, como o *frmA*, que conferem a capacidade das bactérias de tolerar e metabolizar formaldeído. O gene *frmR* é um regulador que controla a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo das bactérias. O gene *frmA*, por sua vez, controla a produção da enzima GFA. Quando as bactérias estão expostas ao formaldeído, o gene *frmR* é ativado e começa a regular a produção da enzima formaldeído desidrogenase. Isso permite que as bactérias possam metabolizar o formaldeído e utilizá-lo como fonte de carbono (ZANG, ZHU, CHEN, 2019).

A enzima GFA produzida pelo gene *frmA* desempenha um papel importante na metabolização do formol em muitas espécies bacterianas. Essa enzima catalisa a oxidação do formaldeído a ácido fórmico, utilizando o composto antioxidante glutaciona como co-fator. A atividade da GFA é importante para a detoxificação do formol e outros aldeídos (WATANABE, WATANABE, TAKEDA, 1991. LIU, et al. 2018).

3. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi determinar a frequência de ocorrência do gene *Int1* (Integron de classe 1), dos genes *qacE*, *sugE*, (genes de resistência a Quaternário de amônio), e *frmA* (codifica a enzima GFA), em estirpes resistentes de *Salmonella* spp., e determinar a correlação da presença destes genes com o grau de resistência aos antimicrobianos.

3.1. Objetivos Específicos

Estabelecer, por meio de antibiograma, o perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Salmonella* spp.;

Determinar a frequência de ocorrência dos genes *qacE*, *sugE*, *frmA* e *Int1* em *Salmonella* originárias de lotes de frangos de corte, dos programas de autocontrole de empresas produtoras de frangos de corte da região Sudeste.

Analisar a correlação entre a presença dos genes de resistência aos Quaternários de Amônio, presença do gene *frmA* e de *Int1*, com o grau de resistência aos antimicrobianos;

4. Material e Métodos

4.1. Amostras

Para este estudo, foram selecionadas 36 cepas de *Salmonella* pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Medicina Aviária – Departamento de Patologia da FMVZ-USP. As estirpes foram selecionadas segundo critério de amostragem não probabilística, por conveniência.

O estudo foi aprovado pela CEUAX – Protocolo 7188031120.

4.2. Isolamento e Identificação das amostras

O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Medicina Aviária da FMVZ-USP. As amostras foram reativadas das culturas de estoque e processadas segundo a Portaria 126 de 1995 do MAPA, conforme a tabela 02.

Em seguida as cepas foram identificadas por espectrometria de massa (Maldi Tof MS) E sorotipificadas por meio da Soro-aglutinação em Placa, classificadas taxonomicamente segundo o modelo proposto por White-Kauffmann e Le Minor, (2007).

Tabela 02. Isolamento de *Salmonella* (Portaria 126 de 1995 do MAPA).

ISOLAMENTO DE <i>SALMONELLA</i>	
Matriz	Suabe ou órgãos de aves
Pré-enriquecimento	2g em 20ml de Caldo BHI Incubar entre 35 e 37°C por 18 a 24h
Enriquecimento seletivo	Com o material pré enriquecido, utilizar 2g em 20ml de Caldo Tetracionato e 0,2g em 20ml de Caldo Rappaport Vassiliadis Incubar entre 43 a 43°C por 18 a 24h
Isolamento	Após o enriquecimento seletivo, estriar em Ágar MacConkey, Verde Brillhante, Hektoen e/ou Rambach (utilizado no mínimo dois meios seletivos) Incubar entre 35 a 37°C por 18 a 24h
Aspecto das colônias	Ágar MacConkey – Colônias incolores Ágar Hektoen – Colônias verde-azuladas com ou sem centro negro Ágar Verde Brillhante – Colônias rosadas Ágar Rambach – Colônias incolores (<i>S. Pullorum</i> e <i>S. Gallinarum</i>) ou vermelhas (outras <i>Salmonella</i>)

4.3. Caracterização do Perfil de Resistência aos Antimicrobianos

O teste de susceptibilidade foi realizado pela técnica de Disco-Difusão de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966), com discos de antimicrobianos amicacina, tetraciclina, ceftiofur, fosfomicina, neomicina, amoxicilina, ampicilina, clortetraciclina, cloranfenicol, enrofloxacina, estreptomicina e gentamicina. A leitura foi realizada com base nos pontos de corte do Br-Cast (2020), considerando multirresistentes os isolados resistentes a mais de 3 ou mais classes diferentes de antibióticos.

4.4. Pesquisa dos genes de resistência

Para a pesquisa dos genes de resistência, os isolados foram submetidos à extração de DNA, pelo método de fervura, segundo procedimento descrito por Barbosa (2020).

Os genes foram pesquisados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) (CHAPMAN, 2003). As condições de reação e sequências de *primers* estão descritas na tabela 03.

Tabela 03. Sequência de *primers* para detecção dos genes de resistência.

Gene	Sequência de Primers	Produto (bp)	Referências
<i>qacE</i>	AGCCCCATACCTACAAAG AGCTTGCCCCTTCCGC	235	Barbosa, 2020
<i>sugE</i>	CTGCTGGAAGTGGTATGGG GCATCGGGTTAGCGGACT	305	Barbosa, 2020
<i>frmA</i>	GCAAACCATGAACACGTCTG ACAGAATCACCTGGCTGGAC	100	Herring, Blattner, 2004
<i>Int1</i>	AGTTGACATAAGCCTGTTC CCCGAGGCATAGACTGTAC	150	Cunha, 2018

Os dados foram analisados estatisticamente no software GraphPad utilizando o teste Fischer exato em tabela de contingência com duas caudas e considerando significativo valor- $p < 0.05$.

5. Resultados

Das 36 amostras analisadas, 56% eram *Salmonella* Heidelberg, seguidas de *Salmonella* Minnessota (28%), *Salmonella* spp (13%) e *S. Mbandaka* (3%). Na análise do perfil de resistência aos antimicrobianos, 34/36 (94,44%) apresentaram resistência a 01 ou mais antimicrobianos, com maior resistência à tetraciclina (83%), ampicilina (72%), amoxicilina (64%), e uma menor resistência à fosfomicina (6%) e cloranfenicol (6%), conforme os dados da tabela 04.

Tabela 04. Percentual de resistência dos sorovares de *Salmonella* spp. São Paulo, 2023

Sorovar	Quantidade	%	Número de isolados, de cada sorovar, resistentes aos antimicrobianos											
			AMI	TET	CFT	FOS	NEO	AMC	AMP	CTX	CLO	ENO	EST	GEN
S. Heidelberg	20	56%	5	19	11	1	2	14	16	10	1	2	7	7
S. Minnesota	10	28%	0	8	0	0	7	8	8	7	0	0	1	0
S. spp	5	13%	3	3	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
S. Mbandaka	1	3%	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
Total	36		8	30	13	2	9	23	26	18	2	4	8	7
			22%	83%	36%	6%	25%	64%	72%	50%	6%	11%	22%	19%

A Tabela 05, apresenta a distribuição do perfil de resistência das cepas de *Salmonella* deste estudo, aos antimicrobianos testados. O perfil, varia de nenhuma resistência a resistência a 9 diferentes antimicrobianos. Dos isolados 94,4% são resistentes a pelo menos 1 antimicrobiano, enquanto 27,7% são resistentes a 6 ou mais antimicrobianos. Foram classificados 69,44% como multirresistentes (resistentes a 3 ou mais classes de antimicrobianos).

A pesquisa da presença dos genes de resistência aos compostos de quaternário de amônia, gene *fmrA* e o gene *Int1*, revelou que nenhuma das amostras possui o gene *sugE*, enquanto a pesquisa para os genes *qacE*, *formA* e *Int1*, foram detectados respectivamente, em 33%, 17% e 31% das cepas avaliadas., conforme apresentado na Tabela 06.

Tabela 05. Perfil de resistência das cepas de *Salmonella* spp. São Paulo, 2023.

Perfil de resistência	Amostras	Sorovar
Sensíveis	2	S. spp
TET	1	S. Heidelberg
AMI, TET	2	S. spp (1) S. Heidelberg (1)
AMI, TET, NEO	1	S. Heidelberg
TET, AMC, AMP	2	S. Heidelberg
TET, FOS, NEO	1	S. Heidelberg
CFT, AMC, AMP	1	S. Heidelberg
TET, AMC, AMP, CTX	1	S. Minnesota
TET, NEO, AMC, AMP	2	S. Minnesota
AMI, TET, AMC, AMP, CTX	2	S. Heidelberg
TET, AMC, AMP, CLO, ENO	1	S. Heidelberg
TET, CFT, AMC, AMP, CTX	2	S. Heidelberg
TET, NEO, AMC, AMP	1	S. Minnesota
TET, NEO, AMC, AMP, EST	1	S. Minnesota
AMI, TET, CFT, FOS, AMP, ENO	1	S. spp
CFT, AMC, AMP, CTX, CLO, ENO	1	S. Mbandaka
TET, CFT, AMP, CTX, EST, GEN	2	S. Heidelberg
TET, CFT, AMC, AMP, CTX, ENO, EST	1	S. Heidelberg
TET, CFT, AMC, AMP, CTX, EST, GEN	4	S. Heidelberg
AMI, TET, CFT, NEO, AMC, AMP, CTX, EST, GEN	1	S. Heidelberg

A presença do gene *qacE* e o gene *Int1* nas mesmas cepas, apresenta uma correlação estatística significativa ($p=0.0018$). Este fato era esperado, pois o gene *qacE* está normalmente presente no integron de classe 1.

Tabela 06. Resultado da pesquisa de genes de resistência em *Salmonella* spp. São Paulo, 2023

Sorovar	Quantidade	Prevalência	Número de sorovares com o gene			
			<i>sugE</i>	<i>qacE</i>	<i>frmA</i>	<i>Int1</i>
<i>S. Heidelberg</i>	20	56%	0	9	5	11
<i>S. Minnesota</i>	10	28%	0	2	1	0
<i>S. spp</i>	5	13%	0	1	0	0
<i>S. Mbandaka</i>	1	3%	0	0	0	0
Total	36		0	12	6	11
			0%	33%	17%	31%

Para a análise estatística da correlação de presença dos genes de resistência e resistência aos antimicrobianos foi selecionado o grupo de cepas resistentes à 4 ou mais classes terapêuticas, neste trabalho, resistente a pelo menos 6 antimicrobianos, representando 27,7% das amostras. Os dados da tabela 07, apresentam o nível de significância estatística da presença dos genes de resistência neste grupo de cepas.

Tabela 07. Significância estatística.

Gene	Significância
<i>qacE</i>	$p=0.0018$
<i>Int1</i>	$p=0.0076$
<i>frmA</i>	$p=0.9999$

6. Discussão

O problema gerado pelo surgimento de cepas resistentes a diversos compostos tem se tornado uma preocupação global. A busca pela conscientização do uso racional dos compostos antibacterianos, bem como a pesquisa e o desenvolvimento de novas moléculas, têm sido ferramentas para a contenção deste problema (WHO, 2001). A adoção de políticas de redução do uso de antimicrobianos, lançado pela aliança OMS, OIE e FAO (2015) estimulou países como o Brasil a proibirem o uso de alguns compostos melhoradores de desempenho, como aditivos alimentares zootécnicos (BRASIL, 2018).

Estudos recentes, avaliaram a presença de genes de resistência a compostos de amônia quaternária em cepas de *Escherichia coli*, evidenciando a grande circulação destes genes entre subpopulações deste gênero (BARBOSA, 2020),

trazendo à luz, a importância da pesquisa destes marcadores genéticos no estudo das dinâmicas populacionais relacionados à resistência bacteriana.

A pesquisa da presença de genes reguladores da resposta oxidativa ao formol, também tem sido utilizada com esta finalidade, pois a capacidade das bactérias adquirirem resistência a este composto aumenta a preocupação com a evolução das populações bacterianas multirresistentes (HERRING, BLATTNER, 2004).

No presente estudo, observamos uma prevalência de 56% das amostras do sorovar *S. Heidelberg*, seguido respectivamente por *S. Minnesota* 28%, *S. spp* 13% e *S. Mbandaka* 3%. Alikhan, *et. al.* (2022), apontam também a *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* como as mais prevalentes no seu estudo, sugerindo que a adoção de determinadas práticas para o controle de *Salmonella* afetam diretamente na dinâmica populacional dos sorovares encontrados, especialmente por estes sorovares demonstrarem em comum, resistência aos compostos betalactâmicos, sulfametoxazol e oxitetraciclina.

Os dados deste estudo revelaram um elevado percentual (69,44%) de cepas multirresistentes, além de uma ampla resistência aos betalactâmicos. Dentre as cepas analisadas, 27,7% (10/36) foram resistentes a 6 ou mais antimicrobianos. Pandini (2014) analisou 39 cepas isoladas de aves e relatou que 51,3% das amostras eram resistentes a um ou mais antimicrobianos, destacando a resistência a até 6 antimicrobianos. Os dados encontrados no presente estudo apontam resistência em 94,4% dos isolados, e para até 9 antimicrobianos.

A frequência de resistência a determinados compostos antimicrobianos, também denota uma piora na comparação com dados anteriores. Observamos neste estudo, uma elevada frequência de cepas resistentes à tetraciclina (83%), ampicilina (72%), amoxicilina (64%), e uma menor frequência de cepas resistentes à fosfomicina (6%) e cloranfenicol (6%). Li, *et al.*, (2020) observaram, em cepas de *Salmonella* oriundas de material avícola, uma frequência de cepas resistentes à tetraciclina de 59,4%, ampicilina 53,9% e amoxicilina 52,2%, enquanto Pandini, *et al.*, (2014), observou a frequência de cepas resistentes à tetraciclina de 30,8%, ampicilina 20,5% e cloranfenicol 2,6%. Apesar deste trabalho evidenciar um quadro preocupante em relação ao agente, não se pode tecer uma cronologia da resistência antimicrobiana, sem inferir as variações decorrentes de regionalização e das práticas de antibioticoterapia adotadas em diferentes empresas, bem como as diferenças entre

os sorovares analisados que podem gerar diferenças nos padrões de cepas resistentes.

O gene *Int11* foi detectado em 31% das cepas. A presença deste gene foi considerada estatisticamente significativa no grupo de bactérias resistentes a 6 ou mais antimicrobianos ($p=0.0076$). Este gene representa um importante marcador molecular na aquisição de resistência aos antimicrobianos pois permite a inserção de marcadores de resistência em cassetes gênicos, bem como a mobilização dos genes a partir deste ambiente genético (PARTRIDGE, 2011).

Chen, *et. al.* (2023) citam o Integron de Classe 1 como carreador de gene de resistência a quaternário de amônio e correlaciona a presença desse gene à resistência aos antimicrobianos em cepas de *Salmonella*. Em seu estudo, 45,78% das amostras possuíam integron de classe 1, sendo que a obteve significância estatística ($p<0,05$) correlacionado à presença de *Int11* com elevada resistência antimicrobiana.

O gene *qacE* foi detectado em 33% das cepas, enquanto o gene *sugE* não foi detectado. Munoz (2019) evidenciou a presença do gene *qacE* e *sugE* em cepas de *Salmonella* numa frequência de 41,1% e 29% respectivamente. Em outras enterobactérias, estes genes também foram detectados conforme a tabela 08, demonstrando que há uma elevada frequência da presença destes genes nas populações de enterobactérias, aumentando o risco da troca de material genético entre diferentes gêneros bacterianos.

Tabela 08. Frequência de detecção dos genes *qacE* e *sugE* em bactérias entéricas

Bactéria	Frequência (%)	
	<i>qacE</i>	<i>sugE</i>
<i>K. pneumoniae</i>	58,3	4,1
<i>E. coli</i>	40	93,3
<i>Enterobacter spp.</i>	37,5	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	80	-

Adaptado de Munoz 2019.

O gene *frmA* foi detectado em 17% das amostras, sendo que este não apresentou significância estatística frente às demais análises, em especial à resistência aos antimicrobianos ($p=0.9999$), porém, a presença deste gene pode conferir às bactérias uma vantagem seletiva, possibilitando que sobrevivam à ambientes contendo resíduos de formaldeído (GONZALEZ, *et al.* 2006).

Tendo em vista, que o Brasil se destaca como segundo maior produtor de carne de frango e o maior exportador desta proteína no mundo, denota-se em grande relevância a tomada de ações de grande pertinência para o uso racional de antimicrobianos e desinfetantes. A adoção de técnicas laboratoriais capazes de identificar os fatores de resistência das *Salmonella* devem ser uma ferramenta de amplo uso na indústria a fim de mitigar o risco do surgimento de novos sorovares multirresistentes.

Novos estudos da expressão gênica devem ser estabelecidos para que se evidencie a importância da presença destes genes nas subpopulações bacterianas multirresistentes.

A preocupação com a saúde pública, deve nortear os estudos epidemiológicos mais aprofundados, para que as ferramentas de controle de *Salmonella* sejam utilizadas da forma correta para cada realidade.

7. Conclusões

Este estudo detectou a presença de genes de integron de classe 1, além dos genes que codificam a resistência aos compostos quaternários de amônia e formaldeído em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de aves comerciais. Esses achados reforçam a ideia de que as práticas atuais de uso de medicamentos e desinfetantes possam atuar na seleção destes patógenos. Novos estudos sobre o tema poderão servir de embasamento para que companhias possam estabelecer uma nova ótica no controle de *Salmonella* spp.

8. Referências

ABPA, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. Relatório Anual 2023. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>. Acesso em 20 de julho de 2023.

ABPA, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Biosafety Procedures for Visits to Poultry and Pig Sectors**. 2021

ALIKHAN N.F., MORENO L.Z., CASTELLANOS L.R., CHATTAWAY M.A., MCLAUCHLIN J., LODGE M., et al. **Dynamics of *Salmonella enterica* and antimicrobial resistance in the Brazilian poultry industry and global impacts on public health.** PLoS Genet 18(6): e1010174. 2022

ANTUNES, P., RÉU, C., SOUZA, J. C., PEIXE, L., PESTANA, N. **Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents.** International Journal of Food Microbiology 82 (2003) 97– 103. 2003

BAPTISTA, D., SANTOS, A.F., AQUINO, M.H., ABREU, D.L., RODRIGUES, D.P., NASCIMENTO, E., & PEREIRA, V. **Prevalência e susceptibilidade antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de frangos vivos e carcaças no estado do Rio de Janeiro.** Pesquisa Veterinária Brasileira, n38, 1278-1285. 2018.

BARBOSA, F. B. **Pesquisa de genes de resistência aos compostos de amônia quaternária (QAC) em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de aves comerciais.** 2020.

BAUER, A.W.; KIRBY, E.; SHERRIS, E.M.; TURK, M. **Antibiotic by standardized single disk method.** American Journal of Clinical Pathology, v.45, p.493-496, 1966.

BESANKO, D., DRANOVE, D., SHANLEY, M., SCHAEFER, S. **A Economia da Estratégia.** 5ª Edição. 2012.

BHAGWAT, A. A., TAN, J., SHARMA, A., & KOTHARY, M. H. **Characterization of *qacE* and *qacEΔ1* genes and their role in multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 60(7), 3943-3947. 2016.

BRAGG, R. et al. **Bacterial resistance to quaternary ammonium compounds (QAC) disinfectants.** Advance in Experimental Medicine and Biology, v. 808, p. 1-13, 2014.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 193 de 19 de setembro de 1994**. 1994

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016**. 2016

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa MAPA nº 56, de 4 de dezembro de 2007**. 2007

BRASIL, PNA-BR **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito de Saúde Única**. Disponível em: www.saude.gov.br/svs. 2018

BUSH, K., & JACOBY, G. A. **Updated functional classification of β -lactamases**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969-976. 2010. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Dados disponíveis em <https://www.cdc.gov/foodsafety>. Acesso em 20 de junho de 2022.

CHAPMAN, J. S. **Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance**. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 51, n. 4, p. 271-276, 2003.

CHEN, S., FU, J., ZHAO, K., YANG, S., LI, C., PENTTINEN, P., AO, X., LIU, A., HU, K., LI, J., YANG, Y., LIU, S., BAI, L., ZOU, L., **Class 1 integron carrying qacE Δ 1 gene confers resistance to disinfectant and antibiotics in Salmonella**, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 404, 2023.

CHIRITA, C., & NICHITA, I. **Quaternary ammonium compounds: microbial resistance and application in the food industry**. A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1906-1917. 2019.

CUNHA, M. P. V. **Determinantes Emergentes de Resistência Antimicrobiana em *Escherichia coli* de Origem Clínica, Fecal e de Carne de Aves e Suínos**. 2018.

DIDELLOT, X. E MAIDEN, M. C. **Impact of recombination on bacterial evolution.** Trends in Microbiology, 18(1), 35-43. 2010.

DURMIC, Z., BARROW, P. A., PETHICK, D. W., et al.. **Antimicrobial resistance in Salmonella from food animals and the human food chain.** Frontiers in Microbiology, 12, 606178. 2021.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA EMBRAPA. <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/custos/frangos>. Acesso em 18 de Novembro de 2022.

FACTA. Fundação Apinco de Ciência e Tecnologias Avícolas. **Doenças das Aves, 3ª Edição**, 2020.

FLEMMING, H. C., WINGENDER, J., SZEWZYK, U., STEINBERG, P., RICE, S. A., & KJELLEBERG, S. **Biofilms: an emergent form of bacterial life.** Nature Reviews Microbiology, 14(9), 563-575. 2016.

FORSYTHE, S.J. - **Microbiologia da Segurança Alimentar.** 2. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002. 602 p.

GERBA, C. P. **Quaternary ammonium biocides: efficacy in application.** Applied and Environmental Microbiology, v. 81, n.2, p. 464-469, 2015.

GILLINGS, M. R. **Integrins: past, present, and future.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, 78(2), 257-277. 2014.

GÓMEZ-LÓPEZ, A., RODRÍGUEZ-BAÑO, J., GÁLVEZ, J., et al.. **The role of horizontal gene transfer in the spread of antimicrobial resistance in Salmonella enterica.** Frontiers in Microbiology, 12, 648171. 2021.

GONZALEZ C. F., PROUDFOOT M., BROWN G., KORNIYENKO Y., MORI H., SAVCHENKO A. V., YAKUNIN A. F., **Molecular Basis of Formaldehyde Detoxification: CHARACTERIZATION OF TWO S-FORMYLGLUTATHIONE**

HYDROLASES FROM ESCHERICHIA COLI, FrmB AND YeiG^{*}, Journal of Biological Chemistry, Volume 281, Issue 20, Pages 14514-14522, 2006.

GOVERNO BRASILEIRO. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/laboratorios-credenciados/o-que-sao-laboratorios-credenciados>.

Acesso em 18 de Novembro de 2022.

HANCOCK, R. E., & BELL, A. **Antibiotic uptake into gram-negative bacteria**. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 7(6), 713-720. 1988.

HERRING, C. D.; BLATTNER, F. R. **Global Transcriptional Effects of a Suppressor tRNA and the Inactivation of the Regulator frmR**. Journal of Bacteriology, p.6714-6720, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA INMETRO. <http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/labrble.asp>. Acesso em 18 de Novembro de 2022.

LAGATTA, L., GAMEIRO, A. H., **Estimativa do custo de implantação das medidas de biossegurança preconizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sobre a produção de ovos nos estabelecimentos avícolas comerciais de postura da regional agropecuária de Limeira, Estado de São Paulo**. 2014.

LI, X. Z., NIKAIDO, H., & POOLE, K. **Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in Pseudomonas aeruginosa**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(9), 5687-5693. 2015.

LIU C, XU W, ZHANG H, et al. **Functional analysis of a novel glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002**. Arch Microbiol. 2018.

MAJOWICZ S.E. , MUSTO J. , SCALLAN E. , ANGULO F.J. , KIRK M. , O'BRIEN S.J. , et al. **The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis Clin Infect Dis**, 50 (2010), pp. 882-889. 2010.

MARTELLI K. E. **"Quaternary Ammonium Compounds: Mechanisms of Antimicrobial Action, Applications, and Environmental Fate"**, in Handbook of Green Chemistry and Technology, John Wiley & Sons, Ltd, 2012.

MAZEL, D. **Integrins: agents of bacterial evolution**. Nature Reviews Microbiology, 4(8), 608-620. 2006

MUÑOZ, M. E. E. **Resistência aos compostos de amônio quaternário (QACs) de uso doméstico e hospitalar em patógenos prioritários multirresistentes**, 2019.

OECD, **Policy guidance on market practices to strengthen ESG investing and finance a climate transition**, OECD Business and Finance Policy Papers, OECD Publishing, Paris. 2022.

PARTRIDGE SR. **Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria**. FEMS Microbiol. 2011.

PANDINI, J. A., PINTO, F. G. S., MULLER, J. M., WEBER, L. D., MOURA, A. C., **Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de Salmonella spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.XX, n.X, p. 1-6. 2014.

PERIN, A.P. **Ocorrência e quantificação de Salmonella spp. em cortes de frango congelados: levantamento epidemiológico no estado do Paraná e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos**. 2017. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2017.

PORTAL G1.COM. <https://g1.globo.com/pr/parana/noticia/carne-fracas-4-fabricas-da-brf-fraudavam-laudos-de-salmonela-para-exportacao.ghtml> Acesso em 07 de Julho de 2022.

PORTAL UOL ECONOMIA. <https://economia.uol.com.br/noticias/redacao/2018/03/05> Acesso em 07 de Julho de 2022.

RASKO, D. A., WEBSTER, D. R., STINE, O. C., et al.. **The pangenome structure of Escherichia coli: comparative genomic analysis of E. coli commensal and pathogenic isolates.** Journal of Bacteriology, 190(5), 14-26. 2008.

RYAN, M.P, O'DWYER, J.; ADLEY, C.C. **Evaluation of the complex nomenclature of the clinically and veterinary significant pathogen Salmonella.** Biomed. Res. Int. e:378218, Epub 2017 Apr 30, 2017.

SAN MILLAN, A., TOLL-RIERA, M., QI, Q., MACLEAN, R. C. **Interactions between horizontally acquired genes create a fitness cost in Pseudomonas aeruginosa.** Nature Communications, 6(1), 1-8. 2015.

SHTYRLIN, N.V.; SAPOZHNIKOV, S.V.; GALIULLINA, A.S.; KAYUMOV, A.R.; BONDAR, O.V.; MIRCHINK, E.P.; ISAKOVA, E.B.; FIRSOV, A.A.; BALAKIN, K.V.; SHTYRLIN, Y.G. **Synthesis and Antibacterial Activity of Quaternary Ammonium 4-Deoxy pyridoxine Derivatives.** Biomed Res. Int. 2016

U&S FOOD AND DRUG. Dados disponíveis em <https://www.fda.gov/animal-veterinary/national-antimicrobial-resistance-monitoring-system/>. Acesso em 20 de junho de 2022.

UNITED NATIONS. www.un.org/en/un75/shifting-demographics. Acesso em 20 de junho de 2022.

VRIENS, A. R. E. **"Quaternary Ammonium Compounds: Chemical Properties, Toxicology, and Biocidal Activity"**, in Handbook of Antimicrobial Resistance, John Wiley & Sons, Inc., 2013.

WANG, R., BRAUGHTON, K. R., KRETSCHMER, D., BACH, T. H., QUECK, S. Y., LI, M., OTTO, M. **Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA.** Nature Medicine, 20(7), 724-731. 2016.

WATANABE, M. WATANABE, K. TAKEDA, K. **Cloning and Expression of the Gene for Glutathione-Dependent Formaldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas putida* F61.** J Bacteriol. 1991

WELDHAGEN, G. F. **Integrins and β -lactamases - a novel perspective on resistance.** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 23, p. 556–562. 2004.

White-Kauffmann and Le Minor Scheme in: PATRICK A.D. GRIMONT & FRANÇOIS-XAVIER Weill. Antigenic Formulae of the Salmonella Sorovars. 9th edition, 2007.

WHO. **Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance.** 2001.

WIRTH, T., ROSNER, B. M., ACOSTA-SERRANO, A., et al.. **The evolution of pathogenicity in *Salmonella* - a matter of selective sweeps?** PLoS Pathogens, 2(9), e79. 2006.

WRIGHT, G. D. **Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification.** Nature Reviews Microbiology, 3(3), 155-164. 2005.

ZHANG, X. ZHU, Y. CHEN, Y. **Molecular mechanisms of formaldehyde detoxification in *Escherichia coli*.** Applied Microbiology and Biotechnology, 103(4). 2019