

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**COMPARAÇÃO TEMPORAL DO PERFIL DE RESISTÊNCIA *IN VITRO* AOS
ANTIMICROBIANOS EM ISOLADOS DE *Salmonella* spp. DE CARNE DE
FRANGO ENTRE 2004 – 2020**

EVELYN FERNANDA FLORES CARON

BOTUCATU

2021

EVELYN FERNANDA FLORES CARON

**COMPARAÇÃO TEMPORAL DO PERFIL DE RESISTÊNCIA *IN VITRO* AOS
ANTIMICROBIANOS EM ISOLADOS DE *Salmonella* spp. DE CARNE DE
FRANGO ENTRE 2004 – 2020**

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira
Coorientador: Prof. Dr. Fábio Sossai Possebon

BOTUCATU

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Caron, Evelyn Fernanda Flores.

Comparação temporal do perfil de resistência *in vitro* aos antimicrobianos em isolados de *Salmonella spp.* de carne de frango entre 2004 - 2020 / Evelyn Fernanda Flores Caron. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Juliano Gonçalves Pereira

Coorientador: Fábio Sossai Possebon

Capes: 50505009

1. Salmonelose em frango de corte. 2. Antimicrobianos. 3. Noxas. 4. Alimentos. 5. Salmonela. 5. Anti-Infecciosos.

Palavras-chave: Alimentos; Multirresistência; Patógenos; Saúde pública.

Nome do autor: Evelyn Fernanda Flores Caron

Título: COMPARAÇÃO TEMPORAL DO PERFIL DE RESISTÊNCIA *IN VITRO* AOS
ANTIMICROBIANOS EM ISOLADOS DE *Salmonella* spp. DE CARNE DE FRANGO
ENTRE 2004 – 2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira

Presidente e orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ/UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ/UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Marcus Vinicius Coutinho Cossi

Membro

Universidade Federal de Uberlândia

FAMEV/UFU – Uberlândia MG

Data da defesa: 5 de maio de 2021.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais José Alberto e Lilian, por todo amor genuíno, por todas as oportunidades de estudo oferecidas, obrigado pela casa que me acolhe, pela coberta que me aquece, pela comida farta na mesa, por sempre acreditarem no sucesso de um filho e investirem para que ocorra. Também agradeço em especial meus irmãos Rafael e Fábio, por todo apoio direto e indireto, o amor de irmão transforma, cura e protege.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da FMVZ-UNESP – Botucatu por ter dado a oportunidade de realizar o mestrado, aos professores do programa, ao laboratório do Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP) e a todos os setores envolvidos em alguma etapa desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço o meu orientador Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira, por ter me aceitado como sua orientada, pela confiança atribuída, pelo conhecimento transmitido, pela oportunidade de estar onde me sinto acolhida e por todo apoio e esforço para a realização deste trabalho.

Agradeço o meu coorientador Fábio Sossai Possebon, pela oferta de tempo e paciência para contribuir com o aprendizado em biologia molecular.

Agradeço aos membros da banca examinadora que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta defesa.

Agradeço meus amigos por todo apoio, por todos os momentos de estudo, descontração e risos. Em especial minhas amigas Aryele Sampaio, Hornblenda Bello,

61 Isabella Feltrin, Maria Gabriela Picellia e Thaisy Dellaqua, a individualidade de cada
62 uma me encanta e me completa, agradeço por Deus sempre colocar pessoas de luz
63 como vocês no meu caminho. Em especial também, meu amigo Vinicius Rodrigues,
64 obrigado por sempre me escutar e aconselhar.

65 Por fim, agradeço carinhosamente todos aqueles que contribuíram para a
66 realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIACÕES

67

68

69 ABC – *Adenosine Triphosphate Binding Cassete*

70 CAZ – Ceftazidima

71 CFO – Cefoxitina

72 CIP – Ciprofloxacina

73 CLO – Cloranfenicol

74 CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

75 DNA – Ácido Desoxirribonucleico

76 ESBL – *Extended Spectrum Beta-Lactamases*

77 EST – Estreptomicina

78 ETP – Ertapenem

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

80 GEN – Gentamicina

81 GLASS – *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System*

82 IPM – Imipenem

83 MATE – *Multidrug and Toxic Efflux*

84 MDR – Multidroga resistente

85 MER – Meropenem

86 MFS – *Major Facilitator Family*

87 NOR – Norfloxacin

88 OIE – World Organisation for Animal Health

89 RND – *Resistance Nodulation Division Family*

90 SMR – Small Multidrug Resistance

91 SUT – Trimetropim/Sulfametoxazol

- 92 TET – Tetraciclina
- 93 TSDD – Teste de Sinergismo de Disco Duplo
- 94 WHO – World Health Organization

LISTA DE TABELAS

95

96

97 **TABELA 1** Frequência de isolados antigos e novos de *Salmonella* spp. obtidos de
98 carne de frango com resistencia a diferentes antimicrobianos.....27

99

100 **TABELA 2** Perfil fenotípico de resistência e multidroga resistência (MDR) de
101 isolados novos de *Salmonella* spp. obtidas de carne de frango.30

102

103 **TABELA 3** Perfil fenotípico de resistência dos isolados confirmados para ESBL
104 através do teste de sinergismo de disco duplo.31

105

LISTAS DE FIGURAS

106

107 **FIGURA 1** Dendrograma obtido da comparação do perfil de resistência de isolados
108 antigos e novos de *Salmonella* spp. de carne de frango.....34

SUMÁRIO

109		
110		
111	RESUMO	1
112	ABSTRACT	2
113	1 INTRODUÇÃO	3
114	2 REVISÃO DE LITERATURA	5
115	2.1 <i>Salmonella</i> spp.	5
116	2.2 Mecanismo de patogenicidade de <i>Salmonella</i> spp.	6
117	2.3 Salmonelose	8
118	2.3.1 Importância dos manipuladores de alimentos	9
119	2.4 Alimentos relacionados em casos de salmonelose	10
120	2.5 Uso de antibióticos na cadeia produtiva da carne de frango	11
121	2.6 Resistência aos antimicrobianos	14
122	2.7 Tipos de resistência	16
123	2.8 Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos	17
124	2.9 β -lactamases de espectro estendido (ESBL)	18
125	3 OBJETIVOS	20
126	4 MATERIAL E MÉTODOS	21
127	4.1 Origem dos isolados	21
128	4.2 Confirmação molecular de <i>Salmonella</i> spp.	22
129	4.3 Critérios de seleção dos antimicrobianos	23
130	4.4 Perfil de resistência pelo método de disco-difusão	24
131	4.5 Tratamento dos dados	24
132	4.6 Método fenotípico de confirmação de ESBL	24
133	5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
134	7 CONCLUSÃO	39
135	8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

136 **9 TRABALHO CIENTÍFICO**47

CARON, E. F. F. **Comparação temporal do perfil de resistência *in vitro* aos antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. de carne de frango entre 2004 – 2020**. Botucatu, 2021. 75p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, *Campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

RESUMO

Salmonella spp. é um dos principais agentes causadores de doenças de origem alimentar no Brasil e no mundo e seu controle é um desafio para a saúde pública. Devido à alta capacidade de transmissão, a presença deste patógeno em animais criados para fins industriais causa grandes perdas econômicas, principalmente no comércio de carne de aves; além de ser prejudicial à saúde humana. Antimicrobianos são ferramentas amplamente utilizadas na tentativa de amenizar os riscos de aparecimento e disseminação de doenças no ambiente de produção, além de, na produção avícola, serem utilizados como promotores de crescimento. Entretanto, o uso prolongado e de maneira indiscriminada pode proporcionar o aparecimento de cepas bacterianas resistentes. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* o perfil de resistência aos antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. de carcaças e cortes de frango nos anos de 2004, 2005 e 2006 “antigos” (n= 63) e 2019 e 2020 “atuais” (n=24) pertencentes a bacterioteca do Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP – UNESP, Botucatu - SP). Previamente ao estudo de perfil de resistência, os isolados foram submetidos à confirmação molecular por meio da PCR em tempo real para detecção do gene *invA*. Posteriormente, os isolados foram submetidos ao teste de perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão. Dos 63 isolados antigos, nenhuma apresentou resistência aos antibióticos testados. Dos isolados novos, 22 (91,66 %) apresentaram resistência a ao menos um antimicrobiano testado e 18 destes foram considerados multidroga resistente. O perfil fenotípico de resistência mais prevalente foi ceftazidima-cefoxitina-ampicilina-tetraciclina 72,72% (16/22), seguido por tetraciclina 18,18% (4/22), ceftazidima-cefoxitina-ampicilina 4,54% (1/22) e ceftazidima-cefoxitina-ampicilina-cloranfenicol-tetraciclina 4,54% (1/22). Dos 18 isolados multidroga resistente, 83,33 % (15/18) foram positivas para ESBL. O dendrograma obtido da comparação do perfil de resistência de isolados antigos e novos, resultou em três grandes clusters, com destaque para o primeiro formado por isolados novos e multirresistentes com similaridade de 80 – 82%. A alta taxa de resistência em isolados novos demonstra que a resistência aos antimicrobianos é crescente com o passar dos anos, sendo assim, é necessário desenvolver ações para monitorar a resistência a antimicrobianos relacionados à carne de frango.

Palavras chave: alimentos; multirresistência; patógenos; saúde pública.

CARON, E. F. F. **Temporal comparison of the in vitro resistance profile to antimicrobials in isolates of *Salmonella* spp. of chicken meat in the 2004 and 2020.** Botucatu, 2021. 75p. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, *Campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

ABSTRACT

Salmonella spp. it is one at the main agent of foodborne diseases worldwide and its control is a challenge for public health. Due to the high transmission ability, the presence of this pathogen in animals bred for industrial purposes causes great economic losses, mainly in the poultry meat trade; in addition to being harmful to human health. Antimicrobials are tools widely used in an attempt to mitigate the risks of the appearance and spread of diseases in the production environment, in addition to, in poultry production, being used as growth promoters. However, prolonged and indiscriminate use can lead to the emergence of resistant bacterial strains. Thus, the aim of this study was to evaluate in vitro the profile of resistance to antimicrobials in isolates of *Salmonella* spp. of carcasses and cuts of chicken in the years of 2004, 2005 and 2006 “old” (n = 63) and 2019 and 2020 “new” (n = 24). Previously to the resistance profile study, the isolates were subjected to molecular confirmation by real-time PCR to detect the *invA* gene. Subsequently, the isolates were subjected to the susceptibility profile test to antimicrobials by the diffusion disk method. Of the 63 old isolates, none showed resistance to the tested antibiotics. Of the new strains, 22 (91,66 %) showed resistance to at least one tested antimicrobial and 18 of these were considered multidrug resistant. The most prevalent phenotypic resistance profile was ceftazidime-cefoxitin-ampicillin-tetracycline 72.72% (16/22), followed by tetracycline 18.18% (4/22), ceftazidime-cefoxitin-ampicillin 4.54% (1/22) and ceftazidime-cefoxitin-ampicillin-chloramphenicol-tetracycline 4.54 % (1/22). Of the 18 multidrug resistant isolates, 83.33% (15/18) were positive for ESBL. From the dendrogram obtained from the comparison of the resistance profile of old and new isolates, it resulted in three large clusters, with emphasis on the first formed by new and multiresistant isolates with similarity of 80 – 82%. The high rate of resistance in new isolates demonstrates that resistance to antimicrobials is increasing over the years, therefore, it is necessary to develop actions to monitor resistance to antimicrobials related to chicken meat.

Keywords: foods, pathogens, public health, multiresistance.

1 INTRODUÇÃO

Salmonella spp. é um importante patógeno, agente etiológico da salmonelose, doença zoonótica e que pode ser transmitida diretamente entre animais e seres humanos sendo difundida no mundo todo. É um dos principais micro-organismos envolvidos em casos de Doenças de Origem Alimentar, causando sérias implicações para a saúde pública. *Salmonella* spp. pode ser isolada em animais domésticos como cães e gatos, mas é normalmente encontrada no ambiente de produção, uma vez que animais como aves, suínos e bovinos são portadores em seu trato gastrointestinal (MENDONÇA, 2016; SILVA et al., 2016).

A preocupação do consumidor em adquirir produtos inócuos é cada vez maior, assim como para o fornecedor e fabricante a oferta de produtos que não causem danos à saúde. Os alimentos mais frequentemente associados a casos de salmonelose são ovos e carnes de aves (MENDONÇA, 2016; SILVA et al., 2016).

Em 2019, o Brasil produziu 13.245 milhões de toneladas de carne de frango e ocupa o 1º lugar no ranking de exportações neste setor, demonstrando que a produção desta *commodity* é uma das atividades mais expressivas do agronegócio do país (ABPA, 2019). O uso de antibióticos na produção animal, além de promover uma melhor conversão alimentar e, conseqüentemente, melhoria no ganho de peso dos animais, evita o risco de aparecimento e disseminação de doenças, já que um único animal doente no plantel pode levar a problemas como mortalidade e diminuição da rentabilidade acarretando conseqüências graves para a produção (ALBUQUERQUE, 2005).

Contudo, o uso prolongado e em baixas doses de antibióticos como promotores de crescimento em animais também origina preocupações, já que proporcionam o

ambiente ideal para o aparecimento de cepas bacterianas resistentes. A resistência aos antibióticos representa um grande desafio para a saúde humana, e a presença de patógenos resistentes na cadeia de produção de alimentos é considerada alarmante (OMS, 2014; VAN BOECKEL et al., 2015).

Considerando o exposto, o presente trabalho, teve como objetivo avaliar e comparar o perfil de resistência aos antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. obtidos de carcaças e cortes de frango com aproximadamente 15 anos de intervalo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Apresenta-se na forma de bastonete Gram negativo, não esporogênico, anaeróbio facultativo; e com temperatura de multiplicação que varia entre 5 e 46°C, com ótima entre 35-43°C (SILVA et al, 2017). A taxonomia do gênero *Salmonella* é baseada na composição de seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) (FRANCO, LANDGRAF, 2002).

O gênero ao qual pertence este patógeno é dividido em duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*, sendo *S. enterica* subdividida em seis subespécies: *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*, *salamae* e *entérica*, são conhecidos mais de 2.500 sorovares, porém os de importância na saúde pública pertencem à *S. enterica* sub. *enterica*. Ressalta-se que a maioria dos sorotipos de *Salmonella* spp. são patogênicos aos humanos apresentando diferenças de sintomatologia em virtude da variação no mecanismo de patogenicidade, além da idade e da resposta imune do hospedeiro (GERMANO, 2003). Os sorotipos mais importantes na transmissão desta enfermidade de animais para humanos são *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (SILVA et al., 2017).

O principal habitat de *Salmonella* spp. é o trato intestinal de humanos e animais. No ambiente, as principais fontes de contaminação são água, solo, fezes de animais, insetos e superfícies de equipamentos e utensílios de fábricas e cozinhas (SILVA et al., 2017).

A infecção de animais e humanos, comumente, ocorre pela via oral, por ingestão de alimentos e água contaminados por fezes, que representam as principais vias de transmissão do patógeno. Utensílios de uso comum por animais (comedouros e bebedouros) e fômites também podem servir como fonte de infecção nos criatórios (MEGID et al. 2016).

Com dezenas de milhões de casos por ano em todo o mundo e no Brasil, *Salmonella* spp. é um dos principais agentes causadores de doenças de origem alimentar, sendo um dos principais patógenos responsáveis por infecções em muitos países, e um importante contaminante de alimentos, sobretudo os de origem animal (LACONHA et al., 2000; LOPALCO et al., 2000; WHO, 2013).

Classificada como a zoonose mais difundida do mundo, o controle da salmonelose representa um desafio para a saúde pública. Considerando que a principal via de transmissão de *Salmonella* spp. está na cadeia de produção de alimentos pela sua presença em animais criados com objetivo comercial, esse micro-organismo é o mais incidente e relevante agente etiológico de infecções entéricas, ocasionando perdas de milhões de dólares para a indústria, particularmente de aves, bovinos e suínos (BRASIL, 2011).

2.2 Mecanismo de patogenicidade de *Salmonella* spp.

A invasão do hospedeiro e proliferação intracelular está diretamente ligada aos genes localizados nas ilhas de patogenicidade – SPI (*Salmonella* Patogenicity Island), que são um tipo particular de ilhas genômicas encontradas nas salmonelas e carregam um ou mais genes de virulência. Atuam como fatores de virulência 17 ilhas de

patogenicidade, porém as mais estudadas e elucidadas são a SPI-1 e SPI-2 (FORTES et al., 2012).

Salmonella spp. tem como mecanismo de patogenicidade a adesão ao intestino delgado pelas fímbrias nos enterócitos. Por meio do sistema de secreção do tipo 3, injetam seus fatores de virulência (proteínas efetoras) que interagem com o metabolismo da célula parasitada. A ilha de patogenicidade do tipo 1 é responsável pela codificação dos elementos utilizados para a invasão. Após a injeção de proteínas efetoras, ocorre a reorganização do citoesqueleto da célula do hospedeiro, que promove a entrada de *Salmonella* spp., que inicialmente, permanece em um vacúolo fagocitário. Após a internalização, o patógeno expressa novo sistema de secreção do tipo 3 para produção de enzimas que possibilitam o rompimento e escape do vacúolo para o interior do citoplasma (DIEYE et al., 2009).

Na ilha de patogenicidade tipo 2, estão localizados a maioria dos genes para sobrevivência nos fagócitos, fazendo a indução da injeção de proteínas efetoras. A replicação ocorre no interior das células, liberando proteínas no citosol e assim a bactéria é liberada na lâmina própria o que leva a inflamação. As células bacterinas são apresentadas ao sistema de defesa e, ao infectar células M e células dendríticas (células de defesa no intestino), o patógeno é capaz de ganhar a via sistêmica, o que justifica, além da inflamação, o sinal clínico de hipertermia. A resposta inflamatória levará a diarreia pela invasão do epitélio, inflamação e infiltração de neutrófilos e liberação de prostaglandinas, aumento da atividade de adenilato ciclase intensificando a troca de fluidos, resultando na secreção de fluidos ocorrendo à diarreia. Esse processo inflamatório e lesão celular levam a dores abdominais relatadas pelos indivíduos acometidos. A enterotoxina termolábil é responsável pelo aumento da atividade da adenilato cilase que levam a diarreia e a citotoxina termolábil tem a

capacidade de lise da célula do hospedeiro, o que também contribuem para a diarreia (HENSEL, 2004).

Todo esse processo de infecção das células leva um tempo para que as células bacterianas possam se multiplicar, determinando o período de incubação é relativamente longo, podendo chegar a 72 horas (HENSEL, 2004).

Evidências apontam que as ilhas genômicas são importantes na evolução destas bactérias, influenciando traços como simbiose, resistência aos antibióticos e adaptação em geral (FORTES et al., 2012).

2.3 Salmonelose

Após a ingestão de alimentos contaminados com quantidades expressivas do patógeno, ocorre a colonização da bactéria no trato intestinal. As bactérias penetram na barreira epitelial, infectam fagócitos dentro da lâmina própria, o que produz uma resposta inflamatória com liberação de prostaglandinas e estimuladores e adenilciclase. Esse processo ocasiona aumento de secreção de água e eletrólitos, estabelecendo os quadros entéricos, que são caracterizados por um período de incubação de 8 a 48 horas posteriormente a ingestão do alimento contaminado (CARVALHO et al., 2016).

As manifestações clínicas, que usualmente são vômito, náuseas, diarreia, cefaleia e calafrios, podem persistir por 1 a 2 dias, e comumente a recuperação ocorre após 3 dias do início da infecção, podendo ser variável conforme as condições do hospedeiro e a dose infectante ingerida (BAÚ et al., 2009).

Na febre tifoide ou entérica, ocasionadas por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Paratyphi, é preconizado o tratamento com antibióticos, uma vez que a

taxa de mortalidade com esta adoção do uso foi reduzida de 15 % para menos de 1 %. Nas gastroenterites ocasionadas pelas demais salmonelas, a infecção se mantém restrita a mucosa intestinal e com quadro autolimitante e dificilmente observa-se infecção sistêmica ou septicemia, o que faz com que o uso de antibióticos seja dispensável, principalmente pela ameaça do surgimento de cepas multirresistentes (BRASIL, 2011; SHINOHARA et al., 2008).

Nos Estados Unidos da América, *Salmonella* não tifoide é responsável a cada ano por números alarmantes, cerca de 1,35 milhões de infecções, 26.500 hospitalizações e 420 óbitos, estimada em 400 milhões de dólares com custos médicos. Embora não seja aconselhável a administração de antibióticos em casos de salmonelose, em casos de infecções graves são preconizados o ciprofloxacino, azitromicina e ceftriaxona. As infecções resistentes são ainda mais graves e podem resultar em maiores taxas de hospitalizados, mortes e custos hospitalares (CDC, 2019).

2.3.1 Importância dos manipuladores de alimentos

Com a finalidade de evitar que manipuladores de alimentos sejam associados a surtos de doenças de origem alimentar, uma vez que estes podem ser portadores assintomáticos de patógenos como bactérias, vírus e parasitas, é de extrema importância garantir que todos aqueles candidatos ao emprego na indústria de alimentos, que terão contato direto ou indireto com alimentos, sejam submetidos a exames médicos, análise de histórico médico em relação a doenças de pele. Ainda secreções dos olhos, nariz, orelhas, feridas e infecções intestinais, bem como exames de fezes podem identificar portadores de patógenos intestinais, como *Salmonella* spp.

Assim, como todos aqueles já empregados devem ser submetidos a exames e questionários regulares e, casos apresentarem sinais ou sintomas de infecção intestinal, devem ser vedados de trabalhar em áreas de alto risco de processamento de alimentos. Além do treinamento de limpeza e desinfecção de equipamentos e superfícies de contato, manipuladores de alimentos devem ser treinados com princípios básicos de higiene pessoal e de alimentos, o que deve incluir conceitos básicos da natureza dos patógenos, sua multiplicação e disseminação em determinadas condições. Programas de treinamento de higiene, podem aumentar a produtividade e reduzem queixas de clientes, consequentemente perdas econômicas para a indústria (FORSYTHE, 2013).

2.4 Alimentos relacionados em casos de salmonelose

Os alimentos de origem animal, como carne bovina, suína, aves, ovos, mariscos, leite e produtos agrícolas não processados como hortaliças e frutas são frequentemente veiculadores em surtos de salmonelose (SHINOHARA et al., 2008; BRASIL, 2011). A contaminação de origem fecal ocorre nos produtos agrícolas através da exposição à água contaminada, em leite e ovos, que pode ocorrer por meio da exposição direta e em carnes durante as operações de abate. A carne de frango apresenta papel fundamental na epidemiologia da salmonelose humana, estando presente na carne de frango de forma crítica, tonando-se problema na determinação de quadros de infecção alimentar (CARVALHO; CORTEZ, 2005).

A contaminação das carcaças durante os procedimentos de abate e sua contaminação cruzada, resulta em grande desafio para diminuir os riscos para o consumidor final, uma vez que o consumo da carne de frango é apontado como um

importante fator de risco para a ocorrência da doença em humanos (VOSS-RECH et al., 2015; THE EUROPEAN, 2017).

Os alimentos são os principais veículos de transmissão de *Salmonella* spp. para os humanos, e o uso de antimicrobianos em animais de produção pode resultar em cepas resistentes. Medidas como evitar o uso impróprio e realizar o rastreamento do uso de antimicrobianos em animais de produção; aperfeiçoamento da produção e processamento de alimentos; educar trabalhadores da indústria alimentícia e consumidores sobre a correta manipulação dos alimentos; são ações que podem diminuir e impedir a disseminação de *Salmonella* spp. (CDC, 2013).

2.5 Uso de antibióticos na cadeia produtiva da carne de frango

Atualmente, o Brasil ocupa o 3º lugar no ranking mundial de produção de carne de frango, e o 1º em exportações, com 4,2 milhões de toneladas de carne de frango/ano. Em 2019, a produção de carne de frango no país foi de 13.245 milhões de toneladas, sendo 32 % da produção destinada à exportação e 68 % para o mercado interno, com o consumo da carne da ordem de 42,84 kg/habitante. Dados como estes, demonstram como é necessário atender as exigências do mercado consumidor no requisito de qualidade e segurança dos alimentos e sanidade avícola (ABPA, 2019).

Uma ferramenta de grande importância na cadeia produtiva de aves, é o uso de aditivos na dieta dos animais, o que inclui os antimicrobianos. Estes são empregados para obter melhores taxas de sobrevivência, crescimento, reduzir cargas patogênicas, melhorar a saúde do trato gastrointestinal e, conseqüentemente, a eficiência alimentar. Há mais de 50 anos, os antimicrobianos têm sido utilizados para

aumentar a produtividade e manter a saúde dos animais (BISCHOFF et al, 2004; SILVA, 2011).

Os expressivos números da produção e exportação de carne de frango brasileira demonstram a demanda e a importância da produção animal para o agronegócio brasileiro. O Brasil ocupa o 3º lugar no uso de antimicrobianos na produção animal e a produção de aves utiliza, em média, 148 mg/kg de peso vivo. Nesta média estão incluídos o uso terapêutico e como promotores de crescimento. A utilização de antibióticos na produção animal pode favorecer o surgimento de bactérias resistentes, levando a novas restrições ao uso destas substâncias, o que poderia levar a queda na produção (MEDEIROS, 2018).

Os antibióticos comumente utilizados em tratamento de animais e humanos representam preocupação em saúde pública, como o surgimento e persistência de cepas resistentes e, conseqüentemente, a resistência aos antibióticos dentro da produção de alimentos (GEBREYES et al., 2017). A presença de cepas multirresistentes têm sido identificadas produtos de origem animal. Fazendas de produção ou ambientes veterinários podem ter ocasionado o surgimento destas cepas através da utilização de antibióticos na alimentação dos animais e há a possibilidade de cuidadores de animais, fazendeiros e manipuladores de alimentos serem prováveis fontes de contaminação (DOYLE, 2015). Grande número de amostras de frango positivas para patógenos alimentares, demonstraram uma alta prevalência de isolados multirresistentes a antibióticos. Tal informação reforça a necessidade de maiores cuidados na produção, transporte e armazenamento dos produtos de origem animal, mas também evidencia a preocupação com a disseminação de bactérias resistentes na cadeia produtiva de alimentos (SILVA et al., 2018).

A resistência aos antibióticos é vista como um dos maiores desafios de saúde pública da atualidade e tem importante impacto na saúde humana e animal, sendo de grande necessidade a preservação de antibióticos classificados com importância crítica na medicina humana. Em 2020, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), seguindo recomendações da WHO (*World Health Organization* – Organização Mundial da Saúde), OIE (*World Organization for Animal Health* – Organização Mundial da Saúde Animal) e FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura), publicou a Instrução Normativa n. 1, que determinou a proibição em todo território nacional, da adição na ração animal dos antimicrobianos tilosina, lincomicina e tiamulina, como melhoradores de desempenho, pois são considerados de grande relevância na medicina humana (MAPA, 2020).

Inquestionavelmente, a resistência bacteriana é um significativo desafio para a saúde humana (YAP et al., 2014). Em 2019, a Organização Mundial da Saúde divulgou um relatório alertando que gerações futuras enfrentarão impactos desastrosos com a resistência aos antimicrobianos.

Estimativas apontam que as enfermidades ocasionadas por bactérias resistentes aos medicamentos poderão ocasionar até 10 milhões de mortes até 2050, acarretando danos à economia equivalentes a crise financeira mundial de 2008-2009 e levar até 24 milhões de pessoas à pobreza extrema. O relatório ainda confirma que a saúde humana, animal, alimentar e ambiental estão profundamente relacionadas, apelando assim aos países para uma abordagem coordenada e multissetorial de “Saúde Única”. Entre as recomendações estão o maior investimento em pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias para combater a resistência aos antibióticos, preconizar o uso responsável nas áreas de saúde humana, animal e vegetal, e banir

obrigatoriamente o uso de antimicrobianos de relevância crítica para humanos, como promotores de crescimento na pecuária. Será necessário comprometimento e coordenação para enfrentar este desafio à saúde pública, saúde e bem-estar animal e inocuidade alimentar para garantir a eficácia e acesso futuro aos medicamentos essenciais (WHO, 2019).

No Brasil, o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Agropecuária (PAN-BR AGRO), visa o desenvolvimento de um sistema de vigilância e monitoramento da resistência aos antimicrobianos no âmbito da agropecuária, neste sentido, o MAPA elaborou o Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária, que tem como objetivos avaliar riscos, tendências e padrões na ocorrência e disseminação da resistência aos antimicrobianos por meio de alimentos de origem animal produzidos no Brasil, e as informações geradas pelo programa irão ajudar na tomada de decisões, no estabelecimento de políticas públicas e na alocação de recursos apropriados nas ações de prevenção e contenção da resistência antimicrobiana na cadeia de produção de alimentos (MAPA, 2018).

2.6 Resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos ocorre quando micro-organismos, uma vez expostos a drogas, mutam ou adquirem genes de resistência como uma maneira de manter-se para perpetuação frente à pressão seletiva provocada pelo uso dos antibióticos. Micro-organismos resistentes são facilmente disseminados, uma vez que são encontrados em pessoas, animais, alimentos e meio ambiente (água, solo e ar) (FERREIRA & TERRA JÚNIOR, 2018).

Diferentes antibióticos utilizados na produção animal não são totalmente metabolizados no organismo, sendo excretados nas fezes e urina parcialmente metabolizados ou na forma do composto original. Excretas animal, utilizadas como fertilizante para o solo, conseqüentemente leva ao acúmulo e disseminação de seus resíduos, podendo chegar a corpos hídricos. A presença destes resíduos no ambiente, além de afetar negativamente organismos aquáticos e terrestres, também podem exercer influência na aquisição de resistência antimicrobiana por micro-organismos sensíveis aos antimicrobianos (REGITANO et al., 2010).

À proporção que o uso dos antimicrobianos fica mais difundido, a resistência das bactérias também se torna mais disseminada. Fatores que favorecem o surgimento da resistência, são relacionados a utilização irresponsável do fármaco em humanos, seja por tratamento interrompido precocemente ou o emprego em casos desnecessários. As precárias condições sanitárias, o manuseio inadequado dos alimentos, a utilização de antibióticos para prevenir doenças em animais saudáveis e como promotores de crescimento em animais, também contribuem para a disseminação de bactérias que possuem genes com resistência na cadeia produtiva animal (WHO, 2020).

Quanto ao perfil de resistência, um micro-organismo é classificado como resistente, quando é empregado o tratamento adequado, onde a terapia, dosagem e tempo de administração do antimicrobiano são considerados apropriados, contudo, mesmo respeitando estes parâmetros, o agente antimicrobiano não é capaz de inibir totalmente sua multiplicação (SCHWARZ, 2017). Para ser considerado multirresistente, um micro-organismo deve apresentar resistência a um ou mais antibióticos de três ou mais classes diferentes (MAGIORAKOS et al., 2012). A maior problemática da resistência é a redução das opções de fármacos para tratamento, e

quando doenças ocorrem por bactérias multirresistentes, torna-se difícil encontrar uma terapêutica adequada (ANVISA, 2018).

O Sistema de Vigilância Antimicrobiana Global (GLASS – *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System*) da Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou em 2018, que em 22 países, cerca de 500.000 pessoas sofreram com doenças relacionadas à resistência aos antibióticos revelando altos níveis de resistência a uma série de infecções bacterianas graves em países de alta e baixa renda, confirmando, assim, a preocupante situação da resistência no mundo (WHO, 2018)

2.7 Tipos de resistência

A resistência a antibióticos pode ser classificada em constitutiva e adquirida. A constitutiva é aquela que, pela falta de mecanismos celulares necessários para que ocorra a sensibilidade aos antibióticos, o micro-organismo se mostra resistente. Já a resistência adquirida, é constituída pelos seguintes mecanismos:

Mutação: mudanças nas sequências de DNA cromossômico, que ocorrem espontaneamente, na presença de um antibiótico;

Transformação: alteração de genótipo do receptor através da transferência genética de DNA puro de uma célula para a outra por transposons, isto é, sequência curtas de DNA que são transferidas;

Transdução: transferência plasmidial por meio de um bacteriófago;

Conjugação: transferência de genes plasmidiais para a bactéria receptora por meio de conjugação bacteriana e;

Transposição: ação de transposons que podem transpor de um cromossomo para um plasmídeo e vice-versa (VAZ, 2009).

Por todo este aparato, o perfil de resistência aos antibióticos em isolados de *Salmonella* spp. e outras bactérias pode ser dinâmica, ou seja, o perfil de isolados de décadas atrás pode não ser o mesmo de isolados obtidos em tempos atuais; assim o estudo dos elementos envolvidos na dinâmica da alteração do perfil de resistência é importante para compreender e responder perguntas relevantes para o planejamento do enfrentamento deste que é um dos maiores desafios para a medicina nos dias atuais. O impacto que a emergência e disseminação da resistência aos antibióticos representa para a saúde animal e humana é de nível global, já que desfechos adversos ocorrem em pacientes infectados por micro-organismos resistentes (COSGROVE, 2006; DE KRAKER et al., 2011; NAYLOR et al., 2017).

2.8 Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos

De acordo com a ANVISA (2007), Baptista (2013), Franco et al (2015) e Loureiro et al. (2016), as bactérias geralmente empregam mais de uma estratégia para impossibilitar a ação dos antimicrobianos. Estes mecanismos podem contribuir para a resistência aos antibióticos. A resistência bacteriana aos antibióticos possui quatro principais mecanismos:

Alteração de permeabilidade da membrana: Há três maneiras para os antibióticos penetrarem na célula bacteriana, por meio de difusão simples pela bicamada fosfolipídicas presente na membrana; difusão facilitada através das porinas e por meio do processo *self promoted uptake*. As porinas estão presentes na membrana externa das bactérias Gram negativas e são proteínas que constituem canais específicos que passam substâncias para o espaço periplasmático da célula e em seguida para o seu interior. Alterações estruturais das porinas, como seletividade,

tamanho, número e conteúdo lipídicos resultam na alteração da permeabilidade aos antibióticos e consequentemente na redução do nível de antibiótico no interior da célula bacteriana;

Alteração do sítio de ação do antibiótico: Fatores como a redução da síntese do DNA, interferência na síntese de proteínas e alterações estruturais do peptidoglicano, fazem com que a afinidade do fármaco ao seu sítio de ação seja reduzida ou neutralizada completamente, para impossibilitar o efeito inibitório ou bactericida do antibiótico. As bactérias através deste mecanismo podem adquirir gene de resistência que vai substituir o alvo original;

Bomba de efluxo: o antibiótico é conduzido do meio intracelular para o extracelular através do bombeamento ativo. A bomba de efluxo é uma proteína presente na membrana bacteriana e são classificadas em cinco tipos de transportadores: *major facilitator family* (MFS); *multidrug and toxic efflux* (MATE); *resistance-nodularion-division family* (RND); *small multidrug resistance* (SMR) e *adenosine triphosphate binding cassette* (ABC);

Mecanismo enzimático: a bactéria produz enzimas que degradam o antibiótico. Esta degradação ocorre através de três reações: hidrólise; transferência de grupos nas moléculas e reações de redução e oxidação. Um clássico exemplo deste mecanismo é a destruição dos agentes β -lactâmicos pelas enzimas β -lactamases.

2.9 β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

Observando a evolução da resistência aos antibióticos nas bactérias Gram negativas, a produção de enzimas β -lactamases é classificada como o mais significativo mecanismo de resistência nestas bactérias. Esta enzima é responsável por efetuar a hidrólise do anel β -lactâmico, estrutura fundamental para a correta atividade dos fármacos β -lactâmicos (LAKSHAMI et al., 2014).

As β -lactamases de espectro estendido (ESBL – *Extended Spectrum β -Lactamases*) apresentam um notável desafio para a terapia, devido sua capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de todas as gerações e monobactâmicos, levando a redução de opções na terapêutica. Carbapenêmicos apresentam estabilidade frente à ESBLs, com destaque para o meropenem (LENHARD-VIDAL, 2011). As cepas produtoras de ESBL geralmente são multirresistentes, devido ao fato da maioria destas enzimas serem codificadas por genes situados em plasmídeos, que frequentemente transportam genes de resistência a outros antibióticos, como aminoglicosídeos, sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol (SOUSA et al., 2002).

As principais bactérias produtoras de ESBL são *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, mas também é observada esta produção nos demais membros da família *Enterobacteriaceae*, como *Salmonella* spp. (THOMSON, 2001).

Considerado o impacto do Brasil como exportador de carne de frango e o consumo desta proteína de origem animal no país, a importância de *Salmonella* spp. como causador de doença veiculada por alimentos e a emergência da multirresistência bacteriana; o presente estudo investigou a comparação temporal do perfil de resistência *in vitro* aos antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. de carne de frango entre 2000 – 2020.

3 OBJETIVOS

Avaliar o perfil fenotípico de resistência in vitro aos antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. obtidas de carcaças e cortes de frango nos anos de 2004, 2005 e 2006 (antigas) e 2019 e 2020 (novas);

Comparar o perfil fenotípico dos diferentes isolados antigos e novos de *Salmonella* spp. obtidas de carcaças e cortes de frango.

Detectar *Salmonella* spp. produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) isoladas de carcaças e cortes de frango.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem dos isolados

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - FMVZ - UNESP, Botucatu - SP, protocolo n. 0011/2021.

Os isolados de *Salmonella* spp. utilizadas neste estudo foram obtidos da análise microbiológica convencional de carcaças ou cortes de frango refrigerados, pertencentes a bacterioteca do laboratório do Serviço de Orientação a Alimentação Publica (SOAP) da UNESP – Botucatu/SP. Para a obtenção destes isolados, as metodologias de isolamento, identificação e caracterização do gênero seguiram as recomendações oficiais.

Foi selecionado um n de conveniência de 87 isolados de *Salmonella* spp., sendo 21 de amostras de produtos analisados em 2004, 22 em 2005, 20 em 2006 (estes denominados “antigos”; n=63), 14 em 2019 e 10 em 2020 (denominadas “novos”; n=24). Sendo assim, os isolados testados possuem um intervalo de isolamento de aproximadamente 15 anos e foram obtidos de diferentes amostras.

Para a reativação, os isolados foram ressuspensos em caldo BHI (*brain heart infusion*) e incubados por 24 horas a 36°C. Após o período de incubação, foram semeados em ágar XLD (xilose lisina desoxicolato) e incubados por 24 horas a 36°C para confirmação das características morfocoloniais, foi realizado a confirmação do gênero *Salmonella* spp. por técnica molecular nestes isolados. Após estas etapas, os isolados foram estocados em ágar TSA (triptona de soja) sob refrigeração para os estudos de multirresistência aos antimicrobianos.

4.2 Confirmação molecular de *Salmonella* spp.

A confirmação do gênero *Salmonella* foi realizada pela técnica da PCR em tempo real tendo como alvo o gene *invA*. Inicialmente, os isolados foram ressuspensos em caldo BHI e incubadas a 36°C por 24 horas. Posteriormente, 1 mL de cada amostra foi transferido para um microtubo identificado e centrifugado a 13800 rcf por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi utilizado para a etapa de extração.

O material genético foi purificado utilizando um protocolo *in house* padronizado no Instituto de Biotecnologia de UNESP, Campus de Botucatu (IBTEC). O *pellet* foi ressuspendido em um tampão com 350 µL de solução de lise (isotiocianato de guanidina a 5,5 M, TRIS-Cl pH 8 a 50 mM, EDTA pH 8 a 20 mM, N-Lauroylsarcosine a 2% e antiespumante a 0,1%), 350 µL de isopropanol, 20 µL de proteinase K (20mg/mL) e 20 µL de solução de *beads* magnéticas a 4% (GE Healthcare Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™) e incubado a 55°C por 15 minutos. Posteriormente, duas etapas de lavagem foram realizadas, primeiro com 500 µL de isopropanol P.A., e posteriormente com 500 µL de etanol 80%. Por fim, o material foi eluído em 100 µL de um tampão de Citrato-Tween (1 mM de citrato trissódico e 0,05% de Tween 20, pH 6,4). O procedimento de extração foi realizado de forma automatizada no equipamento UniXtractor™ (Uniscience™) para 32 amostras.

A amplificação dos alvos foi realizada com o kit GoTaq™ qPCR Master Mix 2X (Promega, Madison, WI, EUA). Foram utilizados 10 µL do master mix, 3,8 µL de água livre de nuclease, 0,6 µL de cada *primer* a 10 pM (*forward* e *reverse*) e 5 µL de amostra extraída. As condições de termociclagem foram 95°C por 5 minutos para

desnaturação inicial, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Ao final foi realizada análise da curva de temperatura de dissociação. Os primers utilizados foram GAT YTG AAR GCC GGT ATT ATT G (*forward*) e ATA AAC TTC ATC GCA CCG TCA (*reverse*). Todas as amostras confirmadas como *Salmonella* spp. foram submetidas ao teste de perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

4.3 Critérios de seleção dos antimicrobianos

Como critérios para a seleção dos antimicrobianos utilizados no estudo, foi realizado um detalhado levantamento de publicações científicas nas bases de dados Scopus e Pubmed utilizando como descritores as palavras “*Salmonella*”, “*chicken meat*”, “*resistance*” e “*antibiotics*”. Baseado nas respostas obtidas, foram selecionados 10 artigos científicos e listados os antimicrobianos utilizados. Ademais, utilizou-se as recomendações da CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) para a seleção final das classes, antimicrobianos e concentrações a serem utilizadas no estudo de perfil de resistência (CLSI, 2020).

Deste modo, os antimicrobianos utilizados e suas respectivas classes foram: gentamicina 10 µg (GEN), estreptomicina 10 µg (EST) (aminoglicosídeos), ertapenem 10 µg (ETP), imipenem 10 µg (IPM), meropenem 10 µg (MER) (carbapenêmicos), ceftazidima 30 µg (CAZ) (cefalosporinas), cefoxitina 30 µg (CFO) (cefamicinas), ciprofloxacino 5 µg (CIP), norfloxacino 10 µg (NOR) (fluorquinolonas), trimetropim-sulfametoxazol 25 µg (SUT) (antagonista da via de folato), ampicilina 10 µg (AMP) (penicilinas), cloranfenicol 30 µg (CLO) (anfenicóis) e tetraciclina 30 µg (TET) (tetraciclinas).

4.4 Perfil de resistência pelo método de disco-difusão

O perfil resistência aos antimicrobianos foi realizado pelo método de disco-difusão. Os isolados foram cultivados em ágar TSA e incubados a 36°C por 24 horas. Após esta etapa, as culturas foram diluídas em solução salina até a obtenção de turbidez de 0,5 da escala de MacFarland lida no equipamento *DensiCHECK*TM Plus (bioMérieux®). A suspensão bacteriana desta diluição foi semeada em placa contendo ágar *Mueller-Hinton* e, posteriormente, adicionado os discos de antibióticos selecionados. Após a secagem, as placas foram incubadas a 36°C por 18-24 horas. Após este período, o halo de inibição foi mensurado e o isolado testado classificado como resistente, intermediária ou sensível, baseado nas recomendações da CLSI (2020). Isolados que apresentaram resistência a três ou mais classes dos antimicrobianos foram considerados multidroga resistentes (MAGIORAKOS et al., 2012).

4.5 Tratamento dos dados

Os resultados do perfil de resistência (tamanho de zonas de inibição) foram analisados utilizando a aplicação *Antibiotic Resistance Profiling* do programa Bionumerics. Esta análise permitiu a construção de um dendrograma contendo os *clusters* de acordo com a categorização de resistência (resistente, intermediário ou sensível).

4.6 Método fenotípico de confirmação de ESBL

Para realização do método fenotípico de confirmação de ESBL através do teste de sinergismo de disco duplo (TSDD), foram escolhidos isolados considerados multidroga resistente pelo método de disco-difusão, este também utilizado como método de triagem para detecção de ESBL, uma vez que o halo de inibição dos antimicrobianos cefotaxima (CTX) e ceftazidima (CAZ) foram menores de 21 e 22 mm nos isolados escolhidos. O TSDD consiste em testar os isolados com discos de cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima), e um disco antimicrobiano contendo ácido clavulânico (amoxicilina + ácido clavulânico), e para ser considerado ESBL positiva é necessário que ocorra expansão do halo de inibição do disco das cefalosporinas em direção ao disco de amoxicilina + ácido clavulânico, denominada “zona fantasma” (LABORCLIN, 2019).

Os isolados foram cultivados em ágar TSA e incubados a 36°C por 24 horas. Após esta etapa, as culturas foram diluídas em solução salina até a obtenção de turbidez de 0,5 da escala de MacFarland lida no equipamento *DensiCHECK™* Plus (bioMérieux®). A suspensão bacteriana desta diluição foi semeada em placa contendo ágar *Mueller-Hinton* para realização do TSDD, adicionando ao centro da placa o disco de amoxicilina + ácido clavulânico 20/10 µg, os discos de ceftazidima 30 µg e cefotaxima 30 µg foram colocados em um raio de 20 mm do disco do centro. Após a secagem, as placas foram incubadas a 36°C por 18-24 horas. Após este período, foi observado se houve expansão do halo de inibição das cefalosporinas em direção ao disco de amoxicilina + ácido clavulânico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resistência antimicrobiana é considerada um grave problema à saúde pública pelo fato de que o uso de drogas que, normalmente, são utilizadas como promotores de crescimento são também utilizadas no tratamento de salmoneloses (PINHEIRO et al., 2010).

Na Tabela 1, é possível observar os resultados do perfil de resistência aos antibióticos nos isolados de *Salmonella* spp. testados. Dos 63 isolados antigos, nenhum apresentou resistência aos antibióticos testados, cinco apresentaram resistência intermediária para ciprofloxacino, quatro para estreptomicina e apenas um isolado apresentou resistência intermediária ao ertapenem.

Dos 24 isolados de *Salmonella* spp. denominados novos, apenas dois foram sensíveis a todos os antibióticos testados. O princípio ativo com maior frequência de resistência dos isolados foi tetracilina (87,50% de cepas resistentes), seguido por ceftazidima, cefoxitina e ampicilina (75%) e cloranfenicol (4,17%). Todos os isolados novos foram sensíveis à gentamicina, ertapenem, meropenem, norfloxacin e sulfazotrim.

Segundo estudos realizados a partir do uso de antibióticos do grupo aminoglicosídeos em isolados de *Salmonella* spp., há uma alta prevalência da resistência relacionada à estreptomicina (VAZ et al., 2010; TURKI et al., 2012; MARRERO-ORTIZ et al., 2012). 12,5 % dos isolados novos apresentaram resistência intermediária a estreptomicina, enquanto todos os isolados antigos apresentaram-se sensíveis. Fato que demonstra indução à mudança do perfil de resistência de cepas ao longo dos anos.

Tabela 1. Frequência de isolados antigos e novos de *Salmonella* spp. obtidos de carne de frango com resistência a diferentes antimicrobianos.

Classe/Antibiótico		Perfil de resistência (n e %)					
		Isolados antigos (n=63)			Isolados novos (n=24)		
		R	I	S	R	I	S
Aminoglicosídeos	GEN	0 (0)	0 (0)	63 (100)	0 (0)	0 (0)	24 (100)
	EST	0 (0)	4 (6,35)	59 (93,65)	0 (0)	3 (12,50)	21 (87,50)
Carbapenêmicos	ETP	0 (0)	1 (1,78)	62 (98,42)	0 (0)	0 (0)	24 (100)
	IPM	0 (0)	0 (0)	63 (100)	0 (0)	1 (4,17)	23 (95,83)
	MER	0 (0)	0 (0)	63 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (100)
Cefalosporinas	CAZ	0 (0)	0 (0)	63 (100)	18 (75)	0 (0)	6 (25)
Cefamicinas	CFO	0 (0)	0 (0)	63 (100)	18 (75)	0 (0)	6 (25)
Fluorquinolonas	CIP	0 (0)	5 (7,94)	58 (92,06)	0 (0)	12 (50)	12 (50)
	NOR	0 (0)	0 (0)	63 (100)	0 (0)	0 (0)	24 (100)
Antagonista da via do folato	SUL	0 (0)	0 (0)	63 (100)	0 (0)	0 (0)	24 (100)
Penicilinas	AMP	0 (0)	0 (0)	63 (100)	18 (75)	0 (0)	6 (25)
Anfenicóis	CLO	0 (0)	0 (0)	63 (100)	1 (4,17)	0 (0%)	23 (95,83)
Tetraciclinas	TET	0 (0)	0 (0)	63 (100)	21 (87,50)	1 (4,17)	2 (8,33)

R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível.

GEN: Gentamicina; EST: Estreptomicina; ETP: Ertapenem; IPM: Imipenem; MER: Meropenem; CAZ: Ceftazidima; CFO: Cefoxitina; CIP: Ciprofloxacino; NOR: Norfloxacino; SUL: Sulfazotrim; AMP: Ampicilina; CLO: Cloranfenicol; TET: Tetraciclina. Isolados antigos: 2004, 2005, 2006. Isolados novos: 2019 e 2020.

Muito utilizada em animais de produção, a tetraciclina em humanos é uma droga considerada de segunda escolha (MAYRHOFER et al., 2004; ANTUNES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005). No presente estudo, a tetraciclina foi uma das drogas que apresentaram maior resistência (87,5 %). Em um estudo realizado por Conceição et al. (2007), em produtos de frango, 65,8 % dos isolados apresentaram-se resistentes a tetraciclina. A resistência a tetraciclina foi a maior observada neste estudo o que corrobora com o estudo de Ribeiro et al. (2008) que detectaram 67,10 % resistentes a tetraciclina quando analisaram 79 cepas de *Salmonella*. No Brasil é vedada a utilização da tetraciclina na avicultura, seja como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009). O estudo de Rossa et al. (2013) analisou a resistência aos antibióticos em enterobactérias isoladas de carcaças de frango convencionais e orgânicas, e

demonstrou que tetraciclina foi o antibiótico com maior frequência de resistência dos isolados em ambos os produtos, sendo 60,59 % em carcaças convencionais e 47,64 % em carcaças orgânicas. O uso indiscriminado de tetraciclinas em planteis pode ser indício da seleção de micro-organismos resistentes. Resultados similares foram apresentados por Johnson et al. (2005) em isolados de produtos de origem animal no Canadá.

Vantagens como o custo acessível, baixa toxicidade e fácil administração, fez com que as tetraciclinas fossem uma das classes de antibióticos mais utilizadas durante anos. Na clínica médica, o uso das tetraciclinas tem sido restringido em consequência da resistência aos antibióticos em um grupo variável de bactérias. Porém, ainda são empregadas no tratamento de diversos tipos de doenças, como por exemplo Doença de Lyme e infecções respiratórias ocasionadas por *Mycoplasma pneumoniae* (PEREIRA-MAIA et al., 2010).

Nos Estados Unidos da América, o uso de fluorquinolonas no tratamento de animais foi suspenso devido à similaridade com antibióticos usados em infecções humanas (FDA, 2005). Observamos nesse estudo uma mudança no perfil de resistência ao comparar os novos isolados aos antigos onde 50 % dos novos isolados mostraram-se com resistência intermediária à droga ciprofloxacina enquanto os antigos apresentaram-se sensíveis ao grupo das fluorquinolonas em relação aos antibióticos testados.

No Brasil, o uso de penicilinas para a alimentação animal está proibido segundo a Portaria Ministerial 193, de 12 de maio de 1998 (Brasil, 1998). A penicilina foi o primeiro antimicrobiano descrito na literatura na década de 1940, e o seu uso ampliou-se desde sua descrição, sendo amplamente utilizada na medicina humana com diversas indicações de uso e com papel relevante no tratamento de sífilis (GRUMACH,

2006). 75 % dos isolados “novos” de *Salmonella* spp., demonstraram resistência à ampicilina. Pinheiro et al. (2010) relataram que no estudo realizado com cepas de *Salmonella* spp. isoladas de granjas avícolas 100 % dos isolados apresentaram-se resistentes à penicilina, concordando com Bau et al. (2001). Assim como no Brasil, na Coréia também foram encontradas cepas resistentes à penicilina em um estudo realizado com isolados de carcaças de frango (CHANG, 2001). Estudo realizado por Maciel et al. (2019) demonstrou que em 105 isolados de *Salmonella* spp. de origem avícola (alimentos), 32,38 % (n=34) foram resistentes, com predominância ao grupo das penicilinas (amoxicilina e ampicilina), tetraciclina (grupo das tetraciclina) e gentamicina (grupo de aminoglicosídeos). Destas cepas, 20 % (21) foram consideradas multirresistentes.

Observou-se a mudança do fenótipo de resistência em relação a ciprofloxacina, onde 50 % dos isolados novos apresentaram resistência intermediária, enquanto os antigos mostraram-se sensíveis à droga. Surtos causados por *Salmonella* spp. resistentes a ciprofloxacina foram relatados na Inglaterra e país de Gales (TRELFAH et al., 1997). Entretanto, Tsai e Hsiang (2005) contradizem essa informação ao encontrarem cepas de *Salmonella* spp isoladas na cidade de Tawain em 2001 que tinham o perfil sensível a este antibiótico.

Da classe dos Anfenicóis, apenas uma cepa apresentou resistência ao cloranfenicol. Entretanto, os dados apresentados por Alcantra et al. (2012) relatam que 100 % dos isolados obtidos no estudo em 2012 eram resistentes ao cloranfenicol.

Na Tabela 2 estão listados os perfis fenotípicos encontrados. Dos isolados resistentes, 72,72% apresentaram perfil de resistência à ceftazidima-cefoxitina-ampicilina-tetraciclina, 18,18% apenas à tetraciclina, 4,54% à ceftazidima-cefoxitina-ampicilina-cloranfenicol-tetraciclina e 4,54% à ceftazidima-cefoxitina-ampicilina. Além

disso, 18 dos 24 isolados de *Salmonella* spp. novos foram considerados multidroga resistentes por apresentaram resistência simultânea a três ou mais classes testadas.

Salmonella Typhimurium multi-resistente foi isolada pela primeira vez em 1964 no Reino Unido (ANDERSON, 1998). Durante a década de 1990 houve um aumento mundial acentuado no número de isolados desse sorovar com esse fenótipo (THRELFALL, 2002). Rowlands (2008) relatou que 10,5 % dos isolados de *Salmonella* spp. de alimentos em 2008 apresentaram multirresistência.

Tabela 2. Perfil fenotípico de resistência e multidroga resistência (MDR) de isolados novos de *Salmonella* spp. obtidas de carne de frango.

Perfil de resistência	N e %(n=22)	MDR
CAZ-CFO-AMP-CLO-TET	1 (4,54)	Sim
CAZ-CFO-AMP-TET	16 (72,72)	Sim
CAZ-CFO-AMP	1 (4,54)	Sim
TET	4 (18,18)	Não

AMP: Ampicilina; CAZ: Ceftazidima; CFO: Cefoxitina; TET: Tetraciclina; MDR: Multidroga resistente (resistência a três ou mais classes de maneira simultânea), segundo MAGIORAKOS et al. (2012).

Pandini et al (2014) observou 25,6 % de multirresistência avaliando a ação de 12 antimicrobianos em 39 amostras de *Salmonella* spp. provenientes de granjas de frangos no estado do Paraná. Almeida et al (2018) realizou o sequenciamento do genoma completo em 90 amostras de *Salmonella* Typhimurium isolados de humanos e alimentos entre 1983 e 2013, obteve um resultado de 38 cepas multirresistentes sendo 19 de humanos e 19 de alimentos. Costa et al (2013) avaliou a resistência antimicrobiana em 12.582 isolados de *Salmonella* spp. de carcaças e produtos avícolas, de diferentes regiões do Brasil entre 2007 e 2011, durante o período do estudo observou-se 16,4 % de multirresistência e aumento da resistência à ampicilina de 12,4 % a 18,9 %, tetraciclina de 15,2 % a 18,9 %.

Em estudo recente, Souza et al. (2019), descreveram que 100 % dos isolados de *Salmonella* spp. de frangos foram multirresistentes sendo amoxicilina, ampicilina, cefazolina, sulfanamida, tetraciclina e trimetropim foram os antimicrobianos de maior resistência percentuais. Os resultados dos estudos citados, juntamente com o resultado de 81,8 % de multirresistência do presente estudo, demonstram que com o passar dos anos a resistência e multirresistência vem se mostrando maior, deixando evidente de que é necessário o monitoramento de microrganismos multirresistentes, em especial *Salmonella* spp.

Dos 18 isolados de *Salmonella* spp. novos considerados multirresistentes pelo teste de disco difusão, 15 (83,33 %) apresentaram resultado positivo para produção de ESBL no teste de sinergismo de disco duplo, confirmando que 62,5 % dos 24 isolados novos de *Salmonella* são ESBL. Na Tabela 3 estão listados os perfis fenotípicos de resistência destes isolados positivos para ESBL.

Tabela 3. Perfil fenotípico de resistência dos isolados confirmados para ESBL através do teste de sinergismo de disco duplo.

Perfil fenotípico	N e % (n=15)
CAZ-CFO-AMP-TET	14/15 (93,33 %)
EST-CAZ-CFO-AMP-CLO-TET	1/15 (6,67 %)

EST: Estreptomicina; CAZ: Ceftazidima; CFO: Cefoxitina; CLO: Cloranfenicol; AMP: Ampicilina; TET: Tetraciclina

Na Figura 1, é apresentado o dendrograma de similaridade dos isolados antigos e novos. Por ele, é possível observar que esta análise produziu três *clusters*. O primeiro *cluster* contendo os isolados novos e multirresistentes (n=18), obteve grau de similaridade entre 80-82 % entre si, sendo este, dividido em dois subgrupos, em um grupo contendo o isolado com perfil ceftazidima-cefoxitina-ampicilina-cloranfenicol-

tetraciclina e no outras os demais isolados multirresistentes (n=17). Estes 17 isolados apresentaram similaridade quanto ao perfil de resistência acima de 94%.

O segundo grande *cluster* foi formado por isolados antigos e novos com grau de similaridade acima de 82 %. O terceiro *cluster* foi formado basicamente por isolados antigos (com exceção do isolado NEW-11, novo 11) e o grau de similaridade foi bastante variado.

Com base nos achados preliminares, foi possível observar que isolados novos de *Salmonella* spp. apresentaram maior frequência de resistência quando comparado com isolados antigos. Esses dados corroboram com questões que vem sendo debatidas nas últimas décadas com relação ao aumento expressivo no número de bactérias resistentes e multirresistentes às drogas veterinárias.

É fato que, por um lado, a produção de produtos de origem animal é crescente e importante sob o ponto de vista econômico, uma vez que parte do produto interno bruto (PIB) brasileiro depende da produção de alimentos (CEPEA, 2017). Porém, do outro lado, a pressão por índices produtivos de excelência e cada vez maiores para o atendimento da demanda de mercado, pode exercer um efeito negativo quanto às questões sanitárias, sobretudo no que tange a massiva utilização de antibióticos.

O alto volume de animais sendo criados em aviários, o melhoramento, genético que permite uma melhor conversão alimentar e consequente ganho de peso em menor espaço de tempo, além de questões de manejo sanitário deficientes, permitem a entrada de patógenos como *Salmonella* spp. no ambiente de produção de aves. (ROCHA et al., 2008) Deste modo, a utilização de antibióticos, tanto como forma de proteção, ferramenta necessária de promoção de crescimento ou tratamento de enfermidades, aumenta a possibilidade da indução à resistência aos antibióticos quando estes são escolhidos sem um critério adequado.

907

908

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

930

931

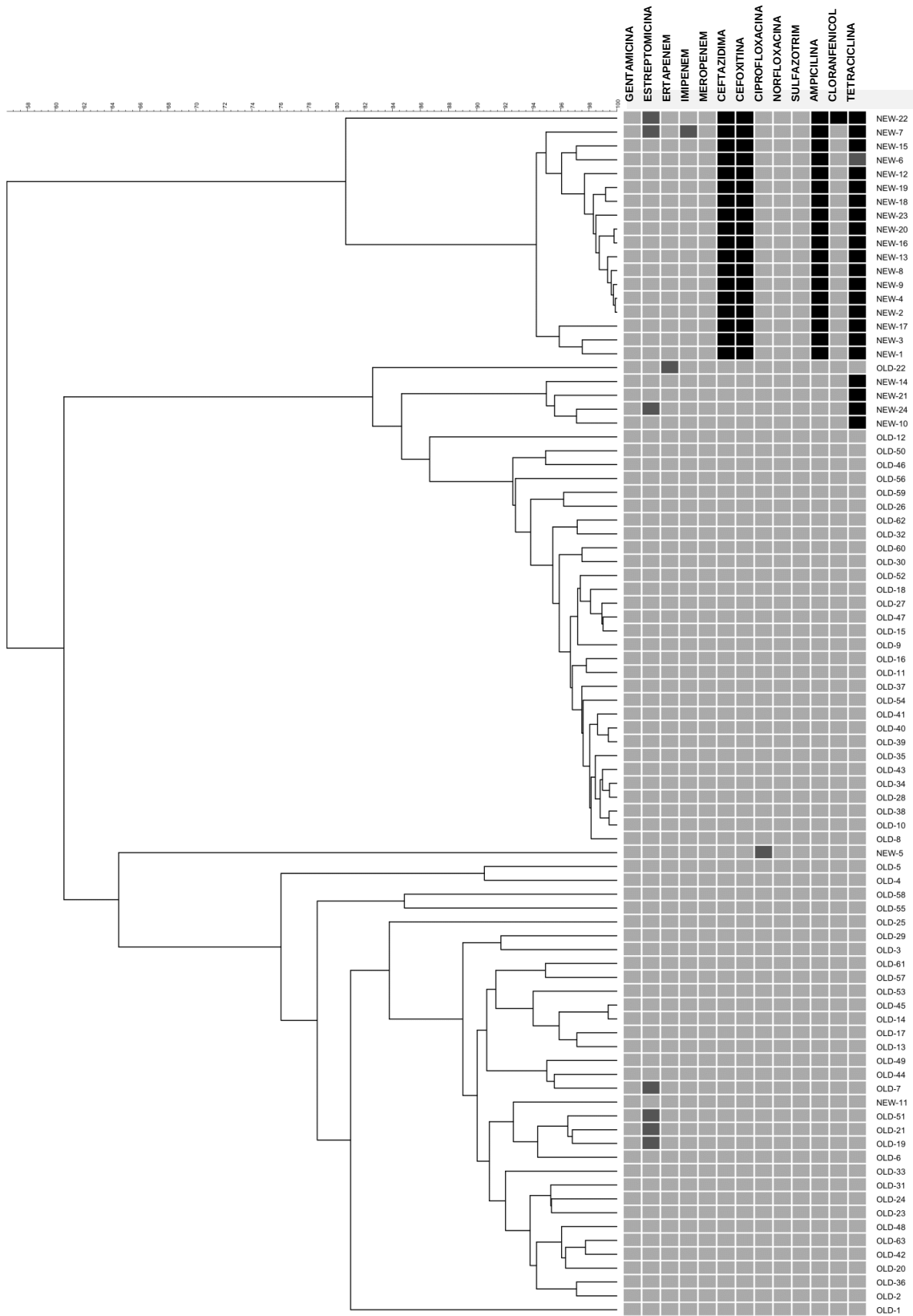


Figura 1. Dendrograma obtido da comparação do perfil de resistência de isolados antigos e novos de *Salmonella* spp. obtidas de carne de frango (Legenda: OLD: isolados antigos; NEW: isolados novos; ■: resistente; ■: sensível; e ■: intermediário)

O elevado número de cepas de *Salmonella* spp. consideradas multirresistentes é um dos resultados mais relevantes em termos de saúde pública. Cepas multirresistentes envolvidas em surtos ou casos de doenças de origem alimentar podem comprometer o tratamento, uma vez que a escolha acertada de um antibiótico para quadros graves de salmonelose ficaria comprometida. Ressalta-se que, em casos leves da doença, a antibioticoterapia não é recomendada, pela ineficácia do tratamento quando a cepa envolvida é multirresistente ou pela indução à resistência, caso o tratamento não seja seguido de acordo com as prescrições médicas.

Como já mencionado, os múltiplos mecanismos de indução à resistência aos antibióticos é um dos agravantes quando se fala em multirresistência de bactérias patogênicas, e o elevado número de cepas resistentes presentes em ambientes de produção portadoras de fatores genéticos móveis, como plasmídeos, pode induzir cepas não resistentes a se tornarem resistentes quando entrarem em contato, tanto no ambiente intestinal quanto no ambiente de produção propriamente dito, por meio de contato com superfícies contaminadas, cama de aviários e fômites, por exemplo.

O estudo realizado por Zishiri et al. (2016), no Brasil, demonstrou que de 24 isolados de *Salmonella* spp. provenientes de frango de corte, todos apresentaram resistência, com resistência de 100 % (n=24) à ampicilina, amoxicilina e tetraciclina. Além disso, demonstrou também alta porcentagem de multirresistência, como por exemplo, 83 % (n=20) para ampicilina e tetraciclina; 80 % (n=16) ampicilina, amoxicilina e tetraciclina; 66,7 % (n=16) para amoxicilina e tetraciclina; 58 % (n=14) para tetraciclina e trimetoprima. No presente estudo, a ampicilina e a tetraciclina também apresentaram alta presença no perfil fenotípico de isolados MDR.

Considerando que os isolados *Extended Spectrum β -Lactamase* (ESBL) ou beta-lactamases de espectro estendido geralmente são multidroga resistentes, e

os agentes ceftazidima, cefoxitina e ampicilina, pertencentes ao grupo dos β -lactâmicos, demonstraram baixa eficácia frente aos isolados novos utilizados neste estudo, e são os principais antimicrobianos que se apresentam nas cepas MDR; foi realizado o método fenotípico para confirmação de ESBL através do teste de sinergismo de disco duplo. Dos 18 isolados considerados MDR pelo teste de disco difusão, 15 (83,33 %) apresentaram resultado positivo para produção de β -lactamases de espectro estendido no teste de sinergismo de disco duplo, confirmando que 62,5 % dos 24 isolados novos de *Salmonella* são ESBL.

Segundo a OMS, as enterobactérias produtoras de ESBL, representam um risco para a saúde humana (OMS, 2014). A propagação de bactérias multirresistentes, incluindo as ESBL, em animais saudáveis produtores de alimentos e produtos alimentícios é de grande preocupação, uma vez que pode levar a maior dispersão destas cepas resistentes.

Estudos têm demonstrado o aumento da frequência de isolados bacterianos produtores de ESBL em produtos de origem animal (KOGA et al., 2015; SCHILL et al., 2017). Clemente et al. (2013), em um estudo realizado em 2013 identificaram apenas cinco cepas produtoras de ESBL em um total de 1120 isolados de *Salmonella* spp.. Qiao et al (2017) detectou 96 (10,8 %) cepas produtoras de ESBL 890 isolados de *Salmonella* spp. recuperados de carcaças de frango entre 2007 e 2011, todos os isolados apresentaram resistência a ampicilina e amoxicilina + ácido clavulânico, como no presente estudo. Entretanto, Ziech et al. (2016), em um estudo com isolados de *Salmonella* spp. de plantas de processamento de frangos, descreveram que 45 % das cepas eram produtoras de ESBL.

Para antibióticos carbapenêmicos, não se observou a mudança significativa do perfil de resistência com os anos. Apenas um isolado antigo e um novo apresentaram

resistência intermediária para esta classe farmacológica. Esses dados são de grande relevância, uma vez que os carbapenêmicos são antibióticos de primeira escolha para no tratamento de microrganismos produtores de ESBL (ZHANEL, et al. 2007; BRCAS, 2018). Porém, Su et al (2012) relata o desenvolvimento de resistência a carbapenêmicos em um isolado de *Salmonella* Typhimurium proveniente de amostra clínica de um paciente com histórico de internações e dificuldade de escolha de antimicrobianos para tratamento terapêutico devido multirresistência já encontrada. O surgimento de cepas de *Salmonella* spp. resistentes aos carbapenêmicos representa grande problema clínico, pois para pacientes com infecção invasiva por este microrganismo multirresistente, os carbapenêmicos podem representar o último recurso de opção terapêutica (JEAN et al. 2005).

Ceftazidima, uma cefalosporina de terceira geração é um antibiótico de escolha no tratamento de infecções por enterobactérias em humanos (Koga et al., 2017). Costa et al (2013) descreve apenas 5,5 % de resistência às cefalosporinas de terceira geração, em *Salmonella* spp. em isolados de carcaças de frango entre 2007 e 2011. No presente estudo, dos isolados novos, 75 % foram resistentes a Ceftazidima juntamente com outras drogas, mostrando que esses isolados são MDR (tabela 1 e 2).

Em 2005 a Secretaria de Estado da Saúde do Paraná por meio de um estudo qualitativo obteve dados sobre os antibióticos utilizados na produção de frango de corte no estado. Este apontou a utilização de medicamentos não recomendados para aves, e o uso de medicamentos proibidos, como o uso das tetraciclina (6 %), quinoxalínicos (1 %) utilizadas como promotores de crescimento e, as tetraciclina (11 %), penicilinas (7 %), sulfonamidas (14 %) como terapêuticas (SESA, 2005).

Em 2014 o Sistema Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana (NARMS - *National Antimicrobial Resistance Monitoring System*) dos EUA, coletou uma amostra de carne de frango durante o monitoramento de rotina. Foi realizado sequenciamento de genoma completo, identificando uma cepa multirresistente de *Salmonella* Infantis. Esta cepa apresentava um gene que não era comum entre *Salmonella* spp. de frango nos Estados Unidos da América. Porém, NARMS inicialmente identificou essa cepa entre pessoas doentes retornando de viagens da América do Sul. Esta cepa resistente se espalhou rapidamente. Em 2018, era responsável por 25% das infecções por *Salmonella* Infantis em pessoas. A maioria dessas pessoas infectadas não tinha histórico de viagens, mas havia comido frango recentemente. Ao mesmo tempo, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA – *United States Department of Agriculture*) identificou a crescente presença desta cepa em amostras de frango. Fatos como este demonstram a facilidade de disseminação de cepas resistentes, tanto em humanos como na cadeia de produção animal (CDC, 2019).

Por fim, o presente estudo teve como principal objetivo a comparação de isolados antigos e novos quanto ao perfil de resistência aos antibióticos. Porém, para elucidar a real importância do fator “tempo” na indução de resistência aos antibióticos será necessária a realização de estudos genéticos mais aprofundados para permitir pesquisa de genes de modo a verificar se os isolados antigos de *Salmonella* spp. possuem genes de resistência e não expressaram; ou se não os possuem. Em comparação, nos isolados novos, será possível verificar o nível de expressão dos genes contidos no genoma para responder quais fatores podem influenciar na expressão desses genes que justifiquem o aumento expressivo do número de isolados resistentes novos quando comparados com os antigos.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que os isolados novos apresentaram maior frequência de resistência em comparação com os isolados antigos, sugerindo que, com o passar dos anos, *Salmonella* spp. pode ter adquirido resistência aos antimicrobianos testados. O uso inadequado destes agentes na medicina humana e medicina veterinária, pode ter influenciado para que isto ocorresse, assim como os mecanismos de indução à resistência que as bactérias podem possuir, como a produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido. Além disso, é necessário a realização de estudos genéticos para avaliar a presença de genes de resistência nestes isolados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Estatística do setor aves**. 2019. Disponível em: <https://abpa-br.org/mercados/> Acesso em: 15 de agosto de 2020.
2. ALMEIDA, F.; SERIBELLI, A. A.; MEDEIROS, M. I. C.; RODRIGUES, D. P.; VARANI, A. M.; LUO, Y.; ALLARD, M. W.; FALCÃO, J. P. Phylogenetic and antimicrobial resistance gene analysis of *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Brazil by whole genome sequencing. **Plos One**, v. 13, n. 8. 2018.
3. ANDERSON, A. D.; NELSON, J. M.; ROSSITER, S.; ANGULO, F. J. Public health consequences of use antimicrobial agents in foos animals in the United States. **Microb. Drug. Resist.**, v.9, n.4, p.373-379, 2003.
4. Antunes P, Réu C, Sousa JC, Peixe L, Pestana N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **Int J Food Microbiol.**, v.82, p.97-103. 2003.
5. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos**. (2007). Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm Acesso em: 23 julho de 2020.
6. BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistencia aos Antibioticos**. 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciencias e Tecnologias da Saude, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013. Disponível em: <http://recil.grupolusofona.pt/handle/10437/3264> . Acesso em: 12 de Julho de 2020.
7. BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em pelotas, RS, Brasil. **Cien. Rural**, v.31, n. 2, 2001.
8. BAÚ, D., SIQUEIRA, M. R., & MOOZ, E. D. (2009). **Salmonella - Agente Epidemiológico Causador De Infecções Alimentares: Uma Revisão**. XX Congresso Brasileiro De Economia Doméstica, VIII Encontro Latino Americano De Economia Doméstica; I Encontro Intercontinental De Economia Doméstica, 1–10. Disponível em: http://www.xxcbcd.ufc.br/args/qt6/qt6_72.pdf
9. BISCHOFF, K.M., CALLAWAY, T.R., EDRINGTON, T.S., GENOVESE, K.J., CRIPPEN, T.L., NISBET, D.J. 2004. **Antimicrobial use in food animals: Potential alternatives**. In: Pond, W.G., Bell, A.W., editors. *Encyclopedia of Animal Science*. New York, NY: Marcel Dekker, Inc. p. 45-47
10. BRASIL – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa no 26, 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. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jul. 2009. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf>. Acesso em: 18 de novembro de 2020.
11. BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de Salmonella: diagnóstico laboratorial do gênero Salmonella**. Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. Brasília, 2011.

12. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCast. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica. 2018.
13. CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella* em carcaças de frango e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n.6, p. 1465-1468. 2005.
14. CARVALHO, C. G. M.; GEUDES, M. I. F.; BAIA, I. L.; MÁLAGA, S. M. R.; OLIVEIRA, T. R. Detection of *Salmonella* through polymerase chain reaction (PCR) on eggs commercialized in Fortaleza, Ceará. **Nutrivisa – Revista de Nutrição e Vigilância em Saúde**, v. 2, n. 3, p. 113-118, 2016.
15. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Antibiotic resistance threats in the United States**. (2013). Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Acesso em: 20 de dezembro de 2020.
16. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Antibiotic resistance threats in the United States**. (2019). Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>. Acesso em: 20 de dezembro de 2020.
17. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. (2017). PIB do agronegócio brasileiro. Recuperado de <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>.
18. CHANG, Y. H. Prevalence of *Salmonella* spp. in poultry broilers and shell eggs in Korea. **J. Food Protect.**, v.63, n.5, p.655-658. 2000.
19. CLEMENTE L, MANAGEIRO VFERREIRA E, et al. Ocorrência de p-lactamases de espectro estendido entre isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* de animais e produtos alimentares destinados à alimentação humana, em Portugal. **IntJ Food Microbiol.**, v. 31, p. 221-228. 2013.
20. CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition**. Wayne, PA, 2020.
21. CONCEICAO, R. C. S.; HENTGES, A.; MOREIRA, A. N.; VASCONCELOS, A. A.; ANGELO, I. M. R.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A.; TIMM, C. D. Isolamento de *Salmonella* de produtos de frango e perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, v.66, p.31-34, 2007.
22. COSGROVE, S.E., The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, p.S82-S89, 2006.
23. COSTA, R. G.; FESTIVO, M. L.; ARAUJO, M. S.; REIS, E. M. F.; LÁZARO, N. S.; RODRIGUES, D. P. Antimicrobial Susceptibility and Serovars of *Salmonella* Circulating in Commercial Poultry Carcasses and Poultry Products in Brazil. **Journal of Food Protection**, v.76, n.12, p. 2011-2017. 2013.
24. DE KRAKER, M.E.A.; DAVEY, P.G.; GRUNDMANN, H.; BURDEN STUDY GROUP. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. **PLOS Medicine**, v.8, p.e1001104, 2011.
25. DIEYE, Y.; AMEISS, K.; MELLATA, M.; CURTIS III R. The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **BMC Microbiology**. 2009; 9:3.
26. DOYLE, M.E. Multidrug-resistant pathogens in the food supply. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.12, n.4, p.261-279. 2015.

- 1146 27. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY; DISEASE PREVENTION AND
1147 CONTROL. The European Union summary report on trends and sources of
1148 zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **European Food**
1149 **Safety Authority Journal**, v.15, p. 5077. 2017.
- 1150 28. FDA. Food and Drug Administration. 2005. Enrofloxacin for Poultry; Final
1151 Decision on Withdrawal of New Animal Drug Application Following Formal
1152 Evidentiary Public Hearing; Availability. Disponível em:
1153 <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2005-08-01/pdf/05-15224.pdf>
- 1154 29. FERREIRA, R. L.; TERRA JÚNIOR, A. T. Estudo sobre a automedicação, o uso
1155 irracional de medicamentos e o papel do farmacêutico na sua prevenção.
1156 **Revista Científica Faema**, v. 9, p.570-576. 2018.
- 1157 30. FORSYTHE, S. J. Práticas de produção higiênica. In: FORSYTHE, S. J.
1158 **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed,
1159 2013. Cap. 7, p. 375-377.
- 1160 31. FORTES, T. P.; FAGUNDES, M. Q.; VASCONCELLOS, F. A.; TIMM, C. D.;
1161 SILVA, E. F. Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão.
1162 **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v.71, ed. 2, p. 27. 2012.
- 1163 32. FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São
1164 Paulo: Editora Atheneu, 2002.
- 1165 33. FRANCO, J. M. P. L.; MENDES, R. C.; CARBRAL, F. R. F.; MENEZES, C. D. A.
1166 Resistência bactéria e o papel do farmacêutico frente à resistência bacteriana
1167 ocasionada pelo uso irracional de antimicrobianos. **E-ciência**, v. 3, n. 2. 2015.
- 1168 34. GEBREYES, W.A.; WITTUM, T.; HABING, G. et al. **Spread of Antibiotic**
1169 **Resistance in Food Animal Production Systems**. In: DODD, C.;
1170 ALDSWORTH, T.; STEIN, R.A. et al. (Ed.). *Foodborne Diseases* (Third edition).
1171 Cambridge: Academic Press, 2017. p.105-130.
- 1172 35. GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de**
1173 **alimentos. Qualidade das matérias primas. Doenças transmitidas por**
1174 **alimentos: treinamento de recursos humanos**. 2.ed. São Paulo: Varela,
1175 2003.
- 1176 36. HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*.
1177 **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p. 95-102.2004.
- 1178 37. JEAN, S.-S; LEE,Y.-T.; GUO, S.-M; HSUEH, P.-R. Recurrent infections caused
1179 by cefotaxime- and ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serotype
1180 choleraesuis treated successfully with imipenem. *Journal of Infection*, v.51,
1181 p.163-165. 2005.
- 1182 38. JOHNSON, J. M.; RAJIC, A.; MCMULLEN, L. M. Antimicrobial resistance of
1183 selected *Salmonella* isolates from food animals and food in Alberta. **Can Vet J.**,
1184 v. 46, n. 2, p. 141- 146. 2005.
- 1185 39. KOGA, V. L.; SCANDORIEIRO, S.; VESPERO, E. C.; OBA, A.; BRITO, B. G. de;
1186 BRITO, K. C. de; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. Comparison of antibiotic
1187 resistance and virulence factors among *Escherichia coli* isolated from
1188 conventional and freerange poultry. **BioMed Research International**, v. 2015,
1189 p. 1-8, 2015.
- 1190 40. LABORCLIN Produtos para Laboratórios. **Manual de Antibiograma 2019:**
1191 Segundo BrCAST/EUCAST. 2019. Disponível em:
1192 [https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/Manual-](https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/Manual-Antibiograma-BRCast-2019.pdf)
1193 [Antibiograma-BRCast-2019.pdf](https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/Manual-Antibiograma-BRCast-2019.pdf)
- 1194 41. LACONHA, I., BAGESSEN D.L., REMENTERIA A. & GARAIZAR J. Genotypic
1195 characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage

- types 1, 4, 6, and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 155-165. 2000.
42. LAKSHMI, R.; NUSRIN, K. S.; GEOROGY, S. A.; SREELAKSHMI, K. S. Role of beta lactamases in antibiotic resistance: A review. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 5, n. 2, p.37-40. 2014.
 43. LENHARD-VIDAL, A.; CARDOSO, R. F.; DE PÁDUA, R. A. F.; SIQUEIRA, V. L. D. High prevalence rate of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) among Enterobacteriaceae in a small Brazilian public hospital. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4. 2011.
 44. LOPALCO, P.L.; GERMINARIO, C.; DI MARTINO, V.; FRISOLI, L.; PAGANO, A.; QUARTO, M.; BARBUTI, S. Epidemiologic study and cost analysis of an *Salmonella* Enteritidis epidemic. **Annali d'igiene**, v. 12, p. 279-285. 2000.
 45. LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A.T.; HERDEIRO, M.T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p.77-84. 2016.
 46. MACIEL, M. J.; MACHADO, G.; AVANCINI, C. A. M. Investigation of resistance of *Salmonella* spp. isolated from products and raw material of animal origin (swine and poultry) to antibiotics and disinfectants. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.20. 2019.
 47. MAGIORAKOS A., SRINIVASAN R. B., CAREY Y., CARMELI M. E., FALAGAS C. G., GISKE S., HARBARTH J. F., HINDLER G., KAHLMETER B., OLSSON-LILJEQUIST D. L., PATERSON L. B., RICE J., STELLING M. J., STRUELENS A., VATOPOULOS A., WEBER J.T., M. D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.
 48. MAPA, Ministério da agricultura pecuária e abastecimento. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da agropecuária, PAN-BR AGRO**. (2018). Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/pan-br-agro/PANBRAGROv.1.0maio2018.pdf>
 49. MAPA, Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Mapa proíbe o uso de tilosina, lincomicina e tiamulina como aditivo para melhorar o desempenho de animais**. (2020). Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-proibe-o-uso-de-tilosina-lincomicina-e-tiamulina-como-aditivo-para-melhorar-o-desempenho-de-animais>. Acesso em: 20 de julho de 2020.
 50. MARRERO-ORTIZ R, HAN J, LYNNE AM, DAVID DE, STEMPE ME, FARMER D, et al. Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* enterica serovars isolated from dairy cattle in Wisconsin. **Food Research International**, v. 45, p.962–967. 2012.
 51. Mayrhofer S, Paulsen P, Smulders FJM, Hilbert F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. **Int J Food Microbiol.**, v. 97, p.23-9. 2004.
 52. MEDEIROS, S. R. **Carta Insumos – Antibióticos na produção animal: restrições a vista?**. (2018) Disponível em: <https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/artigos/49629/carta-insumos---antibioticos-na-producao-animal:-restricoes-a-vista?.htm>. Acesso em: 2020.

- 1246 **53. MENDONÇA, E. P. Características de virulência, resistência e diversidade**
 1247 **genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública,**
 1248 **isolados de frangos de corte no Brasil.** Tese (doutorado). Universidade
 1249 Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
 1250 2016.
- 1251 **54. NAYLOR, N.R.; POUWELS, K.B.; HOPE, R.; GREEN, N.; HENDERSON, K.L.;**
 1252 **KNIGHT, G.M.; ATUN, R.; ROBOTHAM, J.V.; DEENY, S. A National Estimate of**
 1253 **the Health and Cost Burden of *Escherichia coli* Bacteraemia in the Hospital**
 1254 **Setting: The Importance of Antibiotic Resistance.** *bioRxiv*, p.1-18, 2017
- 1255 **55. OLIVEIRA SD, FLORES FS, SANTOS LR, BRANDELLI A. Antimicrobial**
 1256 **resistance in Salmonella Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food,**
 1257 **human and poultry-related samples.** *Int J Food Microbiol.*, v. 97, p.297-305.
 1258 2005.
- 1259 **56. Organização Mundial da Saúde - OMS. Antimicrobial resistance: global report on**
 1260 **surveillance.** Geneva: WHO Press., 2014. Available at: [http://www.](http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport)
 1261 [who.int/drugresistance/documents/surveillancereport](http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport).
- 1262 **57. PANDINI, J. P.; PINTO, F. G. S.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; MOURA, A. C.**
 1263 **Occurrence and antimicrobial resistance profile of Salmonella spp. serotypes**
 1264 **isolated from poultry farms in Paraná, Brazil.** *Arq. Inst. Biol.*, v.XX, n.X, p.1-6.
 1265 2014.
- 1266 **58. PEREIRA-MAIA, E.C.; SILVA, P.P.; ALMEIDA, W.B.; SANTOS, H.F.; MARCIAL,**
 1267 **B.L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral.**
 1268 **Química Nova**, v.33, p.700-706, 2010.
- 1269 **59. PINHEIRO, L.; ELO, R. T.; MENDONÇA, E. P.; COELHO, L. R.; MONTEIRO, G.**
 1270 **P.; ROSSI, D. A. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana de cepas de *Salmonella***
 1271 **spp. isoladas de granjas avícolas.** *Pubvet*, v. 4, n. 34. 2010.
- 1272 **60. QIAO, J.; ZHANG, Q.; ALLI, W. Q.; WANG, J.; MENG, L.; XIAO, Y.; YANG, H.;**
 1273 **CHEN, S.; CUI, S.; YANG. B. Characterization of extended-spectrum β -**
 1274 **lactamases (ESBLs)-producing Salmonella in retail raw chicken carcasses.**
 1275 **International Journal of Food Microbiology**, v.248, p. 72–81. 2017.
- 1276 **61. REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de**
 1277 **antibióticos usados na produção animal brasileira.** *Revista Brasileira Ciência*
 1278 **do Solo**, v. 34 p. 601-616. 2010.
- 1279 **62. RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.**
 1280 **Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras**
 1281 **clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas.** *Arquivo*
 1282 **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.60, n.5, pp.1259-1262,
 1283 2008.
- 1284 **63. ROCHA, J.S.R; LARA, L.J.C; BAIÃO, N. C. Aspectos éticos e técnicos da**
 1285 **produção intensiva de aves.** *Ciênc. vet. tróp.*, Recife-PE, v. 11, sup 1, p.49-55,
 1286 abril, 2008.
- 1287 **64. ROSSA, L. S.; STAHLKE, E. V.; DIEZ, D. C.; WEBER, S. H.; STERTZ, S. C.;**
 1288 **MACEDO, R. F. Resistência antimicrobiana e ocorrência ^ de micro-organismos**
 1289 **patogênicos e indicadores em frangos orgânicos e convencionais: estudo**
 1290 **comparativo.** *Biotemas*, vol. 26, no. 3, pp. 211–220, 2013.
- 1291 **65. ROWLANDS, R. E. G. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e genes de**
 1292 **virulência em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos associados**
 1293 **ou não à toxinfecções alimentares.** 2008. 111 f. Dissertação (Mestrado em
 1294 Bromatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São
 1295 Paulo.

- 1296 66. SCHILL, F.; ABDULMAWJOOD, A.; KLEIN, G.; REICH, F. Prevalence and
1297 characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -
1298 lactamase producing *Enterobacteriaceae* in fresh pork meat at processing level
1299 in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p.58-66.
1300 2017.
- 1301 67. SCHWARZ, S.; LOEFFLER, A.; KADLEC, K. Bacterial resistance to antimicrobial
1302 agents and its impact on veterinary and human medicine. **Veterinary**
1303 **Dermatology**, v. 28. 2017.
- 1304 68. SESA, Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. **Levantamento do uso e**
1305 **comercialização de medicamentos veterinários em frango de corte no**
1306 **Estado do Paraná**. Curitiba: SESA/ISEP, p. 16-17. 2005. Disponível em:
1307 https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-04/relatorio_levantamento_frango.pdf. Acesso em: 20 de dezembro de 2020.
- 1308 69. SHINOHARA, N. K. S.; DE BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E.
1309 C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. *Salmonella* spp., importante agente
1310 patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5,
1311 p.1675-1683. 2008.
- 1312 70. SILVA, A. C.; LACUZIO, R.; CÂNDIDO, T. J. S.; RODRIGUES, M. X.; SILVA, N.
1313 C. C. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e
1314 *Escherichia coli* isolados de carcaças de frangos: resistência a antibióticos e
1315 óleos essenciais. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.8, n.1,
1316 p.95-103. 2018.
- 1317 71. SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.;
1318 GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise**
1319 **microbiológica de alimentos**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017.
- 1320 72. SILVA, V. M.; BITELLO, A. R. Verificação da presença de *Salmonella* spp em
1321 alimentos minimamente processados em um Município do interior do rio grande
1322 do sul. **Revista Destaques Acadêmicos**, Lajeado, v. 8, n. 3. 2016.
- 1323 73. SILVA, W. T. M.; NUNES, R. U.; POZZA, P. C. Avaliação de inulina e prebiótico
1324 para frangos de corte. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 33, n.1, p. 19 –
1325 24. 2011.
- 1326 74. SOUZA, M. S.; BRITO, D. A. P.; MENCK-COSTA, M. F.; OBA, A.; KOBAYASH,
1327 R. K. T.; JUSTINO, L.; BAPTISTA, A. A. S. Multidrug resistant and ESBL-
1328 producing *Salmonella* spp. isolated from poultry. **Ciências Agrárias**, v. 40, n. 6,
1329 p.3045-3056. 2019.
- 1330 75. SU, L. H.; WU, T. L.; CHIU, C. H. Development of carbapenem resistance during
1331 therapy for non-typhoid *Salmonella* infection. *Clinical Microbiology and Infection.*,
1332 v.18, p.91-94. 2012.
- 1333 76. THOMSON, K. S. Controversies about Extended-Spectrum and AmpC Beta-
1334 Lactamases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2. 2001.
- 1335 77. THRELFALL, E. J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and
1336 perspectives in food and water-borne infections. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.26,
1337 n.2, p.141-8. 2002.
- 1338 78. TSAI, H. J.; HSIANG, P. H. The prevalence and antimicrobial susceptibilities of
1339 *Salmonella* and *Campylobacter* in ducks in Taiwan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 67, n. 1,
1340 p. 7-12. 2005.
- 1341 79. TURKI Y, MEHRI I, CHERIF H, NAJJARI A, BEN AISSA R, HASSEN A, et al.
1342 Epidemiology and antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovar Kentucky
1343 isolates from Tunisia: The new emergent multi-drug resistant serotype. **Food**
1344 **Research International.**, v. 45, p.925-930. 2012.
- 1345

- 1346 80. VAN BOECKEL, T.P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN,
1347 S. A.; ROBINSON T.P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in
1348 antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of**
1349 **Science**, v. 112, p. 5649-5654. 2015.
- 1350 81. VAN SEVENTER, J.M., HAMER, D.H. 2017. **Food Borne Disases,**
1351 **Encyclopedia, International Encyclopedia of Public Health** (Second Edition).
1352 pp 160-173.
- 1353 82. VAZ CSL, STRECK AF, MICHAEL GB, MARKS FS, RODRIGUES DP, DOS
1354 REIS EMF, et al. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica*
1355 subspecies enterica serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and
1356 poultry in southern Brazil. **Poultry Science**., v. 89, p.1530-1536. 2010.
- 1357 83. VAZ E.K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a
1358 suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, p.147-150. 2009.
- 1359 84. VOSS-RECH, D.; VAZ, C.S.L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J. A.;
1360 RODRIGUES, D. P.; BACK, A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes
1361 from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94, p.433-441. 2015.
- 1362 85. WHO, World Health Organization. **New report calls for urgent action to avert**
1363 **antimicrobial crisis**. (2019). Disponível em: [https://www.who.int/news-](https://www.who.int/news-room/detail/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis)
1364 [room/detail/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-](https://www.who.int/news-room/detail/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis)
1365 [antimicrobial-resistance-crisis](https://www.who.int/news-room/detail/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis). Acesso em: 18 de agosto de 2020.
- 1366 86. WHO, World Health Organization. **Antimicrobial Resistance**. (2020) disponível
1367 em: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 18
1368 de Agosto de 2020.
- 1369 87. WHO, World Health Organization. **Salmonella (non-typhoidal)**. (2018).
1370 Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acesso
1371 em: 18 de Setembro de 2020.
- 1372 88. WHO. World Health Organization. **High levels of antibiotic resistance found**
1373 **worldwide, new data shows**. (2018). Disponível em:
1374 [https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-](https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/)
1375 [found/en/](https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/). Acesso em: 18 de Agosto de 2020.
- 1376 89. YAP, P.S.X.; YIAP, B.C.; PING, H.C. Essential oils, a new horizon in combating
1377 bacterial antibiotic resistance. **The Open Microbiology Journal**, v.8, p.6-14.
1378 2014.
- 1379 90. ZHANEL G. G.; WIEBE, R.; DILAY, L.; et al. Revisão comparativa dos
1380 carbapenêmicos. *Drogas*, v.67, p.1027-1052. 2007.
- 1381 91. ZIECH, R. E ;LAMPUGNANI, C.; PERIN, A. P.; SERENO, M. J.; SSCIOTTE, R.
1382 A. P.; VIANA, C.; SOARES, V. M.; PINTO, J. P. A. N.; BERSOT, L. S. Multidrug
1383 resistance and ESBL-producing *Salmonella* spp. isolated from broiler processing
1384 plants. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 47, p.191-195. 2016.
- 1385 92. ZISHIRI, O. T.; MKHIZE, N.; MUKARATIRWA, S. Prevalence of virulence and
1386 antimicrobial resistance genes in *Salmonella* spp. isolated from commercial
1387 chickens and human clinical isolates from South Africa and Brazil. **Journal of**
1388 **Veterinary Research**, v. 83. 2016.
- 1389

1390 **9 TRABALHO CIENTÍFICO**

1391

1392 Trabalho a ser enviado para a revista Ciência Rural

1393

1394 As normas da revista estão disponíveis no link

1395 <https://www.scielo.br/revistas/cr/iinstruc.htm>

Comparação temporal do perfil de resistência *in vitro* aos antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. de carne de frango entre 2000 – 2020

Evelyn Fernanda Flores Caron¹ Patrícia Regina Lopes Melo ¹ Aryele Nunes da Cruz Encide Sampaio¹ Fábio Sossai Possebon¹ Juliano Gonçalves Pereira^{1*}

¹ Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu (UNESP), Distrito de Rubião Jr, SN, Botucatu, São Paulo, CEP 18618-681, Brasil. E-mail: juliano.pereira@unesp.br. Autor para correspondência.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi a avaliação *in vitro* do perfil de resistência aos antimicrobianos e investigar a presença de cepas MDR e beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) em isolados de *Salmonella* spp. de carcaças e cortes de frango refrigerados com aproximadamente 15 anos de intervalo. Ao total 87 isolados foram analisados, 63 isolados dos anos de 2004, 2005, 2006 e 24 isolados dos anos de 2019 e 2020. O perfil de resistência foi determinado pelo teste de disco difusão, avaliando o efeito de 13 antimicrobianos de nove classes diferentes. A produção de ESBL foi avaliada utilizando método fenotípico de confirmação através do teste de sinergismo de disco duplo (TSDD). As maiores taxas de multirresistência e ESBL apresentaram-se nos 24 isolados dos anos 2019 e 2020, sendo 18 isolados multidroga resistente e 15 ESBL, o perfil fenotípico de resistência mais prevalente foi ceftazidima-cefoxitina-ampicilina-tetracilina. Em contraste, nenhum dos isolados dos anos 2004, 2005 e 2006 não apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, cinco apresentaram resistência intermediária para ciprofloxacino, quatro para estreptomicina e apenas um para ertapenem. Neste estudo, observou-se que os isolados recentes de *Salmonella* spp. apresentam maior

1421 frequência de resistência quando comparado com os isolados antigos. Dados que contribuem
1422 com o debate sobre o aumento do número de bactérias resistentes e multirresistentes aos
1423 antimicrobianos.

1424 **Palavras-chave:** alimentos; multirresistência; patógenos; saúde pública.

1426 INTRODUÇÃO

1427 *Salmonella* spp. é um patógeno normalmente encontrado no ambiente de produção, e
1428 aves, suínos e bovinos são portadores em seu trato gastrointestinal. Agente etiológico de uma
1429 doença zoonótica, é dos principais micro-organismos envolvidos em casos de doenças
1430 veiculadas por alimentos, ocasionando em sérias implicações para saúde pública. É crescente a
1431 preocupação do consumidor em adquirir produtos que não causem danos para a saúde, assim
1432 como para o fornecedor e fabricante a oferta de produtos inócuos (MENDONÇA, 2006; SILVA
1433 et al., 2016).

1434 Os alimentos de origem animal, como carne bovina, suína, aves, ovos, mariscos e leite
1435 e produtos agrícolas não processados como hortaliças e frutas estão frequentemente
1436 incriminados em surtos de salmonelose (SHINOHARA et al., 2008; BRASIL, 2011). A
1437 contaminação de origem fecal ocorre nos produtos através da exposição à água contaminada,
1438 em leite e ovos, que pode ocorrer por meio da exposição direta e em carnes durante as operações
1439 de abate (CARVALHO; CORTEZ, 2005). A contaminação das carcaças com *Salmonella* spp.
1440 durante os procedimentos de abate e sua contaminação cruzada, resulta em grande desafio para
1441 diminuir os riscos para o consumidor final, uma vez que o consumo da carne de frango é
1442 apontado como um importante fator de risco para a ocorrência da doença em humanos (VOSS-
1443 RECH et al., 2015; THE EUROPEAN, 2017).

1444 Em 2019, a produção de carne de frango no Brasil foi de 13.245 milhões de toneladas,
1445 sendo 32 % da produção destinada à exportação e 68 % para o mercado interno, com o consumo

da carne da ordem de 42,84 kg/habitante. Os expressivos números de produção e consumo de carne de frango brasileira demonstram a demanda e a importância da produção animal para o agronegócio brasileiro (ABPA, 2019). Uma ferramenta de grande importância na cadeia produtiva de aves é o uso de aditivos na dieta dos animais, o que inclui os antimicrobianos. Estes são empregados para obter melhores taxas de sobrevivência, crescimento, reduzir cargas patogênicas, melhorar a saúde do trato gastrointestinal e, consequentemente, a eficiência alimentar. Há mais de 50 anos, os antimicrobianos têm sido utilizados para aumentar a produtividade e manter a saúde dos animais (BISCHOFF et al, 2004; SILVA, 2011).

Contudo, o uso prolongado e em baixas doses de antimicrobianos como promotores de crescimento em animais também origina preocupações, já que proporcionam o ambiente ideal para o aparecimento de cepas bacterianas resistentes. A resistência aos antimicrobianos representa um grande desafio para a saúde humana, e a presença de patógenos resistentes na cadeia de produção de alimentos é considerada alarmante (VAN BOECKEL et al., 2015).

O grande número de amostras de frango confirmadas para patógenos alimentares, demonstrando uma alta prevalência de isolados multirresistentes a antimicrobianos, a identificação de bactérias produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) em carne de frango e *Salmonella* spp. produtora de ESBL, são informações que reforçam a necessidade de maiores cuidados na produção, transporte e armazenamento dos produtos de origem animal, mas também evidencia a preocupação com a disseminação de bactérias resistentes na cadeia produtiva de alimentos (SILVA et al., 2018; STUART et al., 2012; THOMSON, 2001).

Considerando o impacto do Brasil como exportador de carne de frango e o consumo desta proteína de origem animal no país, *Salmonella* spp. sendo um dos principais micro-organismos envolvidos em casos de doenças veiculadas por alimentos e a emergência da multirresistência bacteriana; o presente estudo investigou a comparação temporal do perfil de

resistência *in vitro* aos antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. de carne de frango entre 2000 – 2020.

MATERIAL E MÉTODOS

Identificação dos isolados

Neste estudo foram utilizados 87 isolados de *Salmonella* spp., 21 isolados de amostras de produtos analisados em 2004, 22 em 2005, 20 em 2006 (estes denominados “antigos”; n=63), 14 em 2019 e 10 em 2020 (denominadas “novos”; n=24), pertencentes a bacterioteca do laboratório do Serviço de Orientação a Alimentação Pública (SOAP) da UNESP – Botucatu/SP; obtidos da análise microbiológica convencional de carcaças ou cortes de frango refrigerado. A pesquisa de *Salmonella* spp. seguiu o protocolo de Andrews *et al* (2016) de isolamento, identificação e caracterização do gênero das recomendações oficiais. Após a análise microbiológica, a confirmação do gênero *Salmonella* spp. foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real tendo como alvo o gene *invA*.

Teste de sensibilidade antimicrobiana

O perfil resistência aos antimicrobianos foi realizado pelo método de disco-difusão. Utilizou-se as recomendações da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para a seleção das classes, antibióticos e concentrações a serem utilizadas no estudo de perfil de resistência (CLSI, 2020). Deste modo, os antibióticos utilizados e suas respectivas classes foram: gentamicina 10 µg (GEN), estreptomicina 10 µg (EST) (aminoglicosídeos), ertapenem 10 µg (ETP), imipenem 10 µg (IPM), meropenem 10 µg (MER) (carbapenêmicos), ceftazidima 30 µg (CAZ) (cefalosporinas), cefoxitina 30 µg (CFO) (cefamicinas), ciprofloxacino 5 µg (CIP), norfloxacino 10 µg (NOR) (fluorquinolonas), trimetropim-sulfametoxazol 25 µg (SUT) (antagonista da via de folato), ampicilina 10 µg (AMP) (penicilinas), cloranfenicol 30 µg (CLO)

(anfenicóis) e tetraciclina 30 µg (TET) (tetraciclinas). Os isolados testados foram classificados como resistente, resistência intermediária ou sensível, baseado nas recomendações da CLSI (2020). Isolados que apresentaram resistência a três ou mais classes dos antibióticos foram considerados multidroga resistentes (MAGIORAKOS et al., 2012).

Método fenotípico de confirmação de ESBL

18 isolados que demonstraram multirresistência pelo método de disco difusão, foram analisados para produção de ESBL pelo teste de sinergismo de disco duplo (TSDD) que consiste em testar os isolados com discos de cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima), e um disco antimicrobiano contendo ácido clavulânico (amoxicilina + ácido clavulânico), para ser considerado ESBL positiva é necessário que ocorra expansão do halo de inibição do disco das cefalosporinas em direção ao disco de amoxicilina + ácido clavulânico, denominada “zona fantasma” (LABORCLIN, 2019).

RESULTADOS

Dos 63 isolados antigos, nenhum apresentou resistência aos antibióticos testados, cinco apresentaram resistência intermediária para ciprofloxacino, quatro para estreptomicina e apenas um isolado apresentou resistência intermediária ao ertapenem (Tabela1).

Dos 24 isolados de *Salmonella* spp. denominados novos, apenas dois foram sensíveis a todos os antibióticos testados. O princípio ativo com maior frequência de resistência dos isolados foi tetraciclina (87,50% de cepas resistentes), seguido por ceftazidima, cefoxitina e ampicilina (75%) e cloranfenicol (4,17%). Todos os isolados novos foram sensíveis à gentamicina, ertapenem, meropenem, norfloxacin e sulfazotrim.

Tabela 1. Frequência de isolados antigos e novos de *Salmonella* spp. obtidos de carne de frango com resistência a diferentes antimicrobianos.

Classe/Antibiótico		Perfil de resistência (n e %)					
		Isolados antigos (n=63)			Isolados novos (n=24)		
		R	I	S	R	I	S
Aminoglicosídeos	GEN	0 (0)	0 (0)	63 (100)	0 (0)	0 (0)	24 (100)
	EST	0 (0)	4 (6,35)	59 (93,65)	0 (0)	3 (12,50)	21 (87,50)
Carbapenêmicos	ETP	0 (0)	1 (1,78)	62 (98,42)	0 (0)	0 (0)	24 (100)
	IPM	0 (0)	0 (0)	63 (100)	0 (0)	1 (4,17)	23 (95,83)
	MER	0 (0)	0 (0)	63 (100)	0 (0)	0 (0)	24 (100)
Cefalosporinas	CAZ	0 (0)	0 (0)	63 (100)	18 (75)	0 (0)	6 (25)
Cefamicinas	CFO	0 (0)	0 (0)	63 (100)	18 (75)	0 (0)	6 (25)
Fluorquinolonas	CIP	0 (0)	5 (7,94)	58 (92,06)	0 (0)	12 (50)	12 (50)
	NOR	0 (0)	0 (0)	63 (100)	0 (0)	0 (0)	24 (100)
Antagonista da via do folato	SUL	0 (0)	0 (0)	63 (100)	0 (0)	0 (0)	24 (100)
Penicilinas	AMP	0 (0)	0 (0)	63 (100)	18 (75)	0 (0)	6 (25)
Anfenicóis	CLO	0 (0)	0 (0)	63 (100)	1 (4,17)	0 (0%)	23 (95,83)
Tetraciclinas	TET	0 (0)	0 (0)	63 (100)	21 (87,50)	1 (4,17)	2 (8,33)

R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível. GEN: Gentamicina; EST: Estreptomicina; ETP: Ertapenem; IPM: Imipenem; MER: Meropenem; CAZ: Ceftazidima; CFO: Cefoxitina; CIP: Ciprofloxacino; NOR: Norfloxacin; SUL: Sulfazotrim; AMP: Ampicilina; CLO: Cloranfenicol; TET: Tetraciclina.

Na Tabela 2 estão listados os perfis fenotípicos encontrados. Dos isolados resistentes, 72,72% apresentaram perfil de resistência à ceftazidima-cefoxitina-ampicilina-tetraciclina, 18,18% apenas à tetraciclina, 4,54% à ceftazidima-cefoxitina-ampicilina-cloranfenicol-tetraciclina e 4,54% à ceftazidima-cefoxitina-ampicilina. Além disso, 18 dos 24 isolados de *Salmonella* spp. novos foram considerados multidroga resistentes por apresentaram resistência simultânea a três ou mais classes testadas.

Tabela 2. Perfil fenotípico de resistência e multidroga resistência (MDR) de isolados novos de *Salmonella* spp. obtidas de carne de frango.

Perfil de resistência	N e %(n=22)	MDR
CAZ-CFO-AMP-CLO-TET	1 (4,54)	Sim
CAZ-CFO-AMP-TET	16 (72,72)	Sim
CAZ-CFO-AMP	1 (4,54)	Sim
TET	4 (18,18)	Não

MDR: Multidroga resistente (resistência a três ou mais classes de maneira simultânea), segundo MAGIORAKOS et al. (2012).

Dos 18 isolados de *Salmonella* spp. novos considerados multirresistentes pelo teste de disco difusão, 15 (83,33 %) apresentaram resultado positivo para produção de ESBL no teste de sinergismo de disco duplo, confirmando que 62,5 % dos 24 isolados novos de *Salmonella* são ESBL. Na Tabela 3 estão listados os perfis fenotípicos de resistência destes isolados positivos para ESBL.

Tabela 3. Perfil fenotípico de resistência dos isolados confirmados para ESBL através do teste de sinergismo de disco duplo.

Perfil fenotípico	N e % (n=15)
CAZ-CFO-AMP-TET	14/15 (93,33 %)
EST-CAZ-CFO-AMP-CLO-TET	1/15 (6,67 %)

EST: Estrepmicina; CAZ: Ceftazidima; CFO: Cefoxitina; CLO: Cloranfenicol; AMP: Ampicilina; TET: Tetraciclina

Os resultados do perfil de resistência (tamanho de zonas de inibição) foram analisados

utilizando a aplicação *Antibiotic Resistance Profiling* do programa Bionumerics. Esta análise permitiu a construção de um dendrograma contendo os *clusters* de acordo com a categorização de resistência (resistente, intermediário ou sensível).

Na Figura 1, é apresentado o dendrograma de similaridade dos isolados antigos e novos. É possível observar que esta análise produziu três *clusters*. O primeiro *cluster* contendo os isolados novos e multirresistentes (n=18), obteve grau de similaridade entre 80-82 % entre si, sendo este, dividido em dois subgrupos, num grupo contendo o isolado com perfil ceftazidima-cefoxitina-ampicilina-cloranfenicol-tetracilina e no outras os demais isolados multirresistentes (n=17). Estes 17 isolados apresentaram similaridade quanto ao perfil de resistência acima de 94%. O segundo grande *cluster* foi formado por isolados antigos e novos com grau de similaridade acima de 82 %. O terceiro *cluster* foi formado basicamente por isolados antigos (com exceção do isolado NEW-11, novo 11) e o grau de similaridade foi bastante variado.

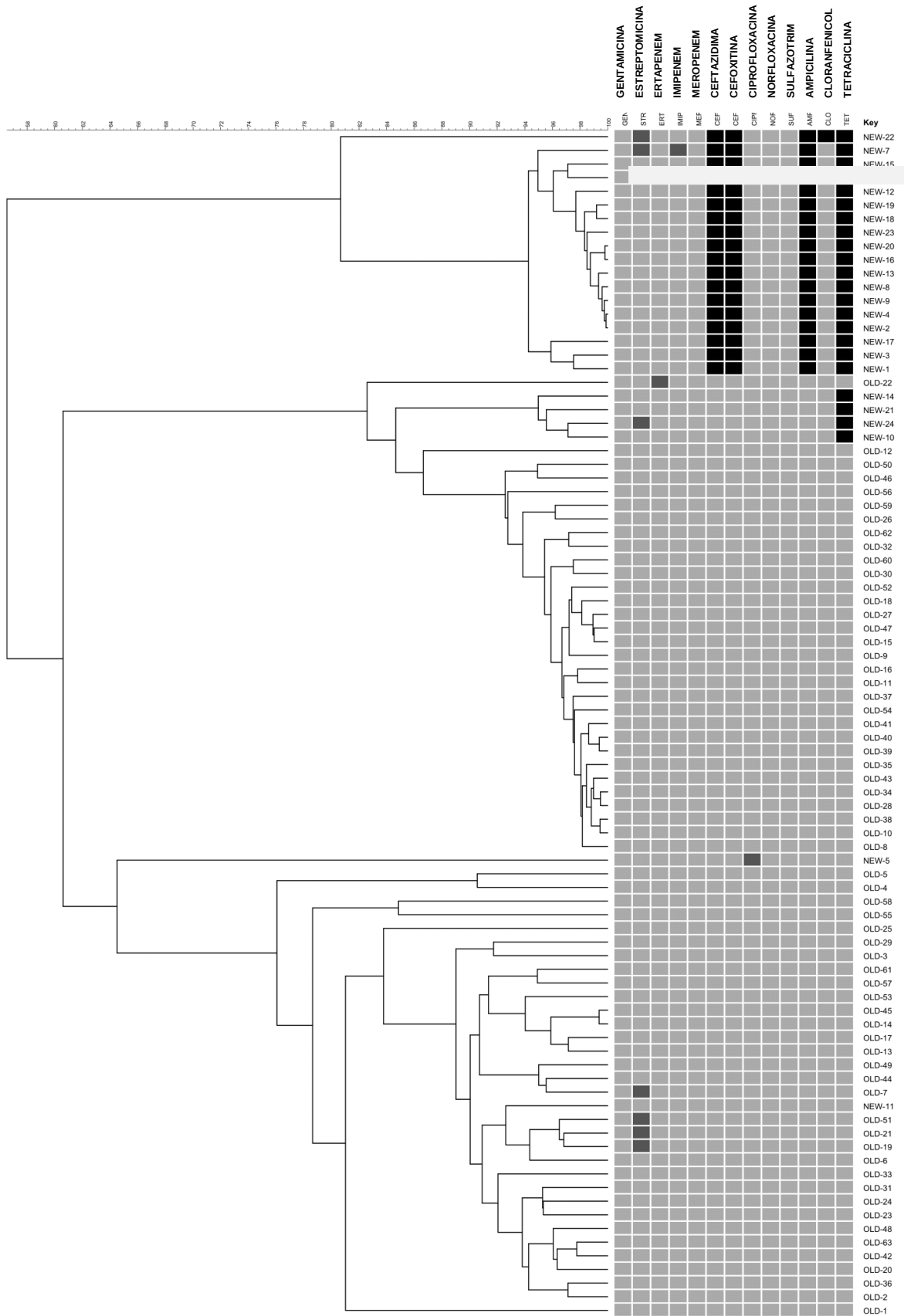


Figura 1. Dendrograma obtido da comparação do perfil de resistência de isolados antigos e novos de *Salmonella* spp. obtidas de carne de frango (Legenda: OLD: isolados antigos; NEW: isolados novos; ■: resistente; □: sensível; e ■: intermediário)

DISCUSSÃO

O elevado número de cepas de *Salmonella* spp. consideradas multirresistentes é um dos resultados mais relevantes em termos de saúde pública. Cepas multirresistentes envolvidas em surtos ou casos de doenças de origem alimentar podem comprometer o tratamento, uma vez que a escolha acertada de um antibiótico para quadros graves de salmonelose ficaria comprometida. Ressalta-se que, em casos leves da doença, a antibioticoterapia não é recomendada, pela ineficácia do tratamento quando a cepa envolvida é multirresistente ou pela indução à resistência, caso o tratamento não seja seguido de acordo com as prescrições médicas.

A resistência a tetraciclina foi a maior observada neste estudo o que corrobora com o estudo de Ribeiro et al. (2008) que detectaram 67,10 % resistentes a tetraciclina quando analisaram 79 cepas de *Salmonella* spp. O estudo de Rossa et al. (2013) analisou a resistência aos antibióticos em enterobactérias isoladas de carcaças de frango convencionais e orgânicas, e demonstrou que tetraciclina foi o antibiótico com maior frequência de resistência dos isolados em ambos os produtos, sendo 60,59 % em carcaças convencionais e 47,64 % em carcaças orgânicas. Conceição et al. (2007), também aponta que em produtos de frango, 65,8 % dos isolados apresentaram-se resistentes a tetraciclina. Fazendas de produção ou ambientes veterinários podem ter ocasionado o surgimento destas cepas através da utilização de antibióticos na alimentação dos animais e há a possibilidade de cuidadores de animais, fazendeiros e manipuladores de alimentos serem prováveis fontes de contaminação (DOYLE, 2015). No Brasil é vedada a utilização da tetraciclina na avicultura, seja como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009), porém em 2005 a Secretaria de Estado da Saúde do Paraná por meio de um estudo qualitativo apontou a utilização de medicamentos não recomendados para aves e o uso de medicamentos proibidos, entre eles a tetraciclina (SESA, 2005). O uso indiscriminado de tetraciclina em planteis pode ser indício da seleção de micro-organismos resistentes.

Resultados similares foram apresentados por Johnson et al. (2005) em isolados de produtos de origem animal no Canadá.

O estudo realizado por Zishiri et al. (2016), no Brasil, demonstrou que de 24 isolados de *Salmonella* spp. provenientes de frango de corte, todos apresentaram resistência, com resistência de 100 % (n=24) à ampicilina, amoxicilina e tetraciclina. Além disso, demonstrou também alta porcentagem de multirresistência, como por exemplo, 83 % (n=20) para ampicilina e tetraciclina; 80 % (n=16) ampicilina, amoxicilina e tetraciclina; 66,7 % (n=16) para amoxicilina e tetraciclina; 58 % (n=14) para tetraciclina e trimetoprima. No presente estudo, a ampicilina e a tetraciclina também apresentaram alta presença no perfil fenotípico de isolados MDR.

Salmonella Typhimurium multirresistente foi isolada pela primeira vez em 1964 no Reino Unido (Anderson, 1998). Durante a década de 1990 houve um aumento mundial acentuado no número de isolados desse sorovar com esse fenótipo (Threlfall, 2002). Rowlands (2008), relatou que 10,5 % dos isolados de *Salmonella* spp. de alimentos em 2008 apresentaram multirresistência. Pandini et al (2014) observou 25,6 % de multirresistência avaliando a ação de 12 antimicrobianos em 39 amostras de *Salmonella* spp. provenientes de granjas de frangos no estado do Paraná.

Almeida et al (2018) realizou o sequenciamento do genoma completo em 90 amostras de *Salmonella* Typhimurium isolados de humanos e alimentos entre 1983 e 2013, obteve um resultado de 38 cepas multirresistentes sendo 19 de humanos e 19 de alimentos. Costa et al (2013) avaliou a resistência antimicrobiana em 12.582 isolados de *Salmonella* spp. oriundos de carcaças e produtos avícolas, de diferentes regiões do Brasil entre 2007 e 2011, durante o período do estudo observou-se 16,4 % de multirresistência e aumento da resistência à ampicilina de 12,4 % a 18,9 %, tetraciclina de 15,2 % a 18,9 %. Em estudo recente, Souza et al. (2019), descreveram que 100 % dos isolados de *Salmonella* spp. de frangos foram

multirresistentes sendo amoxicilina, ampicilina, cefazolina, sulfanamida, tetraciclina e trimetropim foram os antimicrobianos de maior resistência percentuais.

As cepas produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) geralmente são multirresistentes, devido ao fato da maioria destas enzimas serem codificadas por genes situados em plasmídeos, que frequentemente transportam genes de resistência a outros antibióticos, como aminoglicosídeos, sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclinas e cloranfenicol (SOUSA et al., 2002). No presente estudo a pesquisa por cepas produtoras de ESBL apontou que 15 (83,33%) dos isolados MDR foram positivos para ESBL. Estudos como de Clemente et al. (2013), Ziech et al. (2016) e Qiao et al. (2017) demonstram como é cada vez mais comum a presença de *Salmonella* spp. produtora de ESBL em produtos destinados a alimentação humana e plantas de processamento de frango de corte. β -lactamases de espectro estendido apresentam um notável desafio para a terapia, devido sua capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de todas as gerações e monobactâmicos, levando a redução de opções na terapêutica. Carbapenêmicos apresentam estabilidade frente às ESBLs e são drogas de primeira escolha para no tratamento de infecções por microrganismos produtores de ESBL, com destaque para o meropenem (LENHARD-VIDAL, 2011; ZHANEL et al., 2007). Neste estudo não se observou mudança significativa do perfil de resistência aos carbapenêmicos, apenas um isolado antigo e um novo apresentaram resistência intermediária para esta classe farmacológica. Porém, Su et al. (2012) relata o desenvolvimento de resistência a Carbapenêmicos em um isolado de *Salmonella* Typhimurium proveniente de amostra clínica de um paciente com histórico de internações e dificuldade de escolha de antimicrobianos para o tratamento terapêutico devido a multirresistência já encontrada. O surgimento de cepas de *Salmonella* spp. resistentes aos carbapenêmicos representa grande problema clínico, pois para pacientes com infecção invasiva por este microrganismo multirresistente, os carbapenêmicos podem representar o último recurso de opção terapêutica (JEAN et al. 2005).

Em 2014 nos Estados Unidos da América (EUA), foi isolada uma cepa multirresistente de uma amostra de carne de frango, esta cepa apresentava um gene que não era comum entre *Salmonella* spp. de frango nos EUA. Porém, identificou-se essa cepa entre pessoas doentes retornando de viagens da América do Sul. Esta cepa resistente se espalhou rapidamente, e em 2018, era responsável por 25% das infecções por *Salmonella infantis* em pessoas. A maioria dessas pessoas infectadas não tinha histórico de viagens, mas havia consumido carne de frango recentemente. Ao mesmo tempo, identificou-se a crescente presença desta cepa em amostras de frango. Fatos como este demonstram a facilidade de disseminação de cepas resistentes, tanto em humanos como na cadeia de produção animal (CDC, 2019).

Os resultados dos estudos citados, juntamente com os do presente estudo que demonstram o alto percentual de cepas MDR que também se apresentam ESBL, apontam que com o passar dos anos a disseminação de cepas resistentes e multirresistentes vem se mostrando maior e cada vez mais facilitada, deixando evidente de que é necessário o monitoramento destes microrganismos em especial *Salmonella* spp. na cadeia de produção de aves.

CONCLUSÃO

Conclui-se que os isolados novos apresentaram maior frequência de resistência em comparação com os isolados antigos, sugerindo que, com o passar dos anos, *Salmonella* spp. pode ter adquirido resistência aos antimicrobianos testados. O uso inadequado destes agentes na medicina humana e medicina veterinária, pode ter influenciado para que isto ocorresse, assim como os mecanismos de indução à resistência que as bactérias podem possuir, como a produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido. Além disso, é necessário a realização de estudos genéticos para avaliar a presença de genes de resistência nestes isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Estatística do setor aves**. 2019. Disponível em: <https://abpa-br.org/mercados/> Acesso em: 15 de agosto de 2020.
2. ALMEIDA, F.; SERIBELLI, A. A.; MEDEIROS, M. I. C.; RODRIGUES, D. P.; VARANI, A. M.; LUO, Y.; ALLARD, M. W.; FALCÃO, J. P. Phylogenetic and antimicrobial resistance gene analysis of *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Brazil by whole genome sequencing. *Plos One*, v. 13, n. 8. 2018.
3. ANDERSON, A. D.; NELSON, J. M.; ROSSITER, S.; ANGULO, F. J. Public health consequences of use antimicrobial agents in foos animals in the United States. **Microb. Drug. Resist.**, v.9, n.4, p.373-379, 2003.
4. BISCHOFF, K.M., CALLAWAY, T.R., EDRINGTON, T.S., GENOVESE, K.J., CRIPPEN, T.L., NISBET, D.J. 2004. **Antimicrobial use in food animals: Potential alternatives**. In: Pond, W.G., Bell, A.W., editors. *Encyclopedia of Animal Science*. New York, NY: Marcel Dekker, Inc. p. 45-47
5. BRASIL – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa no 26, 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. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jul. 2009. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf>. Acesso em: 18 de novembro de 2020.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella*: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella***. Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. Brasília, 2011.
7. CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella* em carcaças de frango e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n.6, p. 1465-1468. 2005.
8. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Antibiotic resistance threats in the United States**. (2019). Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>. Acesso em: 20 de dezembro de 2020.
9. Clemente L, Manageiro V, Ferreira E, et al. Ocorrência de p-lactamases de espectro estendido entre isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* de animais e produtos alimentares destinados à alimentação humana, em Portugal. **IntJ Food Microbiol.**, v. 31, p. 221-228. 2013.
10. CONCEICAO, R. C. S.; HENTGES, A.; MOREIRA, A. N.; VASCONCELOS, A. A.; ANGELO, I. M. R.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A.; TIMM, C. D. Isolamento de *Salmonella* de produtos de frango e perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, v.66, p.31-34, 2007.
11. COSTA, R. G.; FESTIVO, M. L.; ARAUJO, M. S.; REIS, E. M. F.; LÁZARO, N. S.; RODRIGUES, D. P. Antimicrobial Susceptibility and Serovars of *Salmonella* Circulating in Commercial Poultry Carcasses and Poultry Products in Brazil. **Journal of Food Protection**, v.76, n.12, p. 2011-2017. 2013.
12. DOYLE, M.E. Multidrug-resistant pathogens in the food supply. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.12, n.4, p.261-279. 2015.
13. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY; DISEASE PREVENTION AND CONTROL. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **European Food Safety Authority Journal**, v.15, p. 5077. 2017.

14. 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.
15. JOHNSON, J. M.; RAJIC, A.; MCMULLEN, L. M. Antimicrobial resistance of selected *Salmonella* isolates from food animals and food in Alberta. **Can Vet J.**, v. 46, n. 2, p. 141- 146. 2005.
16. LABORCLIN Produtos para Laboratórios. **Manual de Antibiógrama 2019: Segundo BrCAST/EUCAST**. 2019. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/Manual-Antibiograma-BRCast-2019.pdf>.
17. Lactamases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2. 2001.
18. LENHARD-VIDAL, A.; CARDOSO, R. F.; DE PÁDUA, R. A. F.; SIQUEIRA, V. L. D. High prevalence rate of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) among Enterobacteriaceae in a small Brazilian public hospital. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4. 2011.
19. MAGIORAKOS A., SRINIVASAN R. B., CAREY Y., CARMELI M. E., FALAGAS C. G., GISKE S., HARBARTH J. F., HINDLER G., KAHLMEIER B., OLSSON-LILJEQUIST D. L., PATERSON L. B., RICE J., STELLING M. J., STRUELENS A., VATOPOULOS A., WEBER J.T., M. D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.
20. MENDONÇA, E. P. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil**. Tese (doutorado). Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2016.
21. PANDINI, J. P.; PINTO, F. G. S.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; MOURA, A. C. Occurrence and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* spp. serotypes isolated from poultry farms in Paraná, Brazil. **Arq. Inst. Biol.**, v.XX, n.X, p.1-6. 2014.
22. QIAO, J.; ZHANG, Q.; ALLI, W. Q.; WANG, J.; MENG, L.; XIAO, Y.; YANG, H.; CHEN, S.; CUI, S.; YANG, B. Characterization of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-producing *Salmonella* in retail raw chicken carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v.248, p. 72–81. 2017.
23. RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.60, n.5, pp.1259-1262, 2008.
24. ROSSA, L. S.; STAHLKE, E. V.; DIEZ, D. C.; WEBER, S. H.; STERTZ, S. C.; MACEDO, R. F. Resistência antimicrobiana e ocorrência ^ de micro-organismos patogênicos e indicadores em frangos orgânicos e convencionais: estudo comparativo. **Biotemas**, vol. 26, no. 3, pp. 211–220, 2013.
25. ROWLANDS, R. E. G. **Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e genes de virulência em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos associados ou não à toxinfecções alimentares**. 2008. 111 f. Dissertação (Mestrado em Bromatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
26. SESA, Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. **Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frango de corte no Estado do Paraná**. Curitiba: SESA/ISEP, p. 16-17. 2005. Disponível em: https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-04/relatorio_levantamento_frango.pdf. Acesso em: 20 de dezembro de 2020.

- 1765 27. SHINOHARA, N. K. S.; DE BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C.
1766 L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico
1767 veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p.1675-1683. 2008.
- 1768 28. SILVA, A. C.; LACUZIO, R.; CÂNDIDO, T. J. S.; RODRIGUES, M. X.; SILVA, N.
1769 C. C. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e
1770 *Escherichia coli* isolados de carcaças de frangos: resistência a antibióticos e óleos
1771 essenciais. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.8, n.1, p.95-103. 2018.
- 1772 29. SILVA, V. M.; BITELLO, A. R. Verificação da presença de *Salmonella* spp em
1773 alimentos minimamente processados em um Município do interior do rio grande do sul.
1774 **Revista Destaques Acadêmicos**, Lajeado, v. 8, n. 3. 2016.
- 1775 30. SILVA, W. T. M; NUNES, R. U; POZZA, P. C. Avaliação de inulina e prebiótico para
1776 frangos de corte. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 33, n.1, p. 19 – 24. 2011.
- 1777 31. SOUZA, M. S.; BRITO, D. A. P.; MENCK-COSTA, M. F.; OBA, A.; KOBAYASH,
1778 R. K. T.; JUSTINO, L.; BAPTISTA, A. A. S. Multidrug resistant and ESBL-producing
1779 *Salmonella* spp. isolated from poultry. **Ciências Agrárias**, v. 40, n. 6, p.3045-3056.
1780 2019.
- 1781 32. STUART, J. C.; MUNCKHOF, T. V.; VOETS, G.; SCHARRINGA, J.; FLUIT, A.;
1782 HALL, M. M.-V. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional
1783 retail chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.154, p.212–214.
1784 2012.
- 1785 33. SU, L. H.; WU, T. L.; CHIU, C. H. Development of carbapenem resistance during
1786 therapy for non-typhoid *Salmonella* infection. **Clinical Microbiology and Infection.**,
1787 v.18, p.91-94. 2012.
- 1788 34. THOMSON, K. S. Controversies about Extended-Spectrum and AmpC Beta-
1789 Lactamases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2. 2001.
- 1790 35. THRELFALL, E. J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and
1791 perspectives in food and water-borne infections. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.26, n.2,
1792 p.141-8. 2002.
- 1793 36. VAN BOECKEL, T.P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S.
1794 A.; ROBINSON T.P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in
1795 antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Science**,
1796 v. 112, p. 5649-5654. 2015.
- 1797 37. VOSS-RECH, D.; VAZ, C.S.L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J. A.;
1798 RODRIGUES, D. P.; BACK, A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes
1799 from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94, p.433-441. 2015.
- 1800 38. ZHANEL G. G.; WIEBE, R.; DILAY, L.; et al. Revisão comparativa dos
1801 carbapenêmicos. *Drogas*, v.67, p.1027-1052. 2007.
- 1802 39. ZIECH, R. E ;LAMPUGNANI, C.; PERIN, A. P.; SERENO, M. J.; SSCIOTTE, R. A.
1803 P.; VIANA, C.; SOARES, V. M.; PINTO, J. P. A. N.; BERSOT, L. S. Multidrug
1804 resistance and ESBL-producing *Salmonella* spp. isolated from broiler processing plants.
1805 **Brazilian Journal Microbiology**, v. 47, p.191-195. 2016.
- 1806 40. ZISHIRI, O. T.; MKHIZE, N.; MUKARATIRWA, S. Prevalence of virulence and
1807 antimicrobial resistance genes in *Salmonella* spp. isolated from commercial chickens
1808 and human clinical isolates from South Africa and Brazil. **Journal of Veterinary**
1809 **Research**, v. 83. 2016.