

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DOS PERFIS GENÔMICOS E DE RESISTÊNCIA À
ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *Salmonella*
Heidelberg**

**Andrei Itajahy Secundo de Souza
Biólogo**

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DOS PERFIS GENÔMICOS E DE RESISTÊNCIA À
ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *Salmonella*
Heidelberg**

Andrei Itajahy Secundo de Souza

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Microbiologia Agropecuária

2019

S729a

Souza, Andrei Itajahy Secundo de

Análise dos perfis genômicos e de resistência à antimicrobianos de estirpes de Salmonella Heidelberg / Andrei Itajahy Secundo de Souza.

-- Jaboticabal, 2019

50 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Mauro de Mesquita Souza Saraiva

1. Salmoneloses. 2. Resistência bacteriana a antibióticos. 3. Medicina veterinária. 4. Saúde pública. 5. Saúde animal. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE DOS PERFIS GENÔMICOS E DE RESISTÊNCIA À
ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *Salmonella* Heidelberg

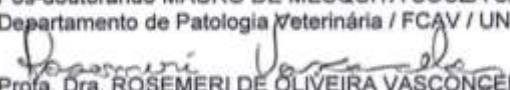
AUTOR: ANDREI ITAJAHY SECUNDO DE SOUZA

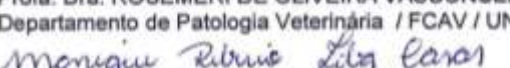
ORIENTADOR: ANGELO BERCHIERI JUNIOR

COORDENADOR: MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Pós-doutorando MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisadora Dra. MONIQUE RIBEIRO TIBA CASAS
Centro de Bacteriologia-Instituto Adolfo Lutz / São Paulo/SP

Jaboticabal, 02 de setembro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Andrei Itajahy Secundo de Souza – Nascido em 05 de outubro de 1994 no município de Duque de Caxias, Rio de Janeiro. No ano de 2012 ingressou no curso de graduação em Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) Câmpus de Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – obtendo o título de Licenciado em 2016 e Bacharel com ênfase em Biotecnologia em 2018. Durante a graduação desenvolveu atividades voltadas tanto para a área pedagógica quanto para a área envolvendo o bacharelado. Em abril de 2012, o aluno ingressou no laboratório de Ornitopatologia sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, sendo possível realizar duas iniciações científicas com bolsa (PIBIC Reitoria). No ano de 2014 realizou estágio extracurricular na empresa Biovet Vaxxinova localizada no município de Vargem Grande Paulista-SP atuando no setor Laboratório de Pesquisa. Em agosto de 2017, o aluno ingressou como aluno de mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária (UNESP, FCAV) sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior e coorientação do Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva. Em abril de 2019 foi contratado pela empresa BioCamp Laboratórios Ltda. ocupando o cargo de Analista de Pesquisa e Desenvolvimento.

“De gênio e louco, todo mundo tem um pouco!”

Augusto Cury

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho para aqueles que em nenhum momento duvidaram da minha capacidade, que em nenhum momento apresentaram contrários as minhas decisões. Aqueles que deixaram com que eu aprendesse com meus próprios erros e a ter poder sobre a tomada de decisão.

Claudio, Lia e Danrlei, conhecidos por mim como: Pai, Mãe e Irmão. Eu amo vocês. Obrigado por toda a paciência. Isto é por vocês!

AGRADECIMENTOS

Lembrar de todos aqueles que me ajudaram de alguma maneira durante o andamento do curso de Mestrado é algo fácil, afinal cada um me marcou de maneira positiva. Porém, se eu for citá-los, essa dissertação seria um estudo de caso sobre pessoas que me ajudaram e essa não é a intenção.

Primeiramente, eu agradeço a *minha família*: meus pais e meu irmão. Sem o apoio de vocês a realização da pós-graduação aqui não seria possível. Saibam que tudo o que fiz aqui é para orgulhá-los.

Agradeço também aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, em especial à *Gabriele Gricio, Gabriella Cavazzini, Gustavo de Moraes, Amanda Barbosa e Juliana Lemes*.

Ao *Laboratório de Ornitopatologia* da FCAV-UNESP, em especial, ao *Prof. Dr. Angelo Berchieri*, que me ajudou em diversos momentos e me ensinou os passos da pesquisa científica, muito obrigado! Ao *Dr. Mauro Saraiva*, o coorientador que veio realmente para somar e me dar uma luz em meio aos meus dados: um grande obrigado!

A *Dra. Marita Vedovelli Cardozo* (Laboratório de Microbiologia, FCAV – UNESP Jaboticabal) e a *Dra. Monique Ribeiro Tiba Casas* (Centro Bacteriológico do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo/SP) por todo o apoio e ajuda na realização deste trabalho, desde a bancada as análises. Muito obrigado!

Ao *Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas* (FCAV – UNESP Jaboticabal) por terem cedido o *software* utilizado para análises. Obrigado!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, *FAPESP*, pela concessão de bolsa e de todo o auxílio financeiro necessário para a realização deste Mestrado, processo nº 2017/25200-3.

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

Agradeço também à empresa *Biocamp Laboratórios Ltda.* pelo apoio fornecido em meio ao processo de escrita permitindo a conciliação do trabalho com o projeto de mestrado.

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária.

Se eu não o mencionei aqui, eu peço perdão. Mas, saibam que sou eternamente grato!

Obrigado!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Taxonomia do gênero <i>Salmonella</i> spp.	3
2.1.1 <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Heidelberg	4
2.2 Antimicrobianos.....	5
2.2.1 Classificação e modos de ação dos antimicrobianos	6
2.2.1.1 Antimicrobianos β -lactâmicos	7
2.2.2 Aquisição da resistência antibacteriana	8
2.2.3 Resistência antimicrobiana em <i>Salmonella</i> Heidelberg	10
2.2.4 Programas de monitoramento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos.....	11
2.3 Caracterização do perfil genético	12
2.3.1 Sequências Repetidas Conservadas	13
2.3.2 <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE).....	14
3. OBJETIVOS	16
3.1 Geral	16
3.2 Específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Estirpes utilizadas, armazenamento e local de experimentação	17
4.2 Extração de DNA.....	19
4.3 Confirmação do sorovar Heidelberg	19
4.4 Teste de susceptibilidade à antimicrobianos.....	20

4.4.1	Metodologia de disco e difusão em ágar	21
4.4.2	Metodologia de microdiluição em caldo.....	22
4.5	Pesquisa de genes de resistência β -lactâmicos	23
4.6	Avaliação do Perfil Genético	24
4.6.1	Sequências Repetidas Conservadas	24
4.6.2	PFGE	26
5.	RESULTADOS	27
5.1	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos	27
5.2	Pesquisa de genes de resistência aos β -lactâmicos	28
5.3	Perfil genético	29
5.3.1	Sequências Repetidas Conservadas	29
5.3.2	PFGE	34
6.	DISCUSSÃO.....	36
6.1	Resistência Fenotípica	36
6.2	Pesquisa de genes β -lactâmicos	38
6.3	Avaliação das metodologias de similaridade por perfil genético	38
7.	CONCLUSÃO	41
8.	REFERÊNCIAS	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Informações a respeito da fonte de isolamento, o local (município e estado) e o ano de isolamento das 62 amostras de <i>Salmonella</i> Heidelberg utilizadas no presente trabalho.....	p. 18
Tabela 02.	Informações sobre os antimicrobianos utilizados (classe pertencente, concentração e abreviação) para os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos (método de [1] disco e difusão e de [2] microdiluição em caldo).....	p. 21
Tabela 03.	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detectar a presença ou ausência de genes de resistência as β -lactamases.....	p. 23
Tabela 04.	Protocolo com a quantidade e concentração dos Protocolo utilizado para amplificação dos genes de resistência de β -lactamases.....	p. 24
Tabela 05.	Condições de amplificações para cada um dos genes de resistência de β -lactamase utilizado.....	p. 24
Tabela 06.	<i>Primers</i> ou Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para avaliação das sequências repetidas conservadas.....	p. 25
Tabela 07.	Protocolo com a quantidade e concentração dos reagentes utilizados na PCR para cada uma das metodologias empregadas na amplificação das sequências repetidas conservadas (ERIC, REP e BOX).....	p. 25
Tabela 08.	Condições de amplificações da PCR empregadas para as metodologias ERIC, REP e BOX.....	p. 25
Tabela 09.	Perfil fenotípico de suscetibilidade dos antimicrobianos testados encontrados nas 62 estirpes de <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	p. 29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Dendrograma de similaridade do perfil genético construído pelo método UPGMA utilizando os dados obtidos do método REP contendo as 62 estirpes de *Salmonella* Heidelberg..... p. 31
- Figura 02.** Dendrograma de similaridade do perfil genético construído pelo método UPGMA utilizando os dados obtidos do método ERIC contendo as 62 estirpes de *Salmonella* Heidelberg p. 32
- Figura 03.** Dendrograma de similaridade do perfil genético construído pelo método UPGMA utilizando os dados obtidos do método BOX contendo as 62 estirpes de *Salmonella* Heidelberg..... p. 33
- Figura 04.** Dendrograma de similaridade do perfil genético construído pelo método UPGMA utilizando os dados obtidos do método PFGE contendo as 62 estirpes de *Salmonella* Heidelberg..... p. 35

ANÁLISE DOS PERFIS GENÔMICOS E DE RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *Salmonella* Heidelberg

RESUMO – *Salmonella* Heidelberg (SH) é um dos sorovares do gênero *Salmonella* capaz de infectar tanto seres humanos quanto animais. Surtos infecciosos em seres humanos estão relacionados principalmente à ingestão de produtos de origem avícola e o tratamento é realizado com o uso de antimicrobianos. Entretanto, estas drogas também são utilizadas na produção avícola como melhoradores de desempenho, o que resulta em resistência bacteriana em SH, já relatada em literatura. Com isso, o objetivo deste estudo foi caracterizar 62 isolados de SH quanto ao fenótipo de resistência a 20 antimicrobianos; identificar o genótipo de resistência aos β -lactâmicos por meio da PCR; e avaliar a similaridade dos isolados utilizando as metodologias ERIC-PCR, REP-PCR, BOX-PCR e PFGE. Todas as estirpes de SH foram confirmadas por PCR e submetidas aos testes de sensibilidade a 20 antimicrobianos. A resistência foi observada em 16 dos 20 antimicrobianos utilizados, ressaltando a elevada resistência aos β -lactâmicos (CEF, FOX, AMP, CTX, AMX, AMC e IMP) com a identificação de 41 estirpes multirresistentes. A partir da PCR identificou-se genes codificadores de enzimas ESBL e AmpC, havendo predominância do gene *bla*_{CMY-2}. O PFGE demonstrou ser a metodologia com a maior diversidade em comparação as demais utilizadas, com a maioria das estirpes sendo agrupadas de acordo com a fonte de isolamento. A partir dos resultados deste estudo é possível observar a diversidade dos isolados de SH no Brasil albergando genes AmpC e apresentando diferentes perfis de multirresistência fenotípica, tornando SH uma preocupação para a saúde pública.

Palavras-chave: genes AmpC, genes ESBL, multirresistência, perfil de resistência, saúde pública.

ANALYSIS OF GENOMIC PROFILE AND RESISTANCE TO ANTIMICROBIALS IN *Salmonella* Heidelberg STRAINS

ABSTRACT – *Salmonella* Heidelberg (SH) is one of the serovars of the *Salmonella* genus capable of infecting both humans and animals. Infectious outbreaks in humans are mainly related to the consumption of products of poultry origin and the treatment is carried out with the use of antimicrobials. However, these drugs are also used in poultry production as performance enhancers, which results in bacterial resistance in SH, already reported in the literature. Thus, the aim of this study was to characterize 62 SH isolates regarding the phenotype of resistance to 20 antimicrobials; identify the genotype of resistance to β -lactams by means of PCR; and to evaluate the similarity of the isolates using the ERIC-PCR, REP-PCR, BOX-PCR and PFGE methodologies. All strains of SH were confirmed by PCR and subjected to sensitivity tests to 20 antimicrobials. Resistance was observed in 16 of the 20 antimicrobials used, highlighting the high resistance to β -lactams (CEF, FOX, AMP, CTX, AMX, AMC and IMP) with the identification of 41 multidrug resistant strains. From the PCR, genes encoding ESBL and AmpC enzymes were identified with a predominance of the blaCMY-2 gene. The PFGE proved to be the methodology with the greatest diversity compared to the others used with the majority of strains being grouped according to the isolation source. From the results of this study, it is possible to observe the diversity of SH isolates in Brazil harboring AmpC genes and presenting different profiles of phenotypic multidrug resistance, making SH a concern for public health.

Keywords: AmpC genes, ESBL genes, multidrug resistance, genetic profile; health public.

1. INTRODUÇÃO

As salmoneloses paratíficas aviárias não possuem hospedeiro específico e podem acometer tanto seres humanos quanto animais e, em casos mais graves, culminar em óbito. Os produtos de origem avícola são historicamente citados como fontes de infecção por *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Typhimurium (STM) em seres humanos, embora outros sorovares vem ganhando destaque nos últimos anos.

No ano de 2017, a União Europeia detectou a presença do gênero *Salmonella* em mais de 250 amostras de carne de frango importadas, sendo expressivo o número de amostras contaminadas pelo sorovar *S. Heidelberg* (SH). A SH configura, recentemente, entre os principais isolados em surtos de origem alimentar em seres humanos a partir do consumo de produtos de origem avícola, de leite e derivados e de carne suína e bovina.

Outro motivo de preocupação para a saúde pública e para o setor avícola é o padrão de multirresistência aos antimicrobianos que as estirpes de SH apresentam. A utilização de antimicrobianos, seja como melhorador de desempenho ou de forma profilática, promove o surgimento e o consequente aumento da quantidade de microrganismos resistentes, devido à pressão seletiva ao qual estes são submetidos. Assim, destaca-se a importância de medidas de biossegurança para prevenção e controle deste patógeno.

Além do exposto, a resistência encontrada em estirpes a campo é reportada em literatura e em sites renomados para notificação de patógenos, tais como, *Centers for Disease Control and Prevention*, *European Food Safety Authority* e *World Organisation for Animal Health*. Fato alarmante é a resistência cruzada demonstrada por patógenos notificados com antimicrobianos importantes para a saúde pública, trazendo a preocupação, não só com a saúde animal, mas também com a saúde humana.

Portanto, o presente trabalho objetivou identificar o perfil fenotípico de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, além de avaliar quatro diferentes

metodologias visando à similaridade genética como ferramenta para possível elucidação da epidemiologia de SH no Brasil.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Taxonomia do gênero *Salmonella* spp.

Espécimes do gênero *Salmonella* são bactérias Gram-negativas, apresentando morfologia do tipo bastonete e que possuem, em sua maioria, flagelos que conferem motilidade. Bioquimicamente não fermentam lactose, produzem o gás sulfeto de hidrogênio (H₂S) e são anaeróbios facultativos. Pertencem à família Enterobacteriaceae, assim como microrganismos dos gêneros *Escherichia*, *Shigella*, entre outros (Adeolu et al., 2016; Grimont et al., 2000). Acredita-se que *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* divergiram entre si, a partir de um ancestral comum há cerca de 120-160 milhões de anos (Bäumler, 1997). A similaridade genômica de ambas pode ser comprovada pelo mesmo autor, por meio da comparação de regiões conservadas utilizando à filogenia.

A taxonomia do gênero *Salmonella* é dividida em cinco níveis: 'gênero', 'espécie', 'subespécie', 'sorovar' e 'biovar'. Ao descrever deve-se sublinhar ou colocar em itálico os itens referentes ao 'gênero' (com a primeira letra maiúscula), 'espécie' e 'subsp.' (letras minúsculas); enquanto os níveis 'sorovar' e 'biovar' são descritos apenas com a primeira letra maiúscula (Berchieri Junior e Freitas Neto, 2009). As características que diferenciam o gênero *Salmonella* em níveis taxonômicos estão relacionadas a análises moleculares utilizando regiões gênicas conservadas – 16S rRNA e 23S rRNA –, análises sorológicas dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e de superfície (IV) e por testes bioquímicos complementares (Grimont et al., 2000; Berchieri Junior e Freitas Neto, 2009). Dessa forma, o gênero *Salmonella* é subdividido em duas espécies, *enterica* e *bongori*. A primeira engloba seis subespécies (subsp.), sendo elas: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Baseando-se nessa classificação, até o presente momento foram identificados 2659 sorovares de *Salmonella* spp., dos quais 1586 pertencem à subsp. *enterica*, incluindo 100 sorovares zoonóticos (Guibourdenche et al., 2010; Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

As salmoneloses aviárias são divididas em três enfermidades distintas: o tifo aviário, causado por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum; a pulorose, causada por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum e o paratifo aviário, causado por qualquer outro sorovar, incluindo *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Heidelberg ou, de forma simplificada, *Salmonella* Heidelberg (SH). Os dois primeiros microrganismos são hospedeiro-específicos de aves e, por outro lado, as salmonelas paratíficas podem infectar tanto os animais quanto os seres humanos, resultando em prejuízos econômicos para a indústria avícola e saúde pública (Berchieri Junior e Freitas Neto, 2009).

2.1.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Heidelberg

SH pertence ao sorogrupo B com a constituição antigênica somática 1, 4, 5 e 12 e flagelar r e 1, 2, segundo classificação do esquema *White-Kauffmann-Le Minor* (Grimont e Weill, 2007). Esse microrganismo causa doença não-tifoide em seres humanos e animais podendo induzir gastroenterite e septicemia (Chittick et al., 2006).

O primeiro caso em que SH foi identificado data de 1933, em uma criação de suínos, responsável por resultar em surto alimentar em 19 seres humanos e um óbito na cidade de Heidelberg, Alemanha (CDC, 2019). Desde então, SH tem sido isolado em vários países (CDC, 2013). No Brasil, há registros de seu isolamento desde 1962 (Hoffer et al., 1997).

A introdução desse patógeno em granjas comerciais pode ocorrer tanto por transmissão pela via vertical de aves reprodutoras infectadas (Zancan et al., 2000) como pela via horizontal, por meio do contato com animais silvestres ou do consumo de ração contaminada (Berchieri Junior et al., 1989). Estudo realizado por Pulido-Landínez et al. (2013) demonstrou que a incidência de SH no sul do Brasil foi de 40,6% das amostras positivas para *Salmonella* spp. provenientes de aves e do ambiente em que vivem.

Surtos de SH em seres humanos têm sido associados ao consumo de alimentos contaminados, como derivados de suínos, queijo, ovos e carne de frango

(Hennessy et al., 2004; Sausen, 2015). A variedade de fontes primárias de infecção ocorre por SH não ser um patógeno hospedeiro-específico, o que facilita a disseminação do mesmo (Sausen, 2015). No contexto de saúde pública, em alguns casos, a bactéria se desloca do trato intestinal para a via sistêmica, podendo causar até morte por septicemia. Esse quadro clínico severo muito se assemelha com aqueles resultantes de infecções por outros sorovares paratíficos, como *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (Chittick et al., 2006).

SH foi recentemente classificado como um dos principais agentes de doenças transmitidas por alimentos, tanto nos Estados Unidos da América (EUA) e Canadá (Foley e Lynne, 2008), como no Brasil (Borges, 2016). Nos dois primeiros é o sorovar mais comumente isolado em casos em humanos de salmoneloses veiculadas por alimentos (Nayak et al., 2007; Andrysiak et al., 2008; Foley e Lynne, 2008; Sausen, 2015).

2.2 Antimicrobianos

Em 1928, Alexander Fleming, ao notar a baixa multiplicação bacteriana de *Staphylococcus aureus* ao redor de um bolor, prosseguiu com o isolamento e posterior identificação do microrganismo e do agente inibidor. O fungo era o *Penicillium notatum* e o agente inibidor uma substância produzida como modo de defesa do microrganismo que posteriormente foi denominada de Penicilina, o primeiro antimicrobiano. A partir dessa descoberta, diversos microrganismos foram utilizados para a obtenção de diferentes agentes antimicrobianos que atuam impedindo outras espécies de se desenvolverem, estando relacionados com a sobrevivência no meio ambiente. Então, sabendo da ação efetiva frente as bactérias, os antimicrobianos passaram a ser utilizados para o tratamento de doenças infecciosas (Michigan State University, 2011).

Para que os antimicrobianos tenham o efeito desejado é importante que a concentração utilizada para o tratamento seja suficiente (Van Hoek et al., 2011). Além disso, devem ser capazes de atingir a molécula-alvo impedindo que os mecanismos de defesa do microrganismo o expulsem da célula; além de apresentar alto nível terapêutico e baixa toxicidade (Baptista, 2013).

Os antimicrobianos podem ser bacteriostáticos ou bactericidas. O bacteriostático inibe a multiplicação bacteriana, porém não ocasiona apoptose bacteriana, enquanto os bactericidas visam a destruição da bactéria com a sua posterior eliminação utilizando-se de fagócitos (Van Hoek et al., 2011; Baptista, 2013). Os antimicrobianos são necessários para o tratamento de doenças infecciosas, e não tem uso recomendado para fim de ganhos zootécnicos em produção animal (Laxminarayan et al., 2015). Dessa forma, a correta prescrição é somente para tratamentos terapêuticos.

Apesar dos esforços para minimizar o uso inadequado, ainda há a incorporação destes produtos em nutrição animal, para prevenção de doenças ou como melhorador de desempenho, o que pode induzir a resistência bacteriana aos antimicrobianos. As preocupações não se restringem a ineficácia no tratamento de doenças em animais de produção, mas também na ocorrência da transferência dessa resistência para bactérias que são patogênicas, tanto para os animais quanto para os seres humanos (Leonídio et al., 2015). Essa transmissão pode ocorrer por meio de diversas vias, contudo seres humanos que possuem contato direto com os animais são os mais susceptíveis (Woolhouse e Ward, 2013).

2.2.1 Classificação e modos de ação dos antimicrobianos

Os antimicrobianos são categorizados de acordo com seu mecanismo de ação e separados em cinco classes: (1) interferência na síntese da parede celular, (2) inibição da síntese de proteínas, (3) interferência na replicação e síntese de ácido nucléicos, (4) danos à membrana plasmática e (5) inibição das rotas metabólicas (Tenover, 2006; Van Hoek et al., 2011).

Dos antimicrobianos que interferem na síntese da parede celular podemos encontrar os β -lactâmicos, como: as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos que atuam sob as enzimas que participam do processo de formação da camada de peptidoglicanos (Bush e Bradford, 2016). Além dos β -lactâmicos, há também os glicopeptídeos que se ligam na posição terminal do resíduo D-alanina do peptidoglicano em processo de síntese, impedindo sua formação. Estas classes de

antimicrobianos não afetam as células eucarióticas, pois as mesmas não apresentam peptideoglicano em sua constituição, não ocasionando danos ao hospedeiro (Tenover, 2006).

A inibição da síntese de proteínas ocorre pela atuação das classes dos macrolídeos, aminoglicosídeos e tetraciclinas que se ligam a subunidade 30S do ribossomo bacteriano. O cloranfenicol, estreptograminas e oxazolidinonas também atuam no ribossomo, porém na subunidade maior, a 50S. A partir desta ação é possível inibir a multiplicação bacteriana (Kotra et al., 2000; Tenover, 2006).

A fluoroquinolona é a classe responsável por interferir na replicação e transcrição do DNA nos microrganismos, enquanto a rifampicina atua sob a síntese de RNA. Os antimicrobianos encarregados de atuar sob as membranas plasmáticas são as polimixinas. Sabe-se que o rompimento da membrana ocorre pela despolarização da camada lipídica havendo a inserção de um lipopeptídeo cíclico a cauda lipídica, resultando no aumento da permeabilidade e vazamento do conteúdo intracelular (Tenover, 2006).

A inibição das rotas metabólicas pode acarretar na síntese de substâncias que serão utilizados para a produção dos metabólitos essenciais. Como exemplo, a utilização do trimetoprim associado ao sulfametoxazol ao qual é capaz de inibir a síntese do ácido fólico por meio da interferência em duas possíveis vias de produção (Tenover, 2006).

2.2.1.1 Antimicrobianos β -lactâmicos

Neste trabalho, daremos foco aos antimicrobianos β -lactâmicos, devido a sua frequente utilização, seja na medicina humana ou animal (Paterson, 2006). Essa classe de drogas é subdividida em penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. Estes, atuam sob o grupo de proteínas de ligação a penicilina presente na bactéria, além de interferir na síntese de peptideoglicano, componente essencial da parede celular (Alcaine et al., 2007).

A penicilina refere-se ao grupo formado por mais de 50 antibióticos quimicamente relacionados, possuindo uma estrutura central comum, o anel β -

lactâmico, denominado de “núcleo”. Podem ser produzidas de forma natural (obtida diretamente de microrganismo do gênero *Penicillium*) ou semissintética (parte é produzida pelo *Penicillium* – “núcleo” – e a outra adicionada quimicamente) (Tenover, 2006; Alcaine et al., 2007; Van Hoek et al., 2011). As primeiras drogas de amplo espectro criadas dessa subclasse foram a ampicilina e a amoxicilina, objetivando sanar as desvantagens de produção das drogas naturais (Van Hoek et al., 2011).

Em comparação à estrutura das penicilinas, os carbapenêmos possuem um átomo de carbono ligado a uma cadeia pentacíclica não-saturada (anel carbapenema), ao qual um átomo de carbono é substituído por um de enxofre e uma ligação dupla é adicionada aos carbonos 2 e 3 (Papp-Wallace et al., 2011). Outras duas subclasses de β -lactâmicos são: monobactâmicos, antimicrobianos que apresentam apenas um único anel β -lactâmico, não ligados a nenhum outro anel, cuja principal droga disponível é o Aztreonam (Tortora et al., 2017); as cefalosporinas são drogas semissintéticas derivadas da cefalosporina C (produzida pelo *Cephalosporinum acremonium*), que se assemelham quimicamente às penicilinas, porém apresentam o ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) como núcleo central. As cefalosporinas podem ser agrupadas em gerações, de acordo com a cronologia da introdução do uso dessas drogas (Tenover, 2006; Tortora et al., 2017).

2.2.2 Aquisição da resistência antibacteriana

O microrganismo resistente a um determinado antimicrobiano é capaz de sobreviver em ambiente que possui um agente que inibe o correto funcionamento da célula bacteriana. Essa sobrevivência é permitida por meio da aquisição de mecanismos que farão com que o microrganismo se torne “imune”, ou melhor, resistente a um antimicrobiano (Hawkey, 1998; Tenover, 2006; Rowlands, 2008).

Há duas maneiras pela qual a aquisição do genótipo de resistência pode ocorrer: por transferência gênica vertical (TGV) ou horizontal (TGH). Há também a possibilidade de transferir diversos genes de resistência agrupados tanto no cromossomo quanto em plasmídios, ao qual podem resultar em multirresistência, caso os genes inseridos sejam de diferentes classes (Leonídio et al., 2015).

A TGV está relacionada às mutações no material genético cromossomal e/ou plasmidial, tendo por base a evolução filogenética. As mutações gênicas são correspondentes as deleções, inserções, inversões e reposições que podem acontecer ao longo da evolução do genoma (Marques, 2012) alterando a composição da estrutura do DNA (Baptista, 2013). Tais alterações são realizadas com o objetivo de buscar a sobrevivência do microrganismo, podendo ocorrer de forma espontânea ou induzida (Tenover, 2006; Marques, 2012).

A TGH refere-se à aquisição de genes por meio do compartilhamento entre bactérias, sejam elas da mesma espécie ou não. Podemos incluir os elementos genéticos móveis que facilitam a transferência e incorporação de genes de resistência dentro de genomas hospedeiros por possuírem sítios de ligação específicos para sua aderência (McManus, 1997; Tenover, 2006; Van Hoek et al., 2011). Como exemplo, podemos citar os plasmídios – elementos extracromossômicos de DNA que possuem como característica a capacidade de se autorreplicar de maneira autônoma e autocontrolada – e os *integrans* – unidades gênicas importantes na disseminação de resistência por serem móveis e por conseguirem se propagar ao longo das gerações bacterianas (Capuano, 2012; Marques, 2012). A TGH pode ocorrer de quatro maneiras distintas: por transformação, transdução, conjugação e/ou transposição.

O princípio de transformação é referente a aquisição e incorporação por células receptoras de material genético disponível no meio extracelular de células que sofreram apoptose. Na transdução, o transporte de segmentos de DNA é realizado via bacteriófagos – tipo de vírus composto por DNA ou RNA que infectam microrganismos procariotos – por meio da inserção de material genético extracelular que poderá seguir por dois caminhos: pela incorporação no DNA da bactéria ou replicação do material genético do bacteriófago (Marques, 2012). A conjugação é o processo que envolve a transferência de material genético pelo contato de uma bactéria doadora para uma bactéria receptora, o qual forma um *pilus* que propiciará a transferência de elementos gênicos (Tenover, 2006; Van Hoek et al., 2011; Marques, 2012; Roberts e Kreth, 2014). Já na transposição, genes que possuem sequências de inserção podem ser introduzidos em diferentes regiões do cromossomo e/ou plasmídio ou passados de um para o outro, plasmídio para cromossomo e vice-versa.

Transposons é a denominação que tais sequências de inserção recebem sendo de grande importância na disseminação da resistência (McManus, 1997).

2.2.3 Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Heidelberg

Dados sobre a quantidade utilizada de antimicrobianos e a resistência de microrganismos em animais de produção são escassos. Contudo, o assunto é mais aprofundado em países desenvolvidos como os EUA e aqueles pertencentes à União Europeia (UE) quando comparados com o Brasil (Bockma et al., 2014). Apesar da falta de informações, estima-se que o Brasil está entre os países que mais utilizam antibióticos na agropecuária, com perspectiva de crescimento deste uso nos próximos anos (Boeckel et al., 2015). Esta prática está diretamente associada ao surgimento de estirpes resistentes na produção animal (Aarestrup et al., 2004).

Vários estudos já demonstraram que os sorovares resistentes de *Salmonella* spp. são cada vez mais identificados na indústria avícola, incluindo SH (Musgrove et al., 2006; Álvarez-Fernández et al., 2012; Leonídio et al., 2015). Quando nos referimos a salmonelas paratíficas é possível encontrar estudos que apontam o sorovar Heidelberg como, atualmente, um dos mais preocupantes no setor avícola (Nayak et al., 2007; Andrysiak et al., 2008; Foley e Lynne, 2008; Sausen, 2015; Borges, 2016) por causar alta porcentagem de infecção sistêmica e mortalidade (Han et al., 2011).

Estudo conduzido por Zhao et al. (2008) avaliou a susceptibilidade de 298 isolados de SH a 15 antimicrobianos. Destes, 67% (n = 198) foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano; 16,4% (n = 49) resistentes a cinco; (3%) seis resistentes a nove. Além disso, observou-se predominância de resistência à tetraciclina em 39,9% dos espécimes e de 37,8% à estreptomicina.

Estirpes de SH multirresistentes aos antimicrobianos têm demonstrado resistência ao ceftiofur que é utilizado no primeiro dia de vida de pintainhos para o controle da mortalidade causada por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bem como, a ceftriaxona, cefalosporinas de terceira geração (Zhao et al., 2008; Dutil et al., 2010). O aumento da resistência as cefalosporinas tem sido relacionado à

disseminação da enzima AmpC β -lactamase codificada pelo gene *bla_{CMY}* inserido em plasmídios, facilitando a sua disseminação (Zhao et al., 2008; Lynne et al., 2009).

Estudo conduzido por Aarestrup et al. (2004) apontou que mais de 65% dos isolados testados foram resistentes, concomitantemente, a três ou mais classes de antimicrobianos, caracterizando-o como multirresistente. Esses mesmos autores observaram que vários dos genes de resistência aos antimicrobianos estavam localizados em plasmídios conjugativos, fato este abordado por Lynne et al. (2009) que destacaram que grandes plasmídios, acima de 75 kilo bases (kb), são os mais associados a multirresistência.

Han et al. (2011) identificaram a presença de grandes plasmídios, tais como IncA/C e IncI1, que albergavam múltiplos genes de resistência. Por isso, estirpes de SH tendem a causar infecção severa em gestantes e crianças, de difícil tratamento, devido à multirresistência aos antimicrobianos (Dutil et al., 2010). De acordo com Zao et al. (2008); Lynne et al. (2009) e Han et al. (2011) os genes mais frequentes para tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol, canamicina e ampicilina encontrados em isolados de campo são: *tetB*, *strA*, *floR*, *Kn* e *bla_{CMY}*, respectivamente.

Um fato interessante sobre a resistência genotípica, é que o gene pode estar presente no microrganismo, porém não ser observado nos testes fenotípicos de susceptibilidade. Isto, deve-se ao fato de que o mesmo pode não ter sido expresso por falta de fatores intrínsecos a resistência ou mutações genômicas. Lynne et al. (2009), por meio da pesquisa de genes de resistência, encontraram três genes responsáveis pelo antimicrobiano sulfisoxazol, porém não foi visualizado nos testes fenotípicos.

2.2.4 Programas de monitoramento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos

Em produção animal os antimicrobianos são utilizados como uma medida terapêutica contra doenças infecciosas. Entretanto, em alguns casos são administradas doses na ração, a fim de melhorar a conversão alimentar e o desempenho do animal, prevenindo também doenças provocadas pelo sistema

intensivo ao qual esses animais são submetidos. Porém, essas práticas são as principais causas de indução da resistência bacteriana aos antimicrobianos (Leonídio et al., 2015).

Tendo isso em vista foram criados programas que objetivam a conscientização e o controle do uso de antimicrobianos na produção animal, possuindo como base na premissa do aumento no surgimento de patógenos zoonóticos multirresistentes. Os órgãos internacionais *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), *World Organization for Animal Health* (OIE) e *World Health Organization* (WHO) desenvolveram o plano multisetorial de ação mundial denominado *One Health*, de modo a promover, em conjunto, o tripé “saúde humana-animal-ambiental”.

No ano de 2016 foi instaurado no Brasil a Comissão sobre Prevenção da Resistência aos Antimicrobianos em Animais (Brasil, 2016) ao qual elaborou o PanAgro (Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Agropecuária) e o AgroPrevine (Brasil, 2017). Anualmente são elaborados planos de amostragem para produtos de origem animal e gerados relatórios com os resultados obtidos com as análises.

2.3 Caracterização do perfil genético

A utilização de perfis genéticos permite o rastreamento e a diferenciação de estirpes geneticamente relacionadas em meio a surtos (Liebana et al., 2001). Pela utilização de metodologias que permitem a caracterização do perfil genético é possível obter respostas mais conclusivas a respeito da epidemiologia do patógeno (Fardsanei et al., 2016, a partir da comparação de perfis gerados).

A utilização de sondas de DNA, combinações de enzimas de restrição ou Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com iniciadores de regiões específicas, são técnicas precisas para identificação de estirpes, tornando o processo mais ágil. Porém, algumas das citadas exigem equipamentos e reagentes específicos e, conseqüentemente, geram maior custo para sua aplicação (Shi et al., 2015; Wattiau et al., 2011).

2.3.1 Sequências Repetidas Conservadas

REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) são sequências constituídas por 38 pares de base (pb). Destes, seis pb estão em posições degeneradas e outros cinco pb são variáveis em cada lado da sequência palíndroma (Stern et al., 1984). Já ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) são repetições de 126 pb, ao qual não se assemelham a nenhuma sequência de inserção já conhecida, seja de elementos transponíveis, plasmídios ou sequências fágicas e eucarióticas (Hulton et al., 1991).

As sequências BOX são elementos repetitivos compostos pela combinação de três subunidades denominadas boxA, boxB e boxC, com 59, 45 e 50 pb, respectivamente (Olive e Bean, 1999). Inicialmente, acreditava-se que os elementos BOX eram exclusivos de *Streptococcus pneumoniae*, porém Olive e Bean (1999) demonstraram que estes elementos estão presentes em um número variado de bactérias.

A natureza palindrômica altamente conservada destas sequências repetidas possuem capacidade de formar estruturas *stem-loop* e têm levado a múltiplas inferências para possíveis funções propostas para estes elementos aleatórios (Stern et al., 1984). De acordo com Lupski e Weinstock (1992) tais elementos estariam relacionados a evolução dos microrganismos com rearranjos no DNA - deleções, inversões e/ou duplicações. Além disso, supõem que as sequências repetidas podem influenciar na virulência do microrganismo.

A localização das sequências é variável de espécie para espécie. Contudo, são geralmente encontradas em regiões transcritas do genoma, em regiões intergênicas do *operon* policistrônico ou, ainda, em regiões não transcritas situadas na porção *upstream* ou *downstream* da sequência gênica (Versalovic et al., 1991).

Para aplicação, há a necessidade de utilizar a metodologia da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificação das sequências por meio de um par de oligonucleotídeos iniciadores que possuem como alvo sequências repetitivas não codificantes dispostas aleatoriamente no genoma de fungos e bactérias (Versalovic et al., 1991). BOX-PCR é uma exceção, visto que o mesmo possui apenas um

oligonucleotídeo iniciador, devido a orientação invertida das repetições no genoma (Lupski; Weinstock, 1992). A amplificação dos produtos é realizada utilizando eletroforese, constituindo um perfil genético que pode ser utilizado na discriminação de subespécies (Versalovic et al., 1991).

Leal (2010) relatou que desde 1991, as sequências ERIC, têm sido amplamente estudados em uma grande diversidade de microrganismos. A detecção de tais sequências altamente conservadas tem sido de grande valia para caracterização de enterobactérias (Rasschaert et al., 2005). Dombek et al. (2000) submeteram 208 isolados de *E. coli* a BOX-PCR e, aproximadamente, 74% (154) dos isolados produziram alta qualidade do perfil genético, ao utilizar o oligonucleotídeo iniciador BOXA1-R. Fendri et al. (2013) utilizou ERIC-PCR e PFGE em amostras de *Salmonella* spp. para avaliação da metodologia quanto ao seu índice discriminatório obtendo 0,85 e 0,95, respectivamente. Ressaltando que no dendrograma formado, as amostras foram agrupadas de acordo com o seu sorovar. Hashemi e Baghbani-arani (2014) compararam quatro metodologias de identificação de perfil genético, entre elas, REP, BOX e ERIC. O índice discriminatório obtido foi de 0.99 para REP, 0.98 para BOX e 0.98 para ERIC. Além disso, realizou a combinação das três metodologias, melhorando ainda mais o índice obtido inicialmente. Assim, o uso das técnicas citadas anteriormente poderiam ser uma alternativa para métodos de caracterização padronizados (Wise et al., 2009).

2.3.2 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

David Schwartz e Charles Cantor foram os responsáveis por desenvolver a metodologia do PFGE (*Pulsed-field Gel Eletrophoresis*) em 1984 (Schwartz; Cantor, 1984). A metodologia é atualmente considerada como padrão-ouro para utilização em investigações epidemiológicas, devido ao seu protocolo padronizado pelo PulseNet e pela eficácia em distinção dos perfis genéticos (Ribot et al., 2006).

O método permite avaliar as diferentes alterações – mutações, inserções e deleções – que podem atingir os fragmentos de DNA (Tenover et al., 1995). Diferente das sequências repetidas conservadas citadas no tópico acima, o PFGE utiliza

endonucleases de restrição que clivam o DNA em sítios específicos, permitindo a fragmentação da sequência e visualização em eletroforese de campos alternados de voltagem utilizando gel de agarose (Shi et al., 2015; Wattiau et al., 2011). As enzimas utilizadas são provenientes de diferentes microrganismos, a mais indicada para uso em estudos com o gênero *Salmonella* é a enzima XbaI, ao qual é derivada do microrganismo *Xanthomonas badrii* com corte da enzima tipo adesivo (Shi et al., 2015; Wattiau et al., 2011). Diferentes parâmetros devem ser considerados para que obtenha um resultado satisfatório, como: tamanho do DNA, porcentagem da agarose, concentração do tampão utilizado para eletroforese, voltagem aplicada, tempo de pulso e tempo de corrida (Magalhães et al., 2005).

Em estudo conduzido por Fendri et al. (2013), ao utilizar o PFGE em 45 amostras do gênero *Salmonella*, obtiveram um índice discriminatório de 0.94 e 13 perfis distintos de macrorrestrição, recomendando a metodologia para sorotipagem do gênero. Celis-Estupiñan et al. (2017) submeteu 45 estirpes de *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum (SG) ao PFGE obtendo 13 perfis distintos e verificando a presença de estirpes endêmicas no Brasil. Seo et al. (2006) comparou os métodos do PFGE e RAPD para avaliar a relação genética entre as 38 estirpes de SG isoladas de diferentes regiões. Como resultado, verificou-se que o PFGE teve um poder discriminatório maior que o RAPD, demonstrando que o PFGE é mais confiável que o RAPD para diferenciação de estirpes de SG.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar os perfis de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, além de avaliar diferentes metodologias de similaridade para elucidar a epidemiologia de estirpes de SH no Brasil.

3.2 Específicos

- Caracterizar o perfil de resistência à antimicrobianos das estirpes de SH, por meio dos testes de difusão de disco em ágar.
- Identificar os genes de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos presentes nas estirpes de SH.
- Caracterizar o perfil fenotípico da Polimixina proposta, por meio do teste de concentração inibitória mínima.
- Utilizar as metodologias moleculares ERIC, REP, BOX e PFGE para caracterizar a similaridade das estirpes de SH.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estirpes utilizadas, armazenamento e local de experimentação

Sessenta e duas estirpes de SH foram utilizadas (Tabela 01) neste estudo. Vinte e duas delas foram provenientes da bacterioteca pertencente ao Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP Câmpus de Jaboticabal; 40 estirpes oriundas do Instituto Adolfo Lutz (Centro de Bacteriologia, Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais).

Todas as estirpes foram armazenadas em Ultra Freezer de Baixa Temperatura (MCF-U33V-PA, Panasonic) a -80°C até o seu uso. Todas as etapas experimentais foram realizadas nas instalações da FCAV/ UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

As estirpes foram categorizadas de acordo com sua fonte de isolamento. As categorizadas como “Ambiente avícola” são aquelas provenientes de suabes de arrasto do galpão, de comedouro, do bebedouro e da cama; as categorizadas como “Frango” são aqueles diretamente do animal, estando o mesmo vivo; as identificadas como “Produto cárneo (aves)” são as estirpes oriundas de produtos avícolas prontos para consumo.

Tabela 01. Informações a respeito da fonte de isolamento, o local (município e estado) e o ano de isolamento das 62 amostras de *Salmonella* Heidelberg utilizadas no presente trabalho.

Amostra	Fonte de isolamento	Local (município/estado)	Ano de isolamento
SH 01	Ambiente avícola	*	2002
SH 02	Ambiente avícola	*	2003
SH 03	Ambiente avícola	*	2004
SH 04	Ambiente avícola	*	2006
SH 05	Ambiente avícola	PR	2010
SH 06	Ambiente avícola	PR	2012
SH 07	Ambiente avícola	PR	2014
SH 08	Ambiente avícola	SC	2015
SH 09	Ambiente avícola	*	2008
SH 10	Ambiente avícola	*	2008
SH 11	Ambiente avícola	*	2005
SH 12	Ambiente avícola	*	1983
SH 13	Ambiente avícola	*	1984
SH 14	Ambiente avícola	*	2000
SH 15	Ambiente avícola	*	2003
SH 16	Ambiente avícola	*	2004
SH 17	Ambiente avícola	*	2004
SH 18	Ambiente avícola	*	2005
SH 19	Ambiente avícola	*	2005
SH 20	Ambiente avícola	*	2006
SH 21	Ambiente avícola	Londrina/PR	2012
SH 22	Ambiente avícola	Cascavel/PR	2012
SH 23	Produto cárneo (aves)	São Paulo/SP	2014
SH 24	Produto cárneo (aves)	São Paulo/SP	2014
SH 25	Produto cárneo (aves)	São Paulo/SP	2014
SH 26	Produto cárneo (aves)	São Paulo/SP	2014
SH 27	Produto cárneo (aves)	São Paulo/SP	2014
SH 28	Produto cárneo (aves)	São Paulo/SP	2014
SH 29	Produto cárneo (aves)	São Paulo/SP	2014
SH 30	Frango	São Paulo/SP	2014
SH 31	Frango	São Paulo/SP	2014
SH 32	Frango	São Paulo/SP	2014
SH 33	Frango	São Paulo/SP	2014
SH 34	Frango	São Paulo/SP	2014
SH 35	Ambiente avícola	Campinas/SP	2014
SH 36	Ambiente avícola	Campinas/SP	2014
SH 37	Ambiente avícola	Campinas/SP	2014
SH 38	Ambiente avícola	Campinas/SP	2014
SH 39	Ambiente avícola	Campinas/SP	2014
SH 40	Produto cárneo (aves)	São Paulo/SP	2015
SH 41	Ambiente avícola	Londrina/PR	2015
SH 42	Ambiente avícola	Uberlândia/MG	2015

Tabela 01 (continuação)

SH 43	Ambiente avícola	São Paulo/SP	2017
SH 44	Ambiente avícola	São Paulo/SP	2017
SH 45	Frango	Avaré/SP	2016
SH 46	Frango	Avaré/SP	2016
SH 47	Frango	Avaré/SP	2016
SH 48	Frango	Avaré/SP	2016
SH 49	Frango	Avaré/SP	2016
SH 50	Produto cárneo (aves)	Avaré/SP	2018
SH 51	Produto cárneo (aves)	Avaré/SP	2018
SH 52	Produto cárneo (aves)	Avaré/SP	2018
SH 53	Produto cárneo (aves)	Avaré/SP	2018
SH 54	Produto cárneo (aves)	Avaré/SP	2018
SH 55	Produto cárneo (aves)	Avaré/SP	2018
SH 56	Produto cárneo (aves)	Avaré/SP	2018
SH 57	Produto cárneo (aves)	Avaré/SP	2018
SH 58	Produto cárneo (aves)	Avaré/SP	2018
SH 59	Produto cárneo (aves)	Avaré/SP	2018
SH 60	Produto cárneo (aves)	Avaré/SP	2018
SH 61	Produto cárneo (aves)	Avaré/SP	2018
SH 62	Produto cárneo (aves)	Avaré/SP	2018

*Isolados cuja localização não foi divulgada

4.2 Extração de DNA

A extração do DNA bacteriano foi realizada utilizando kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme recomendações do fabricante. A verificação da qualidade do DNA extraído foi realizado em aparelho eletroforese (Bio-Rad Laboratories, EUA) com visualização sob luz UV em aparelho fotodocumentador Gel Doc EZ Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories, EUA). A quantificação do DNA foi aferida por meio do espectrofotômetro DeNovix DS-11+ (DeNovix Inc., Delaware, EUA).

4.3 Confirmação do sorovar Heidelberg

A PCR convencional específica para SH foi realizada de acordo com Park e Ricke (2014) com modificações. A região gênica amplificada codifica uma enzima de

restrição do tipo II, subunidade da metilase, específica de SH (número de acesso ao GenBank: ACF69659.1). Para tanto, 20 µL do total da reação eram compostos por 4 µL de 5x FIREPol Master Mix com 12.5 mM MgCl² (Solis BioDyne, EUA), 50 µM dos oligonucleotídeos (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA), 1 µL de DNA e água ultra-pura (Sigma Aldrich, EUA), em quantidade suficiente para (q.s.p.) completar a reação. As condições da PCR foram realizadas em aparelho termociclador MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, EUA,) nas seguintes especificações: um ciclo de desnaturação inicial à 95 °C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, pareamento a 60°C por 20 segundos e extensão da nova fita de DNA a 72°C por 20 segundos; e, por último, um único ciclo de extensão a 72°C por 5 minutos. A sequência dos iniciadores utilizados foi: direto SH-F (5'- TGT TTG GAG CAT CAT CAG AA – 3') e reverso SH-R (5' – GCT CAA CAT AAG GGA AGC AA – 3') (Park e Ricke, 2014).

Em seguida, 5 µL de cada amostra amplificada foi misturada em 1 µL de corante Gel Red Nucleic Acid Stain (Biotium, Califórnia, EUA) na diluição de 1:500 acrescido de 1 µL de tampão de corrida Loading Dye (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, EUA). Ademais, em cada uma das reações realizadas foi utilizado um controle da reação que permitiu a visualização de possíveis contaminantes e inibidores, substituindo o material genético por água ultrapura em mesma quantidade. De modo a identificar o tamanho molecular dos *amplicons* gerados, foram utilizados 5 µL de marcador molecular de 100 pares de base (pb) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, EUA), acrescido de 2 µL de Gel Red Nucleic Acid Stain. Dessa forma, a eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5% (Sigma Aldrich, EUA) sob as condições de 5V/cm da cuba (Bio-Rad Laboratories, EUA) por 1 hora. Após a corrida eletroforética, o gel foi submetido a luz UV em aparelho fotodocumentador Gel Doc EZ Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories, EUA) para a visualização dos *amplicons*.

4.4 Teste de susceptibilidade à antimicrobianos

As estirpes de SH foram submetidas ao teste de disco e difusão em ágar Mueller-Hinton proposto por Bauer et al. (1966), de modo a avaliar a susceptibilidade

aos antimicrobianos (Tabela 02). O procedimento foi realizado conforme o preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (CLSI, 2017). Para a Polomixina E foi realizado o teste de concentração mínima inibitória (*Minimum Inhibitory Concentration* - MIC), por microdiluição em caldo em razão da pouca capacidade de difusão da molécula em disco (Thamlikitkul e Tiengrim, 2014).

Os resultados do antibiograma foram avaliados seguindo as recomendações do CLSI (2017) e utilizado como controle de qualidade a estirpe de *Escherichia coli* ATCC 25922. As estirpes resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos foram classificadas como multirresistentes.

Tabela 02. Informações sobre os antimicrobianos utilizados (classe pertencente, concentração e abreviação) para os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos (método de [1] disco e difusão e de [2] microdiluição em caldo).

Classe	Antimicrobiano	Concentração	Sigla	Metodologia
Quinolonas e fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	5 µg	Cip	1
	Ácido Nalidíxico	30 µg	Nal	
	Enrofloxacin	5 µg	Enr	
	Norfloxacin	10 µg	Nor	
Aminoglicosídeos	Amicacina	30 µg	Ak	1
	Canamicina	30 µg	Ka	
	Estreptomicina	10 µg	S	
	Gentamicina	10 µg	Gm	
β-lactâmico (Penicilinas)	Ampicilina	10 µg	Amp	1
	Amoxilina	10 µg	Amx	
β-lactâmico (Carbapenênicos)	Imipenem	10 µg	Imp	1
β- lactâmico (Cefalosporinas)	Ceftiofur	30 µg	Cef	1
	Cefotaxima		Ctx	
	Cefoxitina	30 µg	Fox	
Combinação de β-lactâmico com inibidor de β-lactamase	Amoxilina-clavulanato	20/10 µg	Amc	1
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	300 µg	Nit	1
Fenicolis	Cloranfenicol	30 µg	C	1
Tetraciclina	Tetraciclina	30 µg	T	1
Inibidores de vias metabólicas	Trimetoprim-sulfamethoxazol	1.25/23.75 µg	Sxt	1
Polimixina	Colistina	-	Pe	2

4.4.1 Metodologia de disco e difusão em ágar

As estirpes foram submetidas à multiplicação bacteriana em caldo LB (Difco™, Brasil) à 37 °C por 18 h, sob agitação. Após a incubação, foram estriadas pelo método de esgotamento em placas de Petri contendo ágar LB e incubadas a 37 °C por 24 horas. Uma a duas colônias foram inseridas em solução salina estéril 0,85% e comparadas com o grau 0,5 da escala MacFarland, até diluição correspondente a, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (CLSI, 2017). Com o auxílio de um suabe estéril, a solução bacteriana preparada em solução salina 0,85% foi despejada e espalhada de maneira uniforme em placas de Petri contendo 30 mL de ágar Mueller-Hinton (Sigma-Aldrich®, USA). Em seguida, foram inseridos os discos de antimicrobianos e submetidos a incubação por 18h horas à 37°C. Para a interpretação dos resultados foi realizado a medição do halo formado com o auxílio de uma régua graduada e seu diâmetro analisado de acordo com o preconizado pelo CLSI (2017) e classificados como sensíveis ou resistentes. A estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade do teste.

4.4.2 Metodologia de microdiluição em caldo

O teste de microdiluição em caldo foi aplicado para aferir a susceptibilidade das estirpes a Polimixina E (Thamlikitkul e Tiengrim, 2014). A suspensão bacteriana foi preparada – do mesmo modo que a metodologia de disco e difusão em ágar –. O antimicrobiano foi preparado do sulfato de colistina à 100 % (Sigma-Aldrich®, USA) utilizando água estéril como solvente com o objetivo de adquirir uma concentração final de 1 mg/mL. A amostra foi acrescida em caldo Mueller-Hinton (Oxoid®, UK) contendo a solução do antimicrobiano em diferentes concentrações (32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 e 0,125 µg/mL). A incubação foi realizada por 18 horas à 37 °C. Após esse período, foi verificado a presença ou não de multiplicação bacteriana para cada diluição do antimicrobiano. A estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade do teste. O ponto de corte para a Colistina foi de menor ou igual a 2 µg/mL.

4.5 Pesquisa de genes de resistência β -lactâmicos

A presença de genes que conferem resistência aos β -lactâmicos foi avaliada utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 03). O protocolo contendo as quantidades e concentrações dos reagentes utilizados estão descritos nas Tabelas 04 e 05. Para visualização dos fragmentos foram acrescentados 5 μ L do produto amplificado junto com 1 μ L do Loading Dye Buffer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) e aplicado em gel de agarose (Sigma-Aldrich, USA) corado com SyBr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). A corrida eletroforética ocorreu nos seguintes parâmetros: 4V/cm por 45 minutos. Após, o gel foi submetido a luz UV em aparelho fotodocumentador Gel Doc EZ Documentation System (Bio-Rad Laboratories, USA).

Tabela 03. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detectar a presença ou ausência de genes de resistência as β -lactamases.

Caracterização	Gene	Sequência (5' > 3')	Tamanho (pares de base)	Referência
ESBL	<i>bla</i> _{TEM-1}	GCACGAGTGGGTTACATCGA GGTCCTCCGATCGTTGTCAG	310	Carlson et al., 1999
	<i>bla</i> _{SHV}	GGGTTATTCTTATTTGTCGC TTAGCGTTGCCAGTGCTC	930	Saraiva et al., 2018
	<i>bla</i> _{CTX-M}	SCSATGTGCAGYACCAGTAA CCGCRAT ATGRTTGGTGGTG	554	Saraiva et al., 2018
	<i>bla</i> _{PSE-1}	TTTGGTTCCGCGCTATCTG TACTCCGAGCACCAAATCCG	150	Perez et al., 2002
	<i>bla</i> _{OXA-2}	ATGGCAATCCGAATCTTCGC TTATCGCGCAGCGTCCGAGT	650	Perez et al., 2002
ampC	<i>bla</i> _{CMY (MOX)}	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT CACATTGACATAGGTGTGGTGC	520	Carlson et al., 1999
	<i>bla</i> _{CMY-2 (CIT)}	TGGCAAGAACTGACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462	Perez et al., 2002
	<i>bla</i> _{FOX}	AACATGGGGTATCAGGGAGATG CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190	Casin et al., 1999
Carbapenemases	<i>bla</i> _{OXA-48}	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG	438	Poirel et al., 2011
	<i>bla</i> _{NDM}	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	621	Poirel et al., 2011

Tabela 04. Protocolo utilizado para amplificação dos genes de resistência de β -lactamases.

Reagentes	Oligonucleotídeos iniciadores						
	CTX-M	SHV	MOX* FOX* CIT [#]	TEM-1	PSE	OXA-2	NDM OXA-48
¹ Buffer	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X
¹ MgCl ₂	3 mM	3 mM	1.5 mM	3 mM	3 mM	1.5 mM	1.5 mM
¹ dNTP	200 μ M	200 μ M	200 μ M	200 μ M	200 μ M	200 μ M	125 μ M
¹ Oligonucleotídeos iniciadores (cada)	1.2 pmol	1.2 pmol	1.2 pmol* 0.8 pmol [#]	1.2 pmol	1.2 pmol	1.2 pmol	0.8 pmol
¹ Taq DNA Pol	1 U	1 U	1.25 U	1 U	1 U	1 U	1.5 U
DNA	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng
Volume Final	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL

A água ultra-pura foi utilizada para completar o volume da reação. ¹Sigma Aldrich, Missouri, USA. Explicar os asteriscos

Tabela 05. Condições de amplificação para cada um dos genes de resistência de β -lactamase utilizados.

Fase	Quantidade de repetições	Oligonucleotídeos iniciadores						
		CTX-M ^a	SHV ^b	MOX ^c FOX ^c CIT ^c	TEM-1 ^b	PSE ^d	OXA-2 ^e	NDM ^f OXA-48 ^f
Desnaturação inicial	1 X	94 °C 180 s	94 °C 300 s	94 °C 180 s	95 °C 300 s	95 °C 420 s	94 °C 240 s	94 °C 600 s
Desnaturação	35 X ^a 30 X ^b	94 °C 30 s	94 °C 60 s	94 °C 30 s	95 °C 60 s	95 °C 60 s	94 °C 30 s	94 °C 30 s
Pareamento	25 X ^c 40 X ^d	57.6 °C 30 s	55.5 °C 60 s	64 °C 30 s	55 °C 60 s	48 °C 30 s	55 °C 30 s	54 °C 40 s
Extensão	38 X ^e 36 X ^f	72 °C 45 s	72 °C 60 s	72 °C 60 s	72 °C 60 s	72 °C 30 s	72 °C 30 s	72 °C 40 s
Extensão Final	1 X	72 °C 300 s	72 °C 300 s	72 °C 420 s	72 °C 420 s	72 °C 420 s	72 °C 300 s	72 °C 300 s

4.6 Avaliação do Perfil Genético

4.6.1 Sequências Repetidas Conservadas

Para cada uma das metodologias empregadas foram utilizados *primers* específicos para a amplificação do material conservado (Tabela 06). O procedimento, bem como, a quantidade e concentração dos reagentes utilizados para amplificação das sequências repetidas, encontra-se descrito na Tabela 07 e 08. Os fragmentos foram visualizados por meio do acréscimo de 5 μ L do produto amplificado juntamente

com 1 µL de Loading Dye Buffer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) e aplicados em gel de agarose a 1,5% corado com SyBr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). Após, os produtos foram submetidos a corrida eletroforética por 4V/cm, durante 45 minutos e a leitura foi realizada em aparelho fotodocumentador Gel Doc EZ Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories, USA).

Tabela 06. *Primers* ou Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para avaliação das sequências repetidas conservadas.

Primers	Sequências	Referência
REP	REP1R-I (5'-IIIICGICGICATCIGGC-3')	Stern et al., (1984)
	REP2-I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3')	
ERIC	ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3')	Versalovic et al. (1991)
	ERIC2 (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3')	
BOX	BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3')	Versalovic et al. (1991)

Tabela 07. Protocolo com a quantidade e concentração dos reagentes utilizados na PCR para cada uma das metodologias empregadas na amplificação das sequências repetidas conservadas (ERIC, REP e BOX).

Reagentes	ERIC	REP	BOX
¹ Buffer	1 X	1 X	1 X
¹ MgCl ₂	3 mM	3,8 mM	2,8 mM
¹ dNTP	300 µM	300 µM	200 µM
¹ Oligonucleotídeos iniciadores (cada)	3 pmol	3 pmol	1 pmol [#]
¹ Taq DNA Pol (5U/µL)	1,5 U	1,5 U	1,5 U
DNA	50 ng/µL	50 ng/µL	50 ng/µL
Volume Final	25 µL	25 µL	25 µL

¹ Sigma Aldrich®, USA. A água ultra-pura foi utilizada para completar o volume da reação.

Tabela 08. Condições de amplificações da PCR empregadas para as metodologias ERIC, REP e BOX.

para as metodologias ERIC, REP e BOX.				
Fase	Repetições	ERIC	REP	BOX
Desnaturação Inicial	1 X	94 °C	94 °C	94 °C
		5 min	5 min	5 min
Desnaturação	30 X	94 °C	94 °C	94 °C
		60 s	30 s	30 s
Pareamento		54 °C	56 °C	56 °C
		45 s	45 s	30 s
Extensão		72 °C	72 °C	72 °C
		70 s	70 s	30 s
Extensão Final	1 X	72 °C	72 °C	72 °C
		5 min	5 min	5 min

s: segundos; min: minutos.

4.6.2 PFGE

PFGE foi realizado de acordo com protocolo publicado por Ribot et al. (2006) utilizando a enzima de restrição *Xba*I (Sigma Aldrich, Missouri, USA). A eletroforese foi realizada em aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories, USA), com os seguintes parâmetros: pulso inicial e final de 2,2s e 54,2s, respectivamente; voltagem de 6V; ângulo de 120°; temperatura de 14°C e corrida de 21 horas.

As análises e construção do dendrograma por similaridade foram realizadas utilizando o *software* Bionumerics versão 7.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), aplicando o UPGMA (*Unweighted Pair Group Mean Arithmetic*) e coeficiente de Dice com 1% de tolerância e 0,5% de otimização.

5. RESULTADOS

5.1 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Na Tabela 09 estão apresentados os resultados das as resistências fenotípicas encontradas neste trabalho. Para efeito dos nossos resultados, os perfis fenotípicos identificados como intermediário foram considerados como resistentes.

As menores taxas de resistência obtidas – ponto de corte em 15% –, de acordo com o teste fenotípico de suscetibilidade, foram observadas para Ka com 12,9% (8/62), Imp com 4,8% (3/62), Cip, C e Pe com 1,6% (1/62) cada. Nenhuma das estirpes estudadas apresentaram resistência para Nor, Sxt, Gm e Ak. Os maiores índices de resistência – acima de 20% – foram encontrados para os 13 antimicrobianos restantes, com destaque para S com 96,70% (60/62), Nal com 80,60% (50/62) e T com 68,30% (43/62) (Tabela 9).

Neste estudo, foi observado elevada resistência aos β -lactâmicos testados. As Penicilinas, Amx e Amp apresentaram 58,1% (36/62) cada; As Cefalosporinas tiveram Cef com 54,8% (/62), Ctx com 59,7% (37/62) e Fox com 56,4% (35/62). A associação de β - lactâmico com inibidor de β -lactamase, Amc com 58,1% (36/62). Apenas o Imipenem (Imp), da subclasse dos Carbapenêmicos apresentou baixa resistência com 4,8% (3/62).

De acordo com os resultados fenotípicos de resistência obtidos, 41 estirpes foram caracterizadas como multirresistentes, ou seja, estirpes que apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos diferentes. Os perfis fenotípicos encontrados com maior frequência foram NalAmxAmpFoxCefCtxAmcTS e NalAmxAmpFoxCefCtxAmcTSNit.

Tabela 09. Perfil fenotípico de suscetibilidade dos antimicrobianos testados encontrados nas 62 estirpes de *Salmonella* Heidelberg.

Classe	Antimicrobiano	Perfil fenotípico	
		Resistente	Sensível
Quinolonas e fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	1,60%	98,40%
	Ácido Nalidíxico	80,60%	19,40%
	Enrofloxacin	29%	71%
	Norfloxacina	-	100%
Aminoglicosídeos	Amicacina	-	100%
	Canamicina	12,90%	87,10%
	Estreptomicina	96,70%	3,30%
	Gentamicina	-	100%
β-lactâmico (Penicilinas)	Ampicilina	58,10%	41,90%
	Amoxilina	58,10%	41,90%
β-lactâmico (Carbapenêmicos)	Imipenem	4,80%	95,20%
β- lactâmico (Cefalosporinas)	Ceftiofur	54,80%	45,20%
	Cefotaxima	59,70%	40,30%
	Cefoxitina	56,40%	43,60%
Associação de β- lactâmico com inibidor de β- lactamase	Amoxilina-clavulanato	58,10%	41,90%
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	37,10%	62,90%
Fenicóis	Cloranfenicol	1,60%	98,40%
Tetraciclina	Tetraciclina	69,30%	30,70%
Inibidores de vias metabólicas	Trimetoprim-sulfamethoxazol	-	100%
Polimixina	Colistina	1,60%	98,40%

5.2 Pesquisa de genes de resistência aos β-lactâmicos

Os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM-1} foram identificados em 3,2% (2/62), 4,8% (3/62) e 3,2% (2/62), respectivamente. Nenhum dos demais genes – *bla*_{PSE-1} e *bla*_{OXA-2} – que codificam as ESBL foram encontrados neste trabalho. Dos genes categorizados como AmpC, apenas para o *bla*_{CMY-2} (CIT) foi encontrado em 62,3% (38/62). Para os demais – *bla*_{CMY-8} (MOX) e *bla*_{FOX} – não foram identificados nas amostras. Nenhum dos genes estudados, que codificam carbapenemases, foram identificados – *bla*_{OXA-48} e *bla*_{NDM}.

5.3 Perfil genético

5.3.1 Sequências Repetidas Conservadas

O dendrograma de cada uma das técnicas (REP, ERIC e BOX) empregadas para obtenção do perfil genético encontra-se nas Figuras 01, 02 e 03, cujo ponto de corte foi 80% para as três técnicas, com intuito de melhorar a visualização da relação de similaridade entre as amostras.

No dendrograma obtido a partir da REP-PCR foram identificados a presença de 7 *clusters* identificados em letras, de A a G (Figura 01). Os isolados de SH agrupados nos *clusters* E e F apresentaram a mesma fonte de isolamento, ambiente avícola. Os demais apresentaram categorias diferentes. Com exceção ao cluster C, compreendido por isolados obtidos no estado de São Paulo, não houve agrupamento por local de isolamento nos demais *clusters* obtidos.

Já no dendrograma obtido a partir da ERIC-PCR, é possível observar 6 diferentes *clusters* (A a F) na Figura 02. Neste dendrograma, houve predominância dos isolados oriundos do ambiente avícola nos *clusters* A, B e C, e dos isolados oriundos de produto cárneo nos *clusters* D e F. Em relação ao local de isolamento, apenas estirpes do estado de São Paulo foram agrupados nos clusters D e E. Entretanto, os outros *clusters* apresentaram diversidade quanto ao local de isolamento, incluindo estirpes com 100% de similaridade obtidas em locais geograficamente distintos (SH42, e SH11 e SH39, oriundas de Minas Gerais e São Paulo, respectivamente).

Em comparação aos anteriores, o dendrograma obtido para BOX-PCR foi o que gerou o menor número de perfis de *fingerprint*, e consequentemente os menores números de ramificações no dendrograma (Figura 03), que foram divididos em 6 *clusters* principais, identificados de A a F. Todos os *clusters* apresentaram fonte de isolamento diversa. Referente ao local de isolamento, o *cluster* A, D e F apresentaram os seguintes estados como origem de isolamento: São Paulo e Paraná; o *cluster* B dos estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais; o *cluster* C houve predomínio do

estado de São Paulo, com apenas um isolado do Paraná (SH41); o *cluster* E apenas do estado de São Paulo; *cluster* F dos estados de São Paulo e Paraná.

Para os três métodos estudados, REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, não houve agrupamento das estirpes quanto aos perfis de resistência obtidos. Além disso, todos os métodos apresentaram isolados provenientes de estados diferentes e com 100% de similaridade.

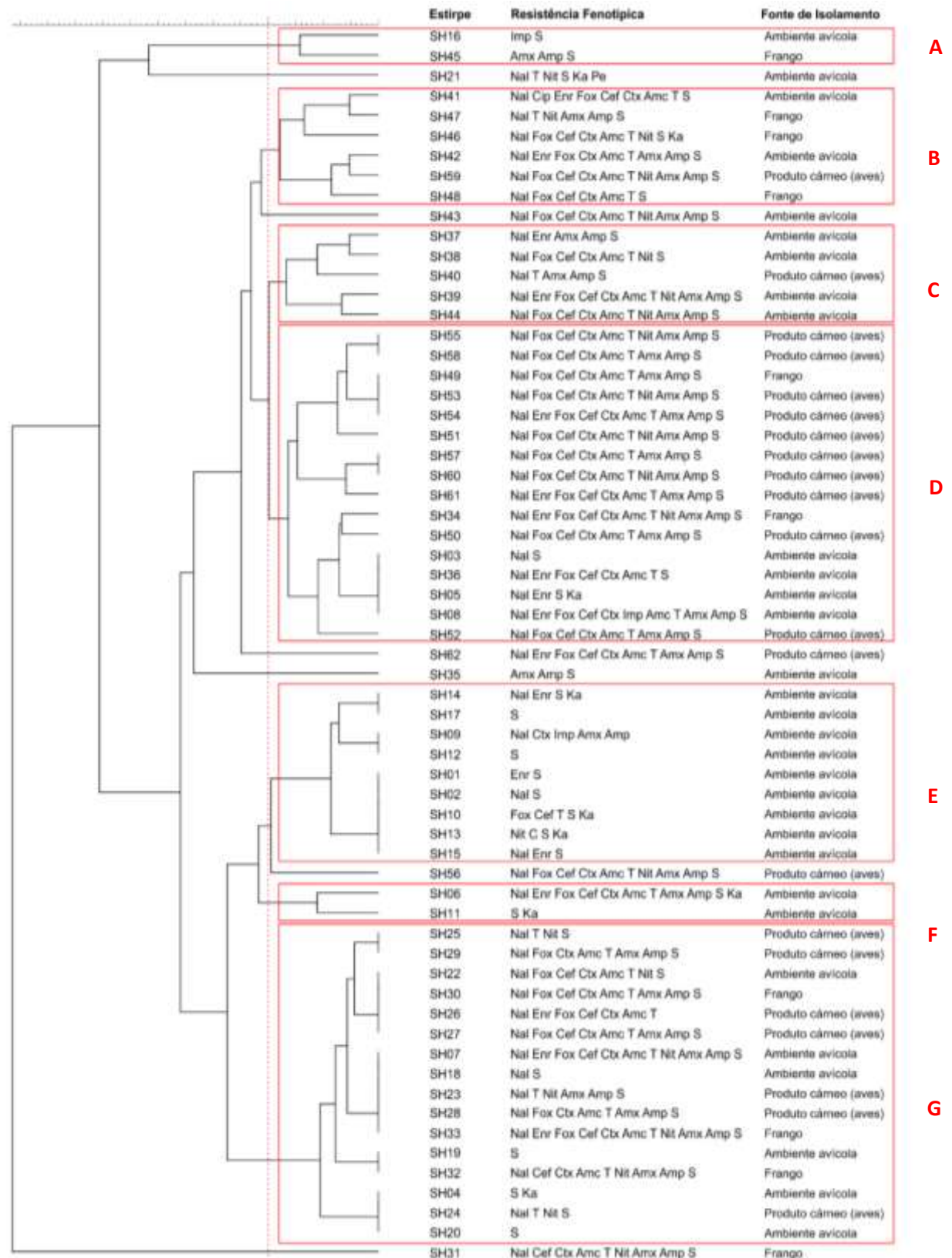


Figura 01. Dendrograma de similaridade do perfil genético construído pelo método UPGMA utilizando os dados obtidos do método REP contendo as 62 estirpes de *Salmonella* Heidelberg.

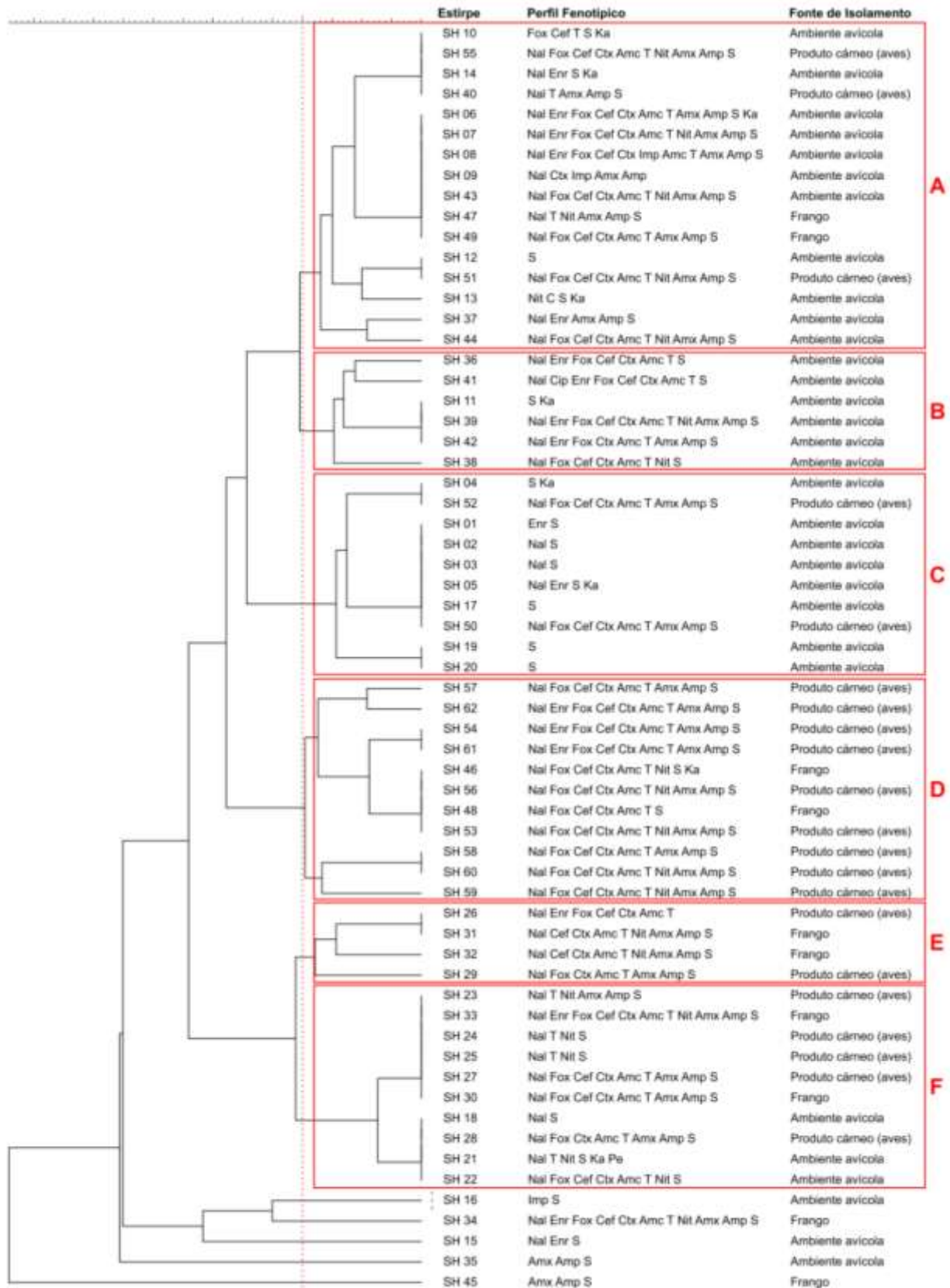


Figura 02. Dendrograma de similaridade do perfil genético construído pelo método UPGMA utilizando os dados obtidos do método ERIC contendo as 62 estirpes de *Salmonella* Heidelberg.

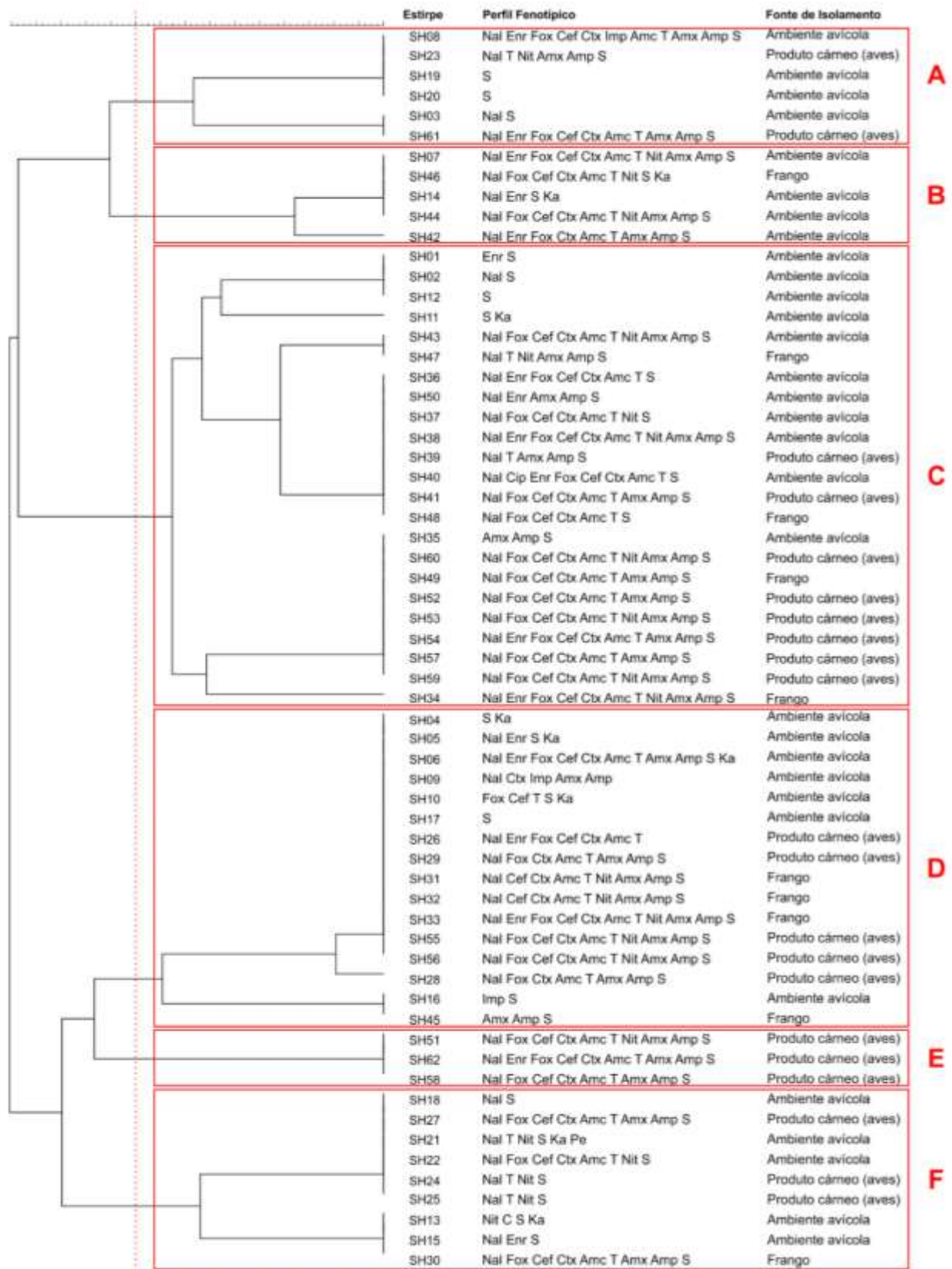


Figura 03. Dendrograma de similaridade do perfil genético construído pelo método UPGMA utilizando os dados obtidos do método BOX contendo as 62 estirpes de *Salmonella* Heidelberg.

5.3.2 PFGE

No dendrograma obtido a partir da PFGE foram identificados a presença de 10 *clusters* (A-J) apresentados na Figura 04. Os isolados de SH agrupadas no *cluster* A, B, D e F apresentaram a mesma fonte de isolamento, ambiente avícola. Os demais apresentaram categorias diferentes. Referente ao local de isolamento, o *cluster* C apresentou predomínio do estado de São Paulo; o *cluster* F dos estados de Minas Gerais e Paraná; o *cluster* G isolados dos estados de São Paulo e Paraná; o *cluster* I dos estados do Paraná, São Paulo e Santa Catarina; o *cluster* J apenas do estado de São Paulo. Os perfis de resistência apresentaram-se altamente distribuídos entre os *clusters* formados.

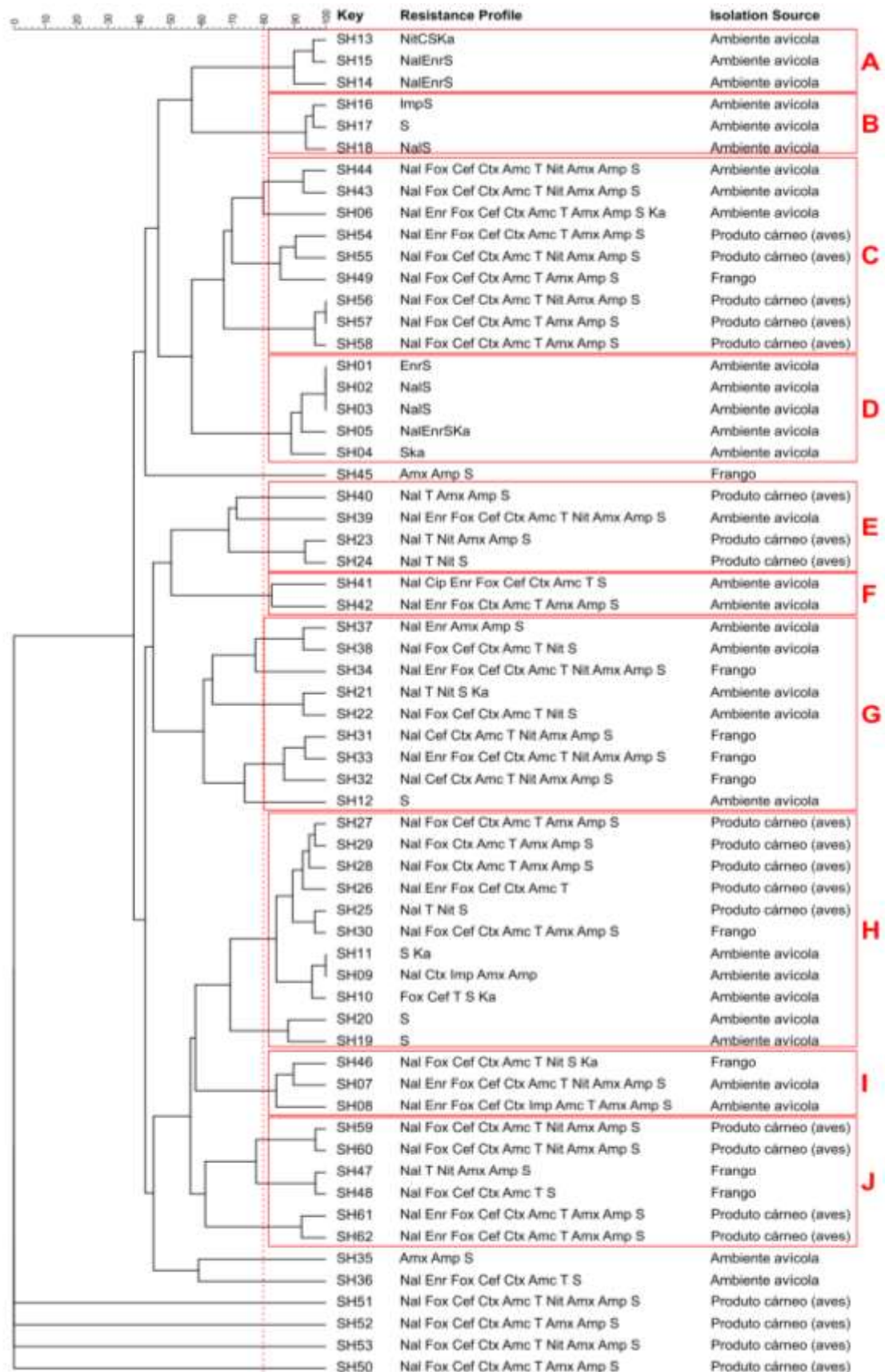


Figura 04. Dendrograma de similaridade do perfil genético construído pelo método UPGMA utilizando os dados obtidos do método PFGE contendo as 62 estirpes de *Salmonella* Heidelberg.

6. DISCUSSÃO

6.1 Resistência Fenotípica

A crescente preocupação com a disseminação da resistência na produção animal, bem como seus impactos na saúde pública são motivos que justificam as diferentes medidas que organizações mundiais, como: OIE, CDC, WHO têm tomado (OIE, 2015). Seja por meio da divulgação de cuidados ao preparar alimentos para consumo até medidas proibitivas de consumo de um determinado antimicrobiano (CDC, 2011).

O ato de proibir a utilização de um determinado antimicrobiano, uma vez que sua resistência já está disseminada a campo, não impede que a bactéria resistente permaneça no ambiente (Carattoli, 2013). Neste trabalho foi possível verificar a presença de estirpes resistentes a antimicrobianos proibidos no Brasil, como: o Cloranfenicol, a Nitrofurantoína (Brasil, 2003), a Tetraciclina (Brasil, 2009) e a Colistina (Brasil, 2016).

Vale ressaltar a alta frequência de estirpes resistentes a Estreptomicina e Tetraciclina, antimicrobianos amplamente utilizados como melhoradores de desempenho. Quanto maior o uso, maior a possibilidade de indução de resistência (Antunes et al., 2016). Pezzella et al. (2004) verificaram que 98 e 95% das amostras de *Salmonella* spp. utilizadas em seu estudo foram resistentes a Tetraciclina e Estreptomicina, respectivamente. Frech e Schwartz (2000) abordaram que de 214 amostras de *Salmonella* referentes aos sorovares Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar e Saintpaul, 126 foram resistentes a Tetraciclina. A resistência a estes dois antimicrobianos está relacionada a presença de genes que podem estar inseridos tanto em transposons quanto em plasmídeos (Frech e Schwartz, 2000; Pezzella et al., 2004).

Os antimicrobianos Ácido Nalidíxico e Enrofloxacin, integrantes da classe das Quinolonas e Fluoroquinolonas, são indicados como primeira linha para o tratamento de infecções gastrointestinais causadas por *Salmonella* spp. em seres humanos,

porém com o aumento da resistência bacteriana a essas drogas, seu uso tem sido substituído por antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (Van Hoek et al., 2011).

Em relação aos β -lactâmicos nota-se, no presente trabalho, a resistência ao Ceftiofur, antimicrobiano utilizado em associação com a vacina de Marek em pintainhos de um dia (Zhao et al., 2008), e embora esta prática não seja recomendada. O uso subterapêutico dessa droga tem sido relacionado com o surgimento de isolados de enterobactérias resistentes em um curto período (Saraiva et al., 2018; Baron et al., 2014). Pois, diferentes relatos (Hiki et al., 2017; Dutil et al., 2010; Zhao et al., 2008) abordam a ocorrência do fenômeno denominado resistência cruzada – quando um antimicrobiano é capaz de expressar a resistência para outros de estrutura semelhante – fato descrito com o antimicrobiano Cefepime e Cefotaxima, utilizados em medicina humana, o que gera um problema de saúde pública.

Em nosso estudo foi identificada elevada frequência de estirpes resistentes a subclasse das Penicilinas (Ampicilina e Amoxicilina), a qual está associada ao seu modo de ação, caracterizado como de amplo espectro, bem como seu tempo de uso no controle de infecções bacterianas, iniciado na década de 1970. Com o surgimento de resistência a estas drogas, as mesmas passaram a ser utilizadas em associação com inibidores de β -lactamases, como por exemplo, a Amoxicilina-Clavulanato (Bush e Bradford, 2016). Os inibidores (clavulanato, tazobactam e sulbactam) atuam diretamente na produção de β -lactamases pelas bactérias, impedindo a lise do anel β -lactâmico e consequentemente, garantindo a eficiência do antimicrobiano (Alcaine et al., 2007). Além disso, atuam sob as penicilinas e cefalosporinas, sendo essa associação de drogas utilizada para caracterização fenotípica de estirpes produtoras de β -lactamases de espectro estendido (*Extended spectrum β -lactamases* - ESBL) e AmpC (Bush e Bradford, 2016).

Neste trabalho, a partir do elevado número de bactérias apresentando resistência fenotípica ao antimicrobiano associado ao inibidor Amoxicilina-Clavulanato (58,10%), infere-se que tais estirpes possuem resistência mediada pelo tipo AmpC, uma vez que o clavulanato não é capaz de inibir a ação de cefalosporinas produzidas por AmpC (Bush e Jacoby, 2010). Tiba-Casas et al. (2018) relataram a presença de estirpes de *Salmonella* Heidelberg albergando o gene *bla_{CMY-2}*, ao qual é um dos genes que caracterizam a resistência tipo AmpC. Este gene pode estar

ancorado em plasmídeos medindo entre 90 a 140 kb e tipos de incompatibilidade dos grupos II e A/C.

6.2 Pesquisa de genes β -lactâmicos

A baixa prevalência dos genes caracterizados como ESBL – *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{PSE-1} e *bla*_{OXA-2} – pode estar relacionada com a utilização de antimicrobianos que consigam inibir a produção de β -lactamases, como exemplo, o clavulanato (utilizado no presente trabalho em associação com um β -lactâmico), sulbactam e o tazobactam (Bush e Bradford, 2016). A baixa prevalência é reportada apenas em hospedeiros animais, enquanto para isolados de fontes humanas são mais frequentes (Bonnet, 2004; Miriagou et al., 2004). Entretanto, a baixa prevalência encontrada pode estar relacionada com a falta de dados epidemiológicos necessários para conclusão do ciclo epidemiológico, não permitindo a elucidação dos resultados.

Referente aos genes categorizados como AmpC, o mais frequente nos isolados foi o *bla*_{CMY-2} (CIT), responsável por expressar resistência as penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração (Bush e Jacoby, 2010; Philippon et al., 2002) e pode ser encontrado tanto em plasmídios quanto no cromossomo (Bush e Jacoby, 2010). Estudos prévios apontam que a resistência ao CEF está relacionada a aquisição do gene *bla*_{CMY-2} (CIT), gerando impacto direto na saúde humana, devido à resistência cruzada com Cefepime e Ceftriaxona (Zhao et al., 2008).

A produção de β -lactamase do tipo AmpC em enterobactérias foi caracterizada como deficiente, devido à pouca produção existente mediada via cromossomo (Bush e Jacoby, 2010; Philippon et al., 2002). Os processos evolutivos permitiram identificar enterobactérias que produzem uma quantidade exacerbada de β -lactamases, que não são inativadas pelos inibidores, detectando um novo meio de produção, utilizando plasmídios que possuem o gene AmpC (Bush e Jacoby, 2010).

6.3 Avaliação das metodologias de similaridade por perfil genético

As metodologias utilizadas para avaliação do perfil de similaridade genética possuem o objetivo de realizar a diferenciação de uma estirpe com outra (Versalovic et al., 1991). Reportados inicialmente na família Enterobacteriaceae, os elementos repetitivos (REP, ERIC e BOX) são diferenciados de acordo com a sua sequência e localização no genoma, permitindo identificações únicas para cada estirpe (Hulton et al., 1991). Com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores é possível realizar a diferenciação entre estirpes bacterianas próximas filogeneticamente (Dombek et al., 2000; Gevers et al., 2001, Yamamura et al., 2004).

O mesmo objetivo pode ser aplicado ao PFGE, sendo que a principal diferença entre o PFGE e os elementos repetitivos está no modo de aplicação do teste – utilizando enzimas de restrição específicas, enquanto o outro utiliza-se de oligonucleotídeos iniciadores – e quanto a padronização, ao qual o PFGE é considerado como padrão ouro para investigação epidemiológica (Basim e Basim, 2001; Ribot et al., 2006). Entretanto, as técnicas baseadas na amplificação dos elementos repetitivos têm mostrado eficácia semelhante à técnica padrão ouro. Campioni et al. (2014) realizou a caracterização de *Salmonella* Enteritidis utilizando os métodos ERIC e PFGE encontrando índice discriminatório de 0.93 para ERIC e 0.90 para o PFGE. Weigel et al. (2004) comparou o método REP com o PFGE para aferir a diversidade genética de *Salmonella* e chegou à conclusão de que ambas as técnicas são reprodutíveis, porém o perfil apresentado por REP obteve maior variação, sendo mais discriminatório do que o PFGE.

Neste trabalho, inferimos que nos dendrogramas para ERIC-PCR e BOX-PCR predominaram as menores diversidades entre as estirpes. As amostras submetidas ao BOX-PCR apresentaram perfis contendo entre dois e quatro *amplicons* em gel de agarose, enquanto ERIC-PCR apresentou entre três a seis *amplicons*. Por sua vez, as amostras submetidas a REP-PCR apresentaram em gel de agarose de seis a dez *amplicons*, possibilitando uma maior diversidade e consequentemente maior diferenciação. Em relação ao PFGE é notável a diversidade, ou melhor, a variação de SH presente, apresentando de oito a quinze tamanhos diferentes de fragmentos de DNA em gel de agarose.

Para isto, devemos levar em conta as características de cada método. Sabe-se que o PFGE é a principal técnica recomendada para a caracterização molecular de

estirpes (Ribot et al., 2006), entretanto por se tratar de técnica laboriosa, outras técnicas têm sido utilizadas como alternativas. Por outro lado, os métodos voltados para os elementos móveis (métodos alternativos) possuem diversos protocolos publicados (Souza et al., 2015; Campioni et al., 2014; Fendri et al., 2013; Dombek 2000; Weigel et al., 2004) e não são considerados como métodos próprios para a caracterização, devido à falta de padronização dos protocolos.

É possível observar que nas quatro metodologias utilizadas houve diferenças nas ramificações dos dendrogramas gerados. Esta diferença está relacionada com a quantidade de ramificações, ou seja, no quão discriminatório um método pode ser em comparação ao outro, sendo assim, aquelas com poucas ramificações são aqueles que possuem um índice discriminatório menor. Aqui, inferimos que do menor para o maior seriam, BOX-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR e PFGE. Vale ressaltar que para confirmar o índice de discriminação do método utilizado deve-se realizar o índice de diversidade de Simpson, apresentado por Hunter (1990).

Outro fato interessante observado são as estirpes que apresentaram resistência a diferentes antimicrobianos que estavam agrupadas com estirpes com pouca resistência. Segundo Park e Rick (2014) para melhores esclarecimentos devem ser utilizadas metodologias que permitem conhecer a sequência de nucleotídeos envolvida, para assim, chegar a conclusões mais assertivas.

7. CONCLUSÃO

Nas condições em que o estudo foi realizado, é possível concluir que:

- A resistência fenotípica apresentada por *Salmonella* Heidelberg atinge índices alarmantes.
- A resistência predominante em SH no Brasil é do tipo AmpC.
- Predomínio do gene *bla*_{CMY-2} (CIT).
- O uso indiscriminado de antimicrobianos em animais de produção pode resultar no aumento de resistência bacteriana em aves, especialmente para antimicrobianos importantes para a saúde pública.
- A utilização de métodos moleculares pode ser útil para a caracterização molecular, desde que sejam validados para utilização diária.

8. REFERÊNCIAS

- Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta R (2016) Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. **Int J Syst Evol Microbiol** 66:5575-5599.
- Aarestrup FM, Hasman H, Olsen I, Sorensen G (2004) International Spread of *bla*_{CMY-2}-Mediated Cephalosporin Resistance in a Multiresistant *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolate Stemming from the Importation of a Boar by Denmark from Canada. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 48: 1916-1917.
- Alcaine SD, Warnick LD, Wiedmann M (2007) Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. **Journal of Food Protection** 70:780 -790.
- Álvarez-Fernández E, Alonso-Calleja C, García-Fernández C, Capita R (2012) Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006. **International Journal of Food Microbiology** 153: 281-287.
- Andrysiak AK, Olson AB, Tracz DM, Dore K, Irwin R, Ng LK, Gilmour MW (2008) Genetic characterization of clinical and agri-food isolates of multi drug resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Canada. **BMC Microbiology**, doi: 10.1186/1471-2180-8-89.
- Antunes P, Mourão J, Campos J, Peixe L (2016) Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection** 22:110-121.
- Baptista MGFM (2013) **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 51 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa.
- Baron S, Jouy E, Larvor E, Eono F, Bougeard S, Kempf I (2014) Impact of Third-Generation-Cephalosporin Administration in Hatcheries on Fecal *Escherichia coli* Antimicrobial Resistance in Broilers and Layers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 58:5428–5434.
- Basim E, Basim H (2001) Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) technique and its use in Molecular Biology. **Turk J Biol** 25:405-418.
- Bauer AW; Kirby E; Sherris EM; Turk M (1966) Antibiotic by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology** 45:493-496.
- Baumler AJ (1997) The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. **Trends in Microbiology** 5:318-322.

Berchieri Junior A, Adachi SY, Calzada CR, Paulillo AC, Iturrind RPS, Tavechio AT (1989). Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 9:9-12

Berchieri Junior A, Freitas Neto OC (2009) Salmoneloses. In: Berchieri Junior A, Silva EM, Di Fábio J, Sesti L, Zuanaze MAF (Eds.). **Doenças das aves**, 2.ed. Campinas: FACTA, p.435-454.

Bockma M, Bondt N, Neijenhuis F, Mevius D, Ruiter S (2014) Antibiotic use in Brazilian broiler and pig production: an indication and forecast of trends. **Livestock Research. Leystad**, Disponível em: <<http://edepot.wur.nl/297414>>. Acesso em: 01/06/18.

Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin AS, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Washington** 112: 5649-5654.

Bonnet R (2004) Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrob Agents Chemother** doi: 10.1128/aac.48.1.1-14.2004.

Borges KA (2016) **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Salmonella* pertencentes a diferentes sorovares isoladas de matrizes e de frangos de corte no campo, de carcaças de frango e de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose**. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Brasil (1999) Instrução Normativa N.º 42, de 20 de dezembro de 1999. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/instrucao-normativa-sda-n-o-42-de-20-de-dezembro-de-1999.pdf>>.

Brasil (2003) Instrução Normativa N.º 9, de 27 de junho de 2003. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/instrucao-normativa-sda-n-o-09-de-27-de-junho-de-2003.pdf/view>>.

Brasil (2009) Instrução Normativa N.º 26, de 9 de julho de 2009. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf>>.

Brasil (2016) Instrução Normativa Nº 45, de 22 de novembro de 2016. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-45-de-22-de-novembro-de-2016.pdf>>.

Brasil (2017) Instrução Normativa Nº 41, de 23 de Outubro de 2017. Disponível em <<http://www.in.gov.br/materia/>>

[/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19401380/do1-2017-11-09-instrucao-normativa-n-41-de-23-de-outubro-de-2017-19401312>.](#)

Bush K, Bradford PA. (2016) β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect Med**. doi: 10.1101/cshperspect.a025247.

Bush K, Jacoby GA (2010) Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**. doi: 10.1128/AAC.01009-09.

Campioni F, Zoldan MM, Falcão JP (2014) Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry and farm environments in Brazil. **Epidemiology Infection** 142:1403-1410.

Capuano VSC (2012) **Estudo comparativo de métodos fenotípicos e biomoleculares para determinação de resistência a antibióticos em cepas de *Salmonella* spp isoladas de couro e carcaça de bovinos e produtos cárneos**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Carattoli A (2013) Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology** 303:298-304.

Carlson AS, Bolton LF, Briggs CE, Hurd HS, Sharma VK, Fedorka-Cray PJ, Jones BD (1999) Detection of multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 using multiplex and fluorogenic PCR. **Molecular and Cellular Probes** 13:213-222.

Casin I, Breauil J, Brisabois A, Moury F, Grimont F, Collatz E (1991) Multidrug-Resistant Human and Animal *Salmonella* Typhimurium Isolates in France Belong Predominantly to a DT104 Clone with the Chromosome and Integron-Encoded β -Lactamase PSE-1 **The Journal of Infectious Diseases** 179:1173-1182.

CDC (2011) Making Food Safer to eat. Disponível em <<http://www.cdc.gov/vitalsigns>>.

CDC (2013) Multistate outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg infections linked to foster farms brand chicken. Disponível em <<https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-10-13/index.html>>.

CDC (2019) Snapshots of *Salmonella* Serotype – German import: *Salmonella* serotype Heidelberg. Disponível em <<https://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/salmonella-atlas/serotype-snapshots.html>>.

Celis-Estupiñan ALP, Batista DFA, Cardozo MV, Souza AIS, Alves LBR, Almeida AM, Barrow PA, Berchieri Jr A, Freitas Neto OC (2017) Further investigations on the epidemiology of fowl typhoid in Brazil. **Avian Pathology** 46:416-425.

Chittich P, Sulka A, Tauxe RV, Fry AM (2006) A Summary of National Reports of Foodborne Outbreaks of *Salmonella* Heidelberg Infections in the United States: Clues for Disease Prevention. **Journal of Food Protection** 69:1150-1153.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 27 ed. CLSI supplement M100**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST, Sadowsky MJ (2000) Use of Repetitive DNA Sequences and the PCR To Differentiate *Escherichia coli* Isolates from Human and Animal Sources. **Applied and Environmental Microbiology** 66: 2572-2577.

Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, Bourgault A, Cole L, Daignault D, Desruisseau A, Demczuk W, Hoang L, Horsman GB, Ismail J, Jamieson F, Maki A, Pacagnella A, Pillai DR (2010) Ceftriaxone Resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Chicken Meat and Humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases** 15: 48-54.

Fardsanei F, Nikkhahi F, Bakhshi B, Salehi TZ, Tamai IA, Dallal MS (2016) Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from food and human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling (GTG) 5-PCR and ERIC-PCR. **New microbes and new infections** 14: 24-30.

Fendri I, Hassena AB, Grosset N, Barkallah, Khannous L, Chuat V, Gautier M, Gdoura R (2013) Genetic Diversity of Food-Isolated *Salmonella* Strains through Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR). **PlosOne** doi: 10.1371/journal.pone.0081315.

Foley SL, Lynne AM (2008) Food animal-associated *Salmonella* challenges, pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science** 86:173-187.

Frech G, Schwarz S (2000) Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probes. **Journal of Applied Microbiology** 89:633-641.

Gevers D, Huys G, Swings J (2001) Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters** 205:31-36.

Grimont PAD, Grimont F, Bouvet P (2000). Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: Wray C e Wray A (Eds.). **Salmonella in Domestic Animals**. New York: CABI Publishing, p. 1-17.

Grimont PAD, Weill (2007) Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars, (9th ed.) Paris: **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella***, Institute Pasteur, Paris, France, 1-166.

Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemuhl J, Grimont PA, Weill FX (2010) Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Res Microbiol.** 161: 26-9.

Han J, David DE, Deck J, Lynne AM, Kaldhone P, Nayak R, Stefanova R, Foley SL (2011) Comparison of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from human

patients with those from animal and food sources. **Journal of Clinical Microbiology** 49: 1130-1133.

Hashemi A, Baghbani-arani F (2014) The effective differentiation of *Salmonella* isolates using four PCR-based typing methods. **Journal of Applied Microbiology** 118:1530-1540.

Hawkey PM (1998) This origins and molecular basis of antibiotic resistance. **BMJ** 317:657-660.

Hennessy TW, Cheng LH, Kassenborg H, Ahuja SD, Mohle-Boetani J, Marcus R, Shiferaw B, Angulo FJ (2004) Egg Consumption is the Principal Risk Factor for Sporadic *Salmonella* serotype Heidelberg Infections: A Case-Control Study in FoodNet Sites. **Clinical Infectious Diseases** 38:237-243.

Hiki M, Shimizu Y, Kawanishi M, Ozawa M, Abi H, Kojima A, Koike R, Suzuki S, Asai T, Hamamoto S (2017) Evaluation of the relationship between the minimum inhibitory concentration of ceftiofur and third-generation cephalosporins in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 29:716-720.

Hoffer E, Silva Filho SJ, Reis EMF (1997) Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 17:55-62.

Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM (1991) ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, and other Enterobacteria. **Molecular Microbiology** 5:825–834.

Hunter PR (1990) Reproducibility and Indices of Discriminatory Power of Microbial Typing Methods. **Journal of Clinical Microbiology** 28:1903-1905.

Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, De Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX (2014) Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, 165:526-530.

Kotra LP, Haddad J, Mobashery S (2000) Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 44:3249-3256.

Laxminarayan RT, Van Boeckel, Teillant A (2015) The Economic Costs of Withdrawing Antimicrobial Growth Promoters from the Livestock Sector, OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers, No. 78, OECD Publishing, Paris.

Leal B (2010) **Uso da ERIC-PCR para caracterização de amostras de *Leishmania chagasi***. 77 f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento) Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

Leonídio ARA, Nascimento GM, Figueira SV, Almeida AMS, Moraes DMC, Andrade MA (2015) Genes de resistência aos antimicrobianos de *Salmonella* sp. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal** 15:574-614.

- Liebana E, Garcia-Miguala L, Breslin MF, Davies RH, Woodward MJ (2001) Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from English poultry Farms Assessed by Multiple Genetic Fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology** 39: 154-161.
- Lupski JR, Weinstock GM (1992) Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology** 174:4525-9.
- Lynne AM, Kaldhone P, David D, White DG, Foley SL (2009) Characterization of Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Serotype Heidelberg Isolated from Food Animals. **Foodborne Pathogens and Disease** 6: 207-215.
- Magalhães VD, Ferreira JC, Barelli C, Darini ALC (2005) Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** 64:155-161.
- Marques MV (2012) **Biologia Molecular e genética bacteriana**. Editora Cubo: Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 348 p., 2012.
- McManus MC (1997) Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **American Journal of Health-System Pharmacy** 54:1420-1433.
- MICHIGAN STATE UNIVERSITY (2011) Antimicrobials: an introduction. Disponível em: < <http://amrls.cvm.msu.edu/pharmacology/antimicrobials/antimicrobials-an-introduction>>.
- Miriagou V, Tassios PT, Legakis NJ, Tzouveleakis LS (2004) Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. **Int J Antimicrob Agents**. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.03.006.
- Musgrove MT, Jones DR, Northcutt JK, Vox NA, Harrison MA, Fedorka-Cray PJ, Ladely SR (2006) Antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from commercial shell eggs. **Poultry Science** 85: 1665-9.
- Nayak R, Call V, Kaldhone P, Tyler C, Anderson G, Phillips S, Kerdahi K, Foley SL (2007) Comparison of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg susceptibility testing results. **Clinical Medicine & Research** 5:98-105.
- OIE (2015) Animal Health: a multifaceted challenge. Disponível em <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Key_Documents/ANIMAL-HEALTH-EN-FINAL.pdf>.
- Olive DM, Bean P (1999) Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. **Journal of Clinical Microbiology** 37: 1661-1669. 1999.
- Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA (2011) Carbapenems: Past, Present, and Future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 55:4943-4960.

Park SH, Ricke SC (2014) Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* genus, *Salmonella* subspecies I, *Salm.* Enteritidis, *Salm.* Heidelberg and *Salm.* Typhimurium. **Journal of Applied Microbiology** 118: 152-160.

Paterson DL (2006) Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **American Journal of Infection Control** 34:S20-S28.

Pérez-Pérez FJ, Hanson ND (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. doi: 10.1128/jcm.40.6.2153-2162.2002.

Pezzella C, Ricci A, DiGiannatale E, Luzzi I, Carattoli A (2004) Tetracycline and Streptomycin Resistance Genes, Transposons, and Plasmids in *Salmonella enterica* Isolates from Animals in Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 48:903-908.

Philippon A, Arlet G, Jacoby GA (2002) Plasmid-Determined AmpC-Type β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**. 2002. doi: 10.1128/aac.46.1.1-11.2002.

Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P (2011) Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 70:119-123.

Pulido-Landinez M, Sánchez-Ingunza R, Guard J, Nascimento PN (2013) Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in Southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology** 4:288-294.

Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerdt K, De Zutter L, Heyndrickx M (2005) Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. **Journal of Clinical Microbiology** 43:3615–3623.

Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens Disease** 3:59-67.

Roberts AP, Kreth J (2014) The impact of horizontal gene transfer on the adaptative ability of the human oral microbiome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 4:1-9.

Rowlands REG (2008) **Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e genes de virulência em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos associados ou não à toxinfecções alimentares.** 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos – Área de Bromatologia) - Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

Saraiva MMS, Moreira Filho ALB, Freitas Neto OC, Silva NMV, Givisiez PEN, Gebreyes WA, Oliveira CJB (2018) Off-label use of ceftiofur in one-day chicks triggers a short-term increase of ESBL-producing *E. coli* in the gut. **PlosOne** doi: 10.1371/journal.pone.0203158.

Sausen L (2015) **Uso de Blend de ácidos orgânicos no controle da disseminação de *Salmonella* Heidelberg em frangos de corte**. 73 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos.

Schwartz DC, Cantor RC (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell, Cambridge** 37: 67-75.

Seo YS, Lee SH, Shin EK, Kim SJ, Jung R, Hahn TW (2006) Pulsed-field gel electrophoresis of *Salmonella* Gallinarum and comparison with random amplified polymorphic DNA. **Veterinary Microbiology** 115: 349-357.

Shi C, Singh P, Ranieri ML, Wiedmann M, Switt AIM (2015) Molecular methods for serovar determination of *Salmonella*. **Critical Reviews in Microbiology** 41:309-325.

Souza AIS, Freitas Neto OC, Batista DFA, Celis-Estupiñan ALP, Almeida AM, Barrow PA, Berchieri A (2015) ERIC-PCR genotyping of field isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum. **Avian Pathology** 44:475-479.

Stern MJ, Ames FLG, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF (1984) Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell** 37:1015–1026.

Tenover FC (2006) Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine** 119:S3-S10.

Tenover FC, Arbelit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **Journal of clinical microbiology** 33:2233–2239.

Thamlikitkul V, Tiengrim S (2014) In vitro activity of colistin plus sulbactam against extensive-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* by checkerboard method. **Journal of the Medical Association of Thailand** 97:S1-S3.

Tiba-Casas MR, Camargo CH, Soares FB, Doi Y, Fernandes AS (2018) Emergence of CMY-2-Producing *Salmonella* Heidelberg Associated with IncI1 Plasmids Isolated from Poultry in Brazil. **Microbial Drug Resistance** doi: 10.1089/mdr.2018.0044.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2017) **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 935 p.

Van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM (2011) Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology** 2:1-27.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research** 19: 6823–6831.

Wattiau P, Boland C, Bertrand S (2011) Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives. **Applied and Environmental Microbiology** 77:7877-7885.

Weigel RM, Qiao B, Teferedegne B, Suh DK, Barber DA, Isaacson RE, White BA (2004) Comparison of pulsed field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. **Veterinary Microbiology** 100:205-217.

Wise MG, Siragusa GR, Plumble J, Healy M, Cray PJ, Seal BS (2009) Predicting *Salmonella enterica* serotypes by repetitive sequence-based PCR. **Journal of Microbiological Methods** 76:18-24.

Woolhouse MEJ, Ward M (2013) Sources of Antimicrobial Resistance. **Science** 341:1460-1461.

Yamamura H, Hayakawa M, Nakagawa Y, Iimura Y (2004) Characterization of *Nocardia asteroides* Isolates from Different Ecological Habitats on the Basis of Repetitive Extragenic Palindromic-PCR Fingerprinting. **Microbial Ecology** 70:3149–3151.

Zancan FT, Berchieri Junior A, Fernandes AS, Gama NMSQ (2000) *Salmonella* spp. investigation in transport boxes of day-old birds. **Brazilian Journal of Microbiology** 31:230-232.

Zhao S, White DG, Friedman SL, Glenn A, Blickenstaff K, Ayers SL, Abbott JW, Hall-Robinson E, McDermott PF (2008) Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006. **Applied and Environmental Microbiology** 74: 6656-6662.