

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU CIÊNCIAS AVIÁRIAS**

Leonardo Felipe Franceschini

Detecção molecular e fenotípica do perfil de resistência aos β -lactâmicos e colistina de *Salmonella* spp. isoladas de swabs de propé de aviários de corte

**UBERLÂNDIA
2022**

Leonardo Felipe Franceschini

Detecção molecular e fenotípica do perfil de resistência aos β -lactâmicos e colistina de *Salmonella* spp. isoladas de swabs de propé de aviários de corte

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação Lato Sensu Ciências Aviárias, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Especialista em Ciências Aviárias.

Área de concentração: Ciências Avícolas
Orientador(a): Profa. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca

**UBERLÂNDIA
2022**

Detecção molecular e fenotípica do perfil de resistência aos β -lactâmicos e colistina de *Salmonella* spp. isoladas de swabs de propé de aviários de corte

Molecular and phenotypic detection of Salmonella spp. isolated in the State of São paulo

Leonardo Franceschine¹; Paula Fernanda de Sousa Braga¹; Guilherme Paz Monteiro¹, Belchiolina Beatriz Fonseca¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

*Correspondente: Leo.franceschine@gmail.com

Resumo

Objetivou-se analisar 19 isolados de *Salmonella* spp., oriundos de swabs de propé no Estado de São paulo, pela tipificação e análise de detecção de genes de resistência associados as ESBLs (extended spectrum Beta lactamase), AMPC (cefalosporinases do tipo C) e carbapenamases por técnicas molecular e fenotípica. Para identificação do sorotipo isolado utilizou-se uma plataforma de PCR microarrays (*Check and Trace*, Check points). Após a tipificação, os isolados foram avaliados quanto a identificação de genes carbapenemase, MCR 1-2 (resistência a colistina), AmpC (Cefalosporinase do tipo C) e ESBL's (resistência às β -lactamases). Para identificação fenotípica de resistência a antibióticos, foi avaliado a minimal inhibitory concentration (MIC) para os antibióticos meropenem, amoxicilina e ceftriaxona. Os sorotipos identificados mais prevalentes foram *S. Infantis* e *S. Saintpaul*, ambos com prevalência de 15,07% (3/19). As demais cepas identificadas foram: *S. Cerro*, *S. Sandiego*, *S. Kentucky*, *S. Alachua*, *S. Javiana*, *S. Livingstone*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *Salmonella* não entérica e uma *Salmonella* não tipificável pelo kit de tipificação. Todas as amostras tiveram resultado negativo para identificação de genes de resistência carba, MCR, ESBL e AmpC. No perfil fenotípico, o meropenem se mostrou o menos resistente, enquanto a amoxicilina e a ceftriaxona apresentaram alto padrão de resistência. Os resultados mostram que a resistência fenotípica não está associada a presença de genes de resistência aqui pesquisados. Além disso, as bactérias resistentes encontradas no MIC possuem mecanismos de resistência não associados aos genes aqui estudados. Medidas adicionais devem ser

implantadas para evitar o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos de forma terapêutica ou como promotores de crescimento.

Palavras-chave: antimicrobiano, frango de corte, carbapenemase, ESBL.

Abstract

This study aimed to analyze 19 isolates of *Salmonella* spp., from broiler chicken flocks in the Estado de São paulo, through serotyping and β -lactams (carbapenemase, meropenem, amoxicillin and ceftriaxone) and colistin detection of resistance, using molecular and phenotypic techniques. For molecular serotyping, a test based on a microarray platform was used (*Check and Trace*, Check points). After serotyping, the isolates were evaluated for identification of carbapenemase, MCR 1-2 (colistin resistance), AmpC (Cefalosporinase do tipo C) and ESBL's (β -lactamases resistance) genes. For antibiotic resistance phenotypic identification, the minimal inhibitory concentration (MIC) for the antibiotics meropenem, amoxicillin and ceftriaxone were evaluated. The most prevalent serotypes identified were *S. Infantis* and *S. Saintpaul*, both with a prevalence of 15.07% (3/19). The other strains identified were *S. Cerro*, *S. Sandiego*, *S. Kentucky*, *S. Alachua*, *S. Javiana*, *S. Livingstone*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, non-enteric *Salmonella* and a *Salmonella* not typifiable by the serotyping kit. All samples were negative for the identification of carba, MCR, ESBL and AmpC genes resistance. In the phenotypic profile, meropenem was the least resistant, while amoxicillin and ceftriaxone showed a high pattern of resistance. The results show that phenotypic resistance is not associated with the presence of resistance genes studied here. Also, resistant bacteria found in MIC may have resistance mechanisms not associated with the genes studied here. Additional measures must be implemented to prevent the indiscriminate use of antimicrobial agents therapeutically or as growth promoters.

Key words: antimicrobial, broiler, carbapenemase, ESBL.

Introdução

As infecções por *Salmonella* ainda são uma preocupação mundial em relação à saúde pública, sendo considerada um dos agentes de maior importância clínica que causam doença em humanos. A composição genética das cepas de *Salmonella* permite sua adaptação em vários ambientes, aumentando a dificuldade em eliminar a bactéria. Por anos, agentes antimicrobianos têm sido utilizados em larga escala na produção avícola para uso terapêutico, profilático e como promotores de crescimento, o que exerce uma pressão seletiva na bactéria, contribuindo para sua resistência (1). Em especial, a emergência de novas cepas multirresistentes (principalmente aos antimicrobianos β -lactâmicos de 3ª e 4ª geração e às carbapenemases), traz um novo desafio em termos de eficiência de tratamento nas infecções causadas por bactérias gram-negativas (2). A prevenção e o controle de doenças transmitidas por alimentos vêm sendo citados como um desafio e a resistência antimicrobiana entre patógenos alimentares como um problema crescente (3).

Os dois principais fatores envolvidos no desenvolvimento da resistência aos antibióticos em bactérias são a pressão seletiva e a presença de genes de resistência (4). Os genes que codificam resistência aos antimicrobianos podem estar localizados no cromossomo ou nos plasmídeos. O DNA cromossômico é relativamente mais estável, enquanto o DNA plasmidial é facilmente transportado de uma linhagem para outra por conjugação bacteriana, permitindo uma transferência de genes em conjunto incluindo os de resistência a antimicrobianos (5).

Dentre os diversos antimicrobianos, a resistência aos de β -lactâmicos e a colistina se destacam devido a importância para a saúde humana. A expressão de genes de β -lactamases de espectro estendido (ESBL's), β -lactamases, Cefalosporinase do tipo C(AmpC) ou carbapenemases (carba) são mecanismos que merecem destaque no que diz respeito a resistência aos de β -lactâmicos, assim como são a expressão de genes MCR 1-2 para a resistência a colistina. Dessa forma, a pesquisa para detecção da presença de genes de resistência codificadores de β -lactamases e colistina em bactérias tem sido realizada em todo o mundo.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi analisar 19 isolados de *Salmonella* spp., oriundos de propé de cama aviária de lotes de frango de corte no Estado de São paulo, por meio da tipificação dos isolados, análise do perfil molecular de resistência aos β -lactâmicos (ESBL's, AmpC, carba) e a colistina (MCR 1-2) assim como identificar o perfil de resistência

fenotípica pela determinação da minimal inhibitory concentration MIC ao meropenem, amoxicilina e ceftriaxona.

Material e Métodos

Foram analisadas 19 cepas de *Salmonella* isoladas de swab de arrasto de cama de frangos de corte com 30 dias de idade, no Estado de São paulo isoladas no Instinto Biológico, localizado na cidade de Descalvado-SP. A escolha das cepas foi aleatória dentro da biblioteca de *Salmonella* spp. isolada de swabs de aviários de frango de corte do estado de São paulo entre janeiro e julho de 2020. As cepas não estavam identificadas quanto ao sorotipo e a sorotipagem molecular foi realizada utilizando , uma plataforma de PCR microarrays (*Check and Trace*, Check points). Cada posição no microarray representa um marcador de DNA específico associado a uma sequência alvo única de *Salmonella*. Os alvos somente se tornam visíveis caso os marcadores de DNA corresponderem exatamente às sequências de DNA equivalentes do isolado de *Salmonella*. O software fornecido com o teste converte essas pontuações nos sorotipos conhecidos.

Os isolados foram ressuspensos em caldo BHI e incubados em ágar XLD para a realização da PCR, utilizando-se o kit comercial Check MDR CT103XL (Check Points B.V., Netherlands), para tipificação molecular e identificação de genes carba, MCR 1-2, AmpC e ESBL's. O DNA foi extraído pelos reagentes presentes no kit comercial Check MDR CT103XL (Check Points B.V., Netherlands). A extração de DNA foi feita por meio do kit DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen) adaptando para o protocolo do fornecedor. O material inicialmente utilizado foi uma colônia pura isolada em ágar TSA (Tryptic Soy Agar). Em um microtubo de 1,5ml, foi adicionado 180µl de tampão ATL e 20µl de solução de proteinase K. Essas colônias foram ressuspensas nessa solução, homogeneizadas por vortexização e incubadas a 56°C em bloco de aquecimento por 01 hora. Os passos seguintes foram conduzidos de acordo com a recomendação do fornecedor. O volume final eluído foi diluído na concentração de 1:5 e usado na solução de trabalho. O kit comercial Check MDR CT103XL (Check Points B.V., Netherlands) foi utilizado conforme as orientações do fabricante e consistiu em 3 passos: reconhecimento do DNA, amplificação e detecção. O reconhecimento molecular específico de sequências de alvo de DNA e amplificações subsequentes foi realizado com primers universais. A reação de detecção de ligação multiplex gerou coleções de moléculas de DNA que foram posteriormente amplificadas por meio de um

único par de amplímeros usando PCR. Os produtos de PCR foram então classificados por hibridização para um microarray de DNA de baixa densidade. A hibridização positiva foi detectada usando um marcador de biotina incorporado em um dos primers de PCR. As amostras foram então inseridas no leitor de tubo ATR03 de canal único após a conclusão da reação de detecção, e as imagens foram adquiridas e interpretadas com software fornecido pelo fabricante (Check Points, Wageningen, Holanda), seguindo o protocolo descrito por Cuzon et.al (2012).

Fig.1 – Genes β -lactamase reportados pelo Check MDR CT103XL



Table 3: β -lactamase genes reported by the Check-Points software.

Carbapenemases	ESBLs		Minor ESBLs	AmpCs	MCR	
GES	CTX-M-1 group	TEM wt	SHV wt	BEL	ACC	MCR 1-2
GIM	CTX-M-1 subgroup	TEM 104K	SHV 238A	GES	ACT/MIR	
IMP	CTX-M-2 group	TEM 164C	SHV 238S	PER	CMY I/MOX	
KPC	CTX-M-3 subgroup	TEM 164H	SHV 240K	VEB	CMY II	
NDM	CTX-M-8 group	TEM 164S			DHA	
OXA-23	CTX-M-9 group	TEM 238S			FOX	
OXA-24	CTX-M-15 subgroup					
OXA-48	CTX-M-25 group					
OXA-58	CTX-M-32 subgroup					
VIM						
SPM						

Para identificação do fenótipo de resistência a antibióticos, foi realizada a metodologia de micro diluição em caldo para determinação da MIC para três diferentes agentes antimicrobianos (Meropenem, Amoxicilina e Ceftriaxona). A interpretação dos resultados foi feita conforme a Clinical and Laboratory Standards Institute (7). Os isolados de *Salmonella* foram inoculados em placas de ágar nutriente e incubados à 37°C por 24 horas. As colônias isoladas foram coletadas e suspendidas em solução salina estéril (0,9%) e diluída para uma concentração final de 1×10^5 UFC por poço (0,5 McFarland Standard) em caldo mulher Hinton. Após, diferentes concentrações de meropenem, amoxicilina e ceftriaxona foram adicionadas aos poços. O controle positivo e negativo foi adicionado para análise. As análises foram feitas em triplicata. A placa foi incubada a 37°C por 24-48 horas e a concentração inibitória mínima foi determinada para cada amostra.

Resultados e Discussão

Entre as 19 amostras de *Salmonella* spp., foram identificados 12 sorotipos (Tabela 1). Os sorotipos mais prevalentes foram *Salmonella* Infantis (15,7%) e *Salmonella* Saintpaul (15,7%), seguidos de *Salmonella* Cerro (10,5%), *Salmonella* Sandiego (10,5%), *Salmonella* Kentucky (10,5%), *Salmonella* Alachua (5,2%), *Salmonella* Javiana (5,2%), *Salmonella* Livingstone (5,2%), *Salmonella* Typhimurium (5,2%), *Salmonella* Heidelberg (5,2%), *Salmonella* não entérica (5,2%) e *Salmonella* genovar 3076 (5,2%) (tabela 1), que consiste em uma cepa cuja subespécie não consta no banco de dados do kit de tipificação.

Tabela 1 – Sorotipos de *Salmonella* spp. de 19 isolados em propés de cama de lotes de frango de corte no Estado de São paulo entre os meses de Jan a Jun de 2020.

Sorotipo identificado	Nº de amostras		Nº Resistentes (antibiótico) pela MIC
	N	%	
<i>Salmonella</i> Infantis	3	15,70% (3/19)	1 (amoxicilina)
<i>Salmonella</i> Saintpaul	3	15,70% (3/19)	1 (amoxicilina)
<i>Salmonella</i> Cerro	2	10,50% (2/19)	1 (ceftriaxona)
<i>Salmonella</i> Sandiego	2	10,50% (2/19)	0
<i>Salmonella</i> Kentucky	2	10,50% (2/19)	0
<i>Salmonella</i> Alachua	1	5,20% (1/19)	0
<i>Salmonella</i> Javiana	1	5,20% (1/19)	0
<i>Salmonella</i> Livingstone	1	5,20% (1/19)	0
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1	5,20% (1/19)	1 (ceftriaxona)
<i>Salmonella</i> Heidelberg	1	5,20% (1/19)	1 (amoxicilina e ceftriaxona)
<i>Salmonella</i> não entérica	1	5,20% (1/19)	0
<i>Salmonella</i> genovar 3076	1	5,20% (1/19)	1 (amoxicilina e ceftriaxona)

A Salmonelose é uma das infecções alimentares humanas mais comuns em todo o mundo (8). De janeiro a junho de 2020, um surto com 473 pessoas com a doença foi notificado nos Estados Unidos (*S. Braenderup*, *S. Muenchen*, *S. Thompson*, *S. Typhimurium*). Ainda, entre o final de 2020 e início de 2021, outros surtos que acometeram aproximadamente 200 pessoas,

foram reportados, envolvendo as cepas *S. Newport*, *S. Thompson*, *S. Enteritidis*, *S. Potsdam* e *S. Miami* (9).

No Brasil os dados a respeito de surtos humanos são muitas vezes escassos, mas foi realizado o levantamento de casos confirmados de óbitos causados por *Salmonella* registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), entre 1º de janeiro de 2013 e 31 de dezembro de 2017. Foram utilizadas as taxas de óbito em conformidade com as regiões do Brasil e faixa etária entre os anos de 2013 e 2017 com base nos registros do Sinan e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), sendo os resultados: 2013 – 07 óbitos, 2014 – 18 óbitos, 2015 – 11 óbitos, 2016 – 10 óbitos, 2017 – 17 óbitos (Furquim et. al, 2021). A taxa de óbitos pela bactéria continua sendo crescente em crianças menores de 1 ano e idosos a partir de 60 anos, sobretudo nos maiores de 80 anos (10).

Sob uma perspectiva global, *Salmonella* Enteritidis tem sido o sorotipo mais isolado em humanos doentes, seguido de *Typhimurium*. Além destes dois sorotipos, há tantos outros frequentemente isolados em uma dimensão global, sendo eles, respectivamente: *Salmonella Newport* (isolado principalmente nas Américas do Norte e Latina e na Europa), *Infantis* (distribuído mundialmente), *Virchow* (registrado principalmente na Ásia, Europa e Oceania), *Hadar* (frequente na Europa) e *Agona* (frequente nas Américas do Norte e Latina e na Europa) (11).

A hidrólise de antibióticos β -lactâmicos pelas β -lactamases é o mecanismo de resistência mais comum para essa classe de agentes antimicrobianos em bactérias gram-negativas clinicamente importantes (12). Das 19 amostras de *Salmonella* testadas, todas tiveram resultado negativo para a presença de genes de resistência carba, ESBL e AmpC. Na análise de identificação do fenótipo de resistência a antibióticos (Fig.1), nenhuma das amostras testadas apresentou 100% de resistência ou sensibilidade aos antimicrobianos utilizados (tabela 1). O fato de algumas amostras terem mostrado alta resistência aos antimicrobianos testados, porém não terem apresentado genes de resistência na análise molecular, pode ser explicado pelas diferentes formas como as bactérias desenvolvem mecanismos de resistência. A detecção das β -lactamases tem algumas limitações como a presença de outros mecanismos de resistência no mesmo microrganismo (alterações de permeabilidade, por exemplo) e produção simultânea de outras β -lactamases, podendo ocorrer também a hiperprodução de uma β -lactamase confundindo fenotipicamente a classificação do microrganismo. Dessa

maneira, esses fatores podem interagir fazendo com que a leitura dos testes fenotípicos seja diferente (13).

Alguns mecanismos de resistência mais frequentes incluem a redução da concentração intracelular do antibiótico, por redução da permeabilidade celular ou por efluxo do antibiótico, que é um mecanismo com particular interesse, uma vez que algumas das bombas de efluxo têm a capacidade de expulsar da célula bacteriana várias classes de antibióticos, podendo contribuir para a emergência de fenótipos multirresistentes (MDR) (14).

A resistência aos carbapenemas em microrganismos Gram-negativos pode ser decorrente de múltiplos mecanismos, como alterações nos lipopolissacarídeos, hiper expressão de bombas de efluxo, perdas de porinas, mutações na cápsula polissacarídea e produção de enzimas β -lactamases (em especial as carbapenemases) (15). Como os genes testados estão associados a esta terceira condição - produção de enzimas (β -lactamases) que degradam os carbapenemas, a resistência encontrada nas cepas que não apresentaram genes carba, ESBL e AmpC, pode se dar por essas duas condições anteriores (ou diminuição da permeabilidade da membrana externa aos antimicrobianos, pela perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa, ou hiper expressão de bombas de efluxo, que reduzem a concentração de antimicrobiano no interior das células). A resistência ao meropenem pode ser devido a presença de outro gene associado a produção da enzima β -lactamase (que não foi testado), como por exemplo a carbapenemase metalo-beta-lactamase (16).

Em um trabalho recente conduzido no Egito, *swabs* cloacais foram coletados de aves comerciais para detecção de *Salmonella*. As taxas de isolamento foram de 3,4% em aves clinicamente saudáveis e 11,1% nas aves com sintomas de diarreia. Todos os isolados de *Salmonella* pertenciam aos sorotipos de relevância em saúde pública - Typhimurium, Kentucky e Infantis. Para o teste de susceptibilidade dos isolados aos antibióticos, foi realizado o teste de difusão em disco e de 20 amostras, 19 apresentaram resistência a mais de um antibiótico, sendo que dessas 19,04% foram ESBL negativas que continham o gene CMY II e eram resistentes à cefalosporina (17).

Já em outro trabalho conduzido na Coreia do Sul, foram investigados mecanismos de resistência e características moleculares de isolados de *Salmonella* Virchow em amostras de fezes e carcaças de bovinos, suínos e aves coletadas entre 2010 e 2017. A grande parte das amostras resistentes (96,4%) foram de aves. Todas as cepas resistentes a cefalosporinas de espectro estendido produziram ESBL do tipo CTX-M-15 e/ou β -lactamase AmpC do tipo

CMY II, evidenciando a importância urgente de práticas de biossegurança na indústria avícola (18).

Para o meropenem, uma amostra (5,2%) apresentou sensibilidade, enquanto as demais (94,7%) tiveram resistência intermediária. Em humanos, esse agente antimicrobiano é utilizado em casos que a bactéria já apresentou resistência a outros antimicrobianos (19). Em um recente trabalho em que isolados de *Salmonella* spp. oriundos de carcaças de frango foram analisados quanto ao perfil de resistência, 100% dos isolados foram sensíveis ao meropenem (20). Dados semelhantes foram encontrados em um estudo, que ao avaliar sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, encontrou um resultado de 100% de sensibilidade ao meropenem nos sorotipos de *Salmonella* testados, entre eles o sorovar Heidelberg (21). Na medicina humana, o meropenem é uma das drogas de primeira escolha para início de tratamento empírico em doentes com infecção grave e agente etiológico desconhecido (20) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a restrição completa de todas as classes de antimicrobianos importantes na medicina humana para uso na promoção do crescimento de animais que produzem alimentos (22). As peculiaridades desse antimicrobiano e sua pouca disponibilidade na avicultura, podem justificar a maior sensibilidade das cepas testadas no trabalho.

Em relação à amoxicilina, 13 amostras (68,4%) apresentaram resistência intermediária e 04 (21,05%) foram altamente resistentes. Em um trabalho realizado com isolados de *Salmonella* spp. de uma planta de abate de frangos no Estado de São Paulo, para avaliação do perfil de resistência a agentes antimicrobianos, de um total de 29 amostras, 16 (55,2%) foram resistentes à amoxicilina. Foram observados resultados intermediários os quais devem ser considerados resistentes, pois o uso destas drogas antimicrobianas como sensíveis, somente fariam seleção de cepas resistentes, 9 (31,03%) amostras apresentaram comportamento intermediário à amoxicilina (23). Galdino et. al (2013) analisaram o perfil de resistência a diferentes antimicrobianos em 18 amostras de *Salmonella* spp. provenientes de swabs de arrasto de lotes de frango de corte durante o ano de 2009 e os dados indicaram que das amostras realizadas, a maior resistência foi à amoxicilina, com 27,7%. O alto perfil de resistência à amoxicilina pode ser explicado devido ao amplo uso desse antimicrobiano na avicultura. Um estudo relativo ao uso de medicamentos em avicultura de postura no Brasil, descreveu os antimicrobianos mais comumente utilizados. Para finalidade terapêutica, dentre vários medicamentos, a amoxicilina é citada (25).

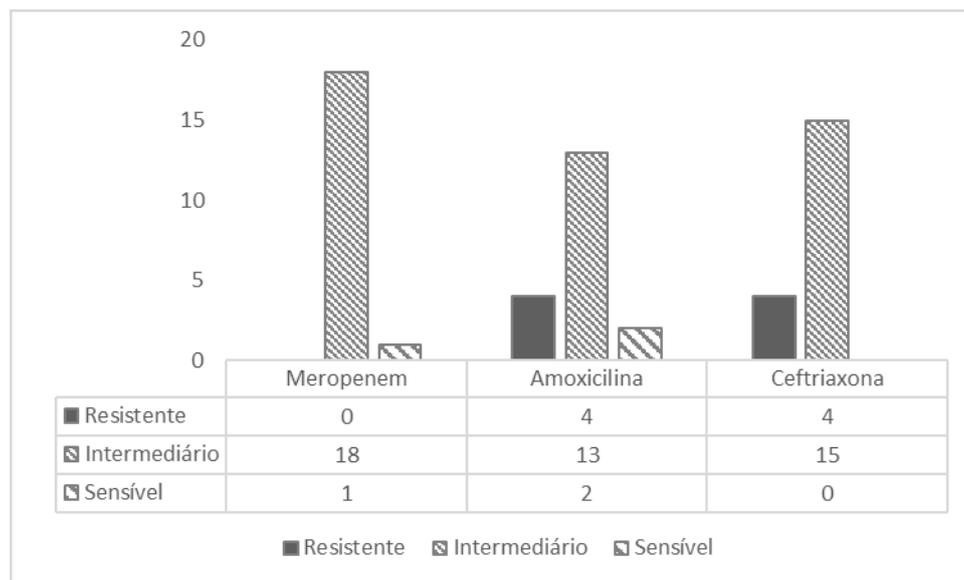
Já para a ceftriaxona, 15 amostras (78,9%) apresentaram resistência intermediária e 04 (21,05%) alta resistência nesse trabalho. Em um trabalho parecido, conduzido em Cuba, de um total de 28 isolados de *Salmonella* spp., um número importante de 06 (21,4%) apresentaram resistência a ceftriaxona, que é o antibiótico de primeira eleição para o tratamento de salmonelose não invasiva em adultos e principalmente, em crianças (26). Interessantemente a ceftriaxona não é utilizada na produção de aves, mas provavelmente outro antibiótico da mesma classe pode estar induzindo a resistência à cefalosporina em isolados de frango, como por exemplo o ceftiofur uma cefalosporina de 3º geração usada na indústria avícola.

O ceftiofur já foi comumente administrado em pintinhos de um dia, juntamente com a vacina da Marek em incubatórios comerciais, como forma de prevenir doenças em frangos (8). O uso de ceftiofur na produção avícola também tem sido responsável pelo aumento de isolados resistentes de *E. coli* e *Salmonella* Heidelberg no Canadá (27). De acordo com Frye e Cay (2007), o elemento genético responsável pela maior parte da resistência ao ceftiofur em *Salmonellas* sp. isoladas a partir de animais nos EUA parece ser o gene BlaCMY, pois eles conseguiram isolar esse gene dos plasmídeos das cepas de *Salmonella* sp. resistentes, inferindo dessa forma que o aumento da resistência está relacionado a passagem do gene através do plasmídeo entre os diferentes sorotipos de *Salmonella* sp. Essa mesma constatação foi relatada em outro trabalho, onde os dezenove isolados resistentes ao Ceftiofur carregavam o gene BlaCMY (29). No entanto, dos isolados estudados por Frye e Cray (2007), 17% dos resistentes não tiveram o gene BlaCMY ou algum dos outros genes β -lactamases resistentes detectado através do PCR, levantando uma preocupação de que outros mecanismos não detectados estão associados a resistência ao ceftiofur.

A emergência de resistência bacteriana às classes de cefalosporinas e fluoroquinolonas é uma grande preocupação uma vez que ambas são amplamente utilizadas em tratamentos de infecções humanas e a resistência a essas drogas pode resultar em sérias complicações aos tratamentos (30). O Sistema Nacional de Monitoramento de Resistência Antimicrobiana (SNMRA) apresentou dados (de 1996 a 2007) que são mais compreensíveis, reportando a emergência de isolados de *Salmonellas* não tifóides que são resistentes ao ácido nalidíxico e ceftriaxona. Esse fenômeno tem aumentado a preocupação entre as autoridades de saúde pública a respeito tanto do manejo clínico, quanto da prevenção da infecção (31).

O efeito de resistência antimicrobiana em bactérias de origem animal tem sido amplamente estudado. O foco maior tem sido retirar drogas para tratamentos em humanos que estão sendo utilizadas como promotores de crescimento ou como drogas profiláticas na alimentação de animais de produção. Bactérias de origem animal podem atingir a população humana de várias formas: contaminação de fontes hídricas, contaminações no abate, efluentes de granjas e outros. Isto se torna particularmente importante com bactérias entéricas. Indivíduos que são mais expostos, como trabalhadores da indústria da carne, tratadores de animais e veterinários, costumam ter um grau de resistência a antimicrobianos maior do que a população em geral. Entretanto, torna-se quase impossível quantificar a transferência desta resistência visto que o mesmo princípio ativo pode ter sido usado também em humanos (32).

Fig.2 – Número de isolados com resistência, resistência intermediária e sensibilidade aos agentes antimicrobianos testados.



Pelos resultados apresentados no trabalho, a alta resistência e resultados intermediários a amoxicilina e ceftriaxona e meropenem é um grande ponto de atenção para o uso indiscriminado de antibióticos no tratamento de infecções e a adição em rações animais como promotores de crescimento, que podem contribuir para a seleção de cepas resistentes. Ressalta-se ainda a importância de medidas profiláticas de biossegurança para conter a disseminação de doenças ou impedir que os lotes sejam acometidos.

Conclusão

De acordo com os dados obtidos nesta pesquisa os sorotipos mais relevantes foram S. Infantis, S. Heidelberg e S. Typhimurium. Apesar das cepas de *Salmonella* spp. não terem apresentado genes de resistência carba, MCR, ESBL e AmpC, alguns isolados apresentaram alto perfil de resistência e perfil intermediário pela MIC ,trazendo grande preocupação já que houve alta resistência as drogas testadas e nenhuma expressão de genes de resistência . Esse evento pode ter ocorrido por processos de resistência por mutação espontânea e seleção relacionandos a genes não estudados nesse trabalho. Essa resistência fenotípica no entanto, pode contribuir para a emergência de fenótipos multirresistentes.

Referências

1. Chantziaras I, Boyen F, Callens B, Dewulf J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: A report on seven countries. J Antimicrob Chemother. 2014;69(3):827–34.
2. Eng SK, Pusparajah P, Ab Mutalib NS, Ser HL, Chan KG, Lee LH. Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. Front Life Sci [Internet]. 2015;8(3):284–93. Available from: <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
3. van Seventer JM, Hamer DH. Foodborne Diseases [Internet]. Second Edi. Vol. 3, International Encyclopedia of Public Health. Elsevier; 2016. 160–173 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00162-4>
4. Witte W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: Environment. Int J Antimicrob Agents. 2000;14(4):321–5.
5. KONEMAN E., ALLEN S., JANDA W., SCHRECKENBERGER P., WINN JR. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Willians & Wilkins, editor. Philadelphia: Lippincott; 1997. 1395 p.
6. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). J Antimicrob Chemother. 2012;67(8):1865–9.
7. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI Document M100-S25. Vol. 32, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 25th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory

- Standards Institute; 2015. 2015. 1–184 p.
8. Webster P. The perils of poultry. *CMAJ*. 2009;181(1–2):21–4.
 9. Popa GL, Popa MI. Salmonella spp. Infection – a continuous threat worldwide. *Germs*. 2021;11(1):88–96.
 10. Saúde MD. DATASUS [Internet]. 2020. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def.%0D>
 11. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DMA, Jensen AB, Wegener HC, et al. Global monitoring of salmonella serovar distribution from the world health organization global foodborne infections network country data bank: Results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis*. 2011;8(8):887–900.
 12. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969–76.
 13. GRALHA REF. Métodos de pesquisa de beta-lactamases em amostras clínicas – estudo de revisão [Internet]. Universidade Fernando Pessoa; 2011. Available from: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/2443/4/TM_16584.pdf
 14. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev*. 1996;60(4):575–608.
 15. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):5873–84.
 16. Bertoncheli C de M, Horner R. A review on metallo-beta-lactamases. *Rev Bras Ciencias Farm*. 2008;44(4):577–99.
 17. Sabry MA, Abdel-Moein KA, Abdel-Kader F, Hamza E. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella* serovars among healthy and diseased chickens and their public health implication. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2020;22:742–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.019>
 18. Na SH, Moon DC, Kang HY, Song HJ, Kim SJ, Choi JH, et al. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase/AmpC-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated from food-producing animals during 2010–2017 in South Korea. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2020;322(September 2019):108572. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108572>
 19. Barreto NSRP, Míriam G. Marquezini, Bromberg R, Porto E, Gilma S. Sturion. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE CEPAS DE SALMONELLA SPP. ISOLADAS DE AVIÁRIOS FRENTE A ANTIBIÓTICOS CARBAPENÊMICOS. 9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo. 2015.
 20. Tuon FF, Rocha JL, Leite TM, Dias C. A simple mathematical model to determine the ideal empirical antibiotic therapy for bacteremic patients. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 2014;18(4):360–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.11.006>
 21. Pandini JA, Pinto FG da S, Muller JM, Weber LD, Moura AC de. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do

- Paraná, Brasil. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)*. 2015;82(0):1–6.
22. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe sobre surtos notificados de doenças transmitidas por água e alimentos - Brasil, 2016-2019. 2020;51:27–31. Available from: www.saude.gov.br/svs
 23. Cortez ALL, Carvalho AC de FB de, Ikuno AA, Bürger KP, Vidal-Martins AMC. Resistência Antimicrobiana De Cepas De Salmonella Spp. Isoladas De Abatedouros De Aves. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)*. 2006;73(2):157–63.
 24. Galdino VMCA, de Melo RT, Oliveira RP, Mendonça EP, Nalevaiko PC, Rossi DA. Virulência de Salmonella spp. de origem avícola e resistência a antimicrobianos. *Biosci J*. 2013;29(4):932–9.
 25. Ministério da Saúde. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet - Relatório 2004 / 2005 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (3º e 4º anos de atividades). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2006.
 26. Sonali Rivera Corona M, Granda A, Felipe L, Bonachea H. Resistencia antimicrobiana en cepas de Salmonella enterica subsp. enterica aisladas en carnes de aves importadas. *Rev Salud Anim*. 2012;34(2):120–6.
 27. Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, et al. Ceftiofur resistance in Salmonella enterica serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):48–54.
 28. Frye JG, Fedorka-Cray PJ. Prevalence, distribution and characterisation of ceftiofur resistance in Salmonella enterica isolated from animals in the USA from 1999 to 2003. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30(2):134–42.
 29. Alcaine SD, Sukhnanand SS, Warnick LD, Su WL, McGann P, McDonough P, et al. Ceftiofur-resistant Salmonella strains isolated from dairy farms represent multiple widely distributed subtypes that evolved by independent horizontal gene transfer. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(10):4061–7.
 30. Hur J, Jawale C, Lee JH. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: A review. *Food Res Int [Internet]*. 2012;45(2):819–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.014>
 31. Crump JA, Medalla FM, Joyce KW, Krueger AL, Hoekstra RM, Whichard JM, et al. Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal Salmonella enterica isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(3):1148–54.
 32. Prescott J.F, Baggot J.D, Walker R.D. Antimicrobial drug resistance and its epidemiology. In: Ames, editor. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Iowa University Press; 2000. p. 27–49.