

JULIANA LÍBERO GROSSI

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM
Salmonella enterica DA CADEIA PRODUTIVA DE AVES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Magister Scientiae

Orientador: Luís Augusto Nero

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G878c
2021

Grossi, Juliana Líbero, 1995-
Caracterização do perfil de resistência a antibióticos em
Salmonella enterica da cadeia produtiva de aves / Juliana Líbero
Grossi. – Viçosa, MG, 2021.
53 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luís Augusto Nero.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Salmonella*. 2. Resistência Microbiana a Medicamentos.
3. Alimentos de origem animal. 4. Microrganismos patogênicos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 579.344

JULIANA LÍBERO GROSSI

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM
Salmonella enterica DA CADEIA PRODUTIVA DE AVES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2021.

Assentimento:


Juliana Líbero Grossi
Autora


Luís Augusto Nero
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade, saúde e determinação para alcançar este objetivo.

Ao meu orientador, professor Dr. Luís Augusto Nero, obrigada pela paciência, ensinamentos e apoio durante todos esses anos e pela confiança depositada em meu trabalho.

Ao meu coorientador professor Dr. Ricardo Seiti Yamatogi, obrigada por toda ajuda e disponibilidade.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária, especialmente ao Dagô, Sr. Luís, Marcinho, Alex, e Nívia pelo suporte e amizade.

A todos os colegas do laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (InsPOA), por serem solícitos, pela amizade e por trazerem ao ambiente de trabalho a alegria, união e leveza.

Aos estagiários que passaram pelo InsPOA, que contribuíram de alguma forma para a realização das atividades.

Aos colegas e professores do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Laboratório de Biologia Molecular, especialmente à Mariana Barros pelo conhecimento compartilhado.

À Bruna e Cibeli, amigas que são exemplos de dedicação, obrigada pelos ensinamentos e apoio.

Às amigas da Pós-Graduação, Mili, Mallu, Lore, Lari, Flávia, Rafa, Mirian, Vivi, Nat e Thaiza pelo carinho e companheirismo.

A todos os amigos, pelo incentivo e compreensão.

Por fim, meu muito obrigada a minha família, especialmente aos meus pais, Júlia e Sérgio, e minha irmã Luísa, por serem meu refúgio e alicerce, e por apoiarem as minhas escolhas.

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

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

RESUMO

GROSSI, Juliana Líbero, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2021. **Caracterização do perfil de resistência a antibióticos de isolados de *Salmonella enterica* obtidos na cadeia produtiva de aves.** Orientador: Luís Augusto Nero.

Alimentos de origem animal são importantes fontes de disseminação de micro-organismos resistentes a antibióticos, um desafio global que deve ser gerenciado considerando uma abordagem em Saúde Única. A cadeia produtiva de aves, em especial, contribui de maneira relevante para esse problema, com destaque para *Salmonella enterica* devido a sua patogenicidade, prevalência e emergência de cepas resistentes a antibióticos. O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil de resistência de isolados de *S. enterica* obtidos em uma cadeia produtiva de aves. O estudo foi dividido em duas fases: 1) determinação dos perfis fenotípicos e genotípicos de resistência e 2) avaliação da atividade de bombas de efluxo dos isolados considerados multidroga-resistentes (MDR). Isolados de *S. enterica* (n = 96) foram selecionados de um estudo prévio de caracterização da distribuição desse patógeno em uma cadeia produtiva de aves, e submetidos a caracterização da resistência fenotípica pelo teste de diluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de 11 antibióticos e da associação trimetoprim-sulfametoxazole. Ainda, os isolados foram avaliados quanto a presença de 21 genes associados a resistência pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Isolados com resultados positivos para *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* (associados a resistência a ciprofloxacina) foram submetidos a High Resolution Melting (HRM) para detecção de mutações e os produtos de amplificação foram posteriormente sequenciados para caracterizar as mutações identificadas. A atividade de bombas de efluxo foi mensurada pela avaliação em ágar da exportação de brometo de etídeo (BrEt). Os principais fenótipos de resistência encontrados foram à estreptomicina (n = 33, 34,4%), ampicilina (n = 11, 11,4%) e cefoxitina (n = 6, 6,3%). Ciprofloxacina apresentou um perfil intermediário de resistência em que 94 (97,9%) isolados apresentaram MIC $\geq 0,0125$ $\mu\text{g/mL}$. Entre os genes pesquisados, 51 (53,1%) isolados apresentaram *aphA* e 94 (97,9%) *qnrB*. *aphA* foi detectado nos isolados resistentes à kanamicina e *qnrB* foi observado somente nos isolados com MIC $\geq 0,0125$ $\mu\text{g/mL}$ para ciprofloxacina. Entre os isolados que apresentaram resultados positivos para *gyrA* (n = 94, 97,9%), *gyrB* (n = 96, 100%), *parC* (n = 95, 99%) e *parE* (n = 96, 100%), variações por HRM foram detectadas e foram selecionados sequências de *gyrA*, *gyrB* e *parC* para sequenciamento. Não foram detectadas mutações nas sequências de *gyrA*, os amplicons de *gyrB* apresentaram mutações silenciosas e os três amplicons de *parC* apresentaram a mutação Thr57Ser. Seis isolados

caracterizados como MDR foram selecionados e quatro deles apresentaram atividade de bomba efluxo na concentração 0,4 mg/L de BrEt; na concentração de 0,8 mg/L não foi detectada atividade de bomba efluxo em nenhum dos isolados. Os resultados deste estudo evidenciam a redução da susceptibilidade de *S. enterica* à ciprofloxacina, associada à distribuição de *qnrB* e de mutação em *parC*, sendo um alerta preocupante, visto a importância desse antibiótico para a saúde humana. A atividade de bombas de efluxo multidroga foi caracterizada em alguns isolados MDR, o que ressalta a importância desse mecanismo como uma alternativa para o desenvolvimento de resistência a antibióticos por *Salmonella*.

Palavras-chave: *Salmonella*. Resistência a antibióticos. Ciprofloxacina. Bombas de efluxo.

ABSTRACT

GROSSI, Juliana Líbero, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2021. **Characterization of the antibiotic resistance profile of *Salmonella enterica* isolates obtained in the poultry production chain.** Advisor: Luís Augusto Nero.

Animal foods are important sources for spreading antibiotic resistant microorganisms, a global challenge that must be managed considering an approach based on One Health. The poultry production chain, in particular, contributes significantly to this problem, with emphasis to *Salmonella enterica* due to its pathogenicity, prevalence and emergence of antibiotic resistant strains. The aim of this study was to characterize the resistance profile of *S. enterica* isolates obtained from a poultry production chain. The study was divided into two steps: 1) determination of phenotypic and genotypic resistance profiles and 2) evaluation of the efflux pumps activity of isolates considered multidrug resistant (MDR). *S. enterica* isolates (n = 96) were selected from a previous study to characterize the distribution of this pathogen in a poultry production chain, and subjected to the characterization of phenotypic resistance by the broth dilution test and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) to 11 antibiotics and to the trimethoprim-sulfamethoxazole association. Moreover, the isolates were evaluated for the presence of 21 genes associated with resistance by Polymerase Chain Reaction (PCR). Isolates with positive results for *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* (associated with ciprofloxacin resistance) were subjected to High Resolution Melting (HRM) to detect mutations and the amplification products were subsequently sequenced to characterize the identified mutations. The efflux pumps activity was measured by evaluating the export of ethidium bromide (EtBr) on agar. The main resistance phenotypes found were streptomycin (n = 33, 34,4%), ampicillin (n = 11, 11,4%) and cefoxitin (n = 6, 6,3%). Ciprofloxacin showed an intermediate resistance profile in which 94 (97,9%) isolates had MIC $\geq$ 0.0125 μ g/mL. Among the researched genes, 51 (53,1%) isolates harbored *aphA* and 94 (97,9%) *qnrB*. *aphA* was detected in isolates resistant to kanamycin and *qnrB* was observed only in isolates with MIC $\geq$ 0.0125 μ g/mL for ciprofloxacin. Among the isolates that showed positive results for *gyrA* (n = 94, 97,9%), *gyrB* (n = 96, 100%), *parC* (n = 95, 99%), and *parE* (n = 96, 100%), variations by HRM were detected and were selected sequences of *gyrA*, *gyrB* and *parC* for sequencing. None mutation was detected in the *gyrA* sequences, the *gyrB* amplicons showed silent mutations and the three *parC* amplicons showed the Thr57Ser mutation. Six isolates characterized as MDR were selected and four of them showed efflux pump activity at a concentration of 0,4 mg/L of EtBr; at a concentration of 0,8 mg/L, none efflux pump activity was detected in any of the isolates. The

results of this study show a reduction in the susceptibility of *S. enterica* to ciprofloxacin, associated with the distribution of *qnrB* and mutation in *parC*, being a worrying alert, given the importance of this antibiotic for human health. The activity of multidrug efflux pumps was characterized in some MDR isolates, which highlights the importance of this mechanism as an alternative for the development of antibiotic resistance by *Salmonella*.

Keywords: *Salmonella*. Antibiotic resistance. Ciprofloxacin, Efflux pumps

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Exemplificação dos mecanismos de resistência. A) Redução da concentração intracelular (bombas de efluxo). B) Alteração da permeabilidade da membrana celular. C) Modificações do sítio de ação, que podem ocorrer por alterações (mutações); por deslocamento, com a introdução de enzimas semelhantes ao alvo (representada em azul); e por proteção do sítio alvo, através de proteínas que se ligam a ele (em laranja); D) Degradação e inativação do antibiótico. Fonte: A autora. 6

Figura 2. Mecanismo de ação de sulfas e trimetoprim e mecanismo de resistência pela aquisição dos genes *sul* e *dfr*. Fonte: Elaborado pela autora e adaptado de GÓRNIAK (2006). 8

Capítulo 2

Figura 1 Sequências de nucleotídeos de *gyrA* (214° ao 300°), *gyrB* (1315° ao 1461°) e *parC* (133° ao 261°) de isolados de *Salmonella enterica* apresentados na (Tabela 5). As sequências foram comparadas à sequência de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 (número de acesso: CP034230.1). As mutações silenciosas estão destacadas em cinza e a mutação Thr57Ser está em amarelo.....34

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1: Genes pesquisados de acordo com as classes de antibióticos relacionadas, sequências de nucleotídeos dos primers, tamanho dos produtos amplificados em pares de base (base pair - pb), e referências.....	24
Tabela 2: Sequências de nucleotídeos dos primers utilizados para a análise de HRM, tamanho dos produtos amplificados em pares de base (base pair - pb), posição das sequências de aminoácidos obtidas e referências.....	27
Tabela 3. Número de isolados de <i>S. enterica</i> distribuídos de acordo com a concentração inibitória mínima encontrada para cada antibiótico testado. Também estão apresentados os breakpoints de resistência e as porcentagens de isolados resistentes.....	29
Tabela 4. Perfis de resistência e resistência intermediária (i) dos isolados de <i>S. enterica</i> correlacionados aos genes de resistência detectados.....	30
Tabela 5. Distribuição das temperaturas de melting (T_m) dos amplicons dos genes: <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> e <i>parE</i> , e relação de amplicons sequenciados.....	33

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	11
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
1. Salmonella.....	12
1.1 Salmonella em aves.....	13
2. Uso de antibióticos em animais produtores de alimentos.....	13
3. Resistência a antibióticos.....	14
4. Mecanismos de resistência.....	15
4.1. Modificação do alvo.....	16
4.2. Degradação e modificação do antibiótico.....	18
4.3. Alteração da permeabilidade e diminuição da concentração intracelular.....	19
5. Sistema de efluxo multidroga.....	19
REFERÊNCIAS.....	21
OBJETIVOS.....	27
CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
Resumo.....	29
Abstract.....	30
1. Introdução.....	31
2. Material e Métodos.....	31
2.1. Isolados em estudo.....	31
2.2. Perfil de resistência fenotípico.....	32
2.3. Perfil de resistência genotípico.....	32
2.4 Avaliação de regiões QRDR dos genes gyrA, gyrB, parC e parE.....	36
2.5. Avaliação da atividade de bombas de efluxo multidroga.....	37
3. Resultados e discussão.....	38
3.1. Perfil de resistência.....	38
3.2. Pesquisa de bomba de efluxo multidroga.....	44
4. Conclusão.....	45
Agradecimentos.....	46
Referências bibliográficas.....	46

INTRODUÇÃO GERAL

A cadeia produtiva de aves é um setor de grande importância à economia brasileira. *Salmonella* é um dos patógenos bacterianos de maior importância na avicultura, e acarreta prejuízos em termos de produtividade, inocuidade dos alimentos e comercialização dos produtos. *Salmonella* está presente no trato digestivo de aves e é uma das causas de infecções de origem alimentar em seres humanos. Devido a patogenicidade desse micro-organismo, medidas de controle e prevenção de sua disseminação são empregadas em toda a cadeia, visando a obtenção de um produto final seguro à saúde dos consumidores.

O uso de antibióticos é permitido nas formas profilática, metafilática, terapêutica e aditiva à alimentação dos animais na produção de carne de aves no Brasil, com os objetivos de reduzir os desafios durante o período de crescimento dos animais e melhorar a produtividade. Contudo, o uso de antibióticos em animais produtores de alimentos promove discussões a respeito de suas vantagens e desvantagens, sendo a resistência bacteriana aos antibióticos a maior consequência indesejada.

As perspectivas relacionadas ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos são preocupantes, o que demanda o estabelecimento de estratégias para a redução do uso de antibióticos e controle da disseminação de cepas bacterianas resistentes. Para isso, pesquisas no âmbito da Saúde Única são necessárias para avaliação da prevalência de micro-organismos resistentes e os seus perfis de resistência. Esses estudos devem ser desenvolvidos com o apoio de metodologias fenotípicas e moleculares, o que permite a caracterização a distribuição de cepas resistentes em diferentes etapas da cadeia produtiva e as suas potenciais rotas de contaminação para produtos finais e seres humanos.

Devido a importância da avicultura para o Brasil e a relevância de *Salmonella* nessa cadeia produtiva, assim como os desafios impostos pela resistência aos antibióticos, este estudo teve como objetivo caracterizar o perfil de resistência a antibióticos em isolados de *Salmonella enterica* obtidos na cadeia produtiva de aves.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Salmonella

Salmonella é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo e pode estar presente no intestino de humanos e animais. O gênero é composto por duas espécies: *S. enterica*, com 6 subespécies, e *S. bongori*, também caracterizadas sorologicamente conforme a presença de antígenos somático (O) e flagelares (H) em mais de 2.600 sorotipos (ANVISA, 2011; CDC, 2019; BANERJI et al., 2020). Salmonella é um dos principais agentes causadores de doenças de origem alimentar e está envolvido em inúmeros surtos registrados no mundo. Esse patógeno está amplamente distribuído nos animais domésticos e selvagens, e pode ser disseminado por meio da alimentação fornecida aos animais até pelo produto final. O contato de Salmonella com os seres humanos ocorre, na maioria dos casos, através de alimentos de origem animal e vegetal, e o patógeno pode ainda ser transmitido de uma pessoa para outra via oro-fecal (SHINOHARA et al., 2008; WHO, 2018).

S. enterica não tifoide é responsável por 78,7 milhões de casos de doenças de origem alimentar e por cerca de 59,1 milhões de mortes em todo o mundo; além disso, 9% dos casos de diarreia registrados globalmente ao ano, aproximadamente 180 milhões, têm *S. enterica* como agente etiológico (HAVELAAR et al., 2015; BESSER, 2018). A salmonelose provoca diarreia, febre e dores abdominais, sintomas que podem se iniciar após 6 horas da exposição ao agente e perduram por 4 a 7 dias. A maioria dos casos são resolvidos sem tratamento, mas conforme a intensidade dos sintomas o paciente deve ser hospitalizado (CDC, 2021).

1.1. Salmonella em aves

A presença de Salmonella está frequentemente relacionada a alimentos de origem avícola e representa uma preocupação para a saúde pública e para a economia (SHINOHARA et al., 2008). Aves podem desenvolver uma infecção clinicamente inaparente, sendo capazes de transmitir Salmonella não tifoide para o plantel e para os seres humanos (OIE, 2019). Segundo o relatório do IFSAC (2020), estima-se que a carne de aves foi responsável por 14,3% do total de casos de salmonelose nos Estados Unidos (EUA).

De acordo com a metanálise apresentada por FERRARI et al. (2019), o sorovar Enteritidis é o mais reportado em aves na Europa, América Latina, Ásia e África, assim como, também foi o mais reportado em humanos nesses locais. A prevalência de Salmonella em aves

e em carne de frangos é de aproximadamente 40,5% e 30%, respectivamente, em perspectiva global (CASTRO-VARGAS et al., 2020).

Estudos realizados no Brasil demonstraram prevalência de 3,7 a 11,6% de *Salmonella* em carcaças de frangos (DUARTE et al., 2009; GIOMBELLI & GLORIA, 2014; PANZENHAGEN et al., 2016; CUNHA-NETO et al., 2017; DE LIMA et al., 2018) e esses números são representativos visto o destaque econômico da cadeia produtiva de aves. Segundo o relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) de 2020, em 2019 o Brasil produziu cerca de 13,245 milhões de toneladas de carne de frango, sendo 7,04% produzidas no estado de Minas Gerais. 32% da produção nacional é destinada ao mercado externo, classificando o Brasil como o maior exportador mundial.

2. Uso de antibióticos em animais produtores de alimentos

Os antibióticos são amplamente utilizados em diferentes etapas da vida produtiva de animais produtores de alimentos. Estimativas mostram que em 2013 cerca de 131 mil toneladas de antibióticos foram consumidas pela produção desses animais em todo o mundo, e o valor tem perspectiva de aumento em 52,7% para 2030. A produção de aves é responsável por um pouco mais de um quarto do consumo de antibióticos dentre as cadeias de animais produtores de alimentos (VAN BOECKEL et al., 2017). A China é o principal país consumidor de antibióticos, sendo responsável por 23% do volume, e o Brasil ocupa o 3º lugar, consumindo 9% dos antibióticos destinados a animais de produtores de alimentos (VAN BOECKEL et al., 2015) e esses representaram 14% das vendas de produtos para a saúde animal no país em 2019 (SINDAN, 2020).

Os antibióticos podem ser utilizados de forma terapêutica, profilática e metafilática no controle de enfermidades nos animais, e também podem ser utilizados como aditivos à alimentação, atuando como promotores de crescimento (LANDERS, 2012). O emprego como aditivo tem como objetivo melhorar a conversão alimentar, reduzindo a competição por nutrientes e os metabólitos microbianos (DIBNER & RICHARDS, 2005; RONQUILLO & HERNANDEZ, 2017). Segundo a OIE (2018), dentre 155 países pesquisados, 45 países, incluindo o Brasil, utilizam os antibióticos como promotores de crescimento.

O uso de antibióticos em animais destinados a produção de alimentos aumentou a eficácia do sistema e reduziu o trabalho dedicado ao tratamento individual dos animais; aliados à biossegurança e higiene, previne o impacto das doenças nos sistemas de produção (KIRCHHELLE, 2018; MEHDI et al., 2018). Contudo, a utilização de antibióticos nesses

sistemas contribui para promoção de genes que conferem a resistência aos antibióticos, criando um reservatório de bactérias resistentes. Além disso, os antibióticos mais utilizados em animais produtores de alimentos são: tetraciclina, penicilinas, quinolonas e macrolídeos, que também são consideradas drogas criticamente ou altamente importantes à saúde humana (VAN BOECKEL et al., 2017; WHO, 2019; MA et al., 2020). Diante do cenário de resistência a antibióticos e conhecimento sobre os mecanismos de resistência, a Organização Mundial da Saúde recomenda que seja evitado o uso de antibióticos considerados de importância crítica à saúde humana na saúde animal (WHO, 2017).

3. Resistência a antibióticos

As infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos representam um grave problema à sociedade, acarretando custos econômicos e sociais. Estima-se que globalmente, bactérias resistentes a antibióticos causam a morte de 700.000 pessoas por ano e perspectivas indicam que 10 milhões de mortes por ano serão em consequência da resistência a antibióticos em 2050, acarretando um custo de 100 trilhões de dólares (TANG et al., 2017; O'NEILL, 2014). As discussões sobre resistência microbiana aos antibióticos ocorrem atualmente em caráter global. Organizações internacionais, nacionais e setores públicos e privados debatem as implicações e possíveis soluções para o problema emergente (WERNLI et al., 2017). No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) lançou em 2018 o PAN-BR AGRO, o plano de ação do governo federal para a prevenção e controle da resistência aos antibióticos, que tem como alguns dos objetivos: conscientização sobre o problema, fortalecimento das bases científicas, otimização do uso de antibióticos por meio das boas práticas de produção, demonstração da importância econômica do investimento em alternativas ao uso de antibióticos e outras intervenções (BRASIL, 2018).

A resistência aos antibióticos envolve as diversas populações bacterianas e como suas interações impactam a saúde humana, animal e o meio ambiente, sendo um desafio no âmbito da Saúde Única (MCEWEN & COLLINGNON, 2018). A microbiota dos animais que recebem antibióticos é submetida a pressão de seleção, e as bactérias que se adaptam ao meio podem ser disseminadas para outros animais ou para o ser humano, através de alimentos, pelo contato direto ou por fontes ambientais (TANG et al., 2017; BURKI, 2018; CANIÇA et al., 2019).

Os alimentos de origem animal possuem grande importância no desafio contra a resistência aos antibióticos. Os alimentos podem veicular patógenos, como *Salmonella*, capazes de causar sérios danos à saúde humana especialmente sendo multidroga resistentes (MDR); e

bactérias comensais que atuam transferindo genes de resistência a patógenos e como reservatórios destes genes no meio ambiente (HARBARTH et al., 2015; LAMMIE & HUGHES, 2016; ROUSHAM et al., 2018; WHO, 2021). De acordo com o CSPI (2013), *Salmonella* é o principal agente causador de surtos de origem alimentar associados a bactérias MDR, e entre 1973 e 2011, 48 surtos foram causados por *Salmonella*, dentre os 55 relatados nos EUA.

4. Mecanismos de resistência

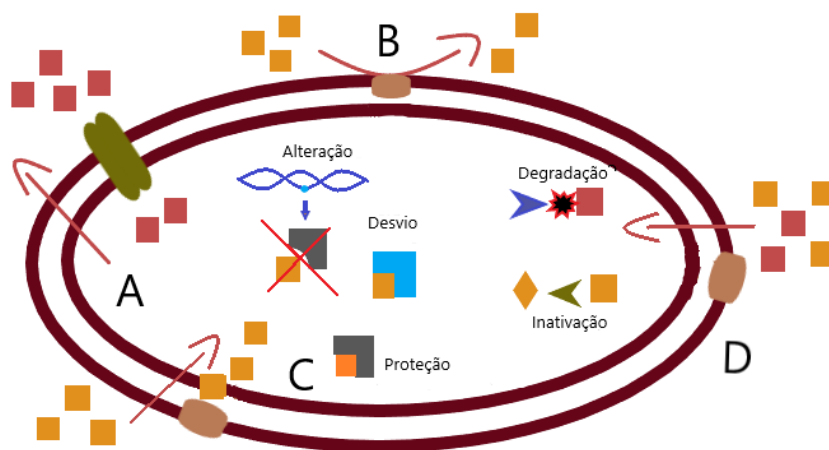
A resistência aos antibióticos ocorre de forma inata ou adquirida. A resistência inata é consequência das características estruturais e funcionais do micro-organismo, e a resistência adquirida ocorre devido a mutações ou pela transferência horizontal de genes. A resistência adquirida gera custos ao metabolismo bacteriano: o condicionamento (Fitness Costs) para a manutenção dos genes adquiridos e efeitos das mutações dependerão do ambiente e dos seus desafios (BLAIR et al., 2015; DURÃO et al., 2018).

A transferência horizontal de genes ocorre pelas estratégias de conjugação, transdução e transformação. A capacidade da bactéria em adquirir novos genes dependerá da densidade e complexidade da comunidade bacteriana e da pressão seletiva (SOMMER et al., 2017). A conjugação utiliza elementos móveis como plasmídeos, integrons e transposons para realizar a transferência do material genético. Os plasmídeos se caracterizam por serem porções extracromossomais do DNA, não necessárias à sobrevivência da célula e que podem ser transferidas através do contato direto entre bactérias. Os plasmídeos também se comportam como veículos para outros elementos móveis, como os transposons e integrons. Os transposons são segmentos de genes que se inserem no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos, sendo os integrons capazes de carregar inúmeros genes por meios dos cassetes genéticos. Essas estruturas possuem papel fundamental na transferência de genes de resistência, devido a plasticidade e capacidade de serem transferidos (HARBOTTLE et al., 2006; SUTAN et al., 2018).

Os mecanismos de transdução e transformação também estão relacionados a transferência horizontal de genes e contribuem para a aquisição e disseminação de genes de resistência, através da injeção de uma nova porção de DNA por um bacteriófago ou pela incorporação de DNA livre ao genoma, respectivamente. Contudo, é difícil avaliar o impacto dessas estratégias na evolução da resistência aos antibióticos (HARBOTTLE et al., 2006; SOMMER et al., 2017, LERMINIAUX & CAMERON, 2019).

A resistência aos antibióticos é adquirida por meio das estratégias acima, e os mecanismos pelos quais ocorre podem ser classificados em 3 grupos: (i) modificação do alvo do mecanismo de ação do antibiótico; (ii) degradação e inativação do antibiótico; (iii) alteração da permeabilidade e redução da concentração intracelular da droga (CHEN et al., 2004; FRYE & JACKSON, 2013). Os mecanismos estão representados na Figura 1.

Figura 1 - Exemplificação dos mecanismos de resistência. A) Redução da concentração intracelular (bombas de efluxo). B) Alteração da permeabilidade da membrana celular. C) Modificações do sítio de ação, que podem ocorrer por alterações (mutações); por deslocamento, com a introdução de enzimas semelhantes ao alvo (representada em azul); e por proteção do sítio alvo, através de proteínas que se ligam a ele (em laranja); D) Degradação e inativação do antibiótico.



Fonte: A autora.

4.1. Modificação do alvo

O mecanismo de modificação do sítio alvo ocorre através da alteração ou proteção desse, evitando que haja a ligação ao antibiótico (BLAIR et al., 2015). A alteração do alvo é resultado de mutações pontuais, alterações enzimáticas e substituição ou desvio do sítio alvo (MUNITA & ARIAS, 2015).

O sítio alvo das quinolonas são as enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, responsáveis pelo superenrolamento do DNA. Ao se ligarem às enzimas, as quinolonas impedem o superenrolamento levando a morte celular. Um dos mecanismos de resistência a essa classe são as mutações nos genes *gyrA* e *gyrB* (DNA-girase) e *parC* e *parE* (topoisomerase IV), codificadores das enzimas. As mutações alteram a sequência de aminoácidos e a afinidade das enzimas, comprometendo a ligação do antimicrobiano ao alvo. Esses genes estão

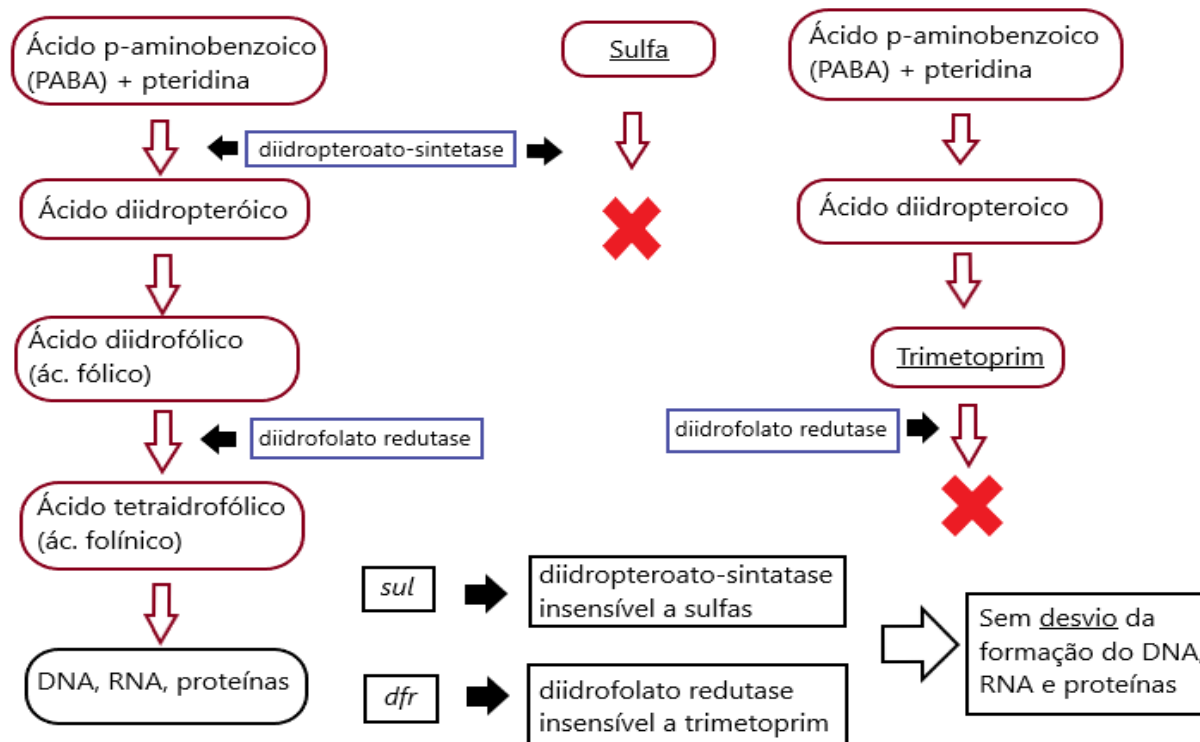
localizados no cromossomo bacteriano e possuem porções conhecidas como: Região Determinante de Resistência a Quinolonas (QRDR) (GÓRNIAK, 2006; HOOPER, 2008; RANDALL et al., 2005; REDGRAVE et al., 2014).

A resistência a quinolonas também pode decorrer da proteção do sítio alvo (MUNITA & ARIAS, 2016). Os genes *qnr* (quinolone resistance protein), codificados em plasmídeos mediadores de resistência a quinolonas (PMQR), codificam as proteínas Qnr que se ligam a DNA-girase e Topoisomerase IV. A ligação da proteína ao sítio alvo interfere, consequentemente, na ligação do antimicrobiano ao seu sítio. Esse mecanismo de resistência provoca um aumento na concentração mínima do antimicrobiano necessária para inibir a multiplicação bacteriana, conferindo uma resistência modesta (HOOPER, 2008; REDGRAVE et al., 2014; KUANG et al., 2018).

A resistência aos inibidores da via folato advém do desvio do sítio de ligação. Sulfonamidas e trimetoprim inibem a formação do DNA a partir do ácido p-aminobenzoico (PABA), sendo as sulfonamidas análogas estruturais do próprio PABA e trimetoprim do ácido fólico, um intermediário da reação. Esses antimicrobianos evitam a síntese do DNA por meio do deslocamento das enzimas essenciais (Figura 2) (GÓRNIAK, 2006). Os genes *sul1*, *sul2* e *sul3* codificam enzimas diidropteroato sintase que não se ligam às sulfas, não deslocando a formação do ácido fólico. Em *Salmonella*, estes genes podem ser adquiridos por meio de plasmídeos e *sul1* faz parte da porção conservada do integron de classe 1 (MICHAEL et al., 2006).

Semelhante ao mecanismo das sulfonamidas, a resistência a trimetoprim decorre da produção da enzima diidrofolato redutase insensível ao antimicrobiano, evitando o deslocamento da formação do ácido folínico. A resistência ao trimetoprim em enterobactérias é codificada pelos genes *dfr* (diidrofolato redutase), que podem estar localizados no cromossomo ou plasmídeos e fazer parte de cassete genéticos (MICHAEL et al., 2006; FRYE & JACKSON, 2013).

Figura 2 - Mecanismo de ação de sulfas e trimetoprim e mecanismo de resistência pela aquisição dos genes *sul* e *dfr*.



Fonte: Elaborado pela autora e adaptado de GÓRNIAK (2006).

4.2. Degradação e modificação do antibiótico

Os mecanismos de resistência que agem sobre os antibióticos são determinados pela ação de enzimas capazes de degradar ou modificar a droga. A degradação do antibiótico é um mecanismo utilizado pelas β -lactamases que agem hidrolisando o anel β -lactâmico, tornando a molécula inativa. As β -lactamases são classificadas de acordo com as sequências de proteínas, funções, inibidores e outras variáveis, que determinam o espectro de ação das enzimas contra as penicilinas, cefalosporinas, carbapenens e outros β -lactâmicos. A maioria das β -lactamases são codificadas pelo grupo dos genes *bla* (β -lactamase), que podem ser encontrados no cromossomo ou plasmídeos e fazendo parte de cassetes genéticos (MICHAEL et al., 2006; UR RAHMAN et al., 2018).

A modificação do antibiótico torna a droga inativa pela adição de um grupo químico à molécula, impedindo a ligação do antibiótico ao sítio de ação (BLAIR et al., 2015). Esse é o principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos, que sofrem a ação de 3 enzimas: acetiltransferase (AAC), fosfotransferase (APH) e adeniltransferase (ANT), codificadas pelos

genes *aac*, *aph* e *ant*, respectivamente, e suas variações. A resistência a cloranfenicol também pode ser determinada pela produção de enzimas modificadoras, chamadas de Cat (cloranfenicol acetiltransferase), codificadas pelos genes *cat*. Os genes são adquiridos por meio de elementos móveis e podem estar localizados no cromossomo ou em plasmídeos. (MICHAEL et al., 2006; VAN HOEK et al., 2011; SUTAN et al., 2018).

4.3. Alteração da permeabilidade e diminuição da concentração intracelular

O terceiro mecanismo de resistência citado tem como foco as membranas celulares, que atuam impedindo a entrada do antibiótico ou o retirando da célula. Bactérias Gram-negativas são intrinsecamente menos permeáveis a alguns antibióticos, devido a presença da membrana externa (IREDELL et al., 2015). A seletividade pode ser aumentada pela regulação negativa das porinas ou pela substituição dessas por canais mais seletivos. Esse mecanismo foi observado em enterobactérias contribuindo com a resistência a carbapenems, sendo associado a regulação dos genes *omp* (TABER, 2008; MUNITA & ARIAS, 2015).

Os sistemas de efluxo promovem a resistência aos antibióticos através da diminuição da concentração no interior da célula. As bombas de efluxo podem ser específicas a um substrato ou podem transpor substratos de diferentes estruturas (BLAIR et al., 2015). Os sistemas específicos são responsáveis por conferir resistência às tetraciclinas. Dos 38 genes *tet* relatados, cerca de 60% codificam bombas de efluxo para tetraciclinas, pertencentes à superfamília dos facilitadores principais (MFS - major facilitator superfamily). Os genes *tet* são adquiridos por meio de elemento móveis, sendo que apenas *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetG* foram encontrados no cromossomo ou plasmídeos de *Salmonella* (ROBERTS, 2004; MICHAEL et al., 2006). Os fenicois também sofrem a ação de bombas de efluxo específicas, pertencentes à família MFS. O gene *floR* codifica bombas de efluxo específicas e estão localizados na Ilha Genômica de *Salmonella* 1 (SP1) (BRAIBATN et al., 2005; FRYE & JACKSON, 2013).

5. Sistema de efluxo multidroga

As bombas de efluxo são fundamentais à fisiologia bacteriana. Em bactérias Gram-negativas, essas bombas retiram componentes do interior da célula e os enviam para o espaço periplasmático ou para o exterior, conferindo resistência intrínseca a antibióticos (BLAIR et al., 2014; WESTON et al., 2017). As bombas de efluxo da família divisão de nodulação da resistência (RND - resistance nodulation division) são as clinicamente mais importantes em

bactérias Gram negativas, devido ao complexo multiproteico capaz de atravessar as duas membranas celulares (BLAIR et al., 2014). Na família RND, AcrAB-TolC é o complexo mais relevante para *Salmonella*. AcrB é a porção localizada na membrana interna, TolC na membrana externa e AcrA no espaço periplasmático, composta por duas subunidades e realiza a conexão das duas proteínas anteriores. O sistema é capaz de exportar antibióticos, detergentes, pigmentos, moléculas produzidas pelo hospedeiro e compostos químicos, permitindo que a bactéria sobreviva no nicho ecológico. Os três componentes são essenciais para a atividade da bomba de efluxo, a ausência de um deles inativa o sistema (NIKAIDO & TAKATSUKA, 2009; PIDDOCK, 2006; BLAIR & PIDDOCK, 2009; BLAIR et al., 2014; COLCLOUGH et al., 2020).

A capacidade de exportar antibióticos é intrínseca às bombas de efluxo da família RND; porém, mutações em genes regulatórios provocam a superexpressão de codificadores de bombas de efluxo, alterando a atividade do sistema e gerando um aumento da tolerância ou resistência ao antibiótico. Alterações na expressão de RDN são encontradas em bactérias Gram-negativas MDR (COLCLOUGH et al., 2020). Em *Salmonella*, AcrAB-TolC promove a resistência de alguns antibióticos, como novobiocina, eritromicina, cloranfenicol, rifampicina, tetraciclina, fluoroquinolonas, norfloxacino e β -lactâmicos (BLAIR et al., 2014; DU et al., 2018).

AcrA consiste em proteínas adaptadoras periplasmáticas (PAP), compreendendo quatro domínios: proximal, β -barril, lipoil e hairpin α -helicoidal. AcrA possui conformidade flexível devido as dobradiças entre os domínios hairpin α -helicoidal e lipoil, e lipoil e β -barril. As proteínas (AcrA) são ancoradas em TolC pelo hairpin α -helicoidal e em AcrB pelos três domínios restantes. AcrB é composta por três monômeros formando uma única proteína na membrana interna. TolC é uma proteína trimérica que forma um túnel do espaço periplasmático ao exterior da célula (BLAIR & PIDDOCK, 2009; ANES et al., 2015)

A regulação dos genes codificadores de bombas de efluxo depende de mecanismos de regulação local e global. A expressão de *acrAB* em *Salmonella* é regulada, principalmente, por RamA, codificada por *ramA*, mas outros ativadores transcricionais podem ser encontrados, como MarA, SoxS e Rob, que são reguladores globais de RDN em Enterobactérias e fazem parte da família AraC/XylS. O aumento da expressão de *ramA*, estimula *acrAB* e a bactéria aumenta o efluxo de droga, da mesma forma que a inativação de *ramA* reduz a expressão da bomba de efluxo. AcrR é um repressor transcricional local de *acrAB* e de sua própria síntese (WESTON et al., 2017; COLCLOUGH et al., 2020).

Diante da importância do mecanismo de efluxo multidroga, a detecção e avaliação da atividade de bombas de efluxo são necessárias para o estudo da resistência aos antibióticos. Para avaliar a exportação de antibióticos são utilizados substratos fluorescentes que entram nas células de forma passiva, porém apenas são removidos pelo sistema de efluxo. A mensuração do efluxo pode ser feita de forma direta, avaliando quanto dos substratos foram removidos das células ou, de forma indireta, pela avaliação do quanto foi acumulado (BLAIR & PIDDOCK et al., 2016; PAL et al., 2019).

Referências

- ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da Salmonella spp.**, Brasília: ANVISA, 2011. 64 p. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>. Acesso em: 14 fev 2021.
- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual: 2020**. São Paulo: ABPA, 2020. 160 p. Disponível em: <https://abpa-br.org/relatorios/>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- ANES, J.; MCCUSKER, M. P.; FANNING, S.; MARTINS, M. The ins and outs of RND efflux pumps in Escherichia coli. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 587, p. 1-14, 2015
- BANERJI, S.; SIMON, S.; TILLE, A.; FRUTH, A.; FLIEGER, A. Genome-based Salmonella serotyping as the new gold standard. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-10, 2020.
- BESSER, J. M Salmonella epidemiology: A whirlwind of change. **Food Microbiology**, v. 71, p. 55-59, 2018.
- BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature**, v.13, n. 1, p. 42-51, 2015.
- BLAIR, J. M. A.; RICHMOND, G. E.; PIDDOCK, L. J. V. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v.9, n. 10, p.1165–1177, 2014.
- BLAIR, J. M. A; PIDDOCK, L. J. V. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. **Current Opinion in Microbiology**, v.12, n. 5, p.512–519, 2009.
- BRAIBANT, M.; CHEVALIER, J.; DANCLA, E. C.; PAGÈS, J. M.; CLOECKAERT, A. Structural and Functional Study of the Phenicol-Specific Efflux Pump FloR Belonging to the Major Facilitator Superfamily. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2965–2971, 2005.
- BRASIL - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos, no Âmbito da Agropecuária**. Brasília: MAPA, 2018. 30 p. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt->

br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/arquivos/copy2_of_publ_panagro_web.pdf. Acesso em: 14 fev. 2021.

BURKI, T. K. Tackling antimicrobial resistance in food-producing animals. **The Lancet**, v. 7, n. 1, p. 93-94, 2018.

CANIÇA, M.; MANAGEIRO, V.; ABRIOUEL, H.; MORAN-GILADD, J.; FRANZ, C. M. A. P. Antibiotic resistance in foodborne bacteria. **Trends in Food Science & Technology**, v. 84, p. 81-84, 2019.

CASTRO-VARGAS, R. H.; HERRERA-SÁNCHEZ, M. P.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, R.; RONDÓN-BARRAGÁN, I. S. Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: A global overview. **Veterinary World**, v. 13, n. 10, p. 2070–2084, 2020.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. **Salmonella**. Atlanta: CDC, 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/>. Acesso em: 21 jan. de 2021.

CHEN, S.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; SCHROEDER, C. M.; LU, R.; YANG, H.; MCDERMOTT, P. F.; AYERS, S.; MENG, J. Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 1–7, 2004.

CHENG, C.; ZHENG, F.; RUI, Y. Rapid Detection of bla_{NDM}, bla_{KPC}, bla_{IMP}, and bla_{VIM} Carbapenemase Genes in Bacteria by Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 6, p. 533-538, 2014.

COLCLOUGH, A. L.; ALAV, I.; WHITTLE, E. E.; PUGH, H. L.; DARBY, E. M.; LEGOOD, S. W.; MCNEIL, H. E.; BLAIR, J. M. A. RND efflux pumps in Gram-negative bacteria; regulation, structure and role in antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 143-157, 2020.

CSPI – Center for Science in the Public Interest. **Antibiotic Resistance in Foodborne Pathogens**. Washington: CSPI, 2013. 22 p. Disponível em: https://cspinet.org/sites/default/files/attachment/outbreaks_antibiotic_resistance_in_foodborne_pathogens_2013.pdf. Acesso em 15 fev. 2021.

CUNHA-NETO, A.; CARVALHO, L. A.; CARVALHO, R. C. T.; RODRIGUES, D. P.; MANO, S. B.; FIGUEIREDO, E. E. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. *Salmonella* isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state of Mato Grosso, Brazil: antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization by repetitive sequence-based PCR system. **Poultry Science**, v. 97, n. 4, p. 1373–1381, 2018.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action. **Poultry Science**, v. 84, n. 4, p. 634–643, 2005.

DUARTE, D. A. M.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SANTOS, S. B.; SILVA, J. V. D.; DE ANDRADE, P. L.; FALCÃO, L. S. P. C. A. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 569-573, 2009.

DURÃO, P.; BALBONTÍN, R.; GORDO, I. Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 677-691, 2018.

- EDELSTEIN, M.; PIMKIN, M.; PALAGIN, I.; EDELSTEIN, I.; STRATCHOUNSKI, L. Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3724–3732, 2003.
- FERRARI, R. G.; ROSARIO, D. K. A.; CUNHA-NETO, A.; MANO, S. B.; FIGUEIREDO, E. E. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in Animal Based Foods: a Meta-analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 14, p. 1-21, 2019.
- GIOMBELLI, A.; GLORIA, M. B. A. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* on Broiler Chickens from Farm to Slaughter and Efficiency of Methods to Remove Visible Fecal Contamination. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 11, p. 1851–1859, 2014
- GÓRNIK, S. L. Quimioterápicos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 36, p. 453-463.
- HAVELAAR, A. H.; KIRK, M. D.; TORGERSON, P. R.; GIBB, H. J.; HALD, T.; LAKE, R. J.; PRAET, N.; BELLINGER, D. C.; DE SILVA, N. R.; GARGOURI, N.; SPEYBROECK, N. CAWTHORNE, A.; MATHERS, C.; STEIN, C.; ANGULO, F. J.; DEVLEESSCHAUWE, B. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. **Plos Medicine**, v. 12, n. 12, p. 1-23, 2015.
- HARBOTTLE, H.; THAKUR, S.; ZHAO, S.; WHITE, D. G. Genetics of Antimicrobial Resistance. **Animal Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 111–124, 2006.
- HARBARTH, S.; BALKHY, H. H.; GOOSSENS, H.; JARLIER, V.; KLUYTMANS, J.; LAXMINARAYAN, R.; SAAM, M.; BELKUM, A. V.; PITTET, D. Antimicrobial resistance: one world, one fight! **Antimicrobial Resistance e Infection Control**, v. 4, n. 49, p. 1-15, 2015.
- HOOVER, D. C. Target Modification as a Mechanism of Antimicrobial Resistance. In: WAX, R. G.; LEWIS, K.; SALYERS, A. A.; TABER, H. **Bacterial Resistance to Antimicrobials** 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2008, p. 133-167.
- FRYE, J. G.; JACKSON, C. R. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. **Frontiers of Microbiology**, v. 4, p. 1-22, 2013.
- IFSAC - The Interagency Food Safety Analytics Collaboration. **Foodborne illness source attribution estimates for 2016 for *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Campylobacter* using multi-year outbreak surveillance data, United States**, CDC, FDA e USDA, 2020. 15 p. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/ifsac/pdf/P19-2018-report-TriAgency-508.pdf>. Acesso em: 13 de fev 2021.
- IREDELL, J.; BROWN, J.; TAGG, K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. **BMJ**, p. 351-6420, 2015.
- KIRCHHELLE, C. Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017). **Palgrave Communications**, v. 4, n. 96, p. 1-13, 2018.

KUANG, D.; ZHANG, J.; XUC, X.; SHID, W.; CHENE, S.; YANGA, X.; SUA, X.; SHIA, X.; MENGAET, J. Emerging high-level ciprofloxacin resistance and molecular basis of resistance in *Salmonella enterica* from humans, food and animals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 280, p. 1-9, 2018.

LAMMIE, S. L.; HUGHES, J. M. Antimicrobial Resistance, Food Safety, and One Health: The Need for Convergence. **Annual Reviews in Food Science and Technology**, v. 7, p. 287–312, 2016.

LANDERS, T. F.; COHEN, B.; WITTUM, T. E.; LARSON, E. L. A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. **Practice Articles**, v. 127, p. 4-22, 2012.

LERMINIAUX, N. A.; CAMERON, A. D. S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical Environments. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 34-44, 2019.

MA, F.; XU, S.; TANG, Z.; LI, Z.; ZHANG, L. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. **Biosafety and Health**. 2020.

MCEWEN, S. A; COLLINGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 2, p. 1-26, 2018.

MEHDI, Y.; LÉTOURNEAU-MONTMINY, M. P.; GAUCHER, M. L.; CHORFI, Y.; SURESH, G.; ROUISSI, T.; BRAR, S. K.; CÔTÉ, C.; RAMIREZ, A. A.; GODBOUT, S. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. **Animal Nutrition**, v. 4, p. 170-178, 2018.

MICHAEL, G. B.; BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1898-1914, 2006.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p. 1-24, 2015.

NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND Multidrug Efflux Pumps. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, n. 5, p. 769-781, 2009.

OIE - World Organisation for Animal Health. Prevention, Detection and Control of *Salmonella* in Poultry. In: **Terrestrial Animal Health Code**, Cap 6.6, p. 1-6, 2019.

OIE - World Organisation for Animal Health. **OIE Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals**. Paris: OIE, 2018. 131 p. Disponível em: https://rr-africa.oie.int/wp-content/uploads/2019/09/annual_report_amr_3.pdf. Acesso em: 14 fev. 2021.

O'NEILL J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Review on Antimicrobial Resistance**, 2014.

PAL, S.; MISRA, A.; BANERJEE, S.; DAM, B. Adaptation of ethidium bromide fluorescence assay to monitor activity of efflux pumps in bacterial pure cultures or mixed population from environmental samples. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 939-945, 2019.

- PANZENHAGEN, P. H. N.; AGUIAR, W. S.; FRASÃO, B. S.; PEREIRA, V. L. A.; ABREU, D. L. C.; RODRIGUES, D. P.; DO NASCIMENTO, E. R.; DE AQUINO, M. H. C. Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Control**, v. 61, p. 243-247, 2016.
- PIDDOCK, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps — not just for resistance. **Nature**, v. 4, p. 629-636, 2006.
- RANDALL, L. P.; COLDHAM, N.G.; WOODWARD, M. J. Detection of mutations in *Salmonella enterica* *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) using standard HPLC instrumentation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 619-623, 2005.
- REDGRAVE, L. S.; SUTTON, S. B.; WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Cell Press**, v. 22, n. 8, p. 438-445, 2014.
- ROBERTS, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, p. 195-203, 2005.
- RONQUILLO, M.G.; HERNANDEZ, J.C.A. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: review of impact and analytical methods. **Food Control**, v. 72, Part B, p. 255-267, 2017.
- ROUSHAM, E. K.; UNICOMB, L.; ISLAM, M.A. Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioral, epidemiological and One Health approaches. **Proceedings Royal Society B**, v. 285, n. 1876, p. 1-9, 2018.
- TABER, H. Antibiotic Permeability. In: WAX, R. G.; LEWIS, K.; SALYERS, A. A.; TABER, H. **Bacterial Resistance to Antimicrobials**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 8, p. 168-182.
- TANG, K. L.; CAFFREY, N. P.; NÓBREGA, D. B.; CORK, S. C.; RONKSLEY, P. E.; BARKEMA, H. W.; POLACHEK, A. J.; GANSHORN, H.; SHARMA, N.; KELLNER, J. D.; GHALI, W. A. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 1, n. 8, p. 316-327, 2017.
- SHINOHARA, N. K. S.; DE BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F. FILHO, J. L. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.
- SINDAN - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. **Anuário da Indústria de Produtos para Saúde Animal**, São Paulo: SINDAN, 2020. 136 p. Disponível em: <http://www.sindan.org.br/anuario2019/>. Acesso em: 15 jan. 2021.
- SOMMER, M. O. A.; MUNCK, C.; TOFT-KEHLER, R. V.; ANDERSSON, D. I. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? **Nature**, v. 15, n. 11, p. 689-696, 2017.

SUTAN I.; RAHMAN, S.; JAN, A. T.; SIDDIQUI, M. T.; MONDAL, A. H.; HAQ, Q. M. R. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-16, 2018.

UR RAHMAN, S.; ALI, T.; ALI, I.; KHAN, N. A.; HAN, B.; GAO, J. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. **BioMed Research International**, v. 2018, n. p. 1-14, 2018.

VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; ROBINSON, T. P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5649-5654, 2015.

VAN BOECKEL, T. P.; GLENNON, E. E.; CHEN, D.; GILBERT, M.; ROBINSON, T. P.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; BONHOEFFER, S.; LAXMINARAYAN, R. Reducing antimicrobial use in food animals. **Science**, v. 357, n. 6358, p. 1350-1352, 2017.

VAN HOEK, A. H. A. M.; MEVIUS, D.; GUERRA, B.; MULLANY, P.; ROBERTS, A. P.; AARTS, H. J. M. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 203, p. 1-27, 2011.

WERNLI, D.; JØRGENSEN, P. S.; MOREL, C. M.; CARROLL, S.; HARBARTH, S.; LEVRAT, N.; PITTET, D. Mapping global policy discourse on antimicrobial resistance. **BMJ Glob Health**, v. 2, n. 2, p. 1-9, 2017.

WESTON, N.; SHARMA, P.; RICCI, V.; PIDDOCK, L.J.V. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae. **Research in Microbiology**, v. 169, n. 7-8, p. 429-431, 2017.

WHO - World Health Organization. **Who guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals**, Geneva: WHO, 2017, 88 p. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/publications/cia_guidelines/en/. Acesso em: 14 fev. 2021.

WHO - World Health Organization. **Salmonella (non-typhoidal)**, Geneva: WHO, 2018. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Acesso em: 15 jan. 2021.

WHO - World Health Organization. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine**, Geneva: WHO, 2019, 44 p. Disponível em: <https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-sixth/en/>. Acesso em: 14 fev. 2021.

WHO - World Health Organization. **Antimicrobial resistance (AMR) from a food safety perspective**, Geneva: WHO, 2021. Disponível em: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/food-safety/areas-of-work/building-national-capacity-in-food-safety/antimicrobial-resistance-amr-from-a-food-safety-perspective>. Acesso em: 15 jan. 2021.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar o perfil de resistência a antibióticos de isolados de *S. enterica* obtidos na cadeia produtiva de frangos de corte.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a resistência fenotípica dos isolados a diferentes antibióticos;
- ✓ Identificar genes que conferem resistência a antibióticos;
- ✓ Avaliar a presença de mutações nos genes codificadores da DNA-girase e topoisomerase IV capazes de conferir resistência a antibióticos;
- ✓ Correlacionar os perfis fenotípicos e genotípicos dos isolados;
- ✓ Avaliar o mecanismo de bomba de efluxo em isolados multidroga-resistentes.

Artigo científico: Resistência fenotípica e genotípica à antibióticos em *Salmonella enterica* da cadeia produtiva de aves.

Juliana Líbero Grossi¹, Cibeli Viana¹, Ricardo Seiti Yamatogi¹, Douglas Ruben Call², Luís Augusto Nero^{1*}

¹ Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570 430, Brasil

² Paul G. Allen School for Global Animal Health, Washington State University, Pullman, WA 99164, EUA

* autor para correspondência: nero@ufv.br

Revista: International Journal of Food Microbiology

Resumo

O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil de resistência de isolados de *Salmonella enterica* obtidos em uma cadeia produtiva de aves. Isolados identificados como *S. enterica* (n = 96) foram avaliados pelo teste de diluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima (MIC) a 11 antibióticos e à associação trimetoprim-sulfametoxazole, e submetidos a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de 21 genes relacionados à resistência aos antibióticos. Isolados que apresentaram os genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* foram submetidos a análise de High Resolution Melting (HRM) para detecção de mutações associadas a resistência às quinolonas, confirmadas por sequenciamento dos produtos de PCR. Após a determinação do perfil de resistência dos isolados, apenas os multidroga-resistentes (MDR) foram avaliados quanto a atividade de bombas de efluxo por meio da técnica em ágar da exportação de brometo de etídeo (BrEt). Os principais fenótipos de resistência foram a estreptomicina (n = 33, 34,4%), ampicilina (n = 11, 11,4%) e cefoxitina (n = 6, 6,3%). Dois (2,1%) isolados foram resistentes a ciprofloxacina e 92 (95,8%) isolados apresentaram resistência intermediária a esse antibiótico (MIC $\geq$ 0,0125 μ g/mL). Os isolados apresentaram os genes *qnrB* (n = 94, 97,9%), presente apenas nos isolados com MIC $\geq$ 0,0125 μ g/mL para ciprofloxacina, e *aphA* (n = 51, 53,1%) detectados nos isolados resistentes à kanamicina. Todos os isolados apresentaram os genes *gyrB* e *parE*; *gyrA* e *parC* foram detectados em 94 (97,9%) e 95 (99%) isolados, respectivamente. A análise de HRM definiu intervalos de temperaturas de melting e amplicons de *gyrA* (n = 8), *gyrB* (n = 4) e *parC* (n = 3) foram sequenciados; *parC* apresentou a alteração Thr57Ser. Seis isolados foram caracterizados como MDR e quatro desses apresentaram atividade de bombas de efluxo na concentração 0,4 mg/L de BrEt e nenhum deles na concentração de 0,8 mg/L. Os resultados deste estudo demonstraram redução da susceptibilidade de *S. enterica* à ciprofloxacina, alertando para os possíveis desafios no tratamento de salmonelose de origem alimentar, e evidenciam a associação da alta distribuição do gene *qnrB* e a alteração na sequência de *parC* ao perfil fenotípico. Além disso, a atividade de bombas de efluxo atenta para a contribuição do mecanismo na emergência de cepas MDR.

Palavras-chave: *Salmonella*, resistência microbiana, antibióticos, bombas de efluxo.

Abstract

The aim of this study was to characterize the resistance profile of *Salmonella enterica* isolates obtained from a poultry production chain. Isolates identified as *S. enterica* (n = 96) were evaluated by the broth dilution test and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) to 11 antibiotics and to the association of trimethoprim-sulfamethoxazole. The isolates were subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect 21 genes related to antibiotic resistance. Isolates that showed the *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes were subjected to High Resolution Melting (HRM) analysis to detect mutations associated with quinolone resistance, and the mutations were confirmed by sequencing the PCR products. After determining the resistance profile of the isolates, only multidrug-resistant (MDR) were evaluated for efflux pump activity using the ethidium bromide (EtBr) export agar technique. The main resistance phenotypes were streptomycin (n = 33, 34,4%), ampicillin (n = 11, 11,4%) and cefoxitin (n = 6, 6,3%). Two (2,1%) isolates were resistant to ciprofloxacin and 92 (95,8%) isolates showed intermediate resistance to this antibiotic (MIC $\geq$ 0.0125 μ g/mL). The isolates had the *qnrB* (n = 94, 97,9%) gene, it is present only in isolates with MIC $\geq$ 0.0125 μ g/mL for ciprofloxacin, and *aphA* (n = 51, 53,1%) was detected in isolates resistant to kanamycin. All isolates had the *gyrB* and *parE* genes; *gyrA* and *parC* were detected in 94 (97,8%) and 95 (99%) of the isolates, respectively. The HRM analysis defined melting temperature profile and amplicons of *gyrA* (n = 9), *gyrB* (n = 4) and *parC* (n = 3) were sequenced.; *parC* showed the alteration Thr57Ser. Six isolates were characterized as MDR, four of them showed efflux pump activity at concentration 0,4 mg/L of EtBr and none of them at 0,8 mg/L. The results of this study demonstrated reduction in the susceptibility of *S. enterica* to ciprofloxacin, warning of possible challenges in the treatment of foodborne salmonellosis, and it shows the association of the high distribution of the *qnrB* gene and the alteration of the *parC* sequence to the phenotypic profile. Furthermore, the activity of efflux pumps attentive to the mechanism contribution to the emergence of MDR strains.

Keywords: *Salmonella*, microbial resistance, antibiotics, efflux pumps.

1. Introdução

Salmonella é um dos principais patógenos responsáveis por doenças associadas a alimentos (EFSA & ECDC, 2019; IFSAC, 2020) e a salmonelose é a terceira causa de morte relacionada a doenças de origem alimentar (FERRARI et al., 2019). Os alimentos de origem animal são as principais vias de transmissão de Salmonella para os seres humanos e o controle desse patógeno nas cadeias de alimentos é fundamental à inocuidade dos produtos finais, aos interesses econômicos e à resistência aos antibióticos (FERRARI et al., 2019; PULIDO-LANDÍNEZ, 2019).

A resistência a antibióticos é uma emergência à saúde global e um problema a ser enfrentado sob a perspectiva da Saúde Única (WHO, 2014; MCEWEN & COLLIGNON, 2018). Os alimentos de origem animal conectam a saúde humana à saúde animal, de modo que os antibióticos podem ser empregados de forma terapêutica, profilática ou como promotores de crescimento na produção animal, exercendo uma pressão seletiva sobre os micro-organismos (BAKER et al., 2018). O Brasil tem posição de destaque mundial como produtor de proteína animal e conseqüentemente como consumidor de antibióticos, utilizando cerca de 9% do total de antibióticos empregados em animais produtores de alimentos no mundo (VAN BOECKEL et al., 2015).

Salmonella é um patógeno presente na cadeia produtiva de frangos e sua prevalência varia entre médias de 3,7% a 11,6% em carcaças de frangos no Brasil (DUARTE et al., 2009; GIOMBELLI & GLORIA, 2014; PANZENHAGEN et al., 2016; CUNHA-NETO et al., 2017; DE LIMA et al., 2018). Dessa forma, a pesquisa de Salmonella em alimentos e a prevalência de resistência fenotípica e genotípica são ferramentas fundamentais para o monitoramento da resistência aos antibióticos. Este trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil de resistência de isolados de Salmonella enterica da cadeia produtiva de aves, determinando o fenótipo dos isolados e possíveis genes responsáveis.

2. Material e Métodos

2.1. Isolados em estudo

Um total de 96 isolados de *S. enterica* foram selecionados para este estudo, sendo eles dos sorovares: Heidelberg (n = 44), Schwarzengrund (n = 28), Anatum (n = 16), O:4,5 (n = 7) e um sem sorovar determinado. Esses isolados foram obtidos de carcaças de frangos (n = 87),

caixas de transporte das aves para o frigorífico (n = 5) e cortes de frango (n = 4) por Dias et al. (2016) e selecionados conforme seus perfis genotípicos obtidos pela digestão por macrorrestrição do DNA com a enzima XbaI e eletroforese em gel pulsado (PFGE). Os isolados foram estocados em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), suplementados com glicerol a 20% e mantidos a -20 °C.

2.2. Perfil de resistência fenotípico

Os 96 isolados foram testados quanto a capacidade de multiplicação na presença de antibióticos pelo método de diluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima (MIC) (CLSI, 2012). Os seguintes antibióticos foram avaliados nessa etapa: ampicilina, ceftazidima, cefoxitina, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, tetraciclina, ertapenem, meropenem, trimetoprim/sulfametoxazole, ciprofloxacina e cloranfenicol, todos adquiridos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). As concentrações dos antibióticos e os seus valores de breakpoint foram definidos conforme o Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Uma estirpe pan-suscetível de *Escherichia coli* ATCC® 25922 foi utilizada como controle de negativo.

Alíquotas (10 µL) dos isolados foram transferidas para caldo Mueller-Hinton (MH, BD, New Jersey, EUA) e incubadas a 35 °C overnight. Os inóculos foram diluídos em caldo MH (BD) até a obtenção de inóculos com concentração aproximada de 10^6 UFC/mL, utilizando o tubo 0.5 da escala de McFarland. As soluções iniciais dos antibióticos foram preparadas em tubos e as concentrações avaliadas foram obtidas pela técnica de microdiluição em placas de 96 poços. Os isolados com concentrações ajustadas foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas a 35 °C por 16-20 horas. A turbidez das culturas foi mensurada por espectrofotometria ($\lambda = 610$ nm) em Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). As concentrações dos antibióticos que determinaram uma redução drástica na densidade óptica dos isolados avaliados foram consideradas como as MIC, permitindo a caracterização dos isolados como resistentes, resistentes intermediários ou susceptíveis, conforme CLSI (2018). Isolados que apresentaram resistência a três ou mais classes de antibióticos foram caracterizados como resistentes a múltiplas drogas (multidrug resistance, MDR) (ECDC et al., 2017).

2.3. Perfil de resistência genotípico

O perfil genotípico foi determinado pela pesquisa de genes de resistência, utilizando a técnica de PCR.

A extração do DNA foi realizada a partir do cultivo overnight dos isolados em caldo BHI a 37 °C, seguindo a metodologia de extração de DNA por fervura de PUI et al. (2011), com modificações. Os produtos da extração foram acondicionados em microtubos e mantidos a -20 °C.

A Tabela 1 apresenta os genes pesquisados (n = 17) e os primers utilizados para caracterização do perfil genotípico de resistência dos isolados. As reações foram preparadas com volume final de 25µL, utilizando 12,5µL de Taq Pol Master Mix (2X) Green (Cellco Biotec, SP, Brasil), 400nM de cada primer, 1µL do DNA e 9,5µL de água nuclease free. Posteriormente, os produtos foram destinados à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (40 mM de Tris-HCl, 1,0 mM EDTA). Os géis foram revelados utilizando corante intercalante de DNA UniSafe Dye® (Uniscience, SP, Brasil) e foram visualizados em UV- transiluminador L.Pix HE (Loccus, SP, Brasil).

Tabela 1: Genes pesquisados de acordo com as classes de antibióticos relacionadas, sequências de nucleotídeos dos primers, tamanho dos produtos amplificados em pares de base (base pair - pb) e referências.

Classes	Genes	Sequências (5'-3')	Tamanho do produto (bp)	Referências
Aminoglicosídeos	aac(3)-II	F: TGAAACGCTGACGGAGCCTC R: GTCGAACAGGTAGCACTGAG	369	Jensen et al., 2006
	aph-A	F: GCTATTCGGCTATGACTGGGC R: CCACCATGATATTCGGCAAGC	200	Aarestrup et al., 2003
	aadA1	F: TATCAGAGGTAGTTGGCGTCAT R: GTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATT	485	Randall et al., 2004
	strA	F: CCAATCGCAGATAGAAGGC R: CTTGGTGATAACGGCAATTC	548	Aarestrup et al., 2003
Tetraciclinas	tet(A)	F: GTAATTCTGAGCACTGTCCG R: CTGCCTGGACAACATTGCTT	957	Aarestrup et al., 2003
	tet(B)	F: GAGACGCAATCGAATTCGG R: TTTAGTGGCTATTCTTCCTGCC	228	Zhu et al., 2017
Fencóis	catA	F: CGCCTGATGAATGCTCATCCG R: CCTGCCACTCATCGCAGTAC	457	Aarestrup et al., 2003
	florR	F: GACGCCCGCTATGATCCAAC R: CCTGCCATCCCAAGAACTCG	371	Liu, 2016
β -lactâmicos	blaTEM	F: ATGAGTATTCAACATTTCCG R: ACCAATGCTTAATCAGTGAG	859	Aarestrup et al., 2003
	blaTEM-1	F: CAGCGGTAAGATCCTTGAGA R: ACTCCCCGTCGTGTAGATAA	643	Giuriatti et al., 2017
	blaOXA-1	F: AATGGCACCAGATTCAACTT R: CTTGGCTTTTATGCTTGATG	595	Giuriatti et al., 2017
	blaCMY-2	F: TGGCCGTTGCCGTTATCTAC R: CCCGTTTTATGCACCCATGA	870	Giuriatti et al., 2017
Quinolonas	gyrA	F: CGTTGGTGACGTAATCGG R: CCGTACCGTCATAGTTAT	251	Randall et al., 2005

Tabela 1: Continuação.

Quinolonas	gyrB	F:GCGCTGTCCGAACGTGTACCT R:CGGTGATCAGCGTCGCCACTTCC	172	Randall et al., 2005
	parC	F:CTATGCGATGTCAGAGCTGG R:TAACAGCAGCTCGGCGTATT	260	Randall et al., 2005
	parE	F:TCTCTTCCGATGAAGTGCTG R:ATACGGTATAGCGGCGGTAG	237	Randall et al., 2005
	qnrB	F:GGCACTGAATTTATCGGC R:TCCGAATTGGTCAGATCG	431	Lavilla et al., 2008
	qnrS	F:CCTACAATCATACATATCGGC R:GCTTCGAGAATCAGTTCTTGC	622	Lavilla et al., 2008
Inibidores da via folato	sul1	F: CTTGATGAGAGCCGGCGGC R: GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	450	Aarestrup et al., 2003
	sul2	F: TTTCGGCATCGTCAACATAA R: GTGTGTGCGGATGAAGTCAG	727	Herrero-Fresno et al., 2016
	dfrA1	F: GTGAACTATCACTAATGG R: TTAACCCCTTTGCCAGATTT	474	El Tayeb et al., 2017

2.4 Avaliação de regiões QRDR dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*

A presença de mutações nos genes codificadores da DNA-girase (*gyrA* e *gyrB*) e em um dos genes codificadores da topoisomerase IV (*parC*) foi avaliada pela técnica High Resolution Melting (HRM). Posteriormente, alguns fragmentos de DNA foram sequenciados para a confirmação dos resultados obtidos pela técnica de HRM. Inicialmente, a presença dos genes *gyrA*, *gyrB* e *parC* foi confirmada por meio da PCR para em seguida serem submetidos a análise HRM.

O DNA dos isolados foram extraídos pela técnica de fervura modificada (PIU et al., 2011) com resina quelante (Chelex® 100, Bio-Rad, CA, EUA) a 5% e mantidos a -20 °C. Os primers utilizados para as reações de qPCR estão apresentados na Tabela 2, e estas foram preparadas para o volume final de 20µL, contendo 10µL de Gotaq qPCR Master Mix 2X (Promega Corporation, Madison, EUA), 200nM de cada primer, 2µL de DNA e 7,2µL de água nuclease free. As condições para a amplificação seguiram as recomendações de Gotaq qPCR Master Mix (Promega), a análise foi realizada no equipamento Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany) e os dados foram analisados pelo Rotor Gene Q Series Software (Qiagen).

Os amplicons escolhidos para o sequenciamento foram purificados utilizando o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) e em seguida foram enviados ao Laboratório de Patologia Florestal (Bioagro, UFV, Brasil) para sequenciamento em Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, EUA). As mutações foram pesquisadas comparando as respectivas sequências a *Salmonella Typhimurium* ATCC® 14028 (número de acesso GenBank CP034230.1).

Tabela 2: Sequências de nucleotídeos dos primers utilizados para a análise de HRM, tamanho dos produtos amplificados em pares de base (base pair - pb), posição das sequências de aminoácido obtidas e referências.

Primers	Sequências (5'-3')	Tamanho do produto (bp)	Posição do produto*	Referências
gyrA	F:GACGTAATCGGTAAATACCATCC R:ATGTAACGCAGCGAGAATG	89	Asp72 - Tyr100	Campioni et al., 2016
gyrB	F:GCAAGAACCAGGCGATTCTG R:CTTGTCCGGGTTGTACTCGT	149	Lys439 - Lys487	Este estudo
parC	F:GCATCGTCTATGCGATGTCA R:CACCATGGCTTCATAGCAGG	131	Ile50 - Val92	Este estudo
parE	F:TCGCGAATATCAGGCGATCA R:TCGCCACGGAAATATCATGC	110	Arg432 - Ala467	Este estudo

* os primers foram desenhados com base nos principais locais em que são detectadas mutações relacionadas a resistência a quinolonas em *Salmonella* (Li et al., 2018).

2.5. Avaliação da atividade de bomba de efluxo multidroga

A atividade de bombas de efluxo foi avaliada apenas para os isolados caracterizados como MDR empregando-se a metodologia proposta por ANBAZHAGAN et al. (2019), com modificações, apenas nos isolados caracterizados como MDR. Brometo de etídio (BrEt) foi utilizado como substrato para a exportação, considerado uma substância confiável para este fim (PAL et al., 2019). Alíquotas de culturas dos isolados selecionados foram diluídas até uma turbidez semelhante ao tubo 0,5 da escala de McFarland e semeados em placas contendo ágar Mueller-Hinton (MH, Kasvi, Paraná, BR) suplementados com BrEt (0,4 mg/L e 0,8 mg/L). Em seguida, as placas foram protegidas contra a luz e incubadas a 37 °C overnight. *E. coli* ATCC® 25922 e um isolado de *E. coli* previamente caracterizado como ativo para bomba de efluxo (OSPINA BARRERO et al., 2014) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. O efluxo do BrEt foi avaliado através da exposição à luz UV em transiluminador e foram considerados com efluxo ativo os isolados que apresentaram fluorescência reduzida.

Os isolados MDR também foram avaliados quanto a presença dos genes *acrA*, utilizando o par de primers 5'-CTTAGCCCTAACAGGATGTG-3' e 3'-TTGAAATTACGCTTCAGGAT-5' (VIVEIROS et al., 2007); e *acrB* com o par 5'-GTCCTCAAGTAGCTTCCT-3' e 3'-GTAATCCGAAATATCCTCCTG-5' (BLAIR et al., 2015). As reações foram preparadas de acordo com a metodologia apresentada para as demais reações de PCR.

3. Resultados e Discussão

3.1 Perfil de resistência

Os perfis fenotípicos de resistência aos antibióticos estão apresentados na Tabela 3 e a associação com a presença de diferentes genes de resistências na Tabela 4. Os isolados apresentaram os maiores índices de resistência à estreptomicina ($n = 33$, 34,4%) e ampicilina ($n = 11$, 11,4%); aos demais antibióticos, os números de isolados resistentes foram iguais ou menores que 6 (6,3%). Quarenta e cinco isolados (46,9%) foram resistentes a pelo menos um antibiótico, sem particularidade alguma em relação ao sorovar, e resultados semelhantes foram encontrados por ALMEIDA et al. (2015), PENG et al. (2016) e ZHOU et al. (2018) que obtiveram índices de 50%, 45,45% e 58,23%, respectivamente.

Seis isolados foram caracterizados como MDR. *S. Heidelberg* ($n = 3$) e *S. Anatum* ($n = 2$) apresentaram resistência a três classes de antibióticos e um isolado de *S. Heidelberg* foi resistente as oito classes testadas. Os isolados MDR representaram 6,3% do painel avaliado, em concordância com resultados obtidos por VELASQUEZ et al. (2018), que obtiveram 5% de isolados MDR, e por SANDT et al. (2013), MAINALI et al. (2014), CUNHA-NETO et al. (2017) que obtiveram percentuais menores que 15% em estudos avaliando *Salmonella* em aves.

Tabela 3. Número de isolados de *S. enterica* distribuídos de acordo com a concentração inibitória mínima encontrada para cada antibiótico testado. Também estão apresentados os breakpoints de resistência e as porcentagens de isolados resistentes.

Antibióticos	Número de isolados por concentração testada (µg/mL)													Resistentes	% resistentes
	≤0,0625	≤0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥256		
Ampicilina							84	-	1	5	2	4		≥32	11 (11,4%)
Cefoxitina							89	1	-	3	1	2		≥32	6 (6,3%)
Ceftazidima						96	-	-	1	-	-			≥16	1 (1,0%)
Ertapenem		95	-	-	-	-	-	1						≥2	1 (1,0%)
Meropenem			93	-	-	-	-	2	1					≥4	3 (3,1%)
Cloranfenicol							91	2	-	2	1	-		≥32	3 (3,1%)
Ciprofloxacina	2	34	53	5	2	-	-							≥1	2 (2,1%)
Gentamicina						92	1	-	-	1	2			≥16	3 (3,1%)
Kanamicina								94	-	-	-	1	1	≥64	2 (2,1%)
Estreptomicina							5	58	25	5	2	1		≥16	33 (34,4%)
Tetraciclina						90	1	-	1	-	4			≥16	5 (5,2%)
				0,5 & 9,5	1 & 19	2 & 38	4 & 76	8 & 152	16 & 304						
Trimetoprim-Sulfametoxazole				92	2	-	1	-	1					≥4/76	2 (2,1%)

Tabela 4. Perfis de resistência e resistência intermediária (i) dos isolados de *S. enterica* correlacionados aos genes de resistência detectados.

Perfil fenotípico	Número de isolados	Perfil genotípico	Número de isolados
STR, CIP(i)	25	qnrB	13
		qnrB, aphA	12
AMP, CIP(i)	4	qnrB	2
		qnrB, aphA	2
TET, CIP(i)	4	qnrB	2
		qnrB, aphA	2
STR, AMP, CIP(i)	2	qnrB, aphA	2
STR, GEN, CIP(i)	1	qnrB	1
AMP, FOX, CIP(i)	2	qnrB, aphA	2
GEN, KAN, CIP(i)	1	qnrB, aphA	1
STR, CHL, MER, CIP(i)	1	qnrB, aphA	1
SXT, CHL, MER, CIP(i)	1	qnrB, aphA	1
STR, FOX, CIP, AMP(i)	1	qnrB, aphA	1
STR, AMP, FOX, CIP(i)	2	qnrB	1
		qnrB, aphA	1
STR, KAN, GEN, AMP, FOX, CAZ, ERT, MER, CHF, CIP, TET, SXT	1	qnrB, aphA	1
CIP(i)	49	qnrB	24
		qnrB, aphA	24
Susceptível	2	-	-

(i) intermediário. AMP (ampicilina), CAZ (ceftazidima), CHL (cloranfenicol), CIP (ciprofloxacina), ERT (ertapenem), FOX (cefoxitin), GEN (gentamicina), KAN (kanamicina), STR (estreptomicina), SXT (sulfametoxazol-trimetoprim), TET (tetraciclina).

O breakpoint de resistência à estreptomicina não é definido pelo CLSI e foi considerado 16 µg/mL (o mesmo breakpoint de gentamicina), determinando o maior percentual de resistência do estudo. Estreptomicina também se destacou com maior índice de resistência em *Salmonella* no estudo do Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF) no Brasil; e no relatório do National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) de 2015, em *S. Heidelberg* de origem humana (MEDEIROS et al., 2011; CDC, 2018). Os genes *strA* e *aadA1* não foram detectados neste estudo e a resistência pode estar relacionada ao gene *strB* e outras variantes do gene *aadA1*, não avaliados neste estudo (RAMIREZ & TOLMASKY, 2010; MCDERMONTT et al., 2018).

Em 11 isolados (11,4%) detectou-se resistência à ampicilina, um dos antibióticos com maiores índices de resistência em trabalhos que também avaliaram *Salmonella* na cadeia avícola no Brasil (PANDINI et al., 2014; MINHARRO et al., 2015; MENDONÇA et al., 2018) e China (CUI et al., 2016; LU et al., 2014). Os genes blaTEM (compatível ao gene blaTEM-1b) e blaTEM-1 são codificadores de β -lactamases capazes de degradar ampicilina pelo rompimento da ligação amina do anel β -lactâmico (AARESTRUP et al., 2003; MUNITA & ARIAS, 2016). Os genes blaTEM são os mais reportados em isolados de *Salmonella* de alimentos (MAKA & POPOWSKA, 2016), contudo, os genes pesquisados não foram detectados. Assim como à estreptomicina, a resistência à ampicilina pode ser relacionada há outras variantes do gene; atualmente são citadas no Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) 213 variantes de blaTEM. Quanto às cefalosporinas de 2ª e 3ª geração e carbapenem foram encontradas altas frequências de susceptibilidade pelos isolados. Um isolado foi resistente a ceftazidime e ertapenem, três a meropenem e seis a cefoxitina. Os genes blaTEM-1, blaOXA-1 e blaCMY-2, codificadores de ESBL, não foram detectados nos isolados em estudo. Seis (6,3%) isolados apresentaram resistência às cefalosporinas, mas não foram detectados genes responsáveis por tal perfil. Os genes blaOXA-1 e blaCMY-2 não foram detectados por AHMED et al. (2016) e obtiveram 2,7% de resistência a cefalosporinas. GIURIATTI et al. (2017) obtiveram dois (11,1%) isolados resistentes às cefalosporinas, mas foram negativos aos genes testados, incluindo blaTEM-1, blaOXA-1 e blaCMY-2.

Gentamicina, kanamicina e cloranfenicol foram antibióticos que demonstraram eficiência contra *Salmonella* em estudos conduzidos a partir de cepas isoladas de frangos e produtos cárneos (PANDINI et al., 2014; DOMÉNECH et al., 2015; PENG et al., 2016; ZHOU et al., 2018; DUC et al., 2019). Foram detectados apenas três isolados resistentes a gentamicina e cloranfenicol, e o fator genotípico não foi determinado. Quanto à kanamicina, foram detectados dois isolados resistentes e positivos para o gene aphA-2, determinante da resistência ao antibiótico (HUR et al., 2012). Contudo, 49 (51%) isolados apresentaram esse gene e foram susceptíveis à kanamicina. A presença de genes de resistência e a ausência da resistência propriamente dita pode ser explicada por esses genes estarem possivelmente “silenciados”, situação relativamente comum de ocorrer em bactérias cultivadas in vitro e devido à pressão de seleção sofrida pelo micro-organismo (ADESIJI et al., 2014; CAMPIONI et al., 2020).

Em relação à tetraciclina e à associação trimetoprim-sulfametoxazole, 5 (5,2%) e 2 (2,1%) dos isolados apresentaram resistência, respectivamente. Entretanto, maiores índices de resistência, principalmente à tetraciclina, foram encontrados em outros estudos com *Salmonella*, bem como a presença de genes tet, sul e dfr, responsáveis pela resistência a esses

antibióticos (LOPES et al., 2015; EL- TAYEB et al., 2017; VÉLEZ et al., 2017; RAMIREZ-HERNANDEZ et al., 2019; SHARMA et al., 2019). Em nosso estudo, a prevalência de resistência à tetraciclina e aos inibidores da via folato foram baixas, contudo, genes associados ao fenótipo também não foram encontrados, havendo concordância de 94,8% e 97,9%, respectivamente, entre o fenótipo e genótipo de resistência. Esses índices foram mais elevados que os encontrados no estudo de CAMPIONI et al. (2020), que avaliaram a correlação fenotípica e genotípica da resistência a antibióticos em *S. enterica* sorovar Enteritidis.

A resistência à ciprofloxacina foi observada em apenas dois isolados, entretanto 95,8% dos isolados avaliados apresentaram um perfil intermediário de resistência a esse antibiótico (MIC entre 0,125 e 0,5 µg/mL). Ciprofloxacina pertence à classe das fluoroquinolonas, uma das últimas linhas de escolha de antibióticos, sendo considerada de importância crítica e de altíssima prioridade para humanos (HARBATH et al., 2015, WHO, 2019). O gene *qnrB* é codificado em plasmídeos, conhecidos como plasmídeos-mediadores de resistência a quinolonas (PMQR); os genes *qnr* codificam as proteínas de resistência a quinolonas (Qnr) que se ligam a DNA-girase e topoisomerase IV impedindo a ligação do antibiótico ao sítio de ação, sendo assim, capazes de reduzir a susceptibilidade de *Salmonella* às quinolonas (REDGRAVE et al., 2014; KARP et al., 2018). O gene *qnrB* foi detectado em 94 dos 96 isolados em estudo, e os dois isolados em que o gene não foi encontrado foram os únicos susceptíveis à ciprofloxacina, apresentando MIC igual ou inferior a 0,00625 µg/mL. O aumento da MIC exibido pelos isolados está em concordância com a detecção do gene *qnrB* visto sua capacidade de conferir baixo nível de resistência a fluorquinolonas (FERRARI et al., 2013; PRIBUL et al., 2017). O gene *qnrB* apresenta potencial de disseminação que envolve não só plasmídeos, mas integrons e transposons localizados no cromossomo (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2016). A presença dos genes *qnr* é variável, estudos realizados na China (LU et al., 2014; GUO et al., 2018) e França (CATTOIR et al., 2007) não detectaram esses genes. Contudo, a presença de *qnr* foi observada também na China (CHEN et al., 2019; HE et al., 2020) e no Brasil (PRIBUL et al., 2017; VIANA et al., 2020); além disso, alta dispersão *qnrB* foi detectada em isolados com perfil intermediário de resistência a ciprofloxacina (CAMPBELL et al., 2018), assim como observado no presente estudo.

A pesquisa de mutações em *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* foi realizada pela técnica HRM já descrita para os genes *gyrA* (SLINGER et al., 2007; CAMPIONI et al., 2016), *gyrB*, *parC* e *parE* (NGOI & THONG et al., 2014). A técnica HRM é utilizada como triagem para a pesquisa de alterações nas sequências genéticas e baseia-se na variação da temperatura de melting (T_m)

dos amplicons. A presença de *gyrA* foi confirmada em 94 isolados, *parC* em 95 isolados e todos apresentaram *gyrB* e *parE*.

Os resultados das análises de HRM e os isolados sequenciados estão apresentados na Tabela 5. Os amplicons de *gyrA* apresentaram temperatura média de 82,68 °C e variação de 0,7 °C, sendo que 72 (76,6%) destes estão no intervalo de 82,5 °C e 82,8 °C. A média de temperatura de melting das sequências de *gyrB* foi de 86,09 °C e, 90 (93,8%) sequências apresentaram temperaturas entre 85,95 °C e 86,25 °C. O gene *parC* apresentou média de 84,9 °C e obtivemos uma variação de aproximadamente 0,4 °C dentre todos os fragmentos avaliados. Por fim, os isolados apresentaram variação de aproximadamente 0,7 °C para o gene *parE*.

Tabela 5. Distribuição das temperaturas de melting (T_m) dos amplicons dos genes: *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, e relação de amplicons sequenciados

Genes	Temperatura de melting média (°C)	min-max (°C)	Isolados selecionados para sequenciamento (Isolado (temperatura)) (°C)		
			Perfil de HRM discrepante	Semelhantes à média	Perfil de HRM discrepante
<i>gyrA</i>	82,68	82,43 - 83,08	80 (82,43), 84 (82,58), 107 (82,53)	4 (82,60), 40 (82,85), 100 (82,62), 315 (82,88), 338 (82,85)	207 (83,03)
<i>gyrB</i>	86,09	85,12 - 86,60	219 (85,12)	84 (86,05), 107 (85,98)	22 (86,60)
<i>parC</i>	84,90	84,70 - 85,08	30 (84,77), 314 (84,70)	84 (84,87)	-
<i>parE</i>	82,87	82,45 - 83,17	-	-	-

- Não foram sequenciados.

Os fragmentos de DNA de *gyrA* avaliados não apresentaram mutações em suas sequências. Já os quatro amplicons de *gyrB* apresentaram mutações silenciosas e diferenças nas T_m dos isolados podem ser associadas ao número de mutações pontuais em suas sequências, como pode-se observar que: O isolado 219 apresentou a menor T_m e foram detectadas 8 alterações em bases nitrogenadas, enquanto que, o isolado 22 apresentou a maior T_m com apenas 3 mutações em sua sequência. Os isolados 84 e 107 apresentaram T_m e número de mutações intermediários comparados aos isolados 219 e 22 e apresentaram 6 mutações. Quanto a *parC*, as três sequências são iguais, bem como, a variação de T_m entre elas é de apenas 0,4 °C. Nestas sequências foi detectada a alteração em Thr57Ser e outras 3 mutações silenciosas. As sequências de DNA estão apresentadas na Figura 1.

A resistência à quinolonas em *Salmonella* ocorre principalmente por meio de mutações na região QRDR de *gyrA* e *parC* (QUIAN et al., 2020). A substituição Thr57Ser foi apresentada em 84 dos 182 isolados avaliados por EAVES et al. (2004a), e também foi a principal mutação

encontrada em parC por HOPKINS et al. (2007), WASYL et al. (2014) e MONTE et al. (2021). A mutação Thr57Ser demonstrou contribuir para a redução da susceptibilidade à ciprofloxacina (LING et al., 2003), contudo, outros autores observaram que Thr57Ser não alterou o MIC de *Salmonella* como as mutações pontuais em Ser80 e Glu84 (BAUCHERON et al., 2005), além de que, não foi associada a resistência à ciprofloxacina em alguns estudos (PALOMO et al., 2012; QUIAN et al., 2020; MONTE et al., 2021), podendo estar envolvida no aumento da susceptibilidade do isolados (EAVES et al., 2004a).

Figura 1 - Sequências de nucleotídeos de *gyrA* (214° ao 300°), *gyrB* (1315° ao 1461°) e *parC* (133° ao 261°) de isolados de *Salmonella enterica* apresentados na (Tabela 5). As sequências foram comparadas à sequência de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 (número de acesso: CP034230.1). As mutações silenciosas estão destacadas em cinza e a mutação Thr57Ser está grifada em amarelo.

<i>gyrA</i>			
reference	GACGTAATCGGTAATAACCATCCCCACGGGCGATTCCGCGAGTGTATGACACCATCGTTTGGT	60	
40/80/84/100/107/207/315/338	GACGTAATCGGTAATAACCATCCCCACGGGCGATTCCGCGAGTGTATGACACCATCGTTTGGT	60	
reference	ATGGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGGTTAC	87	
40/80/84/100/107/207/315/338	ATGGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGGTTAC	87	
<i>gyrB</i>			
reference	AAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAAGGTAAAAATCCTTAAAGTCGAGAAAAGCGCGCTTC	60	
219	AAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAAGGTAAAAATCCTTAAAGTCGAGAAAAGCGCGCTTC	60	
84/107	AAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAAGGTAAAAATCCTTAAAGTCGAGAAAAGCGCGCTTC	60	
22	AAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAAGGTAAAAATCCTTAAAGTCGAGAAAAGCGCGCTTC	60	
reference	GACAAATGCTTCTCTCTCAGGAAGTGGCGACGCTGATCACCGCGCTGGGCTGCGGTATC	120	
219	GACAAATGCTTCTCTCTCAGGAAGTGGCGACGCTGATCACCGCGCTGGGCTGCGGTATC	120	
84/107	GACAAATGCTTCTCTCTCAGGAAGTGGCGACGCTGATCACCGCGCTGGGCTGCGGTATC	120	
22	GACAAATGCTTCTCTCTCAGGAAGTGGCGACGCTGATCACCGCGCTGGGCTGCGGTATC	120	
reference	GGTCGGACGAGTACAAACCGGACAAAG	147	
219	GGTCGGACGAGTACAAACCGGACAAAG	147	
84/107	GGTCGGACGAGTACAAACCGGACAAAG	147	
22	GGTCGGACGAGTACAAACCGGACAAAG	147	
<i>parC</i>			
reference	ATCGTCTATGCGATGTCTAGAGCTGGGGCTGAACGCCACCGCTAAATTTAAAAAATCCGCC	60	
30/84/314	ATCGTCTATGCGATGTCTAGAGCTGGGGCTGAACGCCACCGCTAAATTTAAAAAATCCGCC	60	
reference	CGTACCGTTGGTGACGTACTGGGTAAGTATCACCACGCGATGGGACACAGCGCTGCTATGAA	120	
30/84/314	CGTACCGTTGGTGACGTACTGGGTAAGTATCACCACGCGATGGGACACAGCGCTGCTATGAA	120	
reference	GCCATGGTG	129	
30/84/314	GCCATGGTG	129	

Fonte: A autora

3.2 Pesquisa de bomba de efluxo multidroga

O modelo de análise da atividade de bomba de efluxo escolhido é um método simples e de baixo investimento em equipamentos (MARTINS et al., 2013). Os seis isolados MDR apresentaram diferenças no efluxo de BrEt comparando as concentrações 0,4 e 0,8 mg/L. A 0,4 mg/L, quatro isolados apresentaram atividade de bomba de efluxo, apresentando fluorescência

reduzida. Ao avaliar a concentração 0,8 mg/L, todos os isolados apresentaram alta fluorescência quando comparados ao controle positivo. Os isolados apresentaram baixa atividade de efluxo quando comparados aos resultados obtidos por ANBAZHAGAN et al. (2019), que observaram efluxo a 1 mg/L ou mais em *Salmonella* MDR. Entretanto no estudo de MARTINS et al. (2011), como exceção de dois isolados, *Salmonella* MDR apresentou fluorescência a 0,5 mg/L. Esses resultados nos indicam que há atividade de bomba de efluxo nesses isolados e que podem estar contribuindo para a resistência aos antibióticos. Entretanto, para confirmar a atuação desse mecanismo de transporte de substâncias é necessário avaliar a ação dos inibidores de bombas de efluxo (MARTINS et al., 2013).

O gene *acrA* foi detectado em todos os isolados, contudo *acrB* não foi encontrado em um dos quatro isolados com efluxo ativo, excluindo a bomba de efluxo AcrAB-TolC como mecanismo de resistência para essa cepa. Os genes *acrA* e *acrB* foram pesquisados visto que, AcrAB-TolC é a bomba de efluxo multidroga mais caracterizada em *Salmonella* (EAVES et al., 2004b). Porém, outras bombas de efluxo podem estar envolvidas, como por exemplo, AcrD e AcrF podem ser superproduzidas quando há deleção de *acrB* (DU et al., 2018).

4. Conclusão

Embora os isolados de *S. enterica* tenham apresentado baixas frequências de resistência aos antibióticos amplamente utilizados na avicultura, o perfil de resistência à ciprofloxacina e a detecção de genes que conferem resistência alertam sobre o uso de antibióticos de importância crítica a saúde humana na saúde animal, evidenciando a abordagem da resistência aos antibióticos como um desafio de Saúde Única.

O perfil intermediário de resistência à ciprofloxacina se correlaciona à distribuição do gene *qnrB* e com a mutação Thr57Ser detectada no gene *parC* dos isolados, o que alerta para os possíveis desafios a serem enfrentados no tratamento de infecções bacterianas. Assim também, o estudo da atividade de bombas de efluxo em isolados MDR atenta para o impacto do mecanismo no perfil de cepas resistentes, contudo, testes de inibição de bombas de efluxo devem ser realizados para confirmar a influência do mecanismo no efluxo de antibióticos.

O uso da técnica de HRM demonstrou ser é uma alternativa ao sequenciamento de todos os isolados obtidos em um estudo e uma forma rápida de avaliar isolados de importância clínica. Assim também, a técnica de efluxo de BrEt em ágar demonstrou aplicabilidade no estudo do sistema de efluxo, concluindo que há atividade de bombas nos isolados.

Agradecimentos

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

Referências Bibliográficas

- AARESTRUP, F. M.; LERTWORAPREECHA, M.; EVANS, M. C.; BANGTRAKULNONT, A.; CHALERMCHAIKIT, T.; HENDRIKSEN, R. S.; WEGENER, H. C. Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.715–718, 2003.
- ABRAHAM, S.; O'DEA¹, M.; SAHIBZADA, S.; HEWSON, K.; PAVIC, A.; VELTMAN, T.; ABRAHAM, R.; HARRIS, T.; TROTT, D. J.; JORDAN, D. Escherichia coli and Salmonella spp. isolated from Australian meat chickens remain susceptible to critically important antimicrobial agents. **Plos One**, v. 14, n. 10, p. 1-12, 2019.
- ALMEIDA, F.; MEDEIROS, M. I. C.; RODRIGUES, D. P.; FALCÃO, J. P. Genotypic diversity, pathogenic potential and the resistance profile of Salmonella Typhimurium strains isolated from humans and food from 1983 to 2013 in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 1395–1407, 2015.
- ANBAZHAGAN, P. V; THAVITIKI, P. R.; VARRA, M.; ANNAMALAI, L.; PUTTURU, R.; LAKKINENI, V. R.; PESINGI, P. K. Evaluation of efflux pump activity of multidrug resistant Salmonella Typhimurium isolated from poultry wet markets in India. **Infection and Drug Resistance**. v.12, p.1081-1088, 2019.
- BAUCHERON, S.; CHASLUS-DANCLA, E.; CLOECKAERT, A.; CHIU, C.-H.; BUTAYE, P. High-Level Resistance to Fluoroquinolones Linked to Mutations in gyrA, parC, and parE in Salmonella enterica Serovar Schwarzengrund Isolates from Humans in Taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 862–863, 2005.
- BAKER, S.; THOMSON, N.; WEILL, F. X.; HOLT, K. E. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 733–738, 2018.
- BLAIR, J. M. A.; SMITH, H. E.; RICCI, V.; LAWLER, A. J.; THOMPSON, L. J.; PIDDOCK, L. J. V. Expression of homologous RND efflux pump genes is dependent upon AcrB expression: implications for efflux and virulence inhibitor design. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, p. 424–431, 2015.
- CAMPBELL, D.; TAGG, K.; BICKNESE, A.; MCCULLOUGH, A.; CHEN, J.; KARP, B. E.; FOLSTER, J. P. Identification and Characterization of Salmonella enterica Serotype Newport Isolates with Decreased Susceptibility to Ciprofloxacin in the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 62, n. 7, p. 1-4, 2018.
- CAMPIONI, F.; SOUZA, R. A.; MARTINS, V. V.; STEHLING, E. G.; BERGAMINI, A. M. M.; FALCÃO, J. P. Prevalence of gyrA Mutations in Nalidixic Acid-Resistant Strains of

Salmonella Enteritidis Isolated from Humans, Food, Chickens, and the Farm Environment in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 4, p. 421-428, 2017.

CAMPIONI, F.; GOMES, C. N.; BERGAMINI, A. M. M.; RODRIGUES, D. P.; FALCÃO, J. P. Partial Correlation Between Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance of Salmonella enterica Serovar Enteritidis Strains from Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 26, n. 12, p. 1466-1471, 2020.

CATTOIR, V.; WEILL, F.-X.; POIREL, L.; FABRE, L.; SOUSSY, L.-J.; NORDMANN, P. Prevalence of qnr genes in Salmonella in France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 751-754, 2007.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS) 2015 Human Isolates Surveillance Report**. Atlanta: CDC, 2018. 84 p. Disponível em: https://www.cdc.gov/narms/pdf/2015-NARMS-Annual-Report-cleared_508.pdf. Acesso em: 14 fev. 2021.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**, 9th Ed. M07. Wayne: CLSI, 2012.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, 28th Ed. M100. Wayne: CLSI, 2018.

CUI, M.; XIE, M.; QU, Z.; ZHAO, S.; WANG, J.; WANG, Y.; HE, T.; WANG, H.; ZUO, Z.; WU, Z. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from an integrated broiler chicken supply chain in Qingdao, China. **Food Control**, v. 62, p. 270-276, 2016.

CUNHA-NETO, A.; CARVALHO, L. A.; CARVALHO, R. C. T.; RODRIGUES, D. P.; MANO, S. B.; FIGUEIREDO, E. E. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. Salmonella isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state of Mato Grosso, Brazil: antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization by repetitive sequence-based PCR system. **Poultry Science**, v. 97, n. 4, p. 1373-1381, 2018.

DE LIMA, M. S.; ISOLAN, L. W.; HESSEL, C. T.; PESSOA, J. P.; TONDO, E. C. Prevalence of Salmonella spp. in poultry carcasses samples collected in slaughterhouses of Southern Brazil from 2006 to 2015. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 18, n. 11, p. 1034-1038, 2018.

DIAS, M. R.; CAVICCHIOLI, V. Q.; CAMARGO, A. C.; LANNA, F. G. P. A.; PINTO, P. A.; BERSOT, L. S.; NERO, L. A. Molecular tracking of Salmonella spp. in chicken meat chain: from slaughterhouse reception to end cuts. **Journal Food Science Technology**, v.53, n. 2, p.1084-1091, 2016.

DOMÉNECH, E.; JIMENEZ -BELENGUER, A.; AMOROS, J. A.; FERRUS, M. A.; ESCRICHE, I. Prevalence and antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes and Salmonella strains isolated in ready-to-eat foods in Eastern Spain. **Food Control**, v. 47, p. 120-125, 2015.

DU, D.; WANG- KAN, X.; NEUBERGER, A.; VEEN, H. W. V.; POS, K. M.; PIDDOCK, L. J. V.; LUISI, B. F. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. **Nature Review Microbiology**, v. 16, p. 523-539, 2018.

DUARTE, D. A. M.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SANTOS, S. B.; SILVA, J. V. D.; DE ANDRADE, P. L.; FALCÃO, L. S. P. C. A. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 569-573, 2009.

DUC, V. M.; NAKAMOTO, Y.; FUJIWARA, A.; TOYOFUKU, H.; OBI, T.; CHUMA, T. Prevalence of *Salmonella* in broiler chickens in Kagoshima, Japan in 2009 to 2012 and the relationship between serovars changing and antimicrobial resistance. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 108, p. 1-8, 2019.

EAVES, D. J.; RANDALL, L.; GRAY, D. T.; BUCKLEY, A.; WOODWARD, M. J.; WHITE, A. P.; PIDDOCK, L. J. V. Prevalence of Mutations within the Quinolone Resistance-Determining Region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and Association with Antibiotic Resistance in Quinolone-Resistant *Salmonella enterica*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 4012–4015, 2004a.

EAVES, D. J.; RICCI, V.; PIDDOCK, L. J. V. Expression of *acrB*, *acrF*, *acrD*, *marA*, and *soxS* in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: Role in Multiple Antibiotic Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p.1145-1150, 2004b.

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority); EMA (European Medicines Agency). ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. **EFSA Journal**, v. 15, n. 7, p. 4872, 2017.

EFSA (European Food Safety Authority); ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. **EFSA Journal**, v. 17, n. 2, p. 5598, 2019.

EL-TAYEB, M. A.; IBRAHIM, A. S. S.; AL-SALAMAH, A. A.; ALMAARY, K. S.; ELBADAWI, Y. B. Prevalence, serotyping and antimicrobials resistance mechanism of *Salmonella enterica* isolated from clinical and environmental samples in Saudi Arabia. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 499-508, 2017.

FERRARI, R.; GALIANA, G.; CREMADES, R.; RODRÍGUEZ, J. C.; MAGNANI, M.; TOGNIM, M. C. B.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ROYO, G. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and mutations in the topoisomerase genes of *Salmonella enterica* strains from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 657-662, 2013.

FERRARI, R. G.; ROSARIO, D. K. A.; CUNHA-NETO, A.; MANO, S. B.; FIGUEIREDO, E. E. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in Animal Based Foods: a Meta-analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 14, p. 1-21, 2019.

GIOMBELLI, A.; GLORIA, M. B. A. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* on Broiler Chickens from Farm to Slaughter and Efficiency of Methods to Remove Visible Fecal Contamination. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 11, p. 1851–1859, 2014.

GIURIATTI, J.; STEFANI, L. M.; BRISOLA, M. C.; CRECENCIO, R. B.; BITNER, D. S.; FARIA, G. A. Salmonella Heidelberg: Genetic profile of its antimicrobial resistance related to extended spectrum b-lactamases (ESBLs). **Microbial Pathogens**, v. 109, p. 195-199, 2017.

GUO, X.; WANG, H.; CHENG, Y.; ZHANG, W.; LUO, Q.; WEN, G.; WANG, G.; SHAO, H.; ZHANG, T. Quinolone resistance phenotype and genetic characterization of Salmonella enterica serovar Pullorum isolates in China, during 2011 to 2016. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 225, p. 1-7, 2018.

HARBARTH, S.; BALKHY, H. H.; GOOSSENS, H.; JARLIER, V.; KLUYTMANS, J.; LAXMINARAYAN, R.; SAAM, M.; BELKUM, A. V.; PITTET, D. Antimicrobial resistance: one world, one fight! **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 4, n. 49, p. 1-15, 2015.

HE, J.; SUN, F.; SUN, D.; WANG, Z.; JIN, S.; PAN, Z.; XU, Z.; CHEN, X.; JIAO, X. Multidrug resistance and prevalence of quinolone resistance genes of Salmonella enterica serotypes 4,[5],12:i:- in China. **International Journal of Food Microbiology** v. 330, n. 108692, 2020.

HERRERO-FRESNO, A.; ZACHARIASEN, C.; HANSEN, M. H.; NIELSEN, A.; HENDRIKSEN, R. S.; NIELSEN, S. S.; OLSEN, J. E. Apramycin treatment affects selection and spread of a multidrug-resistant Escherichia coli strain able to colonize the human gut in the intestinal microbiota of pigs. **Veterinary Research**, v. 47, n. 12, p. 1-10, 2016.

HOPKINS, K. L.; ARNOLD, C.; THRELFALL, J. Rapid detection of gyrA and parC mutations in quinolone-resistant Salmonella enterica using Pyrosequencing® technology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, p. 163–171, 2007.

IFSAC - THE INTERAGENCY FOOD SAFETY ANALYTICS COLLABORATION, Foodborne illness source attribution estimates for 2016 for Salmonella, Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, and Campylobacter using multi-year outbreak surveillance data, United States, 2020.

JENSEN, V. F.; JAKOBSEN, L.; EMBORG, H.; SEYFARTH, A. M.; HAMMERUM, A. M. Correlation between apramycin and gentamicin use in pigs and an increasing reservoir of gentamicin-resistant Escherichia coli. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.58, p.101–107, 2006.

KARP, B. E.; CAMPBELL, D.; CHEN, J. C.; FOLSTER, J. P.; FRIEDMAN, C. R. Plasmid-mediated quinolone resistance in human nontyphoidal Salmonella infections: An emerging public health problem in the United States. **Zoonoses Public Health**, v. 65, p. 838–849, 2018.

LAVILLA, S.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. J.; SABATÉ, M.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; LARROSA, M. N.; BARTOLOMÉ, R. M.; CARATTOLI, C.; PRATS, G. Prevalence of qnr genes among extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v.61, p.291–295, 2008.

LING, J. M.; CHAN, E. W.; LAM, A. W.; CHENG, A. F. Cheng Mutations in Topoisomerase Genes of Fluoroquinolone-Resistant Salmonellae in Hong Kong. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3567–3573, 2003.

LIU, J. **The Role of Excreted Antibiotics in the Establishment of Persistent on-Farm Reservoirs of Antibiotic-resistant Bacteria**. 2016. 103 p. Tese. College of Veterinary Medicine, Washington State University, 2016.

LOPES, G. V.; PISSETTI, C.; PELLEGRINI, D. C. P.; da SILVA, L. E.; CARDOSO, M. Resistance Phenotypes and Genotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Isolates from Feed, Pigs, and Carcasses in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 2, p. 407-413, 2015.

LU, Y.; ZHAO, H.; SUN, J.; LIU, Y.; ZHOU, X.; BEIER, R. C.; WU, G.; HOU, X. Characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovars Indiana and Enteritidis from Chickens in Eastern China. **Plos One**, v. 9, n. 5, p. 1-6, 2014.

MAINALI, C.; McFALL, M.; KING, R.; IRWIN, R. Evaluation of Antimicrobial Resistance Profiles of *Salmonella* Isolates from Broiler Chickens at Slaughter in Alberta, Canada. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 3, p. 485-492, 2014.

MARTINS, M.; VIVEIROS, M.; COUTO, I.; COSTA, S. S.; PACHECO, T.; FANNING, S.; PAGÈS, J. M.; AMARAL, L. Identification of Efflux Pump-mediated Multidrug-resistant Bacteria by the Ethidium Bromide-agar Cartwheel Method. **In vivo**, v. 25, p. 171-178, 2011.

MARTINS, M.; MCCUSKER, M. P.; VIVEIROS, M.; COUTO, I.; FANNING, S.; PAGÈS, J. M.; AMARAL, L. A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps. **The Open Microbiology Journal**, v.7, p. 72-82, 2013.

McEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiol Spectrum**, v. 6, n. 2, p. 1-26, 2018.

MCDERMONTT, P. F.; ZHAO, S.; TATE, H. Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 1-26, 2018.

MENDONÇA, E. P.; DE MELO, R. T.; NALEVAIKO, P. C.; MONTEIRO, G. P.; FONSECA, B. B.; GALVÃO, N. N.; GIOMBELLI, A.; ROSSI, D. A. Spread of the serotypes and antimicrobial resistance in strains of *Salmonella* spp. isolated from broiler. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 515-522, 2019.

MEDEIROS, M. A. N.; OLIVEIRA, D.C.N.; RODRIGUES, D.P.; FREITAS, D. R. C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 30, n. 6, p. 555-560, 2011.

MINHARRO, S.; NASCIMENTO, C. A.; GALLETTI, J. P.; MERISSE, T. J.; FEITOSA, A. C. F.; SANTOS, H. D.; DIAS, F. E. F.; SANTANA, E. S.; BALDANI, C. D.; ANDRADE, M. A. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serovars isolated from edible offal and carcasses of slaughtered poultry in the state of Tocantins, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 4, p. 2661-2670, 2015.

MONTE, D. F.M.; NETHERY, M. A.; BARRANGOU, R.; LANDGRAF, M.; FEDORKA-CRAY, P. J. Whole-genome sequencing analysis and CRISPR genotyping of rare antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovars isolated from food and related sources. **Food Microbiology**, v. 93, p. 1-8, 2021.

NGOI, S. T; THONG, K. L. High Resolution Melting Analysis for Rapid Mutation Screening in Gyrase and Topoisomerase IV Genes in Quinolone-Resistant *Salmonella enterica*. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

OSPINA BARRERO, M. A.; PIETRALONGA, P.A.G.; SCHWARZ, D.G.G.; SILVA JUNIOR, A.; PAULA, S. O.; MOREIRA, M. A. S. Effect of the inhibitors phenylalanine arginyl β -naphthylamide (PA β N) and 1-(1naphthylmethyl)-piperazine (NMP) on expression of genes in multidrug efflux systems of *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 2, p. 176–181, 2014.

PAL, S.; MISRA, A.; BANERJEE, S.; DAM, B. Adaptation of ethidium bromide fluorescence assay to monitor activity of efflux pumps in bacterial pure cultures or mixed population from environmental samples. **Journal of King Saud University – Science**, v. 32, n. 1, p. 939-945, 2019.

PALOMO, G.; CAMPOS, M. J.; UGARTE, M.; PORRERO, M. C.; ALONSO, J. M.; BORGE, C.; VADILLO, S.; DOMÍNGUEZ, L. QUESADA, A.; PÍRIZ, S. Dissemination of Antimicrobial-Resistant Clones of *Salmonella enterica* Among Domestic Animals, Wild Animals, and Humans. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p. 171-176, 2012.

PANDINI, J. A.; PINTO, F. G. S.; J.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; DE MOURA, A. C. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 20, n. 10, p. 1-6, 2014.

PANZENHAGEN, P. H. N.; AGUIAR, W. S.; FRASÃO, B. S.; PEREIRA, V. L. A.; ABREU, D. L. C.; RODRIGUES, D. P.; DO NASCIMENTO, E. R.; DE AQUINO, M. H. C. Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Control**, v. 61, p. 243-247, 2016.

PENG, M.; SALAHEEN, S.; ALMARIO, J. A.; TESFAYE, B.; BUCHANAN, R.; BISWAS, D. Prevalence and antibiotic resistance pattern of *Salmonella* serovars in integrated crop-livestock farms and their products sold in local markets. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1654-1665, 2016.

PUI, C. F.; WONG, W. C.; CHAI, L. C.; NILLIAN, E.; GHAZALI, F. M.; CHEAH, Y. K.; NAKAGUCHI, Y; RADU, S. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. **Food Control**, v. 22, p. 337-342, 2011.

PRIBUL, B. R.; FESTIVO, M. L.; 1, RODRIGUES, M. S.; COSTA, R. G.; RODRIGUES, E. C. P.; DE SOUZA, M. M. S.; RODRIGUES, D. P. Characteristics of Quinolone Resistance in *Salmonella* spp. Isolates from the Food Chain in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 299, p. 1-7, 2017.

PULIDO-LANDÍNEZ, M. Food safety - *Salmonella* update in broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 250, p. 53–58, 2019.

QIAN, H.; CHENG, S.; LIU, G.; TAN, Z.; DONG, C.; BAO, J.; HONG, J.; JIN, D.; BAO, C.; GU, B. Discovery of seven novel mutations of *gyrB*, *parC* and *parE* in *Salmonella* Typhi and Paratyphi strains from Jiangsu Province of China. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, n. 7359, p. 1-8, 2020.

- RAMIREZ-HERNANDEZ, A.; BUGAREL, M.; KUMAR, S.; THIPPAREDDI, H.; BRASHEARS, M. M.; SANCHEZ-PLATA, M. X. Phenotypic and Genotypic Characterization of Antimicrobial Resistance in Salmonella Strains Isolated from Chicken Carcasses and Parts Collected at Different Stages during Processing. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 10, p. 1793–1801, 2019.
- RAMIREZ, M. R.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside Modifying Enzymes. **Drug Resist Updat**, v. 13, n. 6, p. 151–171, 2010.
- RANDALL, L. P.; COOLES, S. W.; OSBORN, M. K.; PIDDOCK, L. J. V.; WOODWARD, M. J. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of Salmonella enterica isolated from humans and animals in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 208–216, 2004.
- RANDALL, L. P.; COLDHAM, N. G.; WOODWARD, M. J. Detection of mutations in Salmonella enterica gyrA, gyrB, parC and parE genes by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) using standard HPLC instrumentation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 619–623, 2005.
- REDGRAVE, L. S.; SUTTON, S. B.; WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Cell Press**, v. 22, n. 8, p. 438–445, 2014.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; MACHUCA, J.; CANO, M. E.; CALVO, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. **Drug Resistance Updates**, v. 29, p. 13–29, 2016
- SANDT, C. H.; FEDORKA-CRAY, P. J.; TEWARI, D.; OSTROFF, S.; JOYCE, K.; M'IKANATHA, N. M. A Comparison of Non-Typhoidal Salmonella from Humans and Food Animals Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Antimicrobial Susceptibility Patterns. **Plos One**, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2013.
- SHARMA, J.; KUMAR, D.; HUSSAIN, S.; PATHAK, A.; SHUKLA, M.; PRASANNA KUMAR, V.; ANISHA, P.N.; RAUTELA, R.; UPADHYAY, A.K.; SINGH, S.P. Prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes characterization of nontyphoidal Salmonella isolated from retail chicken meat shops in Northern India. **Food Control**, v. 102, p. 104–111, 2019.
- SLINGER, R.; BELLFOY, D.; DESJARDINS, M.; CHAN, F. High-resolution melting assay for the detection of gyrA mutations causing quinolone resistance in Salmonella enterica serovars Typhi and Paratyphi. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, n. 4, p. 455–458, 2007.
- TAMBURRO, M.; RIPABELLI, G. Resistance mechanisms and fitness of Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis mutants evolved under selection with ciprofloxacin in vitro. **Ann Ig**, v. 29, n. 4, p. 293–316, 2017.
- VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; ROBINSON, T. P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015.

VELASQUEZ, C. G.; MACKLIN, K. S.; KUMAR, S.; BAILEY, M.; EBNER, P. E.; OLIVER, H. F.; MARTIN-GONZALEZ, F. S.; SINGH, M. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of Salmonella isolated from poultry farms in southeastern United States. **Poultry Science** v. 97, p. 2144–2152, 2018.

VÉLEZ D. V.; RODRÍGUEZ, V.; GARCÍA, N. V. Phenotypic and Genotypic Antibiotic Resistance of Salmonella from Chicken Carcasses Marketed at Ibagué, Colombia. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 19, n. 2, p. 347-354, 2017.

VIANA, C.; GROSSI, L. G.; SERENO, M. J.; YAMATOGLI, R. S.; BERSOT, L. S.; CALL, D. R.; NERO, L. A. Phenotypic and genotypic characterization of non-typhoidal Salmonella isolated from a Brazilian pork production chain. **Food Research International**, v. 137, n. 109407, p.1-8, 2020.

VIVEIROS, M.; DUPONT, M.; RODRIGUES, L. COUTO, I.; DAVIN-REGLI, A. MARTINS, M.; PAGE`S, J-M.; AMARA, L. Antibiotic Stress, Genetic Response and Altered Permeability of E. coli. **Plos One**, v. 2, n. 4, p. e365, 2007.

WASYL, D.; HOSZOWSKI, A.; ZAJA, M. Prevalence and characterisation of quinolone resistance mechanisms in Salmonella spp. **Veterinary Microbiology**, v. 171, n. 3, p. 307-314, 2014.

WHO. World Health Organization. **Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance**. Geneva: WHO, 2014. 256 p. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1. Acesso em: 14 fev. 2021.

WHO - World Health Organization. **Who guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals**, Geneva: WHO, 2017, 88 p. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/publications/cia_guidelines/en/. Acesso em: 14 fev. 2021.

ZHOU, X.; XU, L.; XU, X.; ZHU, Y.; SUO, Y.; SHI, C.; SHI, X. Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of Salmonella enterica Seroovar Enteritidis from Retail Chicken Products in Shanghai, China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 6, p. 1-7, 2018

ZHU, Y; LAI, H.; ZOU, L.; YIN, S.; WANG, C.; HAN, X.; XIA, X.; HU, K.; HE, L.; ZHOU, K.; CHEN, S.; AO, X.; LIU, S. Antimicrobial resistance and resistance genes in Salmonella strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 259, p. 43-51, 2017