

1 INTRODUÇÃO

A Salmonelose, é considerada a principal doença transmitida por alimentos em todo o mundo, devido a ampla ocorrência de pessoas infectadas e prejuízos financeiros causados com a destruição de alimentos, perda de animais, entre outras (WHO, 2006). Infecções causadas por *Salmonella* resultam em gastroenterites, podendo causar morte em alguns casos (Koneman *et al.*, 2008). A transmissão de salmonelose entre humanos pode acontecer, mas não é comum, uma grande variedade de espécies dentro do gênero *Salmonella* é encontrado em diversas fontes, como alimentos, animais de consumo humano, água, deixando as pessoas expostas a uma possível contaminação (Oliveira *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2007).

No Brasil, houve grande aumento da prevalência de isolados de *Salmonella* no início dos anos 90, entre os anos de 1991 e 1995, estudo realizado por Tavechio *et al.* (1996) com isolados enviados ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo mostrou que a porcentagem de isolamento de *Salmonella* Enteritidis de origem humana passou de 1,2% para 64,9%. Após esse período *Salmonella* predominou como o principal agente etiológico de Doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil, entre os anos de 2001 e 2010, foi identificada em 19,16% surtos (Brasil, 2011). No estado do Mato Grosso do Sul, no período de 1999 a 2006, *Salmonella* foi detectada em 30,3% dos surtos (Brasil, 2007).

O Ministério da Saúde do Brasil (2008) recomenda o cloranfenicol, ampicilina, sulfatomexazol/trimetoprim, amoxicilina, quinolonas, fluoroquinolonas e ceftriaxona para o tratamento de infecções causadas por *Salmonella*, além do uso de medicamentos antitérmicos e de hidratação oral (Brasil, 2010). Entretanto a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005) recomenda para adultos, antibióticos do grupo quinolona e, para crianças com infecções graves, cefalosporinas de terceira geração. Porém fármacos como, clorafenicol, ampicilina e amoxicilina e sulfametoxazol/trimetoprima também podem ser usados ocasionalmente. Grandes centros utilizam antimicrobianos apenas em grupos de risco, inicialmente adotam o uso de antibióticos rotineiros e após testes de susceptibilidade selecionam o fármaco mais adequado ao tratamento (Ince *at al.*, 2012).

Porém o uso excessivo de agentes antimicrobianos na medicina humana, veterinária, agricultura, promoveram o aumento de isolados resistentes, tornando necessário o controle destes medicamentos (Levy e Marshall, 2004; Singer e Hofaque,

2006). Vários fatores podem contribuir para a resistência a antimicrobianos, entre eles alterações nas porinas encontradas na membrana celular, bombas de efluxo, genes carregados por plasmídeos, mutações gênicas, e um novo mecanismo de resistência vem atraindo a atenção de pesquisadores, os integrons, que são elementos do DNA capazes de adquirir mobilidade quando inseridos em plasmídios ou associados à transposons, tendo como função rearranjar genes localizados em cassetes gênicos dentro da região variável do integron. São divididos em classe 1, classe 2, classe 3, classe 4 e classe 5, sendo as classes 1, 2 e 3 os tipos mais relacionados com genes de resistência (Fluitz e Schmitz, 2004; Cambray *et al.*, 2010). Em integrons de classe 1, já foram identificados mais de 130 cassetes de genes de resistência, e 6 no de classe 2 (Mazel, 2006; Cambray *et al.*, 2010). Ahmed e Shimamoto (2012) identificaram a presença de integrons de classe 1 ou 2 em mais de 70% dos isolados multirresistentes encontradas em seus estudos.

Considerando-se o aumento da prevalência de isolados de *Salmonella* resistentes a antibióticos, determinar o perfil e os possíveis mecanismos responsáveis pela resistência à antimicrobianos em isolados de determinada região é de grande importância para orientar procedimentos terapêuticos. Diante do exposto, o objetivo da pesquisa foi determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos de *Salmonella*, relacionando ao seu local de isolamento (alimento, água e infecção clínica) e investigar a presença de integrons classe 1 e 2 em isolados por meio da técnica de PCR em Dourados, Mato Grosso do Sul.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Salmonella*

Descrita por Daniel Elmer Salmon no ano 1886, *Salmonella* é um gênero de bactérias, gram-negativas, não esporuladas, não encapsuladas, a maioria possui flagelos, em forma de bacilo, conforme figura 1. (Koneman *et al.*, 2008). Vivem no trato gastrointestinal de animais domésticos e selvagens, a única exceção é a *Salmonella typhi*, que é um patógeno exclusivamente humano (Alcocer *et al.*, 2006).

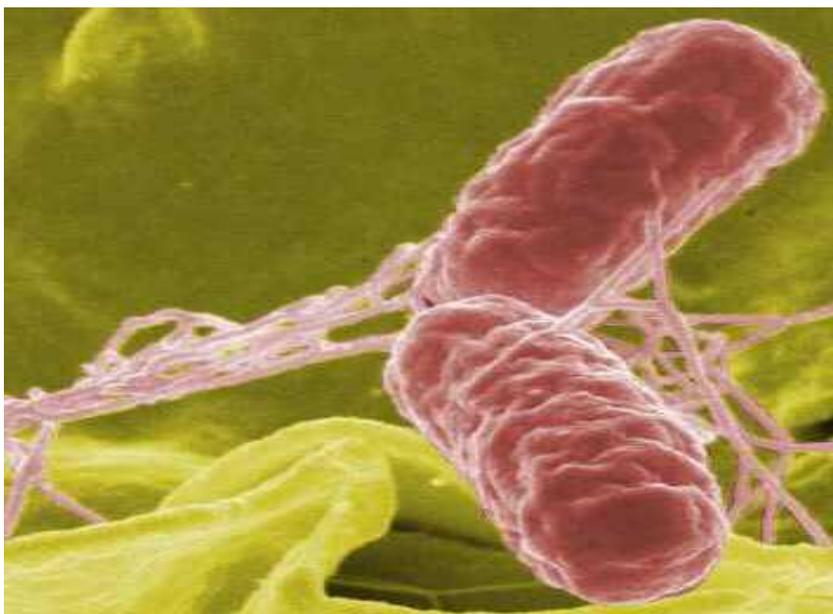


Figura 1. Microfotografia de *Salmonella*. Fonte: Etiology, 2013.

Os seres humanos contraem a infecção por *Salmonella enterica* ingerindo produtos contaminados, de origem animal. O período de incubação deste micro-organismo é de 12 a 36 horas, após a ingestão de água ou alimento contaminado. Os alimentos mais associados a surtos de *Salmonella enterica* são aves e ovos e estes podem ser contaminados na cloaca da galinha ou por infecção transovariana (Koneman *et al.*, 2008). Os sintomas mais comum de um paciente com salmonelose são diarreia, náuseas, febre, cólicas abdominais e vômitos (Ingrahm e Ingrahm, 2010).

A infecção por *Salmonella enterica* pode levar a complicações graves e mesmo a óbito em pessoas frágeis. A taxa de mortalidade associada à diarreia é maior em idosos com mais de 74 anos em comparação com pacientes mais jovens (Akhtar, 2003). Um estudo clínico sobre bacteremia provocada por *Salmonella* não tifóide, realizado na Tailândia, mostrou que pacientes com falhas na função imunológica celular correm o risco de desenvolver a doença e têm taxa de mortalidade bastante elevada: sua mortalidade global foi 36,3%, chegando a 60% nos pacientes com AIDS (Thamlikitkul, *et al.*, 1996).

2.2 Classificação

Pertence à família Enterobacteriaceae, é dividida em 2 espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* (que contém 6 sub-espécies) conforme a Tabela 1, e possui mais de 2400 sorotipos.

Tabela 1. Classificação de espécie e sub-espécie de *Salmonella*

| Espécie | Sub-Espécie |
|---------|-----------------------------------------------------|
| | <i>enterica</i> (I): Inclui a maioria dos sorotipos |
| | <i>salamae</i> (II) |

| | |
|----------------------------|---------------------------|
| <i>Salmonella enterica</i> | <i>arizonae</i> (IIIa) |
| | <i>diarizonae</i> (IIIb) |
| | <i>houtenae</i> (IV) |
| | <i>indica</i> (VI) |
| <i>Salmonella bongori</i> | *antigamente subespécie V |

Fonte: Koneman *et al.* (2008)

De acordo com o Country Databank (2012), banco de dados da Organização Mundial de Saúde, que reúne os 15 sorotipos de *Salmonella* mais prevalentes em cada região do mundo, em fontes humanas, no ano de 2009, *Salmonella* Enteritidis foi a mais prevalente em toda a Europa, África, América do Sul, Oriente Médio e Leste Asiático, enquanto a *Salmonella* Typhimurium, foi a mais prevalente na América do Norte, América Central, Caribe e Oceania. No Sudeste Asiático, predomina a *Salmonella* Weltevreden.

Considerando fontes não humanas, em quase toda a Europa, na região Norte da África e na América do Sul, *Salmonella* Enteritidis é a mais prevalente, enquanto no Norte Europeu, Oceania e América do Norte, *Salmonella* Typhimurium é a mais prevalente. *Salmonella* Kentucky é a mais encontrada no Caribe e Norte da África, *Salmonella* Infantis, no Oriente Médio, *Salmonella* Derby no Oeste Asiático e *Salmonella* Anatum, no Sudeste Asiático (WHO, 2012).

Na América do Sul, os sorotipos mais prevalentes são *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, nas fontes humanas e não-humanas, (WHO, 2009), demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Sorotipos de *Salmonella* mais prevalentes na América do Sul, em fontes humanas e não humanas

| Humana | % | Não Humana | % |
|-------------------------------|----------|-------------------------------|----------|
| <i>Salmonella</i> Enteritidis | 48,3% | <i>Salmonella</i> Enteritidis | 34,1% |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium | 18 % | <i>Salmonella</i> Typhimurium | 9,8% |

| | | | |
|----------------------------|------|-----------------------------|------|
| <i>Salmonella</i> Thyphi | 7,3% | <i>Salmonella</i> Panama | 5,6% |
| <i>Salmonella</i> Infantis | 3,9% | <i>Salmonella</i> Mbandaka | 5,5% |
| <i>Salmonella</i> Agnona | 3,7% | <i>Salmonella</i> Minnesota | 4,2% |

Fonte: WHO, 2009

No Brasil de acordo com a WHO (2012), o sorotipo mais isolado em alimentos é *Salmonella* Typhimurium, em amostras ambientais é *Salmonella* Infantis e em humanos *Salmonella* Enteritidis (Tabela 3).

Tabela 3. Sorotipos de *Salmonella* mais prevalentes no Brasil em Alimentos, Ambiente e Humanos

| Alimentos | % | Ambiente | % | Humanos | % |
|--------------------------|----------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|
| <i>S. Typhimurium</i> | 11,5 | <i>S. Infantis</i> | 9,8 | <i>S. Enteritidis</i> | 32,1 |
| <i>S. Enteritidis</i> | 7,6 | <i>S. Typhimurium</i> | 8,6 | <i>S. Typhimurium</i> | 31,7 |
| <i>S. Infantis</i> | 6,7 | <i>S. Mbandaka</i> | 7,8 | <i>S. Infantis</i> | 4,6 |
| <i>S. Schwarzengrund</i> | 5,8 | <i>S. Senftenberg</i> | 6,4 | <i>S. Muenchen</i> | 2,5 |
| <i>S. Minnesota</i> | 4,9 | <i>S. Tennessee</i> | 5,9 | <i>S. Panama</i> | 2,5 |
| Outros | 63,5 | Outros | 61,5 | Outros | 26,6 |

Fonte: CDB, 2012

2.3 Epidemiologia de *Salmonella*

A salmonelose é a doença transmitida por alimento mais frequente em todo o mundo, de acordo com a Organização Mundial de Saúde. A fonte mais frequente da contaminação por *Salmonella* em humanos são os produtos de origem animal, principalmente os oriundos da indústria avícola (Ribeiro *et al.*, 2007).

Há uma grande perda econômica devido à contaminação por *Salomonella* decorrente de tratamentos médico-hospitalares, da perda de animais contaminados, e da necessidade de reprocessamento ou destruição de alimentos contaminados (WHO, 2006).

Em 1880 foi relatado o primeiro caso de salmonelose em humanos, sendo a *Salmonella* Typhimurium a mais predominante e tem sido registrado um progressivo aumento de infecções por salmonelas em humanos e animais desde o ano de 1940, sendo isolado principalmente as *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis (Forshell e Wierup, 2006).

Os surtos ocorridos no Brasil causados por *Salmonella* Enteritidis aumentaram acentuadamente a partir da segunda metade da década de 1990. Entre 1991 e 1995, a porcentagem de isolamento de *S. Enteritidis* de origem humana passou de 1,2% para 64,9%. Deste então *Salmonella* continuou sendo o principal agente etiológico de DTA no país, no período entre 2001 e 2010, foi identificada em 19,16% surtos (Tavechio *et al.*, 1996; Brasil, 2011).

Vários estudos mostram frangos como uma fonte de isolados de *Salmonella* (Cardoso *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Ahmed e Shimamoto, 2012). A principal forma de contaminação de salmoneloses passando de frango para humanos é a contaminação cruzada, onde instrumentos usados para manipular o alimento antes de cozinhá-lo, como facas, táboas, entre outros, não são corretamente higienizados, contaminando assim outros alimentos, Oscar (2013), concluiu que a indústria está tomando cuidado com a contaminação de frangos, demonstrando que a prevalência de frangos contaminados com *Salmonella* foi de 3% e a incidência de contaminação cruzada foi em 1,8%.

Trabalhos realizados no estado do Mato Grosso do Sul detectaram alta incidência de frangos positivos para *Salmonella*, estudo com 257 amostras, provenientes de carcaças de frango, cortes, vísceras, suabes de arraste, água do *chiller* provenientes de abatedouro, encontrou *Samonella* em 11, 28% das amostras, porém levando em consideração, somente amostras coletadas diretamente do aviário, apenas 3,73% foram

positivas, enquanto as coletadas de abatedouro apresentaram prevalência de 19,51% (Boni *et al.*, 2011).

Em estudo realizado na Grande Dourados, com 50 amostras de carcaças de frango de abatedouros, detectou-se por meio de PCR, a presença de *Salmonella* em 90% das amostras (Chagas *et al.*, 2013).

2.4 Tratamento

Para o tratamento de infecções causadas por *Salmonella* o Ministério da Saúde do Brasil recomenda antibióticos como: cloranfenicol, ampicilina, sulfatomexazol/trimetoprima, amoxicilina, quinolonas, fluoroquinolonas e ceftriaxona, além do uso de medicamentos antitérmicos e hidratação oral (Brasil, 2010). Porém, em casos sem complicação, antibióticos são contraindicados, pois esse tratamento poderia tornar o paciente um portador crônico de *Salmonella* devido a resistência. Em casos graves, especialmente quando bactérias entram na circulação sanguínea, o uso de antibióticos passa a ser essencial para a recuperação do paciente (Ingrahm e Ingrahm, 2010).

Além da utilização em seres humanos, agentes antimicrobianos são utilizados na medicina veterinária tanto para o tratamento e profilaxia de doenças, bem como na produção animal, como promotores de crescimento (Oliveira *et al.*, 2005).

O tratamento destas infecções gera um grande gasto financeiro, estima-se que anualmente surgem 1.397.187 de casos de infecção por Salmonelose, gerando um custo anual em todo o mundo de 2.708.292.046 U\$\$ (Dólares americanos) (ERS, 2010). Gastos que poderiam ser evitados, caso houvesse prevenção.

2.5 Resistência á Antibióticos

Pessoas com infecções causadas por *Salmonella* resistentes têm taxa de mortalidade maior, quando comparada com pessoas infectadas pelo micro-organismo não resistente. Estima-se que a taxa de mortalidade para pessoas com infecções causadas por *Salomonella* multirresistentes é 10 vezes maior nos dois anos seguintes a coleta da amostra do que para a população em geral (WHO, 2005).

Desde 1948, houve aumento no número de bactérias resistentes a antibióticos, além da pressão seletiva exercida pelo uso extensivo de antimicrobianos na medicina humana, há evidências na literatura que sugerem o aparecimento de espécies multirresistentes devido à utilização de antimicrobianos na criação de animais de consumo humano (Smith *et al.*, 2002; Butaye *et al.*, 2006).

Inicialmente as fluoroquinolonas foram licenciadas apenas para o uso terapêutico em humanos, e não foi observado aumento imediato de isolados de *Salmonella* resistentes à essa classe de antimicrobiano. Em contraste, quando posteriormente foram licenciados para uso em animais de produção, a prevalência de isolados resistente às fluoroquinolonas aumentaram gradativamente em animais e alimentos, e posteriormente em infecções humanas (FAO, OIE, WHO, 2003).

A exposição a antibióticos em ambientes aquáticos se dá por diversos fatores, dentre eles, podemos citar a presença de resíduos de fármacos encontrados em estações de tratamentos de esgoto, que podem atingir corpos d'água (Bila e Dezotti, 2003). Outra forma de exposição no ambiente aquático, é através de urinas e fezes excretados, tanto por animais presentes no ambiente, quanto por humanos, tratados com antibióticos, e sua excreção atinge redes de esgotos (Kummerer, 2004). Sabe-se que cerca de 50 a 90% do antimicrobiano digerido, é excretado pelo nosso organismo (Raloff, 1998).

A presença de isolados resistentes em animais de produção pode ameaçar a eficácia de antimicrobianos em humanos se estas bactérias ou seus genes de resistência forem incorporados à população bacteriana humana (Smith *et al.*, 2002).

Em um estudo realizado por Palmeira e Nascimento (2008) não foi encontrado diferenças nos isolados de *S. Enteritidis* entre os estados do sul (PR, SC e RS), e todos isolados de *Salmonella* foram resistentes a bacitracina e a penicilina e 78,2% apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. Rodrigues (2011) detectou que 63,9% dos isolados de *Salmonella* Enteritidis da FIOCRUZ, eram suscetíveis à ampicilina, cefalotina, ciprofloxacina, ceftriaxona, gentamicina, ácido nalidíxico, nitrofurantoína e trimetoprim/sulfametoxazol. A resistência ao ácido nalidíxico foi constatada em 13,2% e à nitrofurantina em 10,5%.

Todos isolados de *Salmonella* Hadar, testados por Ribeiro (2006) apresentaram resistência à tetraciclina, no Rio Grande do Sul, fato que não houve surpresa, pois até o ano de 1998 o antimicrobiano era adicionado em rações, o que aumentou a resistência sobre o mesmo (Silva e Duarte, 2002).

Em países como a Coréia do Sul, antibióticos do grupo quinolona não são mais considerados eficazes no combate às salmoneloses, estudo de Lee *et al.* (2004) mostrou a ineficácia do antibiótico no combate à *Salmonella* Galinarum, agente causador da Febre Tifóide em frangos, em 1995, nenhum isolado exposto a enrofloxacina foi resistente ao antibiótico, em 2001, apenas 6,5% dos foram sensíveis ao medicamento.

Isolados de *Salmonella* de carcaças bovinas, apresentaram baixa resistência quando comparado a estudos de isolados humanos e de frangos, segundo o estudo de (Sibhat *et al.*, 2011), 20,7 % dos isolados expostas à estreptomicina, sulfisoxazole e tetraciclina foram resistente a um ou mais medicamento.

2.6 Genética Bacteriana

As Bactérias possuem um DNA cromossômico, circular de fita dupla, com todas as suas informações vitais contidas no nucleotídeo, e uma cadeia de DNA livre, denominada Plasmídeo, que pode reproduzir-se independente do DNA cromossômico. este último pode ser transferido para outros micro-organismos. São seres assexuados, porém ocorre transferência de genes de 3 formas: Transformação, transdução e conjugação (Snustad e Simmons, 2010).

Na transformação, elementos de DNA de micro-organismos mortos, podem ser adquirido por outros. Transdução, a transferência é carregada por vírus bacteriófagos, que em contato com a bactéria, transfere um novo material genético. A principal forma de troca é a conjugação, onde um micro-organismo doador, entra em contato com um receptor (R), através de uma estrutura denominada Pili, o plasmídeo é transferido de uma célula para outra, neste pode conter genes associados a resistência à antibióticos. Tais genes podem produzir enzimas que degradam o antimicrobiano ao entrar na célula, ou alterar a estrutura, na qual o medicamento agiria, tornando este ineficiente (Koneman *et al.*, 2008; Snustad e Simmons, 2010).

2.7 Mecanismos de Resistência

Vários fatores podem estar associados à causa da resistência de micro-organismos à antimicrobianos. Podem ocorrer alterações nas porinas presentes na membrana externa do micro-organismo, reduzindo a permeabilidade dos agentes (San-Martin *et al.*, 2005; Koneman *et al.*, 2008). Além da influência de alguns genes, podem

codificar a resistência a antimicrobianos, estes genes podem estar localizados no cromossomo ou nos plasmídios. O DNA cromossômico é relativamente mais estável, enquanto que o DNA plasmidial é facilmente transportado de uma linhagem para outra por conjugação bacteriana, permitindo uma transferência de genes em conjunto incluindo os de resistência a antimicrobianos (Koneman et al., 2008; Snustad e Simmons, 2010).

2.7.1 Mutações

Mutações nos Genes GyrA, GyrB, que codificam as subunidades A e B respectivamente, na DNA-girase e nos genes ParC e ParE, codificadores das subunidades da Topoisomerase IV, estão associadas à resistência à medicamentos do grupo quinolona em *Salmonella* (Cloeckaert et al., 2006).

Essas mutações ocorrem em uma região entre os aminoácidos de posição 67 ao de 106, essa região é denominada Região Determinante de Resistência às Quinolonas (QRDR) (Soto et al., 2003).

A maior frequência de alteração na QRDR em *Salmonella* resistentes ao ácido nalidíxico ocorre nos códons correspondentes a Serina-83 (Ser83) e Aspartato-87 (Asp87) (Hopkins et al., 2005).

As mutações no aminoácido Ser83 podem resultar em trocas por tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) ou alanina (Ala), e as mutações no aminoácido Asp87 podem implicar em substituições por asparagina (Asn), glicina (Gly), tirosina (Tyr) ou lisina (Lys). Em *Salmonella* que possui essas mutações, a sensibilidade á antibióticos é reduzida, quando comparadas a isolados não mutantes (Lee et al., 2004; Hopkins et al., 2005).

2.7.2 Integrons

Descrito pela primeira vez no ano de 1988, integrons são elementos de DNA que podem adquirir motilidade, quando associados a transposons e plasmídios, com a função de interagir, retirar e rearranjar genes que se localizam em cassetes gênicos dentro de sua região, a enzima integrase, expressa pelo gene *intI* é a responsável pela realização de todas as suas atividades (Cambray et al., 2010). Conforme Figura 2.

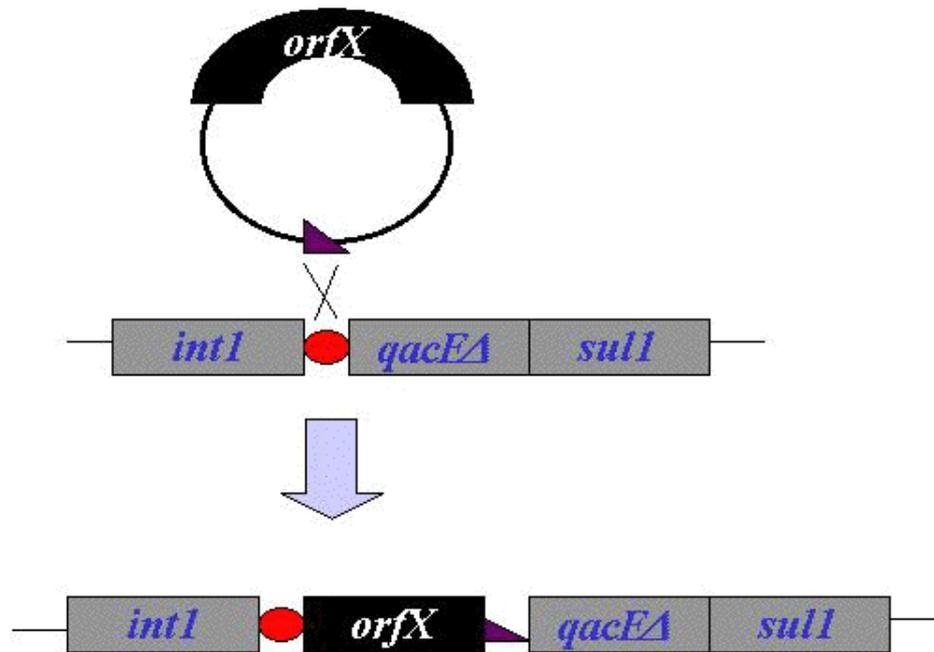


Figura 2. Integron. O triângulo e o círculo consistem em um sítio de inserção de 59pb. Os genes *qacEΔ* e *sul*, são expressos após serem ativados pelo mecanismo. Fonte: San Diego State University.

São classificados em integron classe 1, classe 2, classe 3, classe 4, classe 5 de acordo com a similaridade dos aminoácidos que compõem a enzima Integrase. Estruturalmente são divididos em regiões variáveis e não variáveis, sendo que os cassetes gênicos são inseridos nesta região variável, dependendo da pressão seletiva sofrida pelo micro-organismo (Wallace *et al.*, 2010).

Esse mecanismo de resistência já foi identificado em vários estudos com *Salmonella*, é encontrado principalmente em isolados multirresistentes, Firoozeh *et al.* (2011), isolou 43 serovares de *Salmonella*, multirresistentes, identificando a presença da Integron Classe I em 88,3% das amostras.

Vários fatores podem influenciar na expressão dos genes de resistência contidos nos integrons, um dos principais é que genes encontrados próximo ao promotor tendem a ser expressos com maior eficácia do que aqueles que estão localizados distantes deste promotor, apresentando maior efeito na resistência da bactéria ao antimicrobiano (Weldhagen, 2004).

Ahmed e Shimamoto (2012) obtiveram 17 amostras de *Salmonella*, multirresistentes, destas, em 42,9% foi detectada a presença de integron classe 1 e em 14.3% o integron classe 2.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Verificar os sorotipos de *Salmonella* prevalentes, determinar o perfil e padrão de resistência à antimicrobianos em isolados de fontes diferentes (alimento, água, infecções clínicas) e identificar a presença de integrons classe 1 e 2 no município de Dourados, Mato Grosso do Sul.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar os sorotipos de *Salmonella* isolados com maior frequência nos anos de 2010-2011.
- Avaliar o perfil de resistência a antibióticos dos isolados de *Salmonella* isoladas de diferentes fontes (alimento, água e infecções clínicas) em Dourados, Mato Grosso do Sul utilizando duas metodologias (Difusão em disco e MIC) e verificar se a fonte de origem de isolamento influencia neste perfil;
 - Estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos isolados;
 - Identificar a presença ou ausência de integrons e sua classe (1 ou 2) nos isoladas por meio da técnica de PCR.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED A.M.; SHIMAMOTO, T. Genetic analysis of multiple antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from diseased broilers in Egypt. **Microbiology Immunology**. v. 56, n. 4, p. 254-261, 2012.

AKHTAR, A. J. Acute diarrhea in frail elderly nursing home patients. **Journal of the American Medical Directors Association**. v. 4, n. 1, p. 34-9, 2003.

ALCOCER, I.; OLIVEIRA, K.M.P.; VIDDOTO, M. C.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Discriminação de sorovares de *Salmonella spp.* isoladas de carcaças de frango por REP e ERIC-PCR e fagotipagem do sorovar Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, p. 414-420, 2006.

BAÚ, A.C.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Prevalência de *Salmonella ssp* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n.2, p. 303-307, 2001.

BILA, D.M.; DEZZOTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v.26, n.4, p.523-530, 2003.

BONI, H.F.K; CARRIJO, A.S; FASCINA, V.B. Ocorrência de *Salmonella spp.* em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.12, n.1, p.84-95, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Dados Epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011. – 1 ed. – Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011. 36p.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual Integrado de controle e vigilância à Febre Tifóide. - 1. Ed – Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 92 p.: il. Color. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brasil. Ministério da Saúde. Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. – 1. Ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 158 p.: il. Color, - (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde : relatório de situação : Mato Grosso do Sul / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2007. 23 p.: il. color. – (Série C. Projetos, Programas e Relatórios).

BUTAYE, P. et al. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. **Microbes and Infection**. v. 8, n. 7, p. 1891-1897, 2006.

CAMBRAY, G.; GUEROUT, A.M.; MAZEL, D. Integrons. **Annual Review of Genetics**. v. 44, p. 141-165, 2010.

CARDOSO, M.O; RIBEIRO, A.R; SANTOS, L.R; PILOTTO, F. Antibiotic Resistance in *Salmonella enteritidis* isolated from broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, p. 368-371, 2006.

CHAGAS, F.F.; CRISPIM, B.A.; OLIVEIRA, K.P.M.; GRISOLIA, A.B. Identification and detection of *Salmonella* strains isolated from chicken carcasses and environmental sources in Dourados, MS, Brazil. **African Journal of Microbiology Research**. v.7, n.25, p. 3222-3228, 2013.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. M100-S22. v. 32, n. 3. 2012.

CLOECKAERT, A.; PRAUD, K.; DOUBLET, B.; DEMARTIN, M.; WEILL, F.X. Variant *Salmonella* genomic island 1-L antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Newport. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 11, p. 3944-3946, 2006.

Country Databank. 2012. Top 15 lists from a Country. WHO. Disponível em: <http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY_DATA_SET_REP.show>. Acesso em: 18/06/2013.

Economic Research Service (ERS) Foodborne Illness Cost Calculator. 2010. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/Data/FoodborneIllness/>>. Acesso em: 18/06/2013.

Etiology. There are many different agents known to cause calf scours. Below are some of the most common causes. 2013. Disponível em <http://homepage.usask.ca/~vim458/virology/studpages2007/Chad_Jan_Amy/etiology.html>. Acesso em: 10/08/2013.

[FIROOZEH](#), F.; SHAHCHERAGHI, F.; ZAHRAEI SALEHI, T.; KARIMI, V.; ASLANI, M.M. Antimicrobial resistance profile and presence of class I integrons among *Salmonella enterica* serovars isolated from human clinical specimens in Tehran, Iran. **Iranian Journal of Microbiology**. v.3, n.3, p-112-117, 2011.

FLUIT, A.C.; JONES, M.E.; SCHMITZ, F.J.; ACAR, J.; GUPTA, R.; VERHOEF, J. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the Sentry antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. **Clinical Infectious Diseases**. v. 30, n.32, p. 454-60, 2000.

FLUITZ A.C., SCHMITZ F.J. Resistance integrons and super-integrons. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.10, p.272-288, 2004.

FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics**. v. 25, n. 2, p. 541-554, 2006.

HAKANEM A, LINDGREN M, HUOVINEN P, JAVALA J.; SIITONEN, A, KOTILAINEN P. New quinolone resistance phenomenon in *Salmonella enterica*: nalidixic acid-susceptible isolates with reduced fluoroquinolone susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 11, p. 5775-5778, 2005.

HOPKINS, K. L.; DAVIES, R. H.; THRELFALL, E. J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 25, n. 5, p. 358-73, 2005.

INCE, O.T.; YALÇIN, S.S; YURDAKÖK, K.; ÖZMERT, E.N.; AYDUN, O.; BARIS, Z. *Salmonella* gastroenteritis in children (clinical characteristics and antibiotic susceptibility): comparison of the years 1995-2001 and 2002-2008. **The Turkish Journal of Pediatrics**. v. 54, n.5, p.465-473, 2012.

INGRAHAM, J.L; INGRAHAM, C.A. **Introdução à microbiologia: Uma abordagem baseada em estudos de casos**. 3ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 723p.

KONEMAN, E.W.; WINN Jr, W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R.; PROCOP, G.; WOODS, G. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565p.

KUMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, n.2, p.311-320, 2004.

LEE Y.J.; KIM, K.S.; KIM, J.H.; TAK, R.B. *Salmonella gallinarum* gyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance. **Avian Pathology**, v. 33, n. 2, p. 251 - 257, 2004.

LEVY S.B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**. v. 10, n.12, 2004.

MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiology**. v. 4, n.8, p. 608-620, 2006.

MOLBAK K.; BAGGESEN D.L.; AARESTRUP F.M.; EBBESEN J.M.; ENGBERG J.; FRYDENDAHL K.; GERNER-SMIDT, P.; PETERSEN, A.M.; WEGENER, H.C. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104. **The New England Journal of Medicine**. v. 341, n.19, p. 1420-1425, 1999.

MORITA, M.; TAKAI, N.; TERAJIMA, J.; WATANABE, H.; KUROKAWA, M.; SAGARA, H.; OHNISHI, K.; IZUMIYA, H. Plasmid-Mediated Resistance to Cephalosporins in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.54, n.9, p-3991-3992, 2010.

OLIVEIRA, S. D.; FLORES, F. S.; SANTOS, L. R.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 297-305, 2005.

OSCAR, T.P. Initial contamination of chicken parts with *Salmonella* at retail and cross-contamination of cooked chicken with *Salmonella* from raw chicken during meal preparation. **Journal of Food Protection**. v. 73, n. 1, p. 4-183, 2013.

PALMEIRA, A.L.B.; NASCIMENTO, V.P. Prevalência e perfil de resistência aos Antimicrobianos de *Salmonella ssp* isolados de carcaças de frango e peru na Região Sul do Brasil no período de 2004 a 2006. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.36, n.1, p.84-85. 2008.

RALOFF, J. Does it matter that pharmaceuticals are turning up in water supplies? **Science News**. v.153, n.12, p. 187-189, 1998.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; BESSA, M. C.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, n. 2, p. 296-299, 2007.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; FITTÉL, A. P.; NASCIMENTO, V. P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 3, p. 357-360, 2006.

RODRIGUES, D. P. Reporte de la Vigilancia de la resistencia antimicrobiana de aislados de *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio cholerae*. **Fundação Instituto Oswaldo Cruz**, 2001. Disponível em: < <http://www.paho.org/spanish/hcp/hct/arm-resultados-bra.pdf>> Acesso em: 18/06/2013.

San Diego State University. Integrons. 2013. Disponível em: <<http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/transposons/integrons/integrons.html>>. Acesso em: 20/08/2013.

SAN MARTÍN, B.; LAPIERRE, L.; TORO, C.; BRAVO, V.; CORNEJO, J.; HORMAZABAL, J. C.; BORIE C. Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. from poultry farms. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 110, n. 3/4, p. 239-244, 2005.

SIBHAT, B.; MOLLA ZEWEDE, B.; ZERIHUN, A.; MUCKLE, A.; COLE, L.; BOERLIN, P.; WILKIE, E.; PERETS, A.; MISTRY, K.; GEBREYES, W.A. *Salmonella* serovars and antimicrobial resistance profiles in beef cattle, slaughterhouse personnel and slaughterhouse environment in ethiopia. **Zoonoses and Public Health**. v. 58, n. 2, p. 102-109, 2011.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis in poultry: retrospective in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

SINGER, R. S.; HOFACRE, C. L. Potential impacts of antibiotic in poultry production. **Avian Diseases**, v. 50, n.2, p. 161-172, 2006.

SMITH, D.L.; HARRIS, A.D.; JOHNSON, J.A.; SILBERGELD, E.K; MORRIS, J.G Jr. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 9, p. 6434-6439, 2002.

SNUSTAD, P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos da Genética**. 4esd. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 922p.

SOTO, S.M.; RUÍZ, J.; MENDOZA, M.C.; VILA, J. In vitro fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: analysis of mechanisms involved in resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 5, p. 537-40, 2003.

TAGUCHI, M.; KAWAHARA, R.; SETO, K.; INOUE, K.; HAYASHI, A.; YAMAGATA, N.; KAMAKURA, K.; KASHIWAGI, E. Plasmid-Mediated quinolone resistance in *Salmonella* isolated from patients with overseas travelers diarrhea in Japan. **The Journal of Infectious Diseases**. v.62, n.4, p. 312-314, 2009.

TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella enteritidis* in Sao Paulo, Brazil. **Journal of the Institute of Tropical Medicine of São Paulo**. v. 38, n. 5, 1996.

THAMLIKITKUL, V.; DHIRAPUTRA, C.; PAISARNSINSUP, T.; CHAREANDEE C. Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia: clinical features and risk factors. **Tropical Medicine & International Health**. v. 1, n. 4, p. 443-448, 1996.

WALLACE, K.M.P.; BETHEL, C.R.; DESTLER, A.M.; KASUBOSKI, C.; TARACILA, M.; BONOMO, R. Inhibitor resistance in the KPC-2 β -lactamases, a preeminent property of this class A β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n 54, p.890-897, 2010.

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

World Health Organization (FAO/OIE/WHO). Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment, Geneva, 2003.

World Health Organization (WHO). Global Foodborne Infections Network Country Databank. 2012. Disponível em: < http://thor.dfvf.dk/portal/page?_pageid=53,1&_dad=portal&_schema=PORTAL> Acesso em: 10/08/2013

World Health Organization (WHO). Drug-resistant *Salmonella*. Fact sheet n. 139. 2005.

World Health Organization (WHO). Global Foodborne Infections Network Country Databank – A resource to link human and non-human sources of *Salmonella*. ISVEE Conference, Durban, South Africa. 2009.

World Health Organization (WHO). Progress report (2000-2005): building capacity for laboratory-based foodborne disease surveillance and outbreak detection and response. WHO Global Salmsurv, 2006.

5 ANEXOS

5.1 Artigo científico

O artigo científico segue as normas do periódico, *The Journal of Infection in Developing Countries* (ISSN 1972-2680), fator de impacto (1,2), qualis B2, o qual será submetido.

Identificação de integrons classe 1 e classe 2 em isolados de *Salmonella* resistentes e sensíveis à antimicrobianos.

XXXXXXXX*¹, XXXXXXXXXXXXX², XXXXXXXXXXX

¹Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados/MS, Brasil. Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA).

²XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

*Contato do autor: Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados/MS, 79825-070, MS, Brasil, telefone: +55 67 3410-2321, Fax: +55 67 3410-2002. E-mail: felc86@yahoo.com.br.

Título resumido: Identificação de integrons em *Salmonella*

Palavras chave: *Salmonella*; Resistência à antibióticos; Integrons.

Resumo (normas – o resumo não poderá exceder 250 palavras)

Introdução: O uso indiscriminado de antimicrobianos favoreceu o surgimento de isolados resistentes. Alguns mecanismos podem contribuir para disseminar genes de resistência, entre eles, os integrons. O objetivo do estudo foi descrever os sorotipos, perfil de resistência, e avaliar a presença de integrons em isolados de *Salmonella*, em Dourados, MS.

Metodologia: Foram utilizadas 36 amostras de diferentes fontes. Para avaliar o perfil de resistência, utilizou-se duas técnicas (difusão em disco e concentração inibitória mínima), e por meio de PCR, identificou-se a presença de integrons classe 1 e classe 2.

Resultados: O sorotipo encontrado com maior frequência foi *S. Infantis*. Pelo método de difusão em disco, (22,2%; n=8) dos isolados totais apresentaram perfil de resistência. Quando separados por grupos de acordo com a fonte de isolamento, observou-se, que (44,4%; n=4) amostras isoladas de água, (33,3%; n=3) das de infecções clínicas e (5,8%; n=1) das de alimentos foram resistentes. Avaliados por meio do método de Concentração Inibitória Mínima, (30,5%; n=11) dos isolados totais, foram resistentes, separados por grupos, isolados de infecções clínicas, água e alimentos, apresentaram resistência em (40%; n=4), (33%; n=3) e (23,5%; n=4) das amostras. O integron de classe 1 ocorreu em (88,8%; n=32) dos isolados totais, sendo dentre esses (91,6%; n=11) dos isolados resistentes e (87,5%; n=21) dos isolados não resistentes. O integron classe 2 foi encontrado em (8,3%; n=3) isolados totais, sendo estes todos sensíveis.

Conclusão: O Perfil de resistência não foi relacionado à presença de integrons. Pesquisas futuras com genes associados a este mecanismo poderiam identificar esta associação.

Palavras chave: *Salmonella*; Resistência à antibióticos; Integrons.

Introdução

A Salmonelose é considerada a principal doença transmitida por alimentos (DTA) em todo o mundo, devido à ampla ocorrência de pessoas infectadas e aos prejuízos econômicos causados na medicina humana, veterinária, na destruição ou reprocessamento de alimentos contaminados, entre outros [1]. Infecções causadas por *Salmonella* resultam em gastroenterites, podendo causar até morte em alguns casos [2]. No Brasil, entre 2001 e 2010, *Salmonella* foi o principal agente etiológico causador de DTA, sendo identificadas em 19,16% surtos [3]. No Estado do Mato Grosso do Sul, no período de 1999 a 2006, *Salmonella* foi detectada em 30,30% dos surtos [4]. A transmissão de salmonelose entre humanos pode acontecer, entretanto não é comum. Grande variedade de espécies do gênero *Salmonella* é encontrada em diversas fontes como alimentos, animais de consumo humano, água, expondo as pessoas a possível contaminação [5,6].

O Ministério da Saúde do Brasil recomenda o cloranfenicol, ampicilina, sulfatomexazol/trimetoprim, amoxicilina, quinolonas, fluoroquinolonas e ceftriaxona para o tratamento de infecções causadas por *Salmonella*, além do uso de medicamentos antitérmicos e de hidratação oral [3,7]. Entretanto a Organização Mundial da Saúde recomenda para adultos, antibióticos do grupo quinolona e, para crianças com infecções graves, cefalosporinas de terceira geração. Porém fármacos como, cloranfenicol, ampicilina e amoxicilina e sulfametoxazol/trimetoprima também podem ser usados ocasionalmente [8]. Grandes centros hospitalares utilizam antimicrobianos apenas em grupos de risco, inicialmente adotam o uso de antibióticos rotineiros e após testes de

susceptibilidade selecionam o medicamento mais adequado ao tratamento [9].

A exposição de *Salmonella* aos agentes antimicrobianos na medicina humana, veterinária e em ambientes aquáticos, favoreceu o aumento de isolados resistentes [10,11,12]. Vários mecanismos podem causar a resistência de micro-organismos a antimicrobianos. Dentre eles podemos citar: alterações nas porinas presentes na membrana externa do micro-organismo, transferência de genes de resistência por meio de plasmídios, mutações gênicas, dentre outros [2,13,14].

O mecanismo de resistência determinado por elementos do DNA capazes de adquirir mobilidade quando inseridos em plasmídios ou associados à transposons denominados integrons vem atraindo a atenção de pesquisadores. Estes tem a função de rearranjar genes localizados em cassetes gênicos dentro de região variável no genoma microbiano. São divididos em classe 1, classe 2, classe 3, classe 4 e classe 5, sendo as classes 1, 2 e 3 relacionados com genes de resistência [15,16]. Nos integrons de classe 1, foram identificados mais de 130 cassetes de genes de resistência, e nos de classe 2, 6 cassetes [16,17].

Considerando-se o aumento da prevalência de isolados de *Salmonella* resistentes a antibióticos, determinar o perfil e os possíveis mecanismos responsáveis por esta resistência em isolados de determinadas localidades é importante para direcionar profissionais em procedimentos terapêuticos. Diante do exposto, o objetivo da pesquisa foi identificar os sorotipos mais frequentes, determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos de *Salmonella*, relacionando à sua fonte de isolamento (alimento, água e infecção clínica) e investigar a presença de integrons classe 1 e 2 em isolados em Dourados, Mato Grosso do Sul.

Metodologia

Isolados bacterianos

O estudo incluiu 36 isolados de *Salmonella*, entre os anos de 2010 e 2011 provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados. Dentre as amostras: 17 isolados foram oriundos de alimentos (frangos de abatedouro e peixe), 9

de água (tanques de piscicultura e lagos) e 10 de infecções clínicas (pacientes do Hospital Universitário de Dourados).

Identificação de Salmonella

As amostras foram identificadas bioquimicamente e por métodos sorológicos por meio da determinação dos antígenos somáticos e flagelares, utilizando anti-soros específicos polivalentes e monovalentes [2]. Em seguida, as mesmas foram encaminhadas para Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ) onde se caracterizaram os sorotipos de *Salmonella*.

Perfil de Resistência

Duas técnicas foram utilizadas para caracterizar o perfil de resistência dos isolados, a técnica de difusão em disco e a de Concentração Inibitória Mínima (MIC). Estas foram repetidas em dois momentos distintos.

O teste da difusão em disco foi realizado de acordo com a metodologia da Clinical and Laboratory Standards Institute M11-A8 [18] testando 10 antibióticos: ampicilina (AMP:10µg); ciprofloxacina (CIP:5µg); cloranfenicol (CLO: 30µg), enrofloxacina (ENO: 10µg); estreptomicina (EST: 10µg); gentamicina (GEN: 10µg); nitrofurantoina (NIT: 30µg); norfloxacina (NOR: 10µg); tetraciclina (TET: 30µg); Sulfametoxazol/Trimetoprima (SUT: 23,75/1,25µg).

Os antibióticos nos quais os micro-organismos apresentaram resistência (ampicilina, gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprim) no teste de difusão em disco foram submetidos ao teste da Concentração Inibitória Mínima (MIC, do inglês Minimum Inhibitory Concentration). Também foram incluídas no teste duas quinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina). O MIC foi realizado com a metodologia da Clinical and Laboratory Standards Institute M11-A8 [18]. Embora a estreptomicina tenha apresentado resistência no teste de difusão em disco, não foi submetida ao MIC, por não ser recomendada pela CLSI. Todos os antibióticos utilizados no referido teste foram preparados conforme as recomendações da CLSI M100-S22 [19].

Para o controle de qualidade foi utilizado o micro-organismo *Salmonella* ATTC 1406.

Os critérios de interpretação dos resultados de perfil de resistência foram baseados na Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S23 [20]. Os micro-organismos foram classificados como: resistentes (perfil de resistência a 1 ou mais antimicrobianos) e não resistentes (sensível ou intermediário a todos os agentes testados).

Identificação da presença de integron classe 1 e classe 2

A extração de DNA foi realizada por meio de métodos orgânicos de acordo com protocolo discutido por Chagas *et al.* [21].

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) adaptada de Santos *et al.* [22] foi realizada utilizando três pares de *primers*. O CS [24] e Int1 para integron classe 1 [24] e o Int2 [24] para integron de classe 2 (Tabela 1). Foi preparada a reação com volume final de 25 μ L contendo: 12,5 μ L de PCR Master Mix (Fermentas®), 1,5 μ L (10 pM/ μ L) de cada um dos *primers* (IDT) e 10 a 50 ng de DNA genômico complexados com água ultrapura. As reações em cadeia pela polimerase foram realizadas em termociclador (Biorad®) e consistiu em desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos antes da inicialização dos 35 ciclos: 30s para desnaturação a 94°C, 30s para o anelamento dos *primers* a 55°C e 30s de extensão, a 72°C, e uma extensão final por 7min a 72°C. Todas as reações foram conduzidas utilizando-se uma amostra de controle negativo, onde o DNA foi substituído por igual volume de água ultra pura. A reprodutibilidade dos ensaios foi confirmada testando cada isolado duas vezes. As amostras (10 μ L) dos fragmentos amplificados por meio de PCR, adicionadas ao tampão de corrida (*Loading Buffer*) (Fermentas®), foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,0% a 120v por 30min, o gel foi preparado com tampão TBE e corado com brometo de etídio. O marcador de peso molecular utilizado foi de 50 pares de bases DNA *Ladder* (Promega®). As bandas de DNA dos produtos amplificados foram visualizadas em gel sob luz UV e fotografadas em fotodocumentador (UVP).

Resultados

A partir de 36 isolados, foram identificados 12 sorotipos diferentes, sendo os mais frequentes *Salmonella* Infantis (47,2%; n=17), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:6,7:e,h:-) (16,6%; n=6) e *Salmonella* Typhimurium (11,1%; n=4), que apesar de estar entre as mais prevalentes, foi identificada exclusivamente em infecções clínicas (Tabela 2). Os sorotipos mais encontrados nos isolados de alimentos foram *Salmonella* Infantis (58,8% n=10) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:6,7:e,h) (11,7%; n=2), enquanto que nas amostras de água foram *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:6,7:e,h:-) (44,4%; n=4) e *Salmonella* Infantis com (33,3% n=3). Em Infecções clínicas, *Salmonella* Infantis (40%; n=4) e *Salmonella* Typhimurium (40%; n=4) foram os sorotipos mais identificados.

A técnica de difusão em disco possibilitou identificar que dentre todos os isolados, 22,2% (n=8) foram resistentes. Os isolados que apresentaram maior resistência eram provenientes da água (44,4%; n=4), seguidos de infecções clínicas (30%; n=3) e alimentos (5,8%; n=1). Esta metodologia permitiu identificar 4 tipos padrões de resistência (Tabela 3).

O MIC identificou que 30,5% (n=11) dos isolados totais foram resistentes. Isolados de infecções clínicas (40%; n=4) foram os que apresentaram maior resistência, seguidos de água (33,3%; n=3) e alimentos (23,5%; n=4). Encontrou-se 5 padrões de resistência por meio desta técnica (Tabela 3). Para o MIC 50 (Concentração inibitória mínima para inibir o crescimento de 50% das amostras) não houve diferença entre os isolados. O MIC₉₀ (Concentração inibitória mínima para inibir o crescimento de 90% das amostras) foi maior nas fontes de isolados que apresentaram alta prevalência de resistentes, quando comparados aos que apresentaram baixas (Tabela 4). O antibiótico que apresentou maior quantidade de isolados resistentes foi o sulfametoxazol/trimetoprima com 19,4% (n=7) dos isolados apresentando este perfil, seguido da Ampicilina (13,8%; n=5).

Quando comparadas as duas técnicas, alguns isolados apresentaram padrão de resistência diferente. Quatro amostras que apresentaram resistência no MIC, não apresentaram este mesmo perfil quando comparados com a técnica de difusão em disco. A situação contrária também foi observada, ou seja, um isolado classificado como não resistente no MIC apresentou perfil de resistência na técnica de difusão em disco.

O integron de classe 1, esteve presente em 88% (n=31) dos isolados totais, em 91,6% (n=11) dos isolados resistentes e em 87,5% (n=20) dos isolados que não apresentaram resistência. A classe 2 foi encontrada em apenas 8,3% (n=3) dos isolados. O referido integron não foi detectado em nenhum dos resistentes (Tabela 3). Isolados que possuem integron classe 1 apresentaram valores de MIC₉₀ superiores aos que não possuem, exceto para ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprima. Para o MIC₅₀, não houve diferença nos valores entre os que possuem ou não integrons classe 1, exceto para gentamicina (Tabela 4).

Discussão

De acordo com o Country Databank [25], banco de dados da Organização Mundial de Saúde, que reúne os 15 sorotipos de *Salmonella* prevalentes em todas regiões do mundo, na América do Sul, os sorotipos mais frequentes são *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*, tanto em fontes humanas quanto não-humanas. No Brasil *S. Typhimurium*, *S. Infantis* e *S. Enteritidis* são os sorotipos mais encontrados em alimento, ambiente e humanos, respectivamente. *S. Typhimurium*, um dos sorotipos mais frequentes em humanos e alimentos no Brasil e na América do Sul, no presente estudo foi encontrada exclusivamente em humanos, e *S. Enteritidis*, apesar de ter alta distribuição e frequência mundial, não foi observada em nosso trabalho. Em outro estudo realizado no Mato Grosso do Sul, em aviário e água *chiller* em abatedouro foi identificado o sorotipo *S. Schwarzengrund* como o mais prevalente (37,6%), seguido de *S. Typhimurium* (17,2%), *S. Corvallis* (13,8%), *S. Enterica* (O:4,5:-:1,2) e *S. Enteritidis*, com 10,34% cada [26].

Devido à pressão seletiva exercida pelo uso extensivo de antimicrobianos, evidências na literatura sugerem que o aparecimento de espécies multirresistentes está relacionado à utilização de antimicrobianos na pecuária [27,28]. A presença de isolados resistentes em animais de produção pode ameaçar a eficácia de antimicrobianos em humanos se estas bactérias ou seus genes de resistência forem incorporados à população bacteriana humana [14, 27].

Com base nas técnicas de difusão em disco e MIC, 33,3 % apresentaram perfil de resistência. Vários estudos [9,29,30,31] também identificaram resistência a

antimicrobianos em *Salmonella*. Em países como a Coréia do Sul, antibióticos do grupo quinolona não são mais considerados eficazes no combate às salmoneloses, estudo de Lee *et al.* [9] mostrou a ineficácia do antibiótico no combate à *S. Galinarum*, agente causador da Febre Tifóide em frangos.

A prevalência de resistentes dos isolados do presente trabalho foi menor quando comparada a outros [9,31,32,33,34]. Não foi observada resistência à quinolonas, porém muitos isolados apresentaram-se como intermediários. Estudo conduzido por Kiffer *et al.* [35], relacionou o consumo de antibióticos proporcionalmente equivalente à taxa de resistência, isto é, regiões do município de São Paulo onde o consumo de antimicrobianos é maior, há uma certa elevação na prevalência de resistência. Deve adotar-se medidas cautelosas no consumo de antimicrobianos em nossa região, para não aumentar a prevalência de isolados resistentes.

Beier *et al.* [31] determinou o MIC₅₀, em isolados de *Salmonella*, oriundos de frangos, onde encontrou os seguintes resultados: ciprofloxacina (0,03 µg/ml), ampicilina (≤1 µg/ml), gentamicina (≤0,25 µg/ml), tetraciclina (≤4 µg/ml) e o MIC₉₀ para estes antimicrobianos foi de 0,03 µg/ml, 2 µg/ml, 16 µg/ml, >32, respectivamente. Houve semelhança com nosso trabalho no MIC₅₀ para ampicilina, na tetraciclina foi mais sensível, e gentamicina menos sensível.

Estudo dinamarquês revelou que, embora as pessoas com infecções por *Salmonella* suscetíveis apresentaram maior mortalidade do que a população em geral, pessoas com infecções por *isolados* resistentes tiveram mortalidade ainda maior. A taxa de mortalidade para pessoas com infecções causadas por *Salmonella* multirresistentes foi estimado ser 10 vezes maior nos dois anos seguintes a coleta da amostra do que para a população em geral [5]. A técnica da difusão em disco preconizada pela CLSI é adotada em laboratórios de análises clínicas [9], como teste para determinar a escolha do antimicrobiano que será utilizado no tratamento de pacientes, porém em nosso trabalho, houve amostras que apresentaram sensibilidade na difusão em disco, e resistência na técnica da concentração inibitória mínima (MIC).

A resistência de micro-organismos à antimicrobianos podem estar associados a alterações nas porinas presentes na membrana externa, mutações, genes carreados por plasmídios, dentre outras [2,13,16]. O mecanismo de resistência que vem atraindo a atenção de pesquisadores na última década, os integrons, já foi identificado em vários estudos com *Salmonella* e é encontrado principalmente em isolados multirresistentes,

Firoozeh *et al.* [36], isolou 43 serovares de *Salmonella*, multirresistentes, identificando a presença da integron classe 1 em 88,3% das amostras. Ahmed & Shimamoto [37] obtiveram 17 amostras de *Salmonella*, multirresistentes, destas, em 42,9% foi detectada a presença de integron classe 1 e em 14,3% o integron classe 2. O presente estudo teve alta prevalência de integrons classe 1 em amostras resistentes e não resistentes.

Segundo Ribeiro *et al.* [38], genes contidos em integrons, estão associados a multirresistência á antimicrobianos. Integrons são encontrados com maior frequência em isolados clínicos, porém estudos mostram sua presença em alimentos e ambientes naturais [39], dados que corroboram com nossos resultados. Além de genes que conferem resistência a antimicrobianos, os integrons em ambientes naturais podem expressar genes relacionados à adaptação das bactérias a diferentes pressões ambientais [40]. Vários fatores podem influenciar na expressão dos genes de resistência contidos nos integrons, um dos principais é que genes encontrados próximo ao promotor tendem a ser expressos com maior eficácia do que aqueles que estão localizados distantes deste promotor, apresentando maior efeito na resistência da bactéria ao antimicrobiano [41].

A simples detecção da presença ou ausência deste mecanismo, não foi possível associar ao perfil de resistência, para este tipo de associação, estudo dos genes presentes neste integrons talvez possa esclarecer a influencia desse mecanismo na resistência aos antimicrobianos.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelo apoio à pesquisa.

Referências Bibliográficas

1. World Health Organization (2006) Progress report (2000-2005): building capacity for laboratory-based foodborne disease surveillance and outbreak detection and response. WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/gfn/links/GSSProgressReport2005.pdf>>. Acesso em: 18/06/2013.
2. Koneman EW, Winn Jr W, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn JR, Procop G, Woods G (2008) Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido. 6th edition. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1565p.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. – 1. Ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 158 p.: il. Color, - (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde : relatório de situação : Mato Grosso do Sul / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2007. 23 p.: il. color. – (Série C. Projetos, Programas e Relatórios).
5. Oliveira SD, Flores FS, Santos LR, Brandelli, A (2005) Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. Int J Food Microbiol 97:297-305.
6. Ribeiro AR, Kellermann A, Santos LR, Bessa MC, Nascimento VP (2007) *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. Braz J Microbiol 38: 296-299.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Manual Integrado de controle e vigilância à Febre Tifóide. - 1. Ed – Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 92 p.: il. Color. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
8. World Health Organization (2005) Drug-resistant *Salmonella*. WHO. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/print.html>. Acesso em: 18/06/2013.
9. Ince OT, Yalçın SS, Yurdakök K, Özmert EN, Aydin O, Baris Z (2012) *Salmonella* gastroenteritis in children (clinical characteristics and antibiotic susceptibility): comparison of the years 1995-2001 and 2002-2008. Turk J Pediatr 54:465-473.
10. Levy SB, Marshall B (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat Med 10:122-129.
11. Bila DM, Dezzoti M (2003) Fármacos no meio ambiente. Quim Nova 26:523-530.
12. Singer RS, Hofacre CL (2006) Potential impacts of antibiotic in poultry production. Avian Dis 50:161-172.

13. Sam Martín B, Lapierrw L, Toro C, Bravo V, Cornejo J, Hormazabal JC, Borie C (2005) Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. from poultry farms. *Vet Microbiol* 110:239-244.
14. Souza RB, Magnani M, Oliveira TCRM (2010) Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. *Semina ciênc agrar* 31:413-428.
15. Fluitz AC, Schmitz FJ (2004) Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 10:272-288.
16. Cambray G, Guerout AM, Mazel D (2010) Integrons. *Annu Rev Genet* 44:141-165.
17. Mazel, D (2006) Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Ver Microbiol* 4:608-620.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M11-A9. Suppl 32:1-56.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S22. Suppl 32:1-186.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S23. Suppl 33:1-206.
21. Chagas FF, Amaral BC; Grisolia AB, Oliveira KPM (2013) Identification and detection of *Salmonella* strains isolated from chicken carcasses and environmental sources in Dourados, MS, Brazil. *Afr J Microbiol Res* 7:3222-3228.
22. Santos LR, Nascimento VP, Oliveira SD, Flôres ML, Pontes AP, Pilotto F, Neves N, Salle CTP, Lopes RFF (2001) Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). *Acta Sci Vet* 29:87-92.
23. Bissonnette L, Roy PH (1992) American Society for Microbiology Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* Plasmid pVS1, an Ancestor of Integrons of Multiresistance Plasmids and Transposons of Gram-Negative Bacteria. *J Bacteriol* 174:1248-1257.
24. Koeleman JGM, Stoof J, Madelon W, Bijl VD, Christina MJE, Vandenbroucke-Grauls, Savelkoul PHM (2001) Identification of Epidemic Strains of *Acinetobacter baumannii* by Integrase Gene PCR. *J Clin Microbiol* 39:8-13.
25. Country Databank (2012) Top 15 lists from a Country. WHO. Disponível em: <http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY_DATA_SET_REP.show>. Acesso em: 18/06/2013.
26. Boni HFK, Carrijo AS, Fascina VB (2011) Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. *Rev Bras Saúde Prod An* 12:84-95.
27. Smith DL, Harris AD, Johnson JA, Silbergeld EK, Morris Jr JG (2002) Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6434-6439.

28. Butaye P, Michael GB, Schwarz S, Barrett TJ, Brisabois A, White DG (2006) The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. *Microbes and Infection* 8:1891-1897.
29. Rodrigues DP (2001) Reporte de la Vigilancia de la resistencia antimicrobiana de aislados de *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio cholerae*. Fundação Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em: <<http://www.paho.org/spanish/hcp/hct/arm-resultados-bra.pdf>>. Acesso em: 18/06/2013.
30. Lee YJ, Kim KS, Kim JH, Tak RB (2004) *Salmonella gallinarum* gyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance. *Avian Pathol* 33:251-257.
31. Beier RC, Anderson PN, Hume ME, Poole TL, Duke SE, Crippen TL, Sheffield CL, Caldwell DJ, Byrd JA, Anderson RC, Nisbet DJ (2011) Characterization of *Salmonella enterica* isolates from turkeys in commercial processing plants for resistance to antibiotics, disinfectants, and a growth promoter. *Foodborne Pathog Dis* 8:593-600.
32. Ribeiro AR, Kellermann A, Santos LR, Fittél AP, Nascimento VP (2006) Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. *Arq Inst Bio* 73:357-360.
33. Palmeira ALB, Nascimento VP (2008) Prevalência e perfil de resistência aos Antimicrobianos de *Salmonella* sp isolados de carcaças de frango e peru na Região Sul do Brasil no período de 2004 a 2006. *Acta Sci Vet* 36:84-85.
34. Sibhat B, Molla Zewde B, Zerihun A, Muckle A, Cole L, Boerlin P, Wilkie E, Perets A, Mistry K, Gebreyes WA (2011) *Salmonella* serovars and antimicrobial resistance profiles in beef cattle, slaughterhouse personnel and slaughterhouse environment in ethiopia. *Zoonoses Public Health* 58:102-109.
35. Kiffer CR, Camargo EC, Shimakura SE, Ribeiro PJ Jr, Bailey TC, Pignatari AC, Monteiro AM (2011) A spatial approach for the epidemiology of antibiotic use and resistance in community-based studies: the emergence of urban clusters of *Escherichia coli* quinolone resistance in Sao Paulo, Brasil. *Int J Health Geogr* 28:10-17.
36. Firoozeh F, Shahcherachi F, Zahraei Salehi T, Karimim V, Aslani MM (2011) Antimicrobial resistance profile and presence of class I integrons among *Salmonella enterica* serovars isolated from human clinical specimens in Tehran, Iran. *Iran J Microbiol* 3:112-117.
37. Ahmed AM, Shimamoto, T (2012) Genetic analysis of multiple antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from diseased broilers in Egypt. *Microbiol Immunol* 56:254-261.
38. Ribeiro VB, Lincopan N, Landgraf M, Franco BDGM, Destro MT (2010) Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates from foodstuff and related sources. *Braz J Microbiol* 42:685-692.
39. Rosewarne CP, Pettigrove V, Stokes HW, Parsons YM (2010) Class 1 integrons in benthic bacterial communities: abundance, association with Tn402-like transposition modules and evidence for co-selection with heavy-metal resistance. *FEMS Microbiol Ecol* 72:35-46.

40. Koenig JE, Boucher Y, Charlebois RL, Nesbo C, Zhaxybayeva O, Bapteste E, Spencer M, Joss MJ, Stokes HW, Doolittle WF (2008) Integron-associated gene cassettes in Halifax Harbour: assessment of a mobile gene pool in marine sediments. *Environ Microbiol* 10:1024-1038.
41. Weldhagen GF (2004) Integrons and β -lactamases - a novel perspective on resistance. *Int J Antimicrob Agents* 23:556-562.

Tabela 1. Classe de Integron e *primer* utilizado para identificá-la.

| Classe de integron | Designação | Região alvo | Seqüência nucleotídica (5' - 3') | Tamanho em pares de bases | Referência |
|--------------------|------------|--------------|----------------------------------|---------------------------|------------------------|
| Classe 1 | 5CS | int5'-CS | F – GGCATCCAAGCAAG | Variável | Bissonete & Roy, 1992. |
| | 3CS | int3'-CS | R – AAGCAGACTTGACCTGA | | |
| Classe 1 | INT1F | <i>Int11</i> | F – CAGTGGACATAAGCCTGTTC | 210 a 230 pb | Koeleman et al., 2001. |
| | INT1R | <i>Int11</i> | R - CCCGACGCATAGACTGTA | | |
| Classe 2 | INT2F | <i>Int2</i> | F – TTGCGAGTATCCATAACCTG | 400pb | Koeleman et al., 2001. |
| | INT2R | | R - TTACCTGCACTGGATTAAGC | | |

Tabela 2. Sorotipos de *Salmonella* em isolados de amostras de alimentos, água e infecções clínicas no município de Dourados

| Sorotipo | Alimento n (%) | Água n (%) | I.C n (%) | Total n (%) |
|----------------------------------|---------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|
| <i>S. Infantis</i> | 10 (58) | 3 (33,3) | 4 (40) | 17 (47,2) |
| <i>S. enterica</i> (O:6,7:e,h:-) | 2 (11,7) | 4 (44,4) | 0 | 6 (16,6) |
| <i>S. Typhimurium</i> | 0 | 0 | 4 (40) | 4 (11,1) |
| <i>S. Agona</i> | 1 (5,8) | 0 | 0 | 1 (2,7) |
| <i>S. Paratyphi B</i> | 1 (5,8) | 0 | 0 | 1 (2,7) |
| <i>S. enterica</i> (O:4,5:e,h:-) | 1 (5,8) | 0 | 0 | 1 (2,7) |
| <i>S. enterica</i> (O:6,7:r:-) | 1 (5,8) | 0 | 0 | 1 (2,7) |
| <i>S. Saintpaul</i> | 1 (5,8) | 0 | 0 | 1 (2,7) |
| <i>S. enterica</i> (O:6,7) | 0 | 1 (11,1) | 0 | 1 (2,7) |
| <i>S. Ealing</i> | 0 | 1 (11,1) | 0 | 1 (2,7) |
| <i>S. sorotipo Heidelberg</i> | 0 | 0 | 1 (10) | 1 (2,7) |
| <i>S. enterica</i> (O:4,5:I,v:-) | 0 | 0 | 1 (10) | 1 (2,7) |

I.C = Infecções Clínicas

Tabela 3. Padrão de resistência nos isolados de *Salmonella* de acordo com a técnica utilizada (Difusão em disco e MIC), e presença de integrons classe 1 e classe 2

| Fonte | Amostra | Espécie | Padrão Difusão em Disco | Padrão MIC | CS' | IF1 | IF2 |
|----------|---------|----------------------------------|-------------------------|-----------------|-----------|-----|-----|
| Alimento | F1 | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | Não resistente | + | + | - |
| | F2 | <i>S. Agona</i> | Não resistente | Não resistente | - | + | - |
| | F3 | <i>S. Paratyphi B</i> | Não resistente | Não resistente | - | - | - |
| | F4 | <i>S. enterica</i> (O:6,7:e,h:-) | Não resistente | Não resistente | - | + | + |
| | F5 | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | Não resistente | + | + | - |
| | F6 | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | Não resistente | + | + | - |
| | F7 | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | Não resistente | + | + | + |
| | F8 | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | Não resistente | + | + | - |
| | F9 | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | Não resistente | + | + | - |
| | F10 | <i>S. enterica</i> (O:6,7:e,h:-) | Não resistente | Não resistente | - | + | - |
| | F11 | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | SUT | + | + | - |
| | F13 | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | GEN | - | + | - |
| | F14 | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | SUT | - | + | - |
| | F15 | <i>S. enterica</i> (O:4,5:e,h:-) | Não resistente | Não resistente | + | + | + |
| | F16 | <i>S. enterica</i> (O:6,7:r:-) | Não resistente | Não resistente | - | + | - |
| | F17 | <i>S. Saintpaul</i> | Não resistente | Não resistente | + | - | - |
| | Água | P1 | <i>S. Infantis</i> | EST - AMP - SUT | AMP - SUT | - | + |
| A1 | | <i>S. enterica</i> (O:6,7:e,h:-) | Não resistente | Não resistente | - | + | - |
| A2 | | <i>S. enterica</i> (O:6,7:e,h:-) | SUT | SUT | + | + | - |
| A3 | | <i>S. enterica</i> (O:6,7:e,h:-) | Não resistente | Não resistente | - | + | - |
| A4 | | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | Não resistente | - | + | - |
| A5 | | <i>S. enterica</i> (O:6,7) | SUT | SUT | - | + | - |
| A6 | | <i>S. Infantis</i> | SUT | SUT | - | + | - |
| A7 | | <i>S. enterica</i> (O:6,7:e,h:-) | TET | Não resistente | - | + | - |
| A8 | | <i>S. Ealing</i> | Não resistente | Não resistente | - | + | - |
| A12 | | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | Não resistente | - | - | - |
| I.C | H1 | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | Não resistente | - | - | - |
| | H2 | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | Não resistente | - | + | - |
| | H3 | <i>S. Typhimurium</i> | EST - AMP - SUT | AMP - SUT | - | + | - |
| | H4 | <i>S. Typhimurium</i> | AMP - GEN - TET | AMP - GEN - TET | + | + | - |
| | H5 | <i>S. Heidelberg</i> | Não resistente | AMP | + | + | - |
| | H6 | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | Não resistente | - | + | - |
| | H7 | <i>S. Typhimurium</i> | AMP - GEN - TET | AMP - GEN - TET | + | + | - |
| | H8 | <i>S. Typhimurium</i> | Não resistente | Não resistente | - | - | - |
| | H9 | <i>S. Infantis</i> | Não resistente | Não resistente | + | + | - |
| | H10 | <i>S. enterica</i> (O:4,5:1,v:-) | Não resistente | Não resistente | - | + | - |

AMP: Ampicilina; EST: Estreptomicina; GEN: Gentamicina; SUT: Sulfametoxazol/Trimetoprim; TET: Tetraciclina. + = Presença do gene; - = Ausência do gene. IC: Infecção Clínica.

Tabela 4. MIC₅₀, MIC₉₀ e prevalência de resistência para todos os isolados

de *Salmonella*, para isolados de acordo com sua fonte de isolamento (alimento, água, infecções clínicas) e de acordo com a presença/ausência de integrons classe 1.

| Antibiótico | MIC ₅₀ (µg/mL) para todos isolados MIC ₅₀ (µg/mL) para alimentos/água/IC | MIC ₉₀ (µg/mL) para todos isolados MIC ₉₀ (µg/mL) para alimentos/água/IC | MIC ₅₀ (µg/mL) para todos isolados MIC ₅₀ (µg/mL) para isolados com Int1/sem Int1 | MIC ₉₀ (µg/mL) para todos isolados MIC ₉₀ (µg/mL) para isolados com Int1/sem Int1 |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AMP | 1 1 / 1 / 1 | ≥512 1 / 4 / ≥512 | 1 1 / 1 | ≥512 ≥512 / ≥512 |
| CIP | ≤0,03 ≤0,03 / 0,06 / ≤0,03 | 0,125 0,125 / 0,125 / ≤0,03 | ≤0,03 ≤0,03 / ≤0,03 | 0,125 0,125 / ≤0,03 |
| GEN | 4 8 / 4 / 8 | 8 8 / 8 / ≥256 | 4 8 / 4 | 8 16 / 8 |
| NOR | ≤0,5 ≤0,5 / 1 / ≤0,5 | 1 1 / 1 / ≤0,5 | ≤0,5 ≤0,5 / ≤0,5 | 1 1 / ≤0,5 |
| SUT | 0,25-4,75 0,25-4,75 / 0,5-0,95 / 0,5-9,5 | 4-76 8-152 / 16-304 / 4-76 | 0,25-4,75 0,25-4,75 / 0,25-4,75 | 4-76 8-152 / 16-304 |
| TET | 0,5 0,5 / 0,5 / 0,5 | 4 1 / 4 / 128 | 0,5 0,5 / 0,5 | 4 4 / 1 |

MIC₅₀ = Concentração (mg/µl) mínima para inibir o crescimento de 50% dos isolados; MIC₉₀ = Concentração (mg/µl) mínima para inibir o crescimento de 90% dos isolados

IC: Infecções clínicas; AMP: Ampicilina; EST: Estreptomicina; GEN: Gentamicina; SUT: Sulfametoxazol/Trimetoprim; TET: Tetraciclina.

Int1: Integron classe 1.

