

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ELABORAÇÃO DE *MULTIPLEX-PCR* PARA PESQUISA DE GENES ASSOCIADOS
À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ENTEROBACTÉRIAS**

Saulo Marques Pasko

Porto Alegre

2012/2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ELABORAÇÃO DE *MULTIPLEX-PCR* PARA PESQUISA DE GENES ASSOCIADOS
À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ENTEROBACTÉRIAS**

Autor: Saulo Marques Pasko

**Monografia apresentada à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para
obtenção da Graduação em Medicina
Veterinária**

Orientador: Carlos Tadeu Pippi Salle

Coorientador: Thiago Moreira Tejkowski

Porto Alegre

2012/2

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio incondicional durante esses anos de curso. A orientação e o amor deles me guiaram neste caminho, mantiveram-me focado nos meus objetivos, sempre regido pelos valores da nossa união familiar.

Agradeço especialmente a minha mãe, pessoa fundamental na minha formação e na minha vida, por nunca deixar que algo me faltasse. Seu esforço e determinação neste período foram admiráveis e me tornaram cada dia mais honrado em ser seu filho.

A Liége Fiegenbaum, minha companheira, por ter estado ao meu lado durante a graduação. Seu apoio e carinho me ajudaram a passar por esta etapa e a torná-la mais agradável e feliz.

Sou grato ao meu coorientador, o Mestre Thiago Moreira Tejkowski, por todo comprometimento e disposição em me guiar na elaboração deste trabalho. Sem a sua sabedoria, seu empenho e seu bom humor, o caminho percorrido seria muito mais difícil.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle, meu eterno obrigado por todos os ensinamentos acadêmicos, profissionais e pessoais. Sua participação na minha trajetória ficará para sempre na memória. Considerado um brilhante professor e um ícone da avicultura brasileira, não poupa esforços para que seus alunos recebam a melhor formação possível e o reconhecimento que merecem.

Aos colegas do laboratório de Medicina Veterinária Preventiva - UFRGS, pela disposição e ajuda na execução de parte deste trabalho. Especialmente a Doutoranda Caroline Pissetti, o graduando Daniel dos Santos Paim e a Prof. Dra. Marisa Cardoso.

Por fim, agradeço imensamente aos meus amigos, colegas e professores do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA/UFRGS. Em especial ao Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes e ao Técnico Laboratorial Silvio Luís da Silveira Rocha, que permitiram que a minha passagem por esse laboratório fosse enriquecedora e completa.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	ARTIGO CIENTÍFICO: Elaboração de <i>Multiplex-PCR</i> para Pesquisa de Genes Associados à Resistência Antimicrobiana em Enterobactérias..	12
2.1	Apêndice A - Sequências de oligonucleotídeos dos <i>primers</i> , tamanho dos produtos de PCR e as suas respectivas referências.....	24
2.2	Apêndice B – Protocolos de PCR definidos: composição e concentração da mistura de reagentes, número de ciclos da amplificação, condições do termociclador e concentração do gel de agarose utilizada para cada reação.....	25
2.3	Apêndice C - Bactérias utilizadas como controle positivo e seus respectivos genes de resistência antimicrobiana encontrados.....	26
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA - 1	Protocolos de <i>Multiplex-PCR</i> estabelecidos e os genes pesquisados.....	17
FIGURA - 1	Produtos de amplificação do <i>Multiplex-1</i>	17
FIGURA - 2	Produtos de amplificação do <i>Multiplex-2</i>	18
FIGURA - 3	Produtos de amplificação do <i>Multiplex-3</i>	18
FIGURA - 4	Produtos de amplificação do <i>Multiplex-4</i>	19

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

CDPA – Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária

CG - Citosinas e Guaninas

dNTP - *Deoxyribonucleotide Triphosphates*

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

m-PCR – *Multiplex-Polymerase Chain Reaction*

m-RNA – *Messenger-Ribonucleic Acid*

PABA - Ácido 4-aminobenzóico

PBP - *Penicillin Binding Protein*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

rt-PCR – *Real Time-Polymerase Chain Reaction*

RT-PCR - *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

t-RNA – *Transfer-Ribonucleic Acid*

UBABEF – União Brasileira de Avicultura

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

USDA - *United States Department of Agriculture*

RESUMO

A avicultura é um dos principais segmentos do setor agropecuário no Brasil. O país é o maior exportador e o terceiro maior produtor de carne de frango. As enterobactérias são comumente isoladas em infecções na indústria avícola e geram prejuízos direta e indiretamente. Para o controle dessas bactérias, antimicrobianos são frequentemente utilizados como terapêuticos e como promotores de crescimento. Esses fármacos são administrados durante várias fases do ciclo de produção e podem acarretar problemas à saúde pública, como toxicidade, alergia e desenvolvimento de bactérias resistentes. Os mecanismos de resistência podem ser disseminados horizontalmente, através da transferência de genes entre as bactérias. A resistência antimicrobiana emergente em enterobactérias é um problema significativo que vem mobilizando a comunidade científica em todo o mundo. As pesquisas de genes associados a essa resistência têm aumentado a compreensão dos fatores envolvidos e auxiliado na formulação de estratégias para o uso prudente dos agentes antimicrobianos. Para detecção de múltiplos genes simultaneamente, a técnica de *multiplex-PCR* mostra-se uma ferramenta rápida e eficiente, tanto para o diagnóstico clínico como em pesquisas científicas. O objetivo deste trabalho foi elaborar quatro protocolos de *multiplex-PCR* para detectar 11 genes associados à resistência antimicrobiana em enterobactérias. O presente estudo foi conduzido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), na Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre. Dez amostras de *Salmonella* spp. foram utilizadas como controles positivos. Dois pares de *primers*, foram usados para amplificação dos genes que codificam β -lactamases (*bla*_{TEM} e *bla*_{PSE-1}) simultaneamente. A presença dos genes codificadores da bomba de efluxo das tetraciclina (*tetA*, *tetB*, e *tetG*); da enzima estreptomicina fosfotransferase (*strA* e *strB*); da proteína transportadora não-enzimática de cloranfenicol (*cmlA*) da proteína exportadora de florfenicol (*floR*); da dihidropteroato sintetase tipo I (*suII*); e da dihidropteroato sintetase tipo II (*suIII*) foi determinada a partir do agrupamento de protocolos de PCR previamente estabelecidos em trabalhos publicados. Ajustes foram feitos nos componentes da reação e a temperatura de anelamento foi otimizada para cada grupo de *primer*, permitindo assim o êxito na amplificação dos segmentos esperados. O presente projeto está inserido em uma importante linha de pesquisa do grupo que avalia a resistência antimicrobiana de enterobactérias a partir da associação de diferentes parâmetros (perfil genético, testes bioquímicos, antibiogramas e inteligência artificial).

Palavras-chave: Avicultura; Bactérias; Saúde Pública.

ABSTRACT

The poultry industry is one of leading segment of the agricultural sector in Brazil. The country is the largest exporter and third largest producer of chicken meat. Enterobacteria are commonly isolated from infections in the poultry production and generate direct and indirect losses. To control these bacteria, antibiotics are often used as therapeutic and as growth promoters. These drugs are administered during various phases of the production cycle and may lead to health problems such as toxicity, allergy and development of resistant bacteria. Resistance mechanisms can be spread horizontally through gene transfer among bacteria. Antimicrobial resistance emerging in enterobacteria is a significant problem that has been mobilizing the scientific community around the world. The researches associated with these resistance genes have increased the understanding of the factors involved and assisted in the formulation of strategies for the prudent use of antimicrobial agents. For detection of multiple genes simultaneously, the technique of *multiplex-PCR* is shown a fast and efficient tool for both clinical diagnosis and scientific research. The aim of this study was to develop four protocols of multiplex-PCR for 11 genes associated with antimicrobial resistance in enterobacteria. This study was conducted at the Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), na faculdade de Veterinária, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre. Ten samples of *Salmonella* spp. were used as positive controls. Two pairs of primers were used for amplification of the genes encoding β -lactamases (*bla*TEM and *bla*PSE-1) simultaneously. The presence of genes encoding the tetracycline efflux pump (*tetA*, *tetB* and *tetG*); enzyme streptomycin phosphotransferase (*strA* and *strB*); transporter protein nonenzymatic chloramphenicol (*cmlA*) protein exporter of florfenicol (*floR*); the dihydropteroate synthetase type I (*suI*) and dihydropteroate synthase type II (*suII*) was determined from the grouping of PCR protocols previously established in published works. Adjustments were made in the components of the reaction and the annealing temperature was optimized for each group of primer, allowing the successful amplification of segments expected. This project is part of a research line from the group that evaluates antibiotic resistance of enterobacteria from the association of different parameters (genetic profile, biochemical tests, antibiograms and artificial intelligence).

Keywords: Poultry; Bacteria; Public Health.

1 INTRODUÇÃO

A produção de carne de frango chegou a 13,058 milhões de toneladas em 2011, em um crescimento de 6,8% em relação a 2010. Com este desempenho o Brasil se aproxima da China, hoje o segundo maior produtor mundial, cuja produção de 2011 teria somado 13,2 milhões de toneladas, abaixo apenas dos Estados Unidos, com 16,757 milhões de toneladas, conforme projeções do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA). Do volume total de frangos produzido pelo país, 69,8% foi destinado ao consumo interno, e 30,2% para exportações. Com isso, o consumo per capita de carne de frango atingiu 47,4 quilos por pessoa, um novo recorde para o setor (UBABEF, 2012).

Bactérias patogênicas da família *Enterobacteriaceae* são frequentemente isoladas em infecções na indústria avícola, dentre as quais podemos ressaltar a *Salmonella* spp. e a *Escherichia coli* (SEGABINAZI, 2004). As enterobactérias são micro-organismos Gram negativos, aeróbicos, em forma de bastonetes, apresentando pleomorfismo. Todas são positivas à prova de catalase e negativas à oxidase. São móveis por flagelos peritríquios, porém algumas são imóveis, com ou sem cápsula e fermentadoras de açúcar. As bactérias da família *Enterobacteriaceae* estão distribuídas mundialmente. Elas são encontradas no solo, na água, frutas, vegetais, grãos, flores, árvores e em animais. (HOLT et al., 1994). A sua maioria habita os intestinos do homem e animais, seja como membros da microbiota normal ou como agentes infecciosos (TRABULSI & CAMPOS, 2002).

Antimicrobianos são antibióticos e quimioterápicos que, utilizados com fins terapêuticos, têm a finalidade de combater exclusivamente a doença com a máxima eficácia e o mínimo de riscos para as células do hospedeiro (SANTOS et al., 1998). O custo-benefício do uso de antibióticos e quimioterápicos no controle de doenças das aves se baseia na maximização do efeito terapêutico e na minimização da toxicidade relacionada à droga e ao desenvolvimento de resistência ao antimicrobiano (SANTANA et al., 2011).

Segundo Bellaver et al (2000), os mecanismos de ação dos antimicrobianos são complexos e atuam de diferentes maneiras. Os agentes antimicrobianos que inibem a síntese da parede celular correspondem aos mais seletivos, apresentando um elevado índice terapêutico, como por exemplo, as penicilinas. Esses antibióticos contêm em sua estrutura um anel beta-lactâmico, que interage com proteínas denominadas PBPs (*Penicillin Binding Protein*), inibindo a enzima envolvida na transpeptidação, responsável pela ligação entre as

cadeias de tetrapeptídeos do peptideoglicano. Com isso há o impedimento da formação das ligações entre os tetrapeptídeos de cadeias adjacentes, ocasionando uma perda na rigidez da parede celular. Acredita-se também que tais drogas podem atuar promovendo a ativação de enzimas autolíticas, resultando na degradação da parede.

Os antimicrobianos que inibem a tradução são geralmente bastante seletivos. Correspondem a um dos principais grupos de agentes antimicrobianos, uma vez que a síntese proteica corresponde a um processo altamente complexo, envolvendo várias etapas e diversas moléculas e estruturas. Fármacos como as estreptomicinas e gentamicinas ligam-se à subunidade ribossomal 30S, bloqueando-a e promovendo erros na leitura do m-RNA. As tetraciclina ligam-se à subunidade ribossomal 30S (sítio A), impedindo a ligação do aminoacil-t-RNA. Os cloranfenicóis ligam-se à subunidade ribossomal 50S e inibem a ligação do t-RNA à peptidil transferase, inibindo a elongação (BELLAVÉ et al., 2000).

Outros antimicrobianos têm ação de antagonismo metabólico e agem através da inibição competitiva. Esse é o caso das sulfas e derivados, os quais inibem a síntese do ácido fólico pela competição com o ácido 4-aminobenzóico (PABA) (BELLAVÉ et al., 2000).

Os antimicrobianos são usados em várias fases do ciclo de produção das principais espécies animais. Entretanto, podem acarretar problemas potenciais à saúde do homem, como toxicidade, alergia e desenvolvimento de resistência antimicrobiana (McMULLIN, 2004) e isso tem trazido preocupações à saúde pública. Logo após sua descoberta, os antimicrobianos utilizados em medicina veterinária para o tratamento de doenças bacterianas foram incorporados em alimentos para animais como promotores de crescimento. Assim, desde a década de 1950, os antimicrobianos têm se tornado parte integrante da alimentação animal, em grandes quantidades, gerando preocupações sobre as resistências das bactérias, transmitidas dos animais para os seres humanos. Por esta razão, esforços mundiais têm sido promovidos para conseguir o uso consciente de antibióticos na alimentação animal. Alguns dos critérios que constituem uma utilização prudente de agentes antimicrobianos entre diferentes sistemas de produção ainda são instáveis. Em particular, a quantidade sub terapêutica usada rotineiramente na alimentação de animais para a promoção do crescimento tem sido tema de discussão (AARESTRUP et al., 2010).

A resistência antimicrobiana pode resultar de mutação de genes envolvidos em processos fisiológicos normais e em estruturas celulares, da aquisição de genes de

resistência externos, ou da combinação desses mecanismos. As mutações ocorrem continuamente, mas em uma frequência baixa nas bactérias, levando a uma ocasional e aleatória emergência de mutantes. Entretanto, sob condições de estresse, as populações bacterianas podem aumentar sua frequência de mutações (BLAZQUEZ, 2003; CHOPRA et al., 2004). Esse estado mutagênico pode estar envolvido no rápido desenvolvimento de resistência *in vivo* durante o tratamento com antimicrobianos (KOMP-LINDFRE et al., 2003). Entretanto, a resistência da maioria dos micro-organismos isolados, ocorreu como resultado da aquisição de genes de resistência extracromossomais (GIGUÈRE et al., 2006).

A caracterização fenotípica da resistência aos antimicrobianos é de suma importância para o direcionamento de tratamentos e na definição do grau de sensibilidade de agentes infecciosos. Entretanto, uma pesquisa pode ser complementada por informações epidemiológicas e biomoleculares para incrementar a compreensão dos fatores envolvidos. Dessa maneira, a pesquisa de perfis genotípicos tem auxiliado no controle da disseminação de resistência e nas estratégias de formulação para novos fármacos.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das técnicas mais empregadas nas diversas áreas do diagnóstico molecular. A sua introdução resultou em grande revolução tecnológica, permitindo a amplificação de uma sequência de interesse contida em uma amostra complexa de DNA e possibilitou a adoção de métodos automatizados para a análise do genoma. A tecnologia da reação em cadeia da polimerase também é bastante flexível, permitindo uma série de modificações que possibilitam o seu emprego na análise de uma grande variedade de amostras. Entre as principais técnicas resultantes de modificações da reação em cadeia da polimerase, podemos citar a *Reverse Transcriptase* PCR (RT-PCR), *nested* PCR, *multiplex* PCR (m-PCR) e a PCR em tempo real (rt-PCR) (MOLINA et al., 2004).

A técnica de *Multiplex-PCR* é uma variante da PCR convencional no qual dois ou mais *loci* são amplificados simultaneamente na mesma reação, mostrando-se um ensaio rápido e eficiente, tanto clínico como no laboratório de pesquisa. Descrito pela primeira vez por Chamberlain et al. (1988), esse método vem sendo aplicado em inúmeras áreas da biologia molecular, por vários autores. Pode ser utilizado para detectar múltiplos patógenos ou múltiplos fatores genéticos associados a um mesmo patógeno (PERRY et al., 2007). A Redução do tempo de processamento, amplificação de vários genes de uma só vez, redução de custos e uma menor quantidade de amostra são as vantagens desse ensaio, entretanto,

para o estabelecimento de *multiplex-PCR*, deve-se levar em consideração alguns aspectos que são fundamentais para sua otimização, como: equilíbrio entre as concentrações de $MgCl_2$ (cloreto de magnésio) doador estável de íons Mg^{2+} , imprescindíveis para ação enzimática e os desoxinucleotídeos (dNTPs), que sintetizam as fitas filhas, pois são adicionados pela polimerase à fita-mãe, concentração e tamanho dos *primers*, porcentagem de CG (citosinas e guaninas) entre 35 e 60%, números de ciclos da reação e temperatura de anelamento dos *primers* (HENEGARIU et al. 1997).

A avicultura brasileira tem sido responsável por um superávit na balança comercial brasileira. É com o intuito de fortalecer ainda mais esse setor da economia que o Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) vem desenvolvendo tecnologias inovadoras. As pesquisas desse centro incluem desde a criação de sistemas e modelos aplicáveis na área de sanidade, manejo, nutrição e gestão da cadeia avícola. Focando sempre no produtor e no bem da avicultura, o CDPA une informações complexas provenientes de análises sorológicas, histopatológicas e moleculares, e as traduz em respostas de perguntas do cotidiano, através da utilização de Inteligência Artificial, mais precisamente Redes Neurais Artificiais.

Tendo em vista o exposto acima, esse trabalho tem o objetivo de elaborar protocolos de *multiplex-PCR* para detectar 11 genes de resistência antimicrobiana em enterobactérias.

A próxima seção deste trabalho será apresentada na forma de um artigo científico. O mesmo será submetido à publicação em revista científica, intitulado “**Elaboração de *Multiplex-PCR* para Pesquisa de Genes Associados à Resistência Antimicrobiana em Enterobactérias**”.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Elaboração de *Multiplex-PCR* para Pesquisa de Genes Associados à Resistência Antimicrobiana em Enterobactérias

Establishment of Multiplex-PCR Protocols for Research on Associated Antimicrobial Resistance Genes in Enterobacteria

SAULO MARQUES PASKO¹; THIAGO MOREIRA TEJKOWSKI¹; DANIEL DOS SANTOS PAIM²; CAROLINE PISSETTI²; SILVIO LUIS DA SILVEIRA ROCHA¹; CARLOS TADEU PIPPI SALLE¹

¹Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

²Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

CORRESPONDÊNCIA: S. M. PASKO [saulopasko@hotmail.com – Fone: + 55 (51) 91888774]. Av. Bento Gonçalves nº 9090, CEP: 91540-000. Porto Alegre, RS, Brasil.

ABSTRACT

Background: The use of antimicrobial agents in animals has important implications for the public and veterinary health, since it may lead to the development of resistant bacteria. Enterobacteria are the cause of serious infections and many of the most important members of this family are becoming increasingly resistant to currently available antibiotics. Therefore, detection of genetic resistance is important to understand and control those cases. The antimicrobial mechanisms of action are complex and act in different structures of bacteria. Moreover, the bacteria can withstand the lethal effect of these drugs by metabolic and structural changes, probably mediated by resistance genes. Antibiotic resistance may result from modifications of the structure target, from the cytoplasmic membrane impermeability, from efflux proteins, or enzymatic inactivation of the antibiotic. The emerging antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* is a significant problem that requires immediate attention. The objective of this work is to develop protocols for multiplex-PCR to detect genes associated with antimicrobial resistance in enterobacteria.

Materials, Methods & Results: This study was conducted at the Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA). Ten samples of *Salmonella* spp. were used as positive controls. Two pairs of primers were used for amplification of the genes encoding β -lactamases (*bla*TEM and *bla*PSE-1) simultaneously. The presence of genes encoding the tetracycline efflux pump (*tetA*, *tetB* and *tetG*); enzyme streptomycin phosphotransferase (*strA* and *strB*); transporter protein nonenzymatic chloramphenicol (*cmlA*); protein exporter of florfenicol (*floR*); the dihydropteroate synthetase type I (*sulI*) and dihydropteroate synthase type II (*sulII*) was determined from the grouping of PCR protocols previously established in published works. Some adjustments were made in the components of the reaction and the annealing temperature was optimized for each set of primers. The amplification reactions were performed in a thermocycler and electrophoresis of the amplified products developed agarose gel. With the results in accordance with the bibliography, without the hybridization between primers, without the presence of spurious bands and with appropriate sharpness of the bands expected groups were defined.

Discussion: The selection of genes comprising each of the multiplex protocols, the adjustment of the mix's components, and the temperature conditions, allowed successful amplification of genes associated with antibiotic resistance. Such protocols should result in significant savings in terms of labor and costs in the analysis of a large number of samples in comparison with individual responses for each of the genes.

Keywords: Enterobacteriaceae; Public Health; Antibiotic.

Descritores: Enterobacteriaceae; Saúde Pública; Antibiótico.

INTRODUÇÃO

As enterobactérias pertencem a um grupo filogenético homogêneo e são caracterizadas por serem Gram-negativas, bacilos não formadores de esporos, aeróbias facultativas, oxidase negativa, imóveis ou móveis por flagelação peritríquia. (MADIGAN et al., 2004). A família *Enterobacteriaceae* é causa significativa de sérias infecções e muitos dos mais importantes membros dessa família estão se tornando cada vez mais resistentes aos antibióticos atualmente disponíveis. Isso é uma tendência preocupante e requer vigilância e medidas intensas para controlar uma difusão de resistência acentuada por esses patógenos Gram-negativos (PATERSON, 2006).

O uso de agentes antimicrobianos em animais têm importantes consequências para saúde pública e veterinária, uma vez que pode levar ao desenvolvimento de bactérias, patogênicas ou comensais, resistentes. Alguns micro-organismos encontrados em animais, por sua vez, apresentam perfil de resistência aos antimicrobianos e genótipo semelhantes aos isolados humanos, reforçando a hipótese de que os animais de produção podem ser fontes e reservatórios de bactérias multirresistentes (AIDARA-KANE, 2012).

Os programas de pesquisa em resistência antimicrobiana geralmente visam definir os fenótipos, os quais podem surgir de diferentes fatores genéticos e cada determinante pode apresentar características epidemiológicas específicas. Por isso, a detecção da resistência em níveis genéticos é importante para entender e controlar esses casos (SRINIVASAN et al., 2007).

Os mecanismos de ação dos antimicrobianos são complexos e atuam em diferentes estruturas das bactérias. Inibição da síntese da parede celular, inibição do processo de tradução e antagonismo metabólico são alguns exemplos de formas de atuação desses antibióticos (BELLAVÉ et al., 2000). Por outro lado, as bactérias podem resistir ao efeito letal desses fármacos através de alterações metabólicas e estruturais, provavelmente mediado por genes de resistência. A resistência aos antibióticos pode resultar de modificações da estrutura alvo, impermeabilidade da membrana citoplasmática, existência de proteínas de efluxo, ou ainda da inativação enzimática do antimicrobiano (NIKAIDO, 2009).

A resistência aos agentes antimicrobianos pode surgir de mutações no genoma bacteriano ou da aquisição de genes que codificam essa resistência. A resistência se espalha verticalmente via disseminação clonal ou horizontalmente entre diferentes isolados, espécies, gêneros, e até mesmo entre diferentes reinos (MAZODIER & DAVIES, 1991; NELSON et al., 1999) A disseminação de genes de resistência antimicrobiana por transferência horizontal tem levado a uma rápida emergência de resistência entre isolados clínicos de bactérias. A propagação de genes de resistência é muito maior quando eles fazem parte de um cassete móvel, uma vez que isso proporciona a transferência horizontal por muitos mecanismos (PLOY et al., 2000).

Muitos estudos e relatos têm apontado à ocorrência de cepas de *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. resistentes em animais, ambientes de produção e amostras de produtos de origem animal. Uma compreensão fundamental da

composição da resistência antimicrobiana em bactérias na microbiota intestinal é importante para determinar o impacto do desenvolvimento de resistência aos antibióticos e outros agentes usados na produção de alimentos (BOEHME et al., 2004).

A resistência antimicrobiana emergente em enterobactérias é um problema significativo que requer atenção imediata (PATERSON, 2006). O objetivo deste trabalho é elaborar protocolos de *multiplex-PCR* para detectar genes associados à resistência antimicrobiana em Enterobactérias.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de Estudo

O presente estudo foi conduzido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), na Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre.

Banco de Amostras

Dez amostras de *Salmonella* spp. foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS para serem utilizadas como controles positivos. Essas bactérias estão conservadas em criocultivo com 20% de glicerol e armazenadas a -80°C.

Reativação das Amostras Bacterianas e Extração do DNA

Uma alíquota de cada amostra foi reativada diretamente, semeada por esgotamento em placa de Petri contendo o meio Agar Triptona de Soja (TSA, Oxoid) e, posteriormente, incubada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas em estufa bacteriológica. Uma colônia de cada amostra foi selecionada para aumentar o número de células viáveis em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Oxoid) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Em seguida, um mL da amostra foi centrifugado por 5 minutos (10.000 RPM) e o sobrenadante foi descartado. A extração do DNA sucedeu-se com a utilização do kit NucleoSpin®Tissue (Macherey-Nagel) e

permaneceu armazenado a -20°C até o momento da análise.

Multiplex-PCR

Dois pares de *primers*, descritos por Carlson et al. (1999), foram usados para amplificação dos genes que codificam β -lactamases (*bla*_{TEM} e *bla*_{PSE-1}) simultaneamente. A presença dos genes codificadores da bomba de efluxo das tetraciclinas (*tetA*, *tetB*, e *tetG*); da enzima estreptomicina fosfotransferase (*strA* e *strB*); da proteína transportadora não-enzimática de cloranfenicol (*cmlA*) da proteína exportadora de florfenicol (*floR*); da dihidropteroato sintetase tipo I (*suII*); e da dihidropteroato sintetase tipo II (*suIII*) foi determinada a partir do agrupamento de protocolos de PCR previamente estabelecidos em trabalhos publicados (GUILLAUME et al., 2000; KEYES et al., 2000; GEBREYES & ALTIER, 2002; LANZ et al., 2003). Alguns ajustes foram feitos nos componentes da reação e a temperatura de anelamento foi otimizada para cada grupo de *primers*. As sequências de oligonucleotídeos dos *primers*, o tamanho dos produtos de PCR e as suas respectivas referências estão listadas no Apêndice A.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Swift MaxPro Thermal Cycler - ESCO Technologies®) e a eletroforese dos produtos amplificados desenvolvida em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. A visualização do produto amplificado foi realizada em transluminador de luz ultravioleta (Pharmacia LKB MacroVue).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, a detecção de todos os genes de resistência foi realizada de forma individual. Após a confirmação da correta amplificação, iniciaram-se os testes com mais de um primer em cada reação. Com os resultados em concordância com a bibliografia consultada, sem a hibridização entre *primers*, sem a presença de bandas espúrias e com a devida nitidez das bandas esperadas, os grupos foram definidos. Desse modo, foram elaborados quatro protocolos de *multiplex-PCR* conforme a Tabela 1. Cada grupo de genes utilizou *primers* com temperaturas de anelamento similares para minimizar as amplificações inespecíficas e otimizar a reação. A concentração dos reagentes em cada mistura de reação,

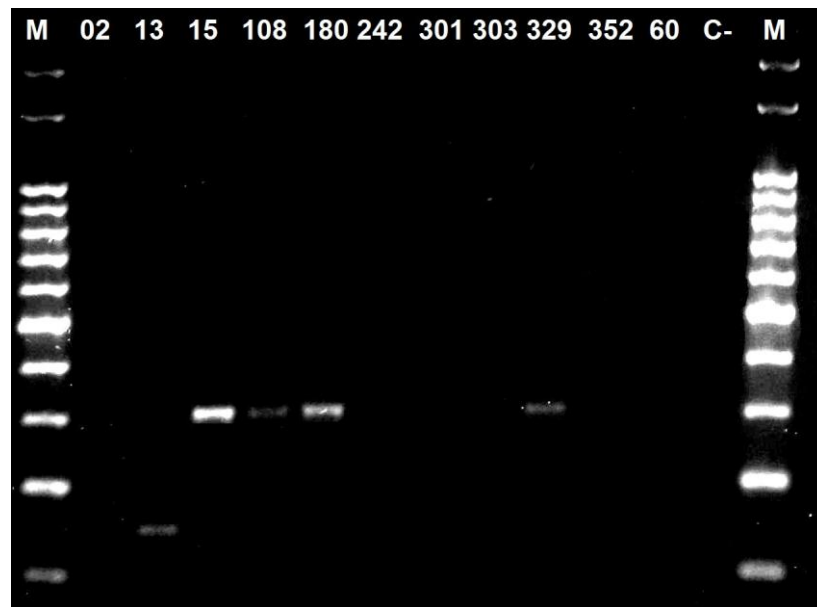
o número de ciclos da amplificação, as condições do termociclador constam no Apêndice B.

Tabela 1 – Protocolos de *Multiplex-PCR* estabelecidos e os genes pesquisados.

Multiplex	Genes
Multiplex 1	<i>blaPSE-1</i> e <i>blaTEM</i>
Multiplex 2	<i>tetA</i> , <i>tetB</i> e <i>tetG</i>
Multiplex 3	<i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>strA</i> e <i>strB</i>
Multiplex 4	<i>sulI</i> , <i>sulII</i>

As bactérias utilizadas como controle positivo e seus respectivos genes de resistência antimicrobiana encontrados estão demonstrados no Apêndice C. Como controle negativo, todos os grupos de *primers* foram testados com água ultrapura e nenhum produto de PCR foi observado nesses controles. O conjunto dos quatro ensaios de *multiplex-PCR* conseguiu amplificar os 11 genes associados à resistência antimicrobiana (Figura 1, 2, 3 e 4).

Figura 1 – Produtos de amplificação do *Multiplex-1*.



Legenda: **M**: Marcador de peso molecular (100 pb). **2, 13, 15, 108, 180, 242, 301, 303, 329, 352**: Amostras Controles. **60**: Amostra de *Salmonella* sp. isolada de um caso clínico no CDPA. **C-**: Controle Negativo. Amplificações: ***blaTEM*** (291 pb), ***blaPSE-1*** (132 pb).

Figura 2 – Produtos de amplificação do *Multiplex-2*.



Legenda: **M**: Marcador de peso molecular (100 pb). **60**: Amostra de *Salmonella* sp. isolada de um caso clínico no CDPA. **2, 13, 15, 108, 180, 242, 301, 303, 329, 352**: Amostras Controles. **C-**: Controle Negativo. Amplificações: *tetB* (228 pb), *tetA* (372 pb), *tetG* (844 pb).

Figura 3 – Produtos de amplificação do *Multiplex-3*.



Legenda: **M**: Marcador de peso molecular (100 pb). **2, 13, 15, 108, 180, 242, 301, 303, 329, 352**: Amostras Controles. **60**: Amostra de *Salmonella* sp. isolada de um caso clínico no CDPA. **C-**: Controle Negativo. Amplificações: *floR* (399 pb), *cmlA* (698 pb), *strA* (548 pb) e *strB* (509 pb).

Figura 4 – Produtos de amplificação do *Multiplex-4*.



Legenda: **M**: Marcador de peso molecular (100 pb). **2, 13, 15, 108, 180, 242, 301, 303, 329, 352**: Amostras Controle Positivo. **60**: Amostra de *Salmonella* sp. isolada de um caso clínico no CDPA. **C-**: Controle Negativo. Amplificações: *suII* (779 pb), *suIII* (721 pb).

Após esta análise inicial, foram escolhidas as amostras 13 e 15 para serem utilizadas como controle positivo no *Multiplex-1*, as amostras 13 e 108 para serem utilizadas como controle positivo nos *Multiplex-2* e *Multiplex-4* e, por fim, as amostras 13 e 329 para o *Multiplex-3*.

Diversos trabalhos em todo o mundo têm pesquisado genes de resistência antimicrobiana em bactérias e, grande parte deles, utilizando amostras da família *Enterobacteriaceae*. *Salmonella enterica* é distribuída mundialmente entre homens e animais e é uma preocupação crescente na saúde pública como causadora de doenças transmitidas por alimentos (COLLAZO & GALAN, 1996; WOLF van der et al., 1999). Rojas et al. (2011) pesquisaram a resistência antibiótica de genótipos de cepas de *Salmonella* spp. de suínos abatidos em matadouros no estado do México, dentre os *primers* utilizados o *blaPSE-1* e o *blaTEM* foram idênticos aos usados no presente trabalho. Os resultados obtidos por Rojas et al. mostraram que na relação fenótipo-genótipo as cepas fenotipicamente sensíveis que tinham resistência genotípica provavelmente nunca tiveram exposição à droga, mas é importante assinalar que essas cepas têm o gene de resistência e que elas, possivelmente, podem expressá-lo fenotipicamente quando expostas aos antimicrobianos específicos. Anteriormente, Yang et al. (2002), haviam pesquisado

resistência antimicrobiana em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* isoladas de animais na Coreia, utilizando esses mesmos *primers*. Esses autores concluíram que a caracterização fenotípica, genotípica e uma expansão do número de genes são essenciais para entender a resistência bem como para fazer a relação epidemiológica dos isolados de *Salmonella*. A monitoria dos padrões de resistência, principalmente do surgimento de bactérias multirresistentes em animais de produção, continua sendo de extrema importância devido à transmissão desses patógenos para humanos que consomem produtos derivados desses animais.

A disseminação de genes de resistência antimicrobiana entre cepas bacterianas é um crescente problema em doenças infecciosas. Muitos genes de resistência estão alocados em plasmídeos e/ou *transposons*, permitindo sua transferência entre uma variedade de espécies de bactérias. Recentemente, outro mecanismo de disseminação de genes de resistência foi descoberto. Esse mecanismo envolve um elemento de DNA que medeia à integração dos genes nos locais específicos através de mecanismos de recombinação. Esse elemento, chamado de *integron*, que também é encontrado como parte de um *transposon* dentro da família Tn21 ou encontrado independentemente em muitos grupos de plasmídeos (MAYNARD et al., 2003).

Dessa maneira, os genes de resistência estão associados com DNA móvel como em plasmídeo, *transposons* e *integrans*, os quais facilitam a distribuição desses genes (JACOBY, 1994; TENOVER & RASHEED, 1998). Os *integrans* são caracterizados por sua integração de muitos cassetes de genes diferentes inseridos na região variável, local específico de inserção que representa outro mecanismo dirigindo a evolução de plasmídeos e *transposons* de bactérias Gram negativas (MAYNARD et al., 2003). Mais de 40 cassetes foram identificados nos *integrans* (RECCHIA & HALL, 1997).

De acordo com Gebreyes & Altier (2002), um aumento da incidência de *S. Typhimurium* multirresistente ocorreu mundialmente devido ao extensivo uso de agentes antimicrobianos em medicina humana e veterinária. Em seu trabalho, Gebreyes & Altier, pesquisaram 14 genes de resistência antimicrobiana sendo três (*strA*, *strB* e *tetG*) amplificados por *primers* idênticos aos utilizados no presente trabalho. Os autores descreveram os padrões de resistência e caracterizaram as cepas de *S. Typhimurium* isoladas de suínos. Encontraram inclusive, todos os genes de resistência inseridos em plasmídeos conjugativos que podiam ser eficientemente transferidos para *Escherichia coli*.

É reconhecido que os genes de resistência entre os sorovares de *Salmonella* spp. podem ser carreados nesses plasmídeos, entretanto, eles isolaram plasmídeos de diferentes tamanhos, números e com diferentes genes de resistência em amostras coletadas no mesmo momento e no mesmo lugar, fortalecendo a evidência da heterogeneidade epidemiológica relacionada com *S. Typhimurium*. A presença de um *integron* nesse plasmídeo é uma preocupação particular. *Integrans* são capazes de receber um ou mais cassetes de genes de resistência e fornecer um promotor para a sua eficiente expressão (STOKES & HALL, 1989), levando a uma rápida evolução de multirresistência. Cepas de *Salmonella* spp. podem carregar esses plasmídeos e por isso adquirir novos fatores de resistência e podem facilmente transferir esses genes dentro e entre espécies por meio de conjugação.

No trabalho de Christine Maynard (2003), que pesquisou genes de resistência antimicrobiana em *E. coli* isoladas de suínos, dentre as 112 amostras analisadas, apenas uma foi positiva para o gene *floR*. Outros estudos relataram a presença de *floR* em cepas de *E. coli* isoladas de aves e gado (CLOECKAERT et al. 2000; KEYES et al., 2000; WHITE et al., 2000). Essa autora, a fim de determinar se existiam possíveis associações entre os genes encontrados, fez uso do teste qui-quadrado de Pearson, e assim, a associação dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} e do *tetA* e *tetC* foi confirmada. O gene *bla*_{TEM} estava associado com os genes *aph*(3)-Ia, *aac*(3)-IV, *dhfr*V, e *cat*I e também, mas em menor proporção, com o gene *sul*III. O gene *aac*(3)-IV mostrou uma associação positiva com o *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} e também com o *aph*(3)-Ia, *dhfr*V e *dhfr*XII. O *aph*(3)-IIa estava positivamente associado com o *tetA* e *tetC* mas estava negativamente associado com o gene *tetB*. Em contraste, o *sul*I estava positivamente associado com o *tetB* mas negativamente com o *tetA* e *tetC*.

Alguns trabalhos com a detecção de genes de resistência encontraram resultados interessantes. Por exemplo, apesar do banimento no uso de cloranfenicol em animais de produção no Canadá desde 1980 (GILMORE, 1986), um aumento da taxa de resistência ao cloranfenicol entre isolados de *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC) foi observado nesse país (MAYNARD et al., 2003). Outros pesquisadores também observaram a persistência desse aumento de resistência em suínos (BISCHOFF et al., 2002; LANZ et al., 2003; TESHAGER et al., 2000) e em outras espécies animais (WERCKENTHIN et al., 2002).

Seguindo nesta linha de pesquisa, o florfenicol é um antibiótico aprovado para uso veterinário em bovinos nos Estados Unidos desde 1991. Embora essa droga não seja

utilizada na avicultura, Keyes et al. (1999) detectaram resistência ao florfenicol em isolados clínicos de *E. coli* aviária. A tipificação molecular demonstrou que o gene de resistência ao florfenicol (*floR*) foi adquirida independentemente e está inserida em plasmídeo. O mesmo estudo demonstrou a persistência de resistência ao cloranfenicol em *E. coli* aviária, embora essa droga não tenha sido usada em animais de produção desde ter sido banida em 1988 nos Estados Unidos.

Atualmente há um maior controle no uso de antimicrobianos e conseqüentemente no desenvolvimento de resistência antimicrobiana em bactérias comensais e patogênicas que podem ser transferidas para o homem através do contato com animais ou produtos de origem animal (SRINIVASAN et al., 2007). Relatórios (DANMAP, 2001; LEHTOLAINEN et al, 2003; LANZ et al., 2003) têm discutido efeitos do uso de antimicrobianos em níveis subterapêuticos como melhoradores de desempenho. Em contraste, pouca atenção foi dada no impacto da terapêutica e do uso profilático de antibióticos na seleção para resistência em *Escherichia coli*. Considerando que esses patógenos de animais podem também ser transmitidos para humanos através de produtos lácteos ou do ambiente, parece prudente explorar não somente os padrões de resistência em antibióticos usados em medicina veterinária, mas também em antimicrobianos usados na medicina humana (Srinivasan et al. 2007). Srinivasan et al. (2007) analisaram os padrões de resistência em *E. coli* isolada de vacas de leite através da amplificação de genes que codificam resistência a tetraciclina, cloranfenicol, florfenicol, estreptomicina e sulfonamidas. Um subgrupo (10%) dos produtos de PCR foi sequenciado e o resultado comparado com o banco de dados do NCBI. Essas seqüências mostraram uma homologia de 96 a 100%. Todas as amostras pesquisadas por Srinivasan et al (2007) carregavam um ou mais genes de resistência em diferentes combinações. Os genes de resistência *tetB*, *tetD*, *tetE*, *tetG* e *cmlA* não foram detectados em nenhuma amostra de *E. coli* avaliada. Em conclusão, muitas amostras de *E. coli* nesse estudo mostraram resistência a múltiplos antibióticos, mas não necessariamente carregavam algum gene que conferia resistência a este antimicrobiano em particular. Por exemplo, a resistência ao sulfisoxazole foi observada em 44 *E. coli* mas os genes responsáveis pela resistência a este antibiótico não foi identificado na maioria desses isolados. Isso sugere a existência de mecanismos de resistência alternativos (SRINIVASAN et al., 2007). Por isso, a presença dos genes de resistência sozinhos não necessariamente implica bactéria resistente, já que esses genes podem não ser expressos (CHEN et al. 2005). Essas bactérias

podem ser reservatórios de genes de resistência antimicrobiana e podem ter papel importante na disseminação desses genes para outras bactérias patogênicas e comensais. Com exceção dos *primers* para os genes *bla*TEM, *bla*PSE-1 e *ampC*, os demais utilizados por Srinivasan et al. possuem a mesma sequência de oligonucleotídeos que os utilizados na presente pesquisa.

Outros protocolos foram bem sucedidos. Ng et al (2001) desenvolveram um ensaio de *multiplex-PCR* para amplificação de 14 genes codificadores de tetraciclinas comumente encontrados em micro-organismos Gram positivos e Gram negativos. Esses protocolos se mostraram úteis para diferenciar os mecanismos de resistência às tetraciclinas. Resistência às cefalosporinas de terceira geração é frequentemente mediada pelas beta-lactamases tipo TEM e SHV na família *Enterobacteriaceae*. As enzimas tipo TEM e OXA-1 são as maiores beta-lactamases transmitidas por plasmídeo que implica resistência para amoxicilina e ácido clavulânico em isolados de *E. coli*. Colom et al. (2003) desenvolveram um protocolo de *multiplex-PCR* simples e confiável para detecção desses genes. Em conclusão, esse estudo mostrou que a técnica de *multiplex-PCR* é uma ferramenta útil para detecção de beta-lactamases inseridas em plasmídeos, conhecidas por conferir resistência a amoxicilina e clavulanato e reduzir a suscetibilidade ou resistência à cefotaxime em enterobactérias (ROJAS et al., 2011).

CONCLUSÃO

A seleção dos genes que compõem cada um dos protocolos *multiplex*, o ajuste das condições da mistura de reagentes e a adequação das temperaturas permitiram êxito na amplificação dos genes associados com resistência antimicrobiana. Esses protocolos deverão resultar em uma economia significativa em termos de trabalho e custos na análise de um grande número de amostras em comparação com reações individuais para cada um dos genes.

Apêndice A - Sequências de oligonucleotídeos dos *primers*, tamanho dos produtos de PCR (*amplicon*) e as suas respectivas referências.

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	<i>Amplicon</i> (pb)	Referências
<i>bla</i> TEM	GCACGAGTGGGTTACATCGA (Forward)	291	Carlson et al. (1999)
	GGTCTCCGATCGTTGTCAG (Reverse)		
<i>bla</i> PSE-1	TTTGGTTCCGCGCTATCTG (Forward)	132	Carlson et al. (1999)
	TACTCCGAGCACCAAATCCG (Reverse)		
<i>tet</i> A	GGCCTCAATTCCTGACG (Forward)	372	Guillaume et al. (2000)
	AAGCAGGATGTAGCCTGTGC (Reverse)		
<i>tet</i> B	GAGACGCAATCGAATTCGG (Forward)	228	Guillaume et al. (2000)
	TTTAGTGGCTATTCTTCCTGCC (Reverse)		
<i>tet</i> G	CAGCTTTCGGATTCTTACGG (Forward)	844	Gebreyes and Altier (2002)
	GATTGGTGAGGCTCGTTAGC (Reverse)		
<i>flo</i> R	TATCTCCCTGTCGTTCCAG (Forward)	399	Keyes et al. (2000)
	AGAACTCGCCGATCAATG (Reverse)		
<i>cml</i> A	CCGCCACGGTGTGTTGTTATC (Forward)	698	Gebreyes and Altier (2002)
	CACCTTGCCTGCCATCATTAG (Reverse)		
<i>str</i> A	TATCTCCCTGTCGTTCCAG (Forward)	548	Gebreyes and Altier (2002)
	AGAACTCGCCGATCAATG (Reverse)		
<i>str</i> B	ATCGTCAAGGGATTGAAACC (Forward)	509	Gebreyes and Altier (2002)
	GGATCGTAGAACATATTGGC (Reverse)		
<i>su</i> I	GTGACGGTGTTCGGCATTCT (Forward)	779	Lanz et al. (2003)
	TCCGAGAAGGTGATTGCGCT (Reverse)		
<i>su</i> II	CGGCATCGTCAACATAACCT (Forward)	698	Lanz et al. (2003)
	TGTGCGGATGAAGTCAGCTC (Reverse)		

Apêndice B – Protocolos de PCR definidos: composição e concentração da mistura de reagentes, número de ciclos da amplificação, condições do termociclador e concentração do gel de agarose utilizada para cada reação.

Gene	Composição do <i>mix</i> de reagentes	Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Gel (%)
<i>blaPSE-1</i>	2,5µL Tampão 10x, 1µL dNTP (10mM), 4µL primer (50pmol), 1U TaqPolimerase, 2,5µL MgCl ₂ (25mM), 3µL DNA	40	95°C – 60seg	48°C – 30seg	72°C – 30seg	1,2
<i>blaTEM</i>	2,5µL Tampão 10x, 1µL dNTP (10mM), 4µL primer (50pmol), 1U TaqPolimerase, 2,5µL MgCl ₂ (25mM), 3µL DNA	40	95°C – 60seg	48°C – 30seg	72°C – 30seg	1,2
<i>tetA</i>	5µL Tampão 10x, 2µL dNTP (10mM), 6µL primer (25pmol), 5U TaqPolimerase, 2µL MgCl ₂ (15mM), 5µL DNA	30	94°C – 45seg	55°C – 45seg	72°C – 45seg	1,2
<i>tetB</i>	5µL Tampão 10x, 2µL dNTP (10mM), 6µL primer (25pmol), 5U TaqPolimerase, 2µL MgCl ₂ (15mM), 5µL DNA	30	94°C – 45seg	55°C – 45seg	72°C – 45seg	1,2
<i>tetG</i>	5µL Tampão 10x, 2µL dNTP (10mM), 6µL primer (25pmol), 5U TaqPolimerase, 2µL MgCl ₂ (15mM), 5µL DNA	30	94°C – 45seg	55°C – 45seg	72°C – 45seg	1,2
<i>floR</i>	5µL Tampão 10x, 2µL dNTP (10mM), 8µL primer (25pmol), 5U TaqPolimerase, 2µL MgCl ₂ (15mM), 5µL DNA	30	94°C – 45seg	53°C – 45seg	72°C – 45seg	1,2
<i>cmlA</i>	5µL Tampão 10x, 2µL dNTP (10mM), 8µL primer (25pmol), 5U TaqPolimerase, 2µL MgCl ₂ (15mM), 5µL DNA	30	94°C – 45seg	53°C – 45seg	72°C – 45seg	1,2
<i>strA</i>	5µL Tampão 10x, 2µL dNTP (10mM), 8µL primer (25pmol), 5U TaqPolimerase, 2µL MgCl ₂ (15mM), 5µL DNA	30	94°C – 45seg	53°C – 45seg	72°C – 45seg	1,2
<i>strB</i>	5µL Tampão 10x, 2µL dNTP (10mM), 8µL primer (25pmol), 5U TaqPolimerase, 2µL MgCl ₂ (15mM), 5µL DNA	30	94°C – 45seg	53°C – 45seg	72°C – 45seg	1,2

Apêndice C - Bactérias utilizadas como controle positivo e seus respectivos genes de resistência antimicrobiana encontrados.

Amostras Bacterianas	Genes de Resistência Antimicrobiana											
	<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> PSE-1	<i>tetA</i>	<i>tefB</i>	<i>tetG</i>	<i>floR</i>	<i>cmlA</i>	<i>strA</i>	<i>strB</i>	<i>sulI</i>	<i>sulII</i>	
<i>Salmonella</i> Typhimurium var. Copenhagen 2 (Frech et al. 2003)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium var. Copenhagen 13 (Frech et al. 2003)	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium var. Copenhagen 15 (Frech et al. 2003)	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Salmonella</i> Bredeney 108 (Michael et al., 2008)	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Salmonella</i> Bredeney 180 (Michael et al., 2008)	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Salmonella</i> Agona 242 (Michael et al. 2005)	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Salmonella</i> Senftenberg 301 (Michael et al., 2010)	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium 303 (Castagna et al. 2004)	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium 329 (Silva et al. 2006)	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>Salmonella</i> Senftenberg 352 (Michael et al., 2010)	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERÊNCIAS

- AIDARA-KANE, A. Containment of antimicrobial resistance due to use of antimicrobial agents in animals intended for food: WHO perspective. **Scientific and Technical Review**, v. 31, n. 1, p. 277-287. 2012.
- BELLAVER, C. O uso de microingredientes (aditivos) na formulação de dietas para suínos e suas implicações na produção e na segurança alimentar. In: **CONGRESSO MERCOSUR DE PRODUCCIÓN PORCINA**, Buenos Aires, 2000. p. 93-108.
- BISCHOFF, K. M. et al., Characterization of chloramphenicol resistance in beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neonatal swine. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p. 389–394. 2002.
- BOEHME, S. et al., Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48, p. 522 – 531. 2004.
- CARLSON, S. A. et al., Detection of multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 using multiplex and fluorogenic PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, p. 213-222. 1999.
- CHEN, S. et al., A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 195–201. 2005.
- CLOECKAERT, A. et al., Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the *floR* gene in *Escherichia coli* isolated from cattle. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2858–2860. 2000.
- COLLAZO, C. M.; GALAN, J. E. Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella* Typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 64 p. 3524-3531. 1996.
- COLOM, K. et al., Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*OXA-1 genes in *Enterobacteriaceae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, p. 147-151. 2003.
- DANMAP, 2001. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and human in Denmark. **The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme**, Copenhagen, Denmark.
- EPE, B.; WOOLEY, P; HORNING, H. Competition between tetracycline and tRNA at both P and A sites of the ribosome of *Escherichia coli*. **FEBS Journal**, v. 213, p. 443-447. 1987.
- FRECH, G.; KEHRENBERG, C.; SCHWARZ, S. Resistance phenotypes and genotypes of multiresistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium var. Copenhagen isolates from animal sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 180–182. 2003.

GEBREYES, A. W.; ALTIER, C. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium Isolates from Swine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2813-2822. 2002.

GEBREYES, W.A.; ALTIER, C., Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium isolates from swine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2813– 2822. 2002.

GILMORE, A. Chloramphenicol and the politics of health. **Canadian Medical Association Journal**, p. 134:435. 1986.

GUILLAUME, G., et al., PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludge from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, p. 77–85. 2000.

JACOBY, G. A. Extrachromosomal resistance in Gram-negative organisms: the evolution of beta-lactamase. **Trends in Microbiology**. v. 2 p. 357–360. 1994.

KEYES, K. et al., Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 421–424. 2000.

KLEIN, N.C.; CUNHA, B. A. Tetracyclines. **Medical Clinics of North America**. V. 79, p. 789-01. 1995.

LANZ, R.; KUHNERT, P.; BOERLIN, P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 91 p. 73–84. 2003.

LEHTOLAINEN, T. et al., In vitro antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from clinical bovine mastitis in Finland and Israel. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3927–3932. 2003.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brooks**, Ed. 10. São Paulo, 2004. 608 p.

MAYNARD, C. et al., Antimicrobial Resistance Genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 Isolates Obtained over a 23-Year Period from Pigs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47 n. 10 p. 3214-3221. 2003

MAZODIER, P.; DAVIES, J., Gene transfer between distantly related bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 25, p. 147–171, 1991.

MICHAEL, G. B. et al., Detection of resistance gene and class 1 integrons among multi-resistant strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Derby and Senftenberg from a swine production line in Southern Brazil. In: **International Symposium Salmonella Salmonellosis**, 2010, Saint Malo. Proceedings, 2010.

- MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Class 1 integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from pig carcasses in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 776–779. 2005.
- MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of multiresistant porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Bredeney isolates from Southern Brazil: identification of resistance genes, integrons and a group II intron. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 120–129. 2008.
- NELSON, K. E. et al., Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. **Nature**, v. 399, p. 323–329, 1999.
- NG, L.-K. et al., Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, p. 209–215. 2001.
- NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78 p. 8-28. 2009.
- PATERSON D. L., Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **American Journal of Infection Control**, v. 34, p. S20-8. 2006
- PLOY, M. C. et al., Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2684-2688. 2000.
- RECCHIA, G. D.; HALL, R. M. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. **Trends in Microbiology**, v. 5, p. 389–394. 1997.
- ROJAS, T. M. et al., Resistencia antibiótica de genotipos de cepas de *Salmonella* spp. de cerdos sacrificados en rastros del Estado de México. **Veterinaria México**, v. 42, p. 269-276. 2011.
- SCHAPPINGER, D.; HILLEN, W. Tetracycles: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. **Archives of Microbiology**, v. 165, p. 359-369. 1996.
- SILVA, L. E. et al., Infecção por *Salmonella enterica* em suínos criados em um sistema integrado de produção do sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 455-461. 2006.
- SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 387-399. 1992.
- SRINIVASAN, V. et al., Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 319–328. 2007.
- SRINIVASAN, V. et al., Prevalence of Antimicrobial Resistance Genes in *Listeria monocytogenes* Isolated from Dairy Farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, n. 3, p. 201-211. 2005.

STOKES, H. W.; HALL, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. **Molecular Microbiology**, v. 3, p. 1669–1683. 1989.

TENOVER, F. C.; RASHEED, J. K. Genetic methods for detecting antimicrobial and antiviral resistance genes, p. 1578–1592. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), **Manual of Clinical Microbiology**, 7th ed., Washington, D.C. 1998.

TESHAGER, T. et al., Surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from pigs at Spanish slaughterhouses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 15, p. 137–142. 2000.

WERCKENTHIN, C. et al., *Escherichia coli* isolates from young calves in Bavaria: in vitro susceptibilities to 14 anti-microbial agents. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 49, p. 61–65. 2002.

WHITE, D. G. et al., Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4593–4598. 2000.

WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F. Emergence and transfer of antibacterial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 151–155. 2001.

WOLF van der, et al. *Salmonella* infections in finishing pigs in the Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. **Veterinary Microbiology**, v. 67, p. 263-275. 1999.

YANG, S. J et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. **Veterinary Microbiology**, v. 86, p. 295-301. 2002.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho faz parte da linha de pesquisa do CDPA que utiliza programas computacionais para inter-relacionar perfis genéticos com a suscetibilidade ou resistência de bactérias aos antimicrobianos. Futuramente, estes protocolos servirão como base para pesquisa de genes de resistência em enterobactérias de interesse na avicultura e na saúde pública. Apesar de o sucesso na elaboração desses ensaios de *multiplex-PCR*, a quantidade de genes a serem pesquisados deverá ser ampliada. A sucessão desta pesquisa será a adição do gene *tetE*, por sua compatibilidade molecular, no *multiplex-2*, dependendo apenas da prévia obtenção de um controle positivo. Além disso, as características dos *multiplex-2* e 3 parecem ser compatíveis para uni-los em um único ensaio. O quinto *multiplex* poderá ser composto pelos genes *aadA*, *tetC* e *tetD*, considerando que bastam apenas alguns ajustes para eliminar o excesso de bandas inespecíficas, problema esse identificado durante a sua tentativa de elaboração. Para complementar a pesquisa, pretendemos confrontar os dados genotípicos com os fenotípicos (antibiograma), caracterizar as amostras, correlacionar os genes de virulência e os perfis bacteriológicos com estes resultados. Por fim, os protocolos de *multiplex* serão utilizados em amostras de *E. coli*, *Salmonella* spp., entre outros.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M. et al., Changes in the use of antimicrobials and the effects on productivity of swine farms in Denmark. **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 7. 2010.
- AIDARA-KANE, A. Containment of antimicrobial resistance due to use of antimicrobial agents in animals intended for food: WHO perspective. **Scientific and Technical Review**, v. 31, n. 1, p. 277-287. 2012.
- ALBUQUERQUE, R. Antimicrobianos como promotores de crescimento. **Farmacologia Aplicada à Avicultura**, Ed. Roca, 2005.
- BELLAVER, C. O uso de microingredientes (aditivos) na formulação de dietas para suínos e suas implicações na produção e na segurança alimentar. In: **CONGRESSO MERCOSUR DE PRODUCCIÓN PORCINA**, Buenos Aires, 2000. p. 93-108.
- BISCHOFF, K. M. et al., Characterization of chloramphenicol resistance in beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neonatal swine. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p. 389–394. 2002.
- BLAZQUEZ, J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 1201. 2003.
- BOEHME, S. et al., Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48, p. 522 – 531. 2004.
- CARLSON, S. A. et al., Detection of multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 using multiplex and fluorogenic PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, p. 213-222. 1999.
- CHAMBERLAIN, J.S. et al., Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 11141-11156. 1988.
- CHEN, S. et al., A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 195–201. 2005.
- CHOPRA I, et al., The Role of mutators in the Emergence of Antibiotic-resistant Bacteria. **Drug Resist Updates**, v. 6, p. 137. 2003.
- CLOECKAERT, A. et al., Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the *floR* gene in *Escherichia coli* isolated from cattle. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2858–2860. 2000.
- COLLAZO, C. M.; GALAN, J. E. Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella* Typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 64 p. 3524-3531. 1996.

COLOM, K. et al., Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*OXA-1 genes in *Enterobacteriaceae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, p. 147-151. 2003.

DANMAP. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and human in Denmark. **The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme**, Copenhagen, Denmark. 2001.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v. 30, p. 299-316. 1999.

EPE, B.; WOOLEY, P; HORNING, H. Competition between tetracycline and tRNA at both P and A sites of the ribosome of *Escherichia coli*. **FEBS Journal**, v. 213, p. 443-447. 1987.

FRECH, G.; KEHRENBERG, C.; SCHWARZ, S. Resistance phenotypes and genotypes of multiresistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium var. Copenhagen isolates from animal sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 180–182. 2003.

GEBREYES, A. W.; ALTIER, C. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium Isolates from Swine. **Journal of Clinical Microbiolog**, v. 40, n. 8, p. 2813-2822. 2002.

GEBREYES, W.A.; ALTIER, C., Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium isolates from swine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2813– 2822. 2002.

GIGUÈRE, S. et al., Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 4 ed. Editora Wiley-Blackwell. 2006. p. 626.

GILMORE, A. Chloramphenicol and the politics of health. **Canadian Medical Association Journal**, p. 134:435. 1986.

GUILLAUME, G., et al., PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludge from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, p. 77–85. 2000.

HARRY, E. G.; HEMSLEY, L. A. The Relationship Between Environmental Contamination with Septicaemia Strains of *Escherichia coli* and Their Incidence in Chickens. **The Veterinary Record**, p. 241–245. 1965.

HOLT, J.G. et al., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 787. 1994.

JACOBY, G. A. Extrachromosomal resistance in Gram-negative organisms: the evolution of beta-lactamase. **Trends in Microbiology**. v. 2 p. 357–360. 1994.

- KEYES, K. et al., Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 421–424. 2000.
- KEYES, K. et al., Detection of Florfenicol Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Sick Chickens. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 421–424. 2000.
- KEYES, K., et al., Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 421–424. 2000.
- KLEIN, N.C.; CUNHA, B. A. Tetracyclines. **Medical Clinics of North America**. V. 79, p. 789-01. 1995.
- KOMP LINDGREN P, et al. Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 47, p. 3222. 2003.
- LANZ, R.; KUHNERT, P.; BOERLIN, P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 91 p. 73–84. 2003.
- LEHTOLAINEN, T. et al., In vitro antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from clinical bovine mastitis in Finland and Israel. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3927–3932. 2003.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brooks**, Ed. 10. São Paulo, 2004. 608 p.
- MAYNARD, C. et al., Antimicrobial Resistance Genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 Isolates Obtained over a 23-Year Period from Pigs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47 n. 10 p. 3214-3221. 2003
- MAZODIER, P.; DAVIES, J., Gene transfer between distantly related bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 25, p. 147–171, 1991.
- MICHAEL, G. B. et al., Detection of resistance gene and class 1 integrons among multi-resistant strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovas Typhimurium, Derby and Senftenberg from a swine production line in Southern Brazil. In: **International Symposium Salmonella Salmonellosis**, 2010, Saint Malo. Proceedings, 2010.
- MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Class 1 integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from pig carcasses in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 776–779. 2005.
- MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of multiresistant porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Bredeney isolates from Southern Brazil: identification of resistance genes, integrons and a group II intron. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 120–129. 2008.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Série - Biologia molecular Atualização Parte 2 - Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. Editora Einstein. 2004; p. 142.

MULLIN, P. M. Produção Avícola sem Antibióticos: Riscos Potenciais de Contaminação Cruzada e detecção de Resíduos. **Anais**. Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola, p. 219-226. 2004.

NELSON, K. E. et al., Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. **Nature**, v. 399, p. 323 –329, 1999.

NG, L.-K. et al., Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, p. 209–215. 2001.

NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78 p. 8-28. 2009.

O. HENEGARIU, N.A.; HEEREMA, S.R.; DLOUHY, G.H. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**, v. 23, n. 3, p. 504-5111. 1997.

PATERSON D. L., Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **American Journal of Infection Control**, v. 34, p. S20-8. 2006

PERRY, L. et al., Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 176-198. 2007.

PLOY, M. C. et al., Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2684-2688. 2000.

RECCHIA, G. D.; HALL, R. M. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. **Trends in Microbiology**, v. 5, p. 389–394. 1997.

ROJAS, T. M. et al., Resistencia antibiótica de genotipos de cepas de *Salmonella* spp. de cerdos sacrificados en rastros del Estado de México. **Veterinaria México**, v. 42, p. 269-276. 2011.

SANTANA, E. S. et al., USO DE ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS NA AVICULTURA. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 21. 2011.

SANTOS, B. M.; PINTO, A.S.; FARIA, J. E. Terapêutica e desinfecção em avicultura. Universidade Federal de Viçosa, Ed. UFV. Viçosa - MG, p. 7-56. 1998.

SCHAPPINGER, D.; HILLEN, W. Tetracycles: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. **Archives of Microbiology**, v. 165, p. 359-369. 1996.

- SEGABINAZI, S. D. L. Presença de Bactérias da Família *Enterobacteriaceae* nas Superfícies Externa e Interna de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) Oriundos de Granjas Avícolas dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), Rio Grande do Sul. p. 104. 2004.
- SILVA, L. E. et al., Infecção por *Salmonella enterica* em suínos criados em um sistema integrado de produção do sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 455-461. 2006.
- SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 387-399. 1992.
- SRINIVASAN, V. et al., Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 319–328. 2007.
- SRINIVASAN, V. et al., Prevalence of Antimicrobial Resistance Genes in *Listeria monocytogenes* Isolated from Dairy Farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, n. 3, p. 201-211. 2005.
- STOKES, H. W.; HALL, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. **Molecular Microbiology**, v. 3, p. 1669–1683. 1989.
- TENOVER, F. C.; RASHEED, J. K. Genetic methods for detecting antimicrobial and antiviral resistance genes, p. 1578–1592. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, and R. H. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), **Manual of Clinical Microbiology**, 7th ed., Washington, D.C. 1998.
- TESHAGER, T. et al., Surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from pigs at Spanish slaughterhouses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 15, p. 137–142. 2000.
- TRABULSI, L.R.; CAMPOS, L.C. Generalidades sobre enterobactérias. In.: **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu p. 207-213. 2002.
- UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). Relatório Anual. São Paulo – SP. 2012.
- WERCKENTHIN, C. et al., *Escherichia coli* isolates from young calves in Bavaria: in vitro susceptibilities to 14 anti-microbial agents. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 49, p. 61–65. 2002.
- WHITE, D. G. et al., Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4593–4598. 2000.
- WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F. Emergence and transfer of antibacterial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 151–155. 2001.

WOLF van der, et al. *Salmonella* infections in finishing pigs in the Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. **Veterinary Microbiology**, v. 67, p. 263-275. 1999.

YANG, S. J et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. **Veterinary Microbiology**, v. 86, p. 295-301. 2002.