

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

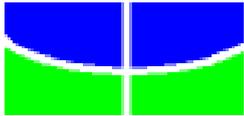
ANDRÉA COLMENERO MOREIRA DE ALCÂNTARA

Realização de antibiograma e detecção de genes de resistência pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em cepas de *Escherichia coli* isoladas de celulite aviária, coletadas de abatedouros frigoríficos do Distrito Federal.

Monografia apresentada para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Brasília / DF

2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ANDRÉA COLMENERO MOREIRA DE ALCÂNTARA

Realização de antibiograma e detecção de genes de resistência pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em cepas de *Escherichia coli* isoladas de celulite aviária, coletadas de abatedouros frigoríficos do Distrito Federal.

Monografia apresentada para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Orientadora
Prof^a. Dr. Ângela Patrícia Santana

Brasília / DF

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

ALCÂNTARA, Andréa Colmenero Moreira de

Realização de antibiograma e detecção de genes de resistência pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em cepas de *Escherichia coli* isoladas de celulite aviária, coletadas de abatedouros frigoríficos do Distrito Federal. / Andréa Colmenero Moreira de Alcântara; orientação de Ângela Patrícia Santana – Brasília, 2010.

60p.: il.

Monografia – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011.

Palavras-chave: celulite aviária, resistência antimicrobiana, *Escherichia coli*.

Cessão de Direitos

Nome da Autora: Andréa Colmenero Moreira de Alcântara

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Realização de antibiograma e detecção de genes de resistência pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em cepas de *Escherichia coli* isoladas de celulite aviária, coletadas de abatedouros frigoríficos do Distrito Federal.

Ano: 2011

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

(Assinatura)

Andréa Colmenero Moreira de Alcântara

CPF: 028.944.881-65

Endereço: Condomínio Quintas do Sol, quadra 3/2, conjunto A, casa 8. Lago sul.

CEP: 71680-370 Brasília/DF- Brasil

Telefone: 9186-2430

E-mail: ddeia.colmenero@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da autora: ALCÂNTARA, Andréa Colmenero Moreira de

Título: Realização de antibiograma e detecção de genes de resistência pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em cepas de *Escherichia coli* isoladas de celulite aviária, coletadas de abatedouros frigoríficos do Distrito Federal.

Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Ângela Patrícia Santana Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof^a. Dra. Déborah Clea Ruy Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof^a. Dra. Simone Perecmanis Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha família,
pessoas essenciais em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela conclusão de mais uma fase na minha vida.

Agradeço aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado, me incentivando a lutar pelos meus sonhos, vibrando com as minhas conquistas, me apoiando nas decisões tomadas.

Agradeço a minha irmã pelos conselhos, pelas conversas, pela ajuda nos momentos difíceis, pelo apoio e compreensão.

Agradeço a minha amiga Júlia, companheira fiel, tanto nas risadas (constantes) quanto na dor. Às vezes mesmo estando distante, você sempre se mostra presente na minha vida. Mora no meu coração.

Às minhas amigas de curso, que fizeram das aulas momentos divertidos e descontraídos.

Ao pessoal do Lamal, que me ajudou com a realização da minha pesquisa.

À minha orientadora, Ângela Patrícia, por me proporcionar tantos anos de experiência científica com Pibic, por me orientar na elaboração desta monografia e por incentivar a minha carreira profissional.

RESUMO

ALCÂNTARA, A. C. M. Realização de antibiograma e detecção de genes de resistência pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em cepas de *Escherichia coli* isoladas de celulite aviária, coletadas de abatedouros frigoríficos do Distrito Federal. Realization of antibiogram and detection of antibiotic resistance genes by polymerase chain reaction (PCR) in strains of *Escherichia coli* isolated from avian cellulitis, collected from slaughterhouses in Distrito Federal. 2011. 60 p. Monografia de conclusão do curso de Medicina Veterinária. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O objetivo deste trabalho foi observar o perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* de celulite aviária. Foram isoladas 22 cepas de *E. coli* coletadas de frangos de corte de abatedouros localizados no Distrito Federal. Todas as amostras foram investigadas quanto à susceptibilidade a 16 agentes antimicrobianos pelo método de disco difusão. A pesquisa de genes de resistência foi feita pela técnica da PCR, por multiplex e uniplex. Todas as amostras apresentaram no antibiograma resistência a pelo menos dois antimicrobianos. Os maiores níveis de resistência foram encontrados para penicilina (100%), espiramicina (100%), sulfonamida (90,91%) e eritromicina (81,82%). Na investigação dos genes de resistência, os mais detectados foram *sul1* (68,18%), *ereA* (50%) e *cat1* (36,36%). Apenas em uma amostra não foi detectado nenhum dos genes de resistência pesquisados. Este estudo revelou que a presença de bactérias resistentes a antibióticos em alimentos destinados ao consumo humano, como a carne de frango, pode se mostrar um risco para a saúde pública.

ABSTRACT

ALCÂNTARA, A. C. M. Realization of antibiogram and detection of antibiotic resistance genes by polymerase chain reaction (PCR) in strains of *Escherichia coli* isolated from avian cellulitis, collected from slaughterhouses in Distrito Federal. Realização de antibiograma e detecção de genes de resistência pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em cepas de *Escherichia coli* isoladas de celulite aviária, coletadas de abatedouros frigoríficos do Distrito Federal. 2011. 60 p. Monografia de conclusão do curso de Medicina Veterinária. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF

The aim of this work was to observe the antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* strains from avian cellulitis. Twenty-two *E. coli* isolates were collected from broilers from slaughterhouses at Federal District area. All the samples were investigated to their susceptibility to 16 antimicrobial agents by disk diffusion method. The search for resistance genes was performed by PCR multiplex and uniplex. All the samples showed antibiotic resistance to at least two antimicrobials. The highest levels of resistance were found for penicillin (100%), spiramycin (100%), sulfonamide (90.91%) and erythromycin (81.82%). In the resistance genes investigation, the genes most frequently detected were *sul1* (68.18%), *ereA* (50%) and *cat1* (36.36%). Only in one sample was not detected none of the resistance genes studied. This study revealed that the presence of antibiotic resistant bacteria in food for human consumption, such as chicken, may have a risk to public health.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Amostra resistente a espiramicina, cefazolina, amoxicilina e sensível a norfloxacin.....45
- Figura 2.** Resultado da multiplex da PCR das amostras 9, 10, 11 e 13.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores em porcentagem dos resultados dos antibiogramas.....	44
Tabela 2. Resultados das PCRs em porcentagem de amostras positivas e negativas.....	47
Tabela 3. Resultado dos antibiogramas dos antimicrobianos que tiveram seu genes pesquisados na PCR.....	50
Tabela 4. Resultado da detecção de genes de resistência pela PCR.....	51

SUMÁRIO

Introdução.....	11
Revisão bibliográfica	14
1. Avicultura no Brasil	14
2. Celulite aviária.....	16
3. <i>Escherichia coli</i>	18
4. Relação entre o uso de antimicrobianos na avicultura e resistência antimicrobiana	20
5. Resistência antimicrobiana	22
5.1 Mecanismos de resistência	25
6 Alguns antimicrobianos de interesse	30
6.1 Sulfonamidas.....	30
6.2 Aminoglicosídeos.....	31
6.3 Beta-lactâmicos	33
6.4 Tetraciclinas.....	34
6.5 Macrolídeos.....	35
6.6 Cloranfenicol	36
6.7 Quinolonas	37
Objetivos	39
Objetivos gerais.....	39
Objetivos específicos.....	39
Metodologia.....	40
1. Isolamento e identificação da <i>Escherichia coli</i>	40
2. Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	40
3. Extração de DNA.....	41
4. Detecção de genes de resistência	42
Resultados e Discussão	44
1. Antibiograma.....	44
2. PCR (Detecção dos genes de resistência a antimicrobianos pela reação em cadeia da polimerase)	47
Conclusão	52
Referências Bibliográficas	53

Introdução

A avicultura brasileira desenvolveu-se e modernizou-se rapidamente alcançando níveis elevados de produtividade nos últimos 30 anos, destacando-se por uma trajetória de incremento tecnológico expressivo, alavancada pela destacada articulação entre os diferentes agentes que a compõe (Giroto e Miele, 2006 *apud* Vieira *et al.*, 2006). Para alcançar a posição de liderança no mercado avícola mundial, o processamento e a inspeção industrial sofreram evoluções com objetivo de adequar os produtos às exigências do mercado. Incluiu-se rígido controle sanitário no abate, processamento, estocagem e expedição a fim de minimizar os riscos de agentes etiológicos transmissíveis por alimentos e de garantir a qualidade do produto (Andrade, 2005 *apud* Vieira *et al.*, 2006).

Muitas enfermidades causam grandes prejuízos à indústria avícola, já que, de acordo com critério de julgamento do médico veterinário, essas doenças acarretam condenações das carcaças e/ou vísceras na linha de inspeção, durante o abate das aves. De acordo com a Normativa nº 210 de 10/11/98 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1998), qualquer órgão ou partes da carcaça que estiverem afetados por um processo inflamatório, como a celulite, deverá ser retirado, e se existir evidência de caráter sistêmico da patologia, a carcaça e as vísceras deverão ser condenadas na sua totalidade (Andrade, 2005).

A celulite aviária ou também chamada dermatite necrótica é um processo inflamatório purulento agudo do tecido subcutâneo rotineiramente encontrado na região abdominal e nas pernas das aves. É responsável por grandes perdas econômicas na indústria avícola, pois é uma das principais causas de condenação de carcaças de frango de corte nos abatedouros de uma forma em geral (Santana *et al.*, 2008). Por exemplo, nos Estados Unidos as perdas por condenação das carcaças de aves por celulite passam de 80 milhões de dólares por ano. No Brasil as perdas chegam a aproximadamente 10 milhões de dólares por ano (Brito *et al.*, 2002).

As causas dessa doença são variáveis, desde problemas na produção como manejo e nutrição até a presença de agentes infecciosos, em especial a *Escherichia coli* (*E. coli*), que agem principalmente quando a ave apresenta uma solução de

continuidade na pele (Van *et al*, 2008). Em um trabalho prévio realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Lamal) da FAV-UnB, verificou-se a presença de *Escherichia coli* na maioria das amostras de celulite aviária coletadas em abatedouros frigoríficos localizados no Distrito Federal.

Com o alto consumo da carne de frango e seus derivados houve um aumento na produção aviária e, conseqüentemente, surgiu um grande número de doenças devido à elevada densidade dos aviários, que pelas condições propícias oferecidas, podem ser chamados de incubadores de microrganismos. Para controlar estas enfermidades optou-se pelo uso de antimicrobianos, causando uma grande revolução na medicina veterinária, pois além de eliminarem microrganismos, têm também, como propriedade adicional, serem estimuladores do crescimento (Palermo, 2003 *apud* PAMvet-PR, 2005).

As modernas tecnologias, no entanto, implicaram numa dependência cada vez maior do uso de substâncias químicas durante as fases de produção do frango de corte. Porém, um fator preocupante é o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos, ocasionando obstáculos aos procedimentos clínicos, aumentando os custos do tratamento e as doenças na população humana (Anuário da Avicultura Industrial Brasileira, 2005 *apud* PAMvet-PR, 2005).

As possíveis relações entre o uso de antimicrobianos em animais e o aumento de resistência em bactérias isoladas do ser humano não estão caracterizadas cientificamente, havendo resultados contraditórios na literatura científica. Alguns pesquisadores consideram que o uso de antimicrobianos como aditivo em rações de animais de produção promove a emergência de microrganismos resistentes em seres humanos, por transmissão direta das bactérias aos consumidores, ou indireta, pela transferência de genes de resistência entre populações bacterianas de animais e de humanos. Outros autores argumentam não haver fundamentação científica que comprove esse risco. Porém, em razão da crescente produção e ao grande consumo de carne de frango, a avicultura industrial torna-se grande alvo de atenções nesse aspecto em nível mundial (Kanashiro & Stoppa, 2010).

As bactérias causadoras da celulite podem adquirir resistência à antimicrobianos modificando o seu genoma por mutação ou incorporando genes provenientes de outros microrganismos por diferentes sistemas de transferência

genética. Assim, novas bactérias que não eram resistentes aos antimicrobianos adquirem o gene de resistência contra determinados fármacos. A *Escherichia coli* é predisponente a efetuar tais transferências genéticas (Van *et al.*, 2008).

Segundo Van *et al.* (2008) a resistência bacteriana a antibióticos não somente se mostra um risco em termos de saúde animal, como também a saúde pública quando transmitida à humanos por alimentos contaminados. Dessa forma, tratar a questão da resistência a antimicrobianos é uma das mais urgentes prioridades no campo da saúde pública atualmente.

Logo, tendo em vista a importância dessa patologia para o setor de avicultura, principalmente para a produção de carnes de aves, e considerando o fato da bactéria *Escherichia coli* ser a predominante nas celulites aviárias, este trabalho teve por objetivo promover a realização de antibiograma e a detecção de genes de resistência por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em cepas de *E. coli* previamente isoladas de celulite aviária, coletadas de abatedouros frigoríficos localizados no Distrito Federal.

Revisão bibliográfica

1. Avicultura no Brasil

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial e o primeiro maior exportador de carne de frango. A avicultura brasileira corresponde a 1,5% do PIB brasileiro e gera 5 milhões de empregos diretos e indiretos. Em 2009 foram produzidas no país 11.417.000 toneladas de carne de frango e foram exportadas 3.700.000 toneladas. A região do Centro-Oeste foi responsável por 12,7% da exportação de carne de frango do Brasil em 2008 e o Distrito Federal correspondeu a 1,8% (UBA, 2009).

Nos últimos anos, o setor avícola no Brasil passou de uma operação em nível de proprietário de granja para uma economia em escala, possível pela associação de numerosos produtores individuais. Este sistema integrado que prevalece no sul do país levou a uma eficiência operacional responsável pela posição do Brasil como um dos líderes da avicultura mundial (Mendes, 2001 *apud* Pereira, 2009).

A carne de frango, na nossa refeição diária, está se tornando cada vez mais popular, não somente no Brasil como também em todo o mundo. Isso ocorre devido à mudança de hábito de consumo. Hoje prefere-se a ingestão de proteínas nobres, de fácil digestão, com baixo teor de gorduras compostas por ácidos graxos assimiláveis, além de ricas em vitaminas e magnésio. A carne de frango é um produto de fácil aquisição por todas as camadas sociais pelo seu baixo custo (Bottezini, 2005 *apud* PAMvet-PR, 2005). Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO), no ano de 2003, o consumo médio mundial *per capita* foi de 11 kg/hab/ano, sendo Hong Kong o maior consumidor de carne de frango (50,4 kg/hab/ano). O Brasil é o quarto colocado, com um consumo de 34,5 kg/hab/ano (Anuário de Avicultura Industrial, 2005 *apud* PAMvet-PR, 2005).

Além da sanidade do rebanho nacional, livre da Doença de Newcastle e da Influenza Aviária, outros fatores contribuem para a competitividade da indústria avícola, como o baixo custo para produção de frangos. Somente o Brasil, Argentina, Paraguai e Bolívia respondem por 50% da produção mundial de soja e 10% de milho, para uma população de 3,5% do globo. E ainda, o Brasil, possui 80 milhões de hectares inexplorados, que podem ampliar a produção de grãos (Lima, 2004 *apud* Neto & Miranda, 2009). Estes dados demonstram a influência da produção de

grãos no aumento da competitividade da atividade avícola, já que o aumento da oferta de grãos, devido a nossa grande extensão territorial e grande oferta de mão de obra barata, representa diminuição dos gastos com ração para alimentação das aves durante a produção (Neto & Miranda, 2009).

Atualmente, a produção avícola é eficiente e de alta produtividade, baseada em um sistema técnico-científico avançado, com otimização da produção, oferecendo proteína de boa qualidade a baixo custo. Com todo esse crescimento econômico e evolução na produção, a preocupação com os aspectos sanitários também aumentaram, e com isso, o aprimoramento tecnológico deve estar associado à evolução nas pesquisas relacionadas à sanidade das aves (Andrade, 2005).

Acrescenta-se que o controle sanitário dos produtos de origem animal tem influenciado, sobretudo, a dinâmica do comércio mundial de carne de aves, estabelecendo novos parâmetros de competitividade associados aos sistemas de qualidade dos alimentos (Martinelli & Souza, 2005 *apud* Neto & Miranda, 2009).

O conceito de qualidade de alimentos, na visão do consumidor, reflete a satisfação de características como sabor, aroma, aparência, embalagem, preço e disponibilidade. Muitas vezes, não é conhecida a condição intrínseca de segurança alimentar nos aspectos relacionados à influência do alimento sobre a saúde humana. O termo alimento seguro significa a garantia de consumo alimentar seguro no âmbito da saúde coletiva, de produtos livres de contaminantes de natureza química, física, biológica ou outras substâncias que possam colocar em risco a saúde (Silva, 2006 *apud* Neto & Miranda, 2009).

Apesar do ótimo desempenho nos últimos anos, a avicultura apresenta problemas com relação à sanidade das aves. Em função do tipo de criação, em escala industrial dos frangos de corte, as enfermidades cutâneas vêm se tornando cada vez mais freqüentes, com crescentes prejuízos à avicultura. Estes danos são causados pela condenação parcial ou total das carcaças nos matadouros, com redução no valor do produto final, despesas com mão-de-obra adicional e equipamentos, redução na velocidade de processamento das carcaças e gastos com limpeza e desinfecção das instalações (Andrade, 2005).

Dentre essas enfermidades, destaca-se a celulite aviária, uma das maiores causas de condenação total de frangos de corte em todo o mundo, acarretando perdas econômicas consideráveis. A principal delas é com a condenação total das carcaças, porém, as partes rejeitadas na condenação parcial também estão incluídas nesse montante, pois diminuem o aproveitamento das mesmas (Andrade, 2005).

2. Celulite aviária

A celulite aviária é definida como um processo inflamatório que pode resultar na presença de um exsudato purulento agudo no tecido subcutâneo, sendo tipicamente observada na região da coxa e baixo abdome (Elfadil *et al.*, 1996 *apud* Andrade *et al.*, 2006).

Como algumas lesões são difusas e não há uma definida delimitação macroscópica, muitos microrganismos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Pausteurella haemolytica*, *Lactobacillus sp*, *Proteus vulgaris*, entre outros, são encontrados além dos limites estabelecidos durante a retirada da parte afetada na inspeção post mortem (Kumor *et al.*, 1998 *apud* Andrade, 2005).

Além de sua importância econômica, a celulite é preocupante em termos de saúde pública, tendo em vista que inúmeros microrganismos estão envolvidos neste processo, principalmente a *Escherichia coli*, que pode ser isolada na maioria das lesões (Messier *et al.*, 1993; Onderka *et al.*, 1997 *apud* Andrade, 2005). Tal bactéria é tida como agente causal da enfermidade em questão. Acredita-se que a celulite resulte de uma quebra na integridade da pele, como um ferimento traumático ou outra abrasão cutânea, permitindo que as bactérias entrem e colonizem o tecido subcutâneo (Norton, 1997 *apud* Andrade, 2005).

As lesões cutâneas em frangos de corte muitas vezes são de etiologia ainda não esclarecida, porém, alguns fatores influenciam no aparecimento das mesmas, como fatores genéticos, de manejo e imunodepressores. Os primeiros estão relacionados com o sexo do animal, pois se sabe que os machos apresentam velocidade de empenamento mais lento e são mais agressivos. Com isso, são mais afetados por lesões decorrentes de traumatismos. Os fatores de manejo são

representados principalmente pela alta densidade populacional na criação dos frangos, pois favorece maior contato entre os animais. Alguns materiais de cama também podem causar lesões cutâneas, e a deterioração da cama favorece a multiplicação de microrganismos patogênicos que podem invadir a pele lesada. O programa de iluminação aumenta o período de atividade da ave, podendo haver maior ocorrência de lesões, enquanto que os fatores imunossupressores conferem à ave uma debilidade na resposta imunológica contra agentes infecciosos (Berchieri JR.; Macari, 2000 *apud* Andrade, 2005).

A densidade máxima na granja e o manejo dos lotes antes do abate podem ser de importância significativa na etiologia da doença. Limpeza da incubadora e a qualidade do pinto precisam ser mantidas como pontos de controle para o desenvolvimento de um sistema imune saudável na ave. Embora nenhuma patologia seja explicada para a celulite, geralmente, qualquer insulto à integridade da pele deve ser considerado como rota significativa da patologia da doença (Norton, 1997 *apud* Andrade, 2005).

O diagnóstico através da avaliação macroscópica das enfermidades cutâneas em frangos de corte freqüentemente resulta em erros (Fallavena, 2001 *apud* Andrade, 2005). Lesões provocadas por diferentes doenças podem ser muito semelhantes entre si, visto que a maioria apresenta espessamento e alterações de coloração e de aspecto da pele. Dependendo do grau de severidade, a dermatite e a celulite podem apresentar alterações muito similares (Fallavena *et al.*, 2000 *apud* Andrade, 2005). O exame histopatológico parece ser a maneira mais adequada de diagnosticar doenças cutâneas (Fallavena, 2006 *apud* Vieira *et al.*, 2006).

Microscopicamente há inflamação do subcutâneo formando massa constituída de restos celulares necróticos e bandas de fibrina, circundadas por cápsula de tecido conjuntivo contendo heterófilos, linfócitos e macrófagos, podendo haver formação granulomatosa, e em alguns casos envolvimento do folículo plumoso (Messier *et al.*, 1993; Onderka *et al.*, 1997; Fallavena, 2000; Fallavena, 2001; Alves, 2005; Andrade, 2005 *apud* Vieira *et al.*, 2006).

É indispensável que a pele esteja lesada para que bactérias invadam e se multipliquem no hospedeiro (Norton, Macklin e McMurtrey, 1999; Fallavena, 2000; Fallavena, 2001 *apud* Vieira *et al.*, 2006), embora Elfadil *et al.* (1996) e Allan (1997) relatem que apesar de haver a necessidade de lesões de pele para a ocorrência da

celulite, este fator não é isoladamente suficiente para a ocorrência da enfermidade (Vieira *et al.*, 2006).

3. *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um dos microrganismos mais versáteis encontrados na natureza. De ampla distribuição, normalmente coloniza o trato gastrointestinal de humanos e animais, onde faz parte da flora normal e estabelece uma relação mutuamente benéfica com seu hospedeiro. Contudo existem algumas cepas que são extremamente virulentas e capazes de causar doenças graves (Informativo Cefar de Microbiologia, 2006).

A *Escherichia coli* é uma bactéria do grupo coliforme, bastonete gram-negativa, anaeróbia facultativa, que fermenta a lactose e manitol, com produção de ácido e gás a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em 24 horas. Produz indol a partir do triptofano, é oxidase negativa, catalase positiva, não hidroliza a uréia e apresenta atividade das enzimas β galactosidase e β glucoronidase (BRASIL, 2004). Em ágar Mac Conkey as colônias se apresentam na cor rosa clara circundadas por um precipitado, e em ágar EMB (Eosyn-Methylene-Blue), são verde-escuras em tom metálico ou pretas (BARNES *et al.*, 1997).

Após a identificação inicial da espécie, é possível continuar a classificar as *E. coli* com base em certas reações imunológicas. Tais reações se baseiam no fato de cada variante expressar diferentes antígenos em sua superfície. Esses antígenos são: O (antígeno do lipopolissacarídeo - LPS); H (antígeno flagelar) e K (antígeno capsular). Ao se avaliar qual o antígeno O presente em dada cepa, pode-se classificar a *E. coli* em sorogrupos e, até o momento, mais de 170 sorogrupos já foram identificados. Da combinação da identificação do antígeno O com a identificação do antígeno H e, em alguns casos, o K, pode-se definir sorotipos. A classificação sorológica é importante, pois é sabido que cada sorogrupo e sorotipo possui características individuais quanto a resposta contra antibióticos ou com relação a patogenicidade (Informativo Cefar de Microbiologia, 2006).

A *E. coli* pode ser encontrada na cama aviária da granja, na poeira, na água, na ração e no intestino de aves saudáveis. Tem habilidade de crescer rapidamente e usa uma grande variedade de tipos de materiais como nutrientes (Andrade, 2005).

Tem sido relatado que estirpes de *E. coli* que colonizam o trato intestinal de frangos são capazes de serem transmitidas aos humanos através do contato íntimo, podendo, inclusive, ser isoladas de amostras fecais humanas (Messier, 1993 *apud* Vieira *et al.*, 2006). Além disso, a presença de *E. coli* nas lesões de celulite favorece a contaminação cruzada nas linhas de processamento de frangos quando estas são expostas (Gomis *et al.*, 2001 *apud* Vieira *et al.*, 2006).

Embora não se saiba o potencial que as estirpes isoladas de celulite têm de causar doenças em humanos, as habilidades em adquirir fatores de virulência por transferência genética são fatores a serem considerados (Ngeleka *et al.*, 1996; Kumor *et al.*, 1998 *apud* Vieira *et al.*, 2006).

Alimentos contaminados com bactérias resistentes a antibióticos podem ser uma grande ameaça para a saúde pública, já que existe a distinta possibilidade de que os genes que codificam a resistência aos antibióticos, que são carregados em elementos genéticos móveis, possam ser transferidos para outras bactérias de importância clínica humana. A *E. coli* é um veículo candidato para tais transferências por causa da sua diversidade de cepas e também pela sua capacidade de sobrevivência na flora do trato gastrointestinal tanto de homens quanto de animais. Estes são sensíveis à pressão de seleção exercida pelo uso de antimicrobianos e carregam elementos genéticos móveis que podem realizar essas transmissões. (Van den Bogaard e Stobberingh, 2000 *apud* Van *et al.* 2008).

No que se refere especificamente à *Escherichia coli* comensal de animais, já é sabido que é resistente à maioria dos agentes antimicrobianos comumente utilizados, como as tetraciclina, sulfametoxazole, ampicilina, estreptomicina e carbenicilina (Kang, *et al.* 2005 *apud* Artencio, 2007).

Os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos são desenvolvidos em função do agente utilizado contra o microrganismo; dessa forma, em *E. coli* pode-se ter uma ampla variedade de mecanismos de resistência, visto que antimicrobianos de diversas classes são utilizados no tratamento das enfermidades por ela determinadas. Dentre estes mecanismos, pode-se ter a produção de beta-lactamase (resistência a penicilinas e cefalosporinas), metilação do RNA ribossomal e efluxo do antimicrobiano (resistência à macrolídeos e tetraciclina), modificação enzimática do antimicrobiano (resistência a

aminoglicosídeos) e mutações da DNA girase (resistência a fluoroquinolonas) (Palermo Neto, 2005 *apud* Artencio, 2007).

Foi constatado em uma pesquisa que o uso de cefalosporinas de terceira geração no tratamento contra bactérias da família *Enterobacteriaceae* poderia selecionar bactérias mutantes, o que acarretaria em uma superprodução de beta-lactamases (Paterson, 2006 *apud* Artencio, 2007).

Especificamente, a resistência a quinolonas, tem sido relatada em *E. coli* mediada por plasmídios e associada com a aquisição do gene *qnr* (Paterson, 2006 *apud* Artencio, 2007).

4. Relação entre o uso de antimicrobianos na avicultura e resistência antimicrobiana

O problema de resistência a drogas específicas nas bactérias causadoras de infecção humana coincidiu com a introdução de inúmeros antimicrobianos na década 50, expandindo-se, a partir de 1960, com a introdução de novos beta-lactâmicos e agravando-se nas décadas de 80 e 90, com o surgimento de novas formas de resistência e disseminação de multirresistentes. Os antimicrobianos atuam como selecionadores de micro-organismos resistentes devido aos empregos em vários segmentos, como na clínica (humana e veterinária), na indústria (conservação de alimentos), na produção animal (engorda de animais) e em experimentos (Kanashiro & Stoppa, 2010).

Vários experimentos indicam que os promotores de crescimento proporcionam diminuição do número de bactérias aderidas à mucosa intestinal (o que reduz a competição por nutrientes com o hospedeiro), diminuição de bactérias produtoras de toxinas e amônia (que prejudicam a absorção dos nutrientes), e, conseqüentemente, diminuição das células inflamatórias na parede intestinal e do grau de descamação e renovação das vilosidades intestinais (Armstrong, 1986; Henry *et al.*, 1987; Izat *et al.*, 1989 *apud* Pessanha & Gontijo Filho, 2000).

Com o aumento do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e até mesmo com fins terapêuticos na criação de animais de produção, existe o interesse global referente ao consumo de baixos níveis de resíduos de antimicrobianos em alimentos e os efeitos destes na saúde humana. A ingestão de

alimentos contendo resíduos de fármacos antimicrobianos pode ocasionar resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados rotineiramente na terapêutica humana, dificultando o tratamento de enfermidades infecciosas humanas (Mantilla et al., 2007 *apud* Franco et al., 2010).

Na avicultura, a administração de certos antibióticos e quimioterápicos em pequenas concentrações e de forma contínua à ração, proporciona aumento significativo do ganho de peso e melhor conversão alimentar (Griffin, 1980; Soares, 1996 *apud* Mota et al., 2005). Segundo Young (1994), a adoção desse manejo é relatada como subterapêutica, pois a quantidade utilizada destas drogas é inferior àquela usada no tratamento de doenças específicas, favorecendo o aparecimento de resistência antimicrobiana em cepas de bactérias patogênicas, diminuindo assim a capacidade destas drogas na cura de infecções em pessoas e animais (Manie et al., 1997 *apud* Mota et al., 2005).

Segundo o Anuário da Avicultura Industrial Brasileira (2005), no segmento avícola da indústria de medicamentos veterinários, houve faturamento próximo de R\$ 443 milhões, representando 21,3% do total faturado pelo setor em 2004, onde as classes terapêuticas dos antimicrobianos, anticoccidianos e promotores de crescimento/antibióticos tiveram 29% de participação do mercado (PAMvet-PR, 2005).

Os antimicrobianos, quando usados como promotores de crescimento na alimentação animal, podem exercer forte pressão seletiva sobre os patógenos e a microbiota saprofítica, principalmente quando utilizados abusivamente, podendo resultar no aparecimento de resistência quer seja na microbiota saprofítica e/ou patogênica, em dependência da codificação de genes para resistência antimicrobiana pela ação de plasmídios e transposons, colocando em perigo o ingestor de produtos de origem animal pelo rápido desenvolvimento da resistência por mutação (Franco et al., 2006 *apud* Franco et al., 2010).

A União Européia progressivamente foi restringindo o uso de antimicrobianos como aditivos promotores do desempenho zootécnico em animais de produção, tendo proibido o uso dessas substâncias a partir de janeiro de 2006. Os aditivos para uso em aves começaram a ser proibidos no Brasil a partir de 1998. Atualmente, as drogas proibidas como aditivos são cloranfenicol, penicilina, tetraciclina, sulfonamidas sistêmicas, arseniacais, antimonialis, olaquinox e violeta de genciana.

O cloranfenicol e nitrofuranos são proibidos inclusive para uso terapêutico desde 2003. A problemática da resistência bacteriana a antimicrobianos não deve ser vista de modo simplista, sendo necessário que se entenda o alimento de origem animal presente na mesa do consumidor como ponto final de uma grande cadeia iniciada nas propriedades rurais produtoras (Kanashiro & Stoppa, 2010).

A resistência antimicrobiana é um problema com graves implicações clínicas, pois novos agentes antimicrobianos devem ser desenvolvidos e são sempre mais caros e muitas vezes mais tóxicos que os utilizados anteriormente nos tratamentos das infecções. Portanto, um dos maiores desafios na área de produção animal tem sido à busca de alternativas para se reduzir o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em rações. Este desafio é consequência das crescentes pressões impostas por legislações de países que importam produtos de origem animal, como os da Comunidade Européia, que proíbem a inclusão de antimicrobianos nas dietas de frangos de corte e outras espécies animais. (Medeiros *et al.*, 2009 *apud* Franco *et al.*, 2010).

5. Resistência antimicrobiana

O descobrimento dos antibióticos foi um grande avanço para a aplicação terapêutica tanto na medicina humana quanto na veterinária. Eles são importantes na redução da morbidade e mortalidade de doenças infecciosas (Aschbacher, 1978 *apud* Mota *et al.*, 2005).

A antibioticoterapia é usualmente utilizada como primeira opção no tratamento de diversas enfermidades na medicina veterinária e humana. Atualmente, uma variedade de drogas com princípios ativos diferentes são encontrados no mercado, tornando-se muito importante a avaliação da eficácia desses medicamentos frente aos microrganismos causadores destas enfermidades (Langnegger *et al.*, 1986; Mackie *et al.*, 1988 *apud* Mota *et al.*, 2005).

As duas definições para resistência antimicrobiana mais comumente usadas são baseadas em critérios microbiológicos (resistência *in vitro*) e clínicos (resistência *in vivo*). Segundo a definição microbiológica, uma cepa é dita resistente caso cresça na presença de concentrações de droga acima das suportadas por outras cepas filogeneticamente relacionadas. Já de acordo com a definição clínica, uma cepa é

resistente quando sobrevive à terapia antimicrobiana utilizada. Independente da definição utilizada trata-se de um fenômeno complexo que envolve uma variedade de agentes antimicrobianos, espécies de bactérias, genes de resistência e mecanismos de resistência (Aarestrup, 2005 *apud* Dias, 2010).

A resistência a agentes antimicrobianos pode ser subdividida em dois tipos básicos de resistência: resistência intrínseca e resistência adquirida. A resistência intrínseca descreve um status de insensibilidade geral da bactéria a agentes antimicrobianos específicos ou a uma classe de agentes. Isso geralmente ocorre devido à falta de estruturas alvo para certos agentes antimicrobianos (por exemplo, a resistência de bactérias sem parede celular a beta-lactâmicos) ou a inacessibilidade destes agentes a bactérias específicas. A resistência intrínseca é uma propriedade gênero- ou espécie-específica da bactéria. Em contraste, a resistência adquirida é uma propriedade cepa-específica que pode ocorrer devido a aquisição de genes de resistência estranhos ou a mutação cromossomal de genes alvo (Aarestrup, 2006).

Muitas bactérias possuem resistência intrínseca a vários grupos de antibióticos, porém o problema da resistência aos antimicrobianos é colocado quando as bactérias sofrem mutações, originando formas resistentes (Soares, 2001 *apud* Sousa Junior *et al.*, 2004).

Em relação às variações regionais, tem-se conhecimento que a ocorrência de resistência está intimamente relacionada à pressão de seleção do agente às drogas utilizadas com maior frequência no tratamento da afecção (Jones *et al.*, 1985 *apud* Baccaro *et al.*, 2002).

Níveis elevados de resistência podem estar relacionados ao fenômeno de multiresistência, através do qual, antibióticos como a ampicilina podem induzir a seleção de amostras de *E. coli* resistentes às tetraciclinas, sulfas, kanamicina e ampicilina na ausência da exposição do agente ao antimicrobiano (Bongers *et al.*, 1995 *apud* Baccaro *et al.*, 2002). A resistência múltipla, também pode ser observada na administração de sulfonamidas, neomicina, cloranfenicol, tetraciclina e sais de cobre quando utilizados para o tratamento de diarreia em suínos. Na maioria dos casos, o fenômeno é mediado por plasmídeos, razão pela qual deve-se evitar o uso de antimicrobianos utilizados como facilitadores do crescimento, no tratamento e na profilaxia de doenças (Bongers *et al.*, 1995 *apud* Baccaro *et al.*, 2002).

O principal mecanismo para uma bactéria sensível, numa população, tornar-se resistente é através da mutação cromossômica. Outro tipo de resistência pode ser transferida de uma bactéria resistente para uma sensível por contato entre as células. Esta resistência é referida como transferível, transmissível, ou infectível. A resistência é transferível por organismos da mesma espécie e entre espécies diferentes (Smith, 1974 *apud* Mota *et al.*, 2005). Esta transmissão é realizada por meio de plasmídeos (Jawetz *et al.*, 1991 *apud* Mota *et al.*, 2005).

Plasmídeos são elementos genéticos extracromossômicos de replicação autônoma, que variam de tamanho entre 1 a 1000 kb. Plasmídeos podem codificar resistência para agentes antimicrobianos, desinfetantes, cátions de metais pesados, ânions, proteínas de ligação, ou bacteriocinas, mas também para propriedades metabólicas ou de virulência. Plasmídeos de resistência são conhecidos por carregar um ou mais genes de resistência, algumas vezes juntamente com genes que determinam outras características fenotípicas. Plasmídeos de grande peso molecular podem carregar um complexo de gene *tra* que permite que estes plasmídeos se movam de uma célula hospedeira para outra por conjugação. É digno de nota que nem todo plasmídeo pode replicar em toda bactéria hospedeira. Portanto, quando transferidos para uma nova célula hospedeira, os plasmídeos podem replicar estavelmente; formar integrações com outros plasmídeos; ou se integrar, em parte ou totalmente, no DNA cromossomal. Plasmídeos geralmente agem como vetores para transposons e integrons/cassetes de genes (Aarestrup, 2006).

Os genes de resistência codificam enzimas que inativam (por modificação química) ou degradam classes específicas de antibióticos ou que alteram a permeabilidade da célula a essas drogas. Um plasmídeo pode tanto determinar resistência a um único antibiótico como pode conter genes que conferem resistência a múltiplas drogas. O plasmídeo R100, por exemplo, possui genes que conferem resistência a sulfonamidas, estreptomicina/espectromicina, ácido fusídico, cloranfenicol, tetraciclina e mercúrio. R100 é transmissível para enterobactérias do gênero *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* e *Shigella* e muito dos genes de resistência a drogas presentes no plasmídeo fazem parte de elementos transponíveis, que podem, potencialmente, mediar a própria transferência, por exemplo, para o cromossomo da célula hospedeira (Zaha *et al.*, 2003).

Genes de resistência podem ser transferidos entre bactérias por meio de transformação, transdução, conjugação ou transposição. A resistência a um agente antibacteriano frequentemente resulta em resistência cruzada com outros agentes da mesma classe. Essa forma de resistência é observada com sulfonamidas, tetraciclinas, aminoglicosídeos e macrolídeos (QUINN *et al.*, 2005 *apud* Dias, 2010). Na transformação, a bactéria incorpora genes de resistência presentes no meio, os quais foram produzidos por outra bactéria. A transdução consiste na transferência do gene de resistência de uma bactéria para outra por meio de um bacteriófago. Na conjugação, a transferência do gene de resistência é feita através de uma ponte citoplasmática que é estabelecida entre duas bactérias. Por fim, o mecanismo de transposição é a transferência por meio de transposons, que são elementos de DNA que podem transferir-se de uma molécula de DNA para outra. A mutação, transdução e transformação são as formas de resistência mais comuns em bactérias Gram-positivas, ao passo que as Gram-negativas podem apresentar qualquer uma dessas formas, predominando, a transposição (Spinosa *et al.*, 2006 *apud* Dias, 2010).

Tudo que evita ou danifica o encontro da droga antimicrobiana com seu "alvo" (receptores de penicilina, unidade 30S e 50S dos ribossomos, enzimas responsáveis pela síntese da parede celular, síntese de DNA e de mRNA, entre outros) gera maior ou menor resistência. Os alvos geralmente são proteínas, quase sempre enzimas, importantes para o metabolismo da célula bacteriana. Assim, quanto mais específico e estratégico para a célula for o alvo, mais eficaz será a droga. A resistência cromossômica surge por mutação espontânea, que pode ser a simples troca de um nucleotídeo, desde que não torne a bactéria inviável. A bactéria pode adquirir, após a mutação, resistência cromossômica pela alteração ou superprodução do alvo, mas também, por mudanças na síntese de proteínas ligadas à permeabilidade do seu envoltório, alterando a entrada e o acúmulo da droga dentro da célula, dificultando o encontro droga-alvo (Souza, 1998 *apud* Mota *et al.*, 2005).

5.1 Mecanismos de resistência

Os mecanismos genéticos que codificam a resistência bacteriana se exteriorizam por seis principais mecanismos bioquímicos de ação: inativação enzimática da droga, alteração da permeabilidade bacteriana à droga, alteração de

sistemas de transporte na célula, retirada ativa da droga do meio intracelular, alteração do receptor à droga, modificação do sistema metabólico ativo para a droga e síntese das vias metabólicas alternativas (Tavares, 2001 *apud* Sousa Junior *et al.*, 2004). Todos estes mecanismos citados podem ser reunidos em três grupos: inativação enzimática, alteração do sítio de ação do antibiótico e alteração do transporte do antibiótico através do invólucro bacteriano. Um quarto mecanismo, caso específico de resistência as sulfonamidas e trimetropim, se relaciona à capacidade da célula bacteriana de evitar a rota metabólica inibida por estes antibióticos (Barros *et al.*, 2001 *apud* Sousa Junior *et al.*, 2004).

Alteração dos sítios-alvo das drogas

A alteração do local-alvo onde atua determinado antimicrobiano, de modo a impedir a ocorrência de qualquer efeito inibitório ou bactericida, constitui um dos mais importantes mecanismos de resistência. As bactérias podem adquirir um gene que codifica um novo produto resistente ao antibiótico, substituindo o alvo original. *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina e estafilococos coagulase-negativos adquiriram o gene cromossômico *mec A* e produzem uma proteína de ligação da penicilina (PBP ou PLP) resistente aos beta-lactâmicos, denominada 2a ou 2', que é suficiente para manter a integridade da parede celular durante o crescimento, quando outras PBPs essenciais são inativadas por antimicrobianos beta-lactâmicos. Alternativamente, um gene recém-adquirido pode atuar para modificar um alvo, tornando-o menos vulnerável a determinado antimicrobiano. Assim, um gene transportado por plasmídeo ou por transposon codifica uma enzima que inativa os alvos ou altera a ligação dos antimicrobianos como ocorre com eritromicina e clindamicina (Anvisa, 2007).

Inativação enzimática do antibiótico

A inibição ou inativação enzimática produzida pelos microrganismos é provavelmente o principal mecanismo molecular de resistência microbiana. Foi inicialmente descrita por Abraham e Chaim, em 1940, que demonstraram em extratos de *Escherichia coli* uma enzima capaz de inativar a ação da penicilina, provocando a sua abertura por hidrólise e transformando o antibiótico em produto

inativo. Com a introdução das cefalosporinas na década de 60, o termo cefalosporinase passou a ser empregado para designar as enzimas que hidrolisavam este grupo de antibióticos beta-lactâmicos (Tavares, 2001 *apud* Sousa Junior *et al.*, 2004).

A produção de betalactamases é o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas. O grau de resistência irá depender da quantidade de enzima produzida, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão (potência) e da velocidade com que o beta-lactâmico penetra pela membrana externa da bactéria (permeabilidade da membrana) (Sousa Junior *et al.*, 2004).

Foram descritas numerosas betalactamases diferentes. Essas enzimas são codificadas em cromossomos ou sítios extracromossômicos através de plasmídeos ou transposons, podendo ser produzidas de modo constitutivo ou ser induzido (Anvisa, 2007).

Nas bactérias Gram-negativas, o papel das betalactamases na resistência bacteriana é complexo e extenso. Verifica-se a presença de quantidades abundantes de enzimas; muitas delas inativam vários antimicrobianos beta-lactâmicos, e os genes que codificam essas betalactamases estão sujeitos a mutações que expandem a atividade enzimática e que são transferidos de modo relativamente fácil. Além disso, as betalactamases de bactérias Gram-negativas são secretadas no espaço periplasmático, onde atuam em conjunto com a barreira de permeabilidade da parede celular externa, produzindo resistência clinicamente significativa a antimicrobianos. As betalactamases de espectro estendido (ESBL), mediadas por plasmídeos, inativam as cefalosporinas de terceira geração e os monobactâmicos como ocorre em cepas de *Klebsiella pneumoniae*. As betalactamases mediadas por cromossomos são produzidas em baixos níveis por *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e outros bacilos Gram-negativos; quando esses microrganismos são expostos a antimicrobianos beta-lactâmicos, são induzidos altos níveis de betalactamases, produzindo resistência às cefalosporinas de terceira geração, cefamicinas e combinações de beta-lactâmicos/ácido clavulânico ou sulbactam (Anvisa, 2007).

O primeiro relato de cepas produtoras de ESBL ocorreu em Frankfurt, na Alemanha em 1983, onde enzimas do tipo SHV foram isoladas de *Klebsiella*

pneumoniae e *Escherichia coli*. A análise destas cepas demonstrou posteriormente que a resistência devia-se à produção de uma beta-lactamase plasmidial transferível, derivada de SHV-1, sendo denominada SHV-2. Desde então, têm sido descritas em todo mundo numerosas enzimas dos tipos TEM e SHV com este fenótipo de resistência. Cepas de *Klebsiella spp* e *Escherichia coli* são as bactérias mais comuns produtoras de ESBL, porém já foram detectadas em diversas espécies de *Enterobacteriaceae* e em *Pseudomonas aeruginosa* (Peloso *et al.*, 2002 *apud* Sousa Junior *et al.*, 2004).

Alteração de permeabilidade da membrana celular

A permeabilidade limitada constitui uma propriedade da membrana celular externa de lipopolissacarídeo das bactérias Gram-negativas. A permeabilidade dessa membrana reside na presença de proteínas especiais, as porinas, que estabelecem canais específicos pelos quais as substâncias podem passar para o espaço periplasmático e, em seguida, para o interior da célula. A permeabilidade limitada é responsável pela resistência intrínseca dos bacilos Gram-negativos à penicilina, eritromicina, clindamicina e vancomicina e pela resistência de *Pseudomonas aeruginosa* ao trimetoprim. As bactérias utilizam esta estratégia na aquisição de resistência. Assim, uma alteração na porina específica da membrana celular externa de *P. aeruginosa*, por exemplo, pela qual o imipenem geralmente se difunde, pode excluir o antimicrobiano de seu alvo, tornando *P. aeruginosa* resistente ao imipenem (Anvisa, 2007).

Efluxo rápido

O bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular, isto é, o seu efluxo ativo, produz resistência bacteriana a determinados antimicrobianos. A resistência às tetraciclinas codificada por plasmídeos em *Escherichia coli* resulta deste efluxo ativo (Anvisa, 2007).

Em bactérias Gram-negativas, o sistema de efluxo tipicamente possui três componentes: uma bomba de efluxo, situada na membrana interna ou citoplasmática; uma proteína formadora do canal extrusor na membrana externa (OMP) e uma proteína de fusão (MFP) que liga estes dois componentes. Esse

sistema possui um amplo espectro, expulsando da célula bacteriana substratos como antimicrobianos, anti-sépticos, desinfetantes, desempenhando um importante papel na resistência intrínseca e adquirida de vários patógenos Gram-negativos. Estes sistemas são codificados por genes cromossomais e sua expressão está sob o controle de genes reguladores (Anvisa, 2007).

As proteínas transmembrana, responsáveis por mediar o efluxo ativo, geralmente têm ampla especificidade pelo substrato e apenas algumas delas conferem resistência aos agentes antimicrobianos. A resistência é determinada pela redução na concentração do fármaco no citoplasma, impedindo ou limitando o acesso da droga ao seu alvo. Algumas bombas de efluxo agem sobre drogas específicas (bombas de resistência específica a antimicrobianos), enquanto outras são ativas contra múltiplas drogas (bombas de resistência múltipla a antimicrobianos). As bombas de resistência específica representam mecanismo mais importante de resistência às tetraciclínas, especialmente em bactérias Gram-negativas. Elas também conferem resistência a macrolídeos e fenicóis. Essas bombas geralmente conferem alta resistência e estão associadas a elementos genéticos móveis. Já as bombas de resistência a múltiplos agentes antimicrobianos geralmente conferem resistência de baixo nível e são frequentemente codificadas cromossomicamente. Dependendo da fonte de energia para uso do efluxo ativo, essas bombas são divididas em dois grupos principais: transportadores de cassetes de ligação a ATP e os transportadores de drogas secundárias. Os transportadores de cassetes de ligação a ATP utilizam hidrólise do ATP como fonte de energia, possuem amplas funções fisiológicas em células eucarióticas e procarióticas e geralmente mediam a exportação de determinadas classes de antibióticos, tais como os macrolídeos (Aarestrup, 2005 *apud* Dias, 2010).

Uma mutação ou mesmo uma deleção nos genes reguladores pode resultar em hiperexpressão dos sistemas de efluxo e, conseqüentemente, na extrusão de antimicrobianos em níveis elevados, impedindo-os, assim, de atingirem seu sítio de ação. Uma vez que os genes que codificam esses sistemas de efluxo são principalmente constitutivos, existe a possibilidade de qualquer microrganismo desenvolver este fenótipo de resistência (Anvisa, 2007).

Além de conferir resistência a beta-lactâmicos, os sistemas de efluxo podem contribuir para a resistência intrínseca e adquirida de Gram-negativos a outros

antimicrobianos, como tetraciclina, fluoroquinolonas, cloranfenicol, e eritromicina. O sistema de efluxo é um mecanismo comum dentre isolados de Gram-negativos, e a sua hiperexpressão associada a outros mecanismos pode contribuir para um fenótipo de multirresistência, restringindo as opções terapêuticas (Anvisa, 2007).

6 Alguns antimicrobianos de interesse

Os antimicrobianos ou anti-infecciosos são substâncias químicas usadas para combater os microrganismos. Os antimicrobianos inespecíficos atuam sobre microorganismos em geral, quer sejam patogênicos ou não; pertencem a este grupo os anti-sépticos e os desinfetantes. Os antimicrobianos específicos atuam sobre microorganismos responsáveis pelas doenças infecciosas que acometem os animais; são os quimioterápicos e os antibióticos (Spinosa *et al.*, 2006).

6.1 Sulfonamidas

As sulfas foram amplamente utilizadas, mesmo no período do advento das penicilinas; entretanto, devido ao aparecimento de resistência microbiana e dos vários relatos de seus efeitos adversos, o uso destes quimioterápicos foi sendo limitado, principalmente em Medicina Humana. Atualmente, as sulfas ocupam ainda destacado papel no tratamento de diversas infecções dos animais domésticos. Além disso, estes quimioterápicos vêm sendo amplamente utilizados na ração de animais de criação, com o objetivo de prevenir as denominadas “doenças de confinamento” (Spinosa *et al.*, 2006).

As sulfonamidas, quando administradas em concentrações terapêuticas, são bacteriostáticas e, em concentrações altas, são bactericidas. Este quimioterápico é um análogo estrutural do ácido p-aminobenzóico (PABA), uma substância essencial para a síntese de ácido fólico, o qual, por sua vez, quando em sua forma reduzida, o ácido tetraidrofólico, é fundamental para a síntese de DNA e RNA bacteriano; portanto as sulfas funcionam como um antimetabólico (Spinosa *et al.*, 2006).

A viabilidade clínica dos sulfonamídicos deve-se, fundamentalmente, à sua toxicidade seletiva, não causando efeito tóxico para o hospedeiro, pois este consegue utilizar o ácido fólico da dieta. Portanto, são sensíveis aos sulfonamídicos

apenas os microrganismos que não conseguem utilizar o ácido fólico pré-formado (Spinosa *et al.*, 2006).

A resistência bacteriana às sulfas normalmente ocorre de maneira gradativa e lenta. Entretanto, uma vez estabelecida, é persistente e irreversível. Presume-se que tal resistência se faça principalmente através de plasmídeo. Plasmídeos podem codificar resistência proporcionada por enzimas com pouca afinidade ou determinar diminuição de permeabilidade da bactéria. São reconhecidas várias formas de resistência bacteriana às sulfas, entre elas, a mutação, levando à produção aumentada de ácido para-aminobenzóico ou à síntese de diidropteroato-sintetase que apresentam pouca afinidade pelo antimicrobiano; o aumento da capacidade do microrganismo de inativar o quimioterápico; um caminho metabólico alternativo para a formação do ácido fólico; o aumento da produção de PABA pelas bactérias (Anvisa, 2007; Spinosa *et al.*, 2006).

Os genes de resistência as sulfonamidas pertencem ao grupo *sul* (*sul1*, *sul2* e *sul3*) e podem ser de origem cromossômica ou adquirida através de elementos móveis (Pérez-Trallero e Iglesias, 2003; Tavares, 2009j *apud* Soler, 2011; Wu *et al.*, 2010).

6.2 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos constituídos por um núcleo de hexose unido a aminoaçúcares através de ligações glicosídicas; por isto são chamados também de aminociclitéis. A maioria dos antibióticos deste grupo é produzida por microrganismos (*Streptomyces griseus*, *S. kanamyceticus*, *S. fradiae*, *Micromonospora purpúrea*, etc.); contudo, há também aqueles semi-sintéticos. O primeiro aminoglicosídeo introduzido em terapêutica foi a estreptomina, em 1943. A seguir, outros foram surgindo, como a neomicina (1949), paramomicina (1956), canamicina (1957), espectinomicina (1961), gentamicina (1963), tobramicina (1968), entre outros (Spinosa *et al.*, 2006).

Estes antibióticos interferem na síntese protéica bacteriana, promovendo a formação de proteínas defeituosas. Os aminoglicosídeos ligam-se a subunidade 30 S do ribossoma, provocando a leitura incorreta do código genético e, conseqüentemente, permitem a incorporação de aminoácidos incorretos na cadeia

polipeptídica que está sendo formada no ribossoma. Esta proteína defeituosa formada na presença dos aminoglicosídeos é fundamental para o metabolismo da bactéria, levando à morte celular; portanto, os aminoglicosídeos são antibióticos bactericidas. Estes antibióticos não interferem na síntese protéica das células dos animais superiores, porque não conseguem se ligar ao ribossoma deles, formado pelas subunidades 40 S e 60 S, enquanto o das bactérias é constituído pelas subunidades 30 S e 50 S (Spinosa *et al.*, 2006).

A resistência bacteriana é relativamente comum entre os aminoglicosídeos, sendo causada por plasmídeos. A resistência determinada pelos plasmídeos é decorrente da produção de enzimas. Estas enzimas introduzem modificações na molécula do aminoglicosídeo, impedindo sua entrada na célula bacteriana e/ou sua ligação ao ribossoma bacteriano (Spinosa *et al.*, 2006).

Existem três mecanismos reconhecidos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos: alteração dos sítios de ligação no ribossomo; alteração na permeabilidade; modificação enzimática da droga. Os genes que conferem resistência podem estar associados a plasmídeos conjugativos e não conjugativos e em transposons, e parecem ser constitutivos, não sendo induzidos pela presença do antimicrobiano (Anvisa, 2007).

A resistência aos aminoglicosídeos está aumentando, com mais de 50 enzimas modificadoras de aminoglicosídeos já descritas, a maioria associada com bactérias Gram negativas, classificadas como aminoglicosídeos acetiltransferases (AAC), adeniltransferases ou nucleotidiltransferases (ANT) e fosfotransferases (APH) (Remonato *et al.*, 2005).

Os aminoglicosídeos modificados nos grupamentos amino por AAC ou nos grupos hidroxila por ANT ou APH perdem a habilidade de se ligar ao ribossomo e não mais inibem a síntese protéica (Paulsen *et al.*, 1997 *apud* Remonato *et al.*, 2005).

Além das enzimas modificadoras de aminoglicosídeo, sistema de efluxo e mutações no rRNA têm sido descritos (Schmitz *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 1993 *apud* Remonato *et al.*, 2005).

6.3 Beta-lactâmicos

As penicilinas e as cefalosporinas são polipeptídeos, cuja estrutura química tem um anel beta-lactâmico. Ambos os grupos de antibióticos impedem a síntese da parede celular, estrutura encontrada apenas em microrganismos, responsável pelas funções de proteção, sustentação e manutenção da forma da bactéria. Como a parede celular é uma estrutura fundamental para a manutenção da vida da bactéria, a supressão da sua síntese conduz à morte da célula (Spinosa *et al.*, 2006).

As penicilinas e cefalosporinas afetam a síntese dos componentes do peptidoglicano inibindo uma etapa particular, em que ligações cruzadas são formadas entre as cadeias de peptidoglicano. Este fato permite uma falha na sustentabilidade da parede celular (Pelczar *et al.*, 1996 *apud* Sousa Junior *et al.*, 2004). Os beta-lactâmicos agem ligando-se às proteínas carreadoras de penicilina na parede celular bacteriana. A resistência a estes agentes geralmente envolve processos que interferem na atuação destas proteínas (Sousa Junior *et al.*, 2004).

Alguns microrganismos produzem uma enzima capaz de quebrar o anel beta-lactâmico das penicilinas, fazendo com que o antibiótico perca sua atividade antimicrobiana. Estas enzimas são chamadas genericamente de beta-lactamases; quando atuam sobre as penicilinas são chamadas de penicilinases e, da mesma forma, quando agem sobre as cefalosporinas são denominadas cefalosporinases (Spinosa *et al.*, 2006). Estas enzimas são frequentemente produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias, e lisam o anel betalactâmico por hidroxilação irreversível da ligação amida, com inativação do antibiótico. Embora o resultado final de sua ação seja o mesmo, a atividade enzimática é variável de acordo com o tipo de betalactamase produzida e os diversos substratos existentes. Existe uma variação em especificidade de substrato entre as betalactamases: algumas hidroxilam preferencialmente as penicilinas, outras têm atração pelas cefalosporinas e algumas enzimas inativam ambas as classes de antibióticos. Em alguns patógenos, verifica-se a produção de diferentes tipos de betalactamases, onde diferentes cepas podem produzir diferentes enzimas, ou uma única cepa pode produzir mais de um tipo de enzima (Sousa Junior *et al.*, 2004).

São descritas três formas principais pelas quais as bactérias apresentam resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos: produção de beta-lactamases (é o

meio mais eficiente e comum das bactérias se tornarem resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos); modificações estruturais das proteínas ligadoras de penicilina (PLP) codificadas pelo gene *mecA*; diminuição da permeabilidade bacteriana ao antimicrobiano através de mutações e modificações nas porinas, proteínas que permitem a entrada de nutrientes e outros elementos para o interior da célula (Anvisa, 2007).

As ESBLs (beta-lactamases de espectro estendido) são enzimas que apresentam um aminoácido serina em seu centro ativo, sendo este seu principal resíduo catalítico. São capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda (exceto cefamicinas) e terceira geração, apresentando suscetibilidade a inibição por Ácido clavulânico, Sulbactam e/ou Tazobactam. As principais ESBLs estão distribuídas nos grupos TEM, SHV e CTX-M que no total apresentam 179, 134 e 103 variantes, respectivamente (Bush e Jacoby – 2003, 2010; Naas *et al.*, 2008 *apud* Soler, 2011).

6.4 Tetraciclinas

As tetraciclinas são antibióticos produzidos por diversas espécies de *Streptomyces*, e algumas são semi-sintéticas. As tetraciclinas são assim denominadas por causa da sua estrutura química, formada por quatro anéis. São classificadas como antibióticos de largo espectro de ação antimicrobiana. Atuam sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, clamídias, riquetsias e até sobre alguns protozoários (Spinosa *et al.*, 2006).

As tetraciclinas inibem a síntese protéica dos microrganismos sensíveis, ligando-se aos ribossomas (que nos microrganismos são constituídos das subunidades 30 e 50 S, enquanto os animais superiores possuem subunidades 40 e 60 S). Estes antibióticos ligam-se à subunidade 30 S do ribossoma do microorganismo, impedindo que o RNA-transportador (RNAt) se fixe ao ribossoma e, com isto, a síntese protéica é inibida. Embora as tetraciclinas tenham maior afinidade pela subunidade 30 S do ribossoma microbiano, podem ligar-se também à subunidade 40 S do ribossoma dos animais superiores, explicando algumas reações adversas que ocorrem com seu uso terapêutico. São antibióticos bacteriostáticos (Spinosa *et al.*, 2006).

O principal mecanismo de resistência microbiana é por diminuição da acumulação da droga no interior da célula. A resistência pode ser cromossômica ou, mais frequentemente, mediada por plasmídeos ou transposons (Anvisa, 2007).

A resistência bacteriana adquirida é mediada principalmente por plasmídeos, que reduzem a captação das tetraciclinas pela célula bacteriana; algumas bactérias podem também ser induzidas a sintetizar enzimas que inativam o antibiótico (Spinosa *et al.*, 2006).

Os genes do grupo *tet* e *otr*, expressam resistência a tetraciclinas e principalmente os do grupo *tet*, se associam a elementos móveis como plasmídeos, transposons e integrons, disseminando resistência a diversas espécies bacterianas (Pérez-Trallero e Iglesias, 2003; Balassiano *et al.*, 2007; Tavares, 2009h *apud* Soler, 2011).

6.5 Macrolídios

Os macrolídios são antibióticos que possuem um anel lactônico macrocíclico, ao qual se ligam açúcares. São ativos contra bactérias Gram-positivas e micoplasma e possuem boa atividade contra bactérias anaeróbicas. As bactérias Gram-negativas aeróbicas são resistentes aos macrolídeos, de modo geral (Spinosa *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação consiste no impedimento da síntese protéica bacteriana, ligando-se à subunidade 50 S do ribossoma, impedindo a translocação do RNAt e inibindo a enzima peptidiltransferase (impedindo o alongamento da cadeia peptídica). São antibióticos bacteriostáticos (Spinosa *et al.*, 2006).

A resistência pode surgir por: diminuição da permeabilidade da célula ao antimicrobiano, alteração no sítio receptor da porção 50S do ribossoma e inativação enzimática (Anvisa, 2007).

A resistência cromossômica desenvolve-se facilmente para este grupo de antibiótico; a resistência mediada por plasmídeos também ocorre e é mais estável. A resistência bacteriana adquirida impede que o antibiótico se ligue à subunidade 50 S do ribossoma. A resistência cruzada é comum entre os antibióticos de um mesmo grupo e entre grupos entre si (Spinosa *et al.*, 2006).

Já foram encontrados em cepas do gênero *Escherichia* os seguintes genes de resistência a macrolídeos: *erm(B)*, *ere(A)*, *ere(B)*, *mph(A)* e *mph(B)* (Roberts *et al.*, 1999).

A resistência aos macrolídeos ocorreu pela primeira vez, em 1953. A bactéria metilava o rRNA que perdia afinidade aos macrolídeos. A metilação é feita por uma adenina N6-metiltransferase, cujo gene é denominado *erm* [Erythromycin Ribosome Methylation]. Os genes *erm* geralmente estão localizados em elementos genéticos móveis, tal como transposons, inseridos no cromossoma. Alguns destes transposons residem em plasmídios. Os genes *erm* muitas vezes estão associados à presença de genes que conferem resistência à tetraciclina (genes *tet*) (Anvisa, 2008).

6.6 Cloranfenicol

O cloranfenicol (descoberto em 1947), produzido pelo *Streptomyces venezuelae*, também pode, atualmente, ser obtido por síntese laboratorial. É considerado um antibiótico de largo espectro de ação, atuando sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, riquetsias, espiroquetas e micoplasma (Spinosa *et al.*, 2006).

O cloranfenicol inibe a síntese protéica dos microrganismos sensíveis, ligando-se à subunidade 50 S e, desta forma, interfere na formação do peptídeo pelo bloqueio da enzima peptidiltransferase. Assim, o cloranfenicol impede o alongamento da cadeia polipeptídica. É um antibiótico bacteriostático (Spinosa *et al.*, 2006).

A resistência pode ser adquirida através de plasmídeos ou alterações de permeabilidade à droga (Anvisa, 2007). A maioria é mediada por plasmídeos, que têm a capacidade de produzir uma enzima, cloranfenicol-acetiltransferase (CAT), que inativa o cloranfenicol. Esta enzima impede a interação do cloranfenicol com os ribossomas bacterianos, abolindo a atividade antibacteriana. Há resistência cruzada entre o cloranfenicol e outros antibióticos, como os macrolídeos e as lincosamidas (Spinosa *et al.*, 2006).

6.7 Quinolonas

As quinolonas são um grupo de substâncias químicas antibacterianas, com grande aplicação tanto em Medicina Humana como em Medicina Veterinária. A primeira quinolona introduzida foi o ácido nalidíxico, seguindo-se a flumequina e o ácido oxonílico. Estas substâncias foram denominadas de quinolonas de primeira geração. Devido à grande eficiência contra a maioria das *Enterobacteriaceae*, este grupo tornou-se de escolha no combate de infecções urinárias de difícil tratamento; por outro lado, nenhuma dessas quinolonas de primeira geração possui qualquer atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, anaeróbio e bactérias Gram-positivas. Na década de 1980, intensas pesquisas realizadas a partir dessas primeiras quinolonas originaram as denominadas quinolonas de segunda geração, a partir de então denominadas fluoroquinolonas, sendo as principais representantes a enrofloxacin, orbifloxacin, difloxacin e marbofloxacin (exclusivamente de uso veterinário), e também norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, lomefloxacin e pefloxacin (Spinosa *et al.*, 2006).

As quinolonas são antimicrobianos bactericidas e sua atividade antimicrobiana se relaciona com a inibição das topoisomerasas bacterianas do tipo II, também conhecida como DNA girase. Assim, embora as quinolonas possuam diferentes características de ligação com a enzima, todos estes quimioterápicos inibem a DNA girase, impedindo o enrolamento da hélice de DNA numa forma superespiralada (Spinosa *et al.*, 2006).

Ao contrário das quinolonas de primeira geração, a administração clínica das fluoroquinolonas produz mutantes resistentes numa frequência, ainda, relativamente pequena. Por outro lado, deve-se considerar que há uma grande preocupação quanto ao uso indiscriminado de fluoroquinolonas. Este fato, sem dúvidas, propicia a promoção de rápido desenvolvimento de resistência bacteriana às fluoroquinolonas de maneira geral (Spinosa *et al.*, 2006).

Até o momento não se verificou resistência bacteriana às quinolonas através dos plasmídeos. A resistência a estes quimioterápicos é atribuída a modificações na DNA girase, ou alterações de permeabilidade na célula bacteriana. É possível a existência de um mecanismo que aumente a retirada da droga do interior da célula (bomba de efluxo). Os mutantes isolados mostram reação cruzada com as diferentes quinolonas; portanto, particularmente em relação ao uso das quinolonas de primeira

geração, por induzirem alto grau de resistência bacteriana, estas só devem ser utilizadas quando se realizar o antibiograma. Além disso, os microorganismos resistentes às quinolonas mostram ainda reação cruzada com antimicrobianos de outros grupos, como as cefalosporinas, o cloranfenicol e as tetraciclinas (Spinosa *et al.*, 2006; Anvisa, 2007).

Objetivos

Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de lesões de celulite aviária, oriundas de abatedouros frigoríficos localizados no Distrito Federal.

Objetivos específicos

1. Comprovação da identificação e do isolamento eficaz das cepas de *Escherichia coli* por meio de provas bioquímicas.
2. Realização de antibiograma para antimicrobianos das classes dos beta-lactâmicos, aminoglicosídios, macrolídios, sulfonamidas, quinolonas, tetraciclínas e o cloranfenicol.
3. Detecção de genes de resistência nas cepas de *E. coli* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Metodologia

1. Isolamento e identificação da *Escherichia coli*

Foram utilizadas 22 cepas de *Escherichia coli* isoladas de celulite aviária obtidas de abatedouros do Distrito Federal. A obtenção das carcaças e lesões, assim como o isolamento das bactérias foram realizados em um trabalho prévio feito no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FAV-UnB. Todas as 22 cepas passaram por provas bioquímicas para a confirmação de isolamento eficaz (ausência de contaminação). Os teste bioquímicos utilizados foram: TSI (Meio tríplice açúcar ferro), citrato, indol, catalase, oxidase, urease e fenilalanina. Nos resultados do TSI o meio apresentou-se amarelo com ou sem a produção de gás. Todas as amostras foram positivas para catalase e indol, e negativas para oxidase, citrato, urease e fenilalanina. Todos os resultados foram compatíveis com o perfil bioquímico da *Escherichia coli*. As amostras também foram repicadas em placas de petri com meio ágar EMB, nas quais foi observado o crescimento de colônias típicas de *E. coli* (verdes metálicas brilhantes).

2. Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os antibiogramas foram executados conforme o indicado pela NCCLS (2003). A preparação do inóculo foi feita pelo método do crescimento em caldo de soja tríptica. Selecionou-se de 3 a 5 colônias bem isoladas de *E. coli* de uma amostra contida em uma placa de petri com ágar Mac Conkey. A superfície de cada colônia foi tocada com uma alça e transferida para um tubo contendo 5 ml de caldo de soja tríptica. A cultura em caldo foi incubada em uma estufa de 35°C até alcançar o grau de turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5 (por volta de 2 horas). Esse processo foi realizado com cada uma das 22 amostras de *E. coli*.

Após a incubação, cada uma das culturas em caldo foram inoculadas individualmente em placas de *petri* contendo o meio ágar Müeller-Hinton. Esse processo foi feito da seguinte forma: mergulhou-se um swab de algodão estéril na suspensão, até 15 minutos após atingir o grau de turbidez esperado da suspensão de inóculo. Foi eliminado o excesso de inóculo no swab e distribuiu-se o restante em toda a superfície do ágar Müeller-Hinton contido em placas de petri (inclusive na

margem da placa). Repetiu-se o procedimento de passar o swab no ágar mais duas vezes, mudando a direção na placa, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo.

Logo em seguida à inoculação das placas de petri com o meio ágar Müeller-Hinton, iniciou-se a colocação dos discos de antimicrobianos. Os antimicrobianos utilizados e suas respectivas concentrações por disco foram: ampicilina (10 µg), cefazolina (30 µg), gentamicina (10 µg), espiramicina (100 µg), doxiciclina (30 µg), cefalexina (30 µg), sulfonamida (200 µg), cefalotina (30 µg), penicilina (6 µg), enrofloxacina (5 µg), tetraciclina (30 µg), neomicina (30 UI), norfloxacina (10 µg), eritromicina (15 µg), amoxicilina (25 µg) e cloranfenicol (30 µg). Para cada amostra de *E. coli* foram utilizadas 4 placas contendo 4 discos de antibióticos cada. As placas foram invertidas e incubadas em uma estufa de 35°C por 16 a 18 horas.

A leitura dos resultados dos antibiogramas foi feita pela mensuração do diâmetro dos halos de inibição em milímetros (incluindo o diâmetro do disco), a olho nu, com o auxílio de uma régua. As amostras foram classificadas em sensíveis, intermediárias ou resistentes aos antibióticos testados de acordo com tabela da NCCLS (2003).

3. Extração de DNA

O preparo do inóculo para a extração de DNA foi feito da seguinte forma: em placas contendo ágar Nutriente, 3 colônias isoladas de *Escherichia coli* de cada amostra foram transferidas, por meio de palitos de dente estéreis, para tubos falcon contendo 2 mL de meio LB. Os tubos foram deixados no shaker, overnight, a uma temperatura de 37°C para o crescimento bacteriano.

A extração de DNA das amostras foi realizada com Fenol-Clorofórmio conforme o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2001). Os pellets de DNA formados nos eppendorfs foram dissolvidos em 30 µl de TE e armazenados à 20°C negativos.

Para cada amostra extraída conferiu-se a presença de DNA por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (3 µl).

4. Detecção de genes de resistência

Todas as 22 amostras foram testadas, por meio da PCR (reação em cadeia pela polimerase), para a detecção dos seguintes genes de resistência: *sul1*, *SHV*, *cat1*, *ereA*, *aac(3)-I*, *tetA*, *tetB* e *tetC*.

Foram realizados 1 multiplex (*sul1*, *SHV*, *cat1*) e 5 uniplex (*aac(3)-I*, *ereA*, *tetA*, *tetB* e *tetC*) (Quadro 1).

Quadro 1. Primers utilizados na PCR (Van *et al.*, 2008).

	Gene	Resistência antimicrobiana	Primers	Sequência de DNA 5'→3'	Produto amplificado (bp)
Multiplex	<i>sul1</i>	Sulfonamida	<i>sul1</i> -F <i>sul1</i> -R	TTCGGCATTCTGAATCTCAC ATGATCTAACCCCTCGGTCTC	822
	<i>SHV</i>	Beta-lactâmico	<i>blaSHV</i> -F <i>blaSHV</i> -R	TCGCCTGTGTATTATCTCCC CGCAGATAAATCACCACAATG	768
	<i>cat1</i>	Cloranfenicol	<i>CAT1</i> -F <i>CAT1</i> -R	AGTTGCTCAATGTACCTATAACC TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	547
Uniplex	<i>ereA</i>	Macrolídio	<i>ereA</i> (A)-F <i>ereA</i> (A)-R	GCCGGTGCTCATGAACTTGAG CGACTCTATTCGATCAGAGGC	419
Uniplex	<i>aac(3)-I</i>	Aminoglicosídeo	<i>aac(3)-I</i> -F <i>aac(3)-I</i> -R	ACCTACTCCCAACATCAGCC ATATAGATCTCACTACGCGC	157
Uniplex	<i>tetA</i>	Tetraciclina	<i>tetA</i> (A)-F <i>tetA</i> (A)-R	GTGAAACCCAACATACCCC GAAGGCAAGCAGGATGTAG	887
Uniplex	<i>tetB</i>	Tetraciclina	<i>tetB</i> (B)-F <i>tetB</i> (B)-R	CCTTATCATGCCAGTCTTGC ACTGCCGTTTTTTCGCC	773
Uniplex	<i>tetC</i>	Tetraciclina	<i>tetC</i> (C)-F <i>tetC</i> (C)-R	ACTTGGAGCCACTATCGAC CTACAATCCATGCCAACCC	880

As reações de PCR do multiplex foram realizadas em um volume total de 25 µl contendo 2 µl do DNA extraído, 2,5 µl de tampão 10x, 0,5 µl de cada primer, concentrações finais de 3,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs e 0,5 µl de Taq polimerase. As reações de uniplex dos genes *ereA* e *aac(3)-I* diferem apenas na concentração final de MgCl₂ (2,5 mM).

As reações de PCR dos uniplex dos genes *tetA*, *tetB* e *tetC* foram realizadas em um volume total de 25 µl contendo 1 µl do DNA extraído, 2,5 µl de tampão 10x, 0,5 µl de cada primer, concentrações finais de 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs e 0,5 µl de Taq polimerase.

As amplificações por PCR do multiplex e do uniplex do gene *ereA* foram realizadas em termociclador MyCycler™ (BIO-RAD) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 59°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto e ciclo final de amplificação a 72°C por 10 minutos. Na amplificação da PCR do gene *aac(3)-I* foi utilizada a temperatura de anelamento 55°C.

As amplificações dos uniplex dos genes *tetA*, *tetB* e *tetC* foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto e ciclo final de amplificação a 72°C por 10 minutos.

Todos os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 2%, utilizando marcador 100bp, corados com brometo de etídio (3 µl) e processados a 50 V, por aproximadamente 1h e 40min. Os resultados foram observados em um transluminador com luz ultravioleta.

Resultados e Discussão

1. Antibiograma

Os resultados encontrados nos antibiogramas para as cepas de *E. coli* oriundas das lesões de celulite aviária foram calculados na forma de porcentagem de amostras (n=22) para cada antimicrobiano e estão representados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Valores em porcentagem dos resultados dos antibiogramas.

ANTIBIÓTICOS	Resistente	Intermediário	Sensível
Ampicilina	59,09%	4,55%	36,36%
Gentamicina	40,90%	4,55%	54,55%
Tetraciclina	4,55%	13,63%	81,82%
Enrofloxacina	36,36%	36,36%	27,28%
Cefalotina	54,55%	13,63%	31,82%
Cefalexina	59,09%	4,55%	36,36%
Eritromicina	81,82%	18,18%	0%
Penicilina	100%	0%	0%
Sulfonamida	90,91%	0%	9,09%
Doxiciclina	4,55%	9,09%	86,36%
Cloranfenicol	0%	4,55%	95,45%
Neomicina	4,55%	22,73%	72,72%
Cefazolina	50%	0%	50%
Espiramicina	100%	0%	0%
Amoxicilina	68,18%	0%	31,82%
Norfloxacina	18,18%	13,64%	68,18%

Todas as amostras apresentaram resistência a pelo menos 2 antimicrobianos. Estes resultados são similares aos observados por Ferreira & Knobl (*apud* Artencio, 2007) em que verificaram que amostras de *E. coli* isoladas de aves são frequentemente multiresistentes a drogas. Na **Figura 1** observa-se uma amostra resistente a espiramicina, cefazolina e amoxicilina e sensível apenas a norfloxacina.

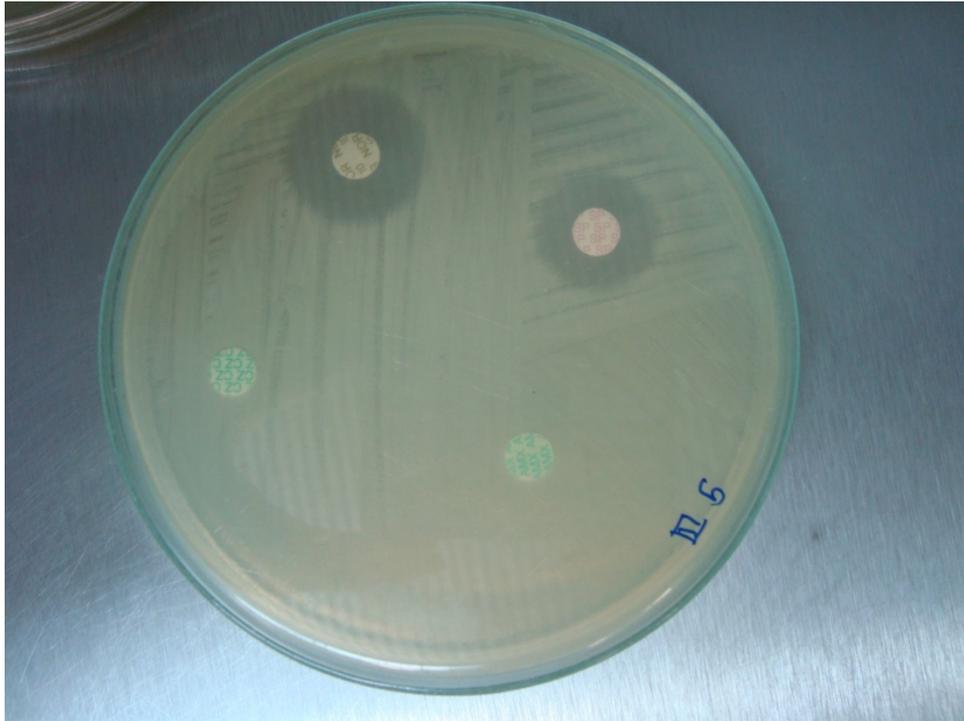


Figura 1. Amostra resistente a espiramicina, cefazolina, amoxicilina e sensível a norfloxacin.

Mais da metade das amostras apresentaram resistência para os antibióticos da classe dos Beta-lactâmicos. Para ampicilina, 13 amostras se mostraram resistentes e para amoxicilina, 15 amostras. Todas as cepas foram resistentes a penicilina. Zanatta *et al.* (2004), em um estudo semelhante, encontraram valores aproximados de resistência para ampicilina e amoxicilina (58% para as duas). Gonçalves (2005) encontrou também em amostras de *E. coli* coletadas de lesões (aerossaculite, pericardite e traqueíte) de frangos de corte, 100% de resistência a penicilina.

Apresentaram resistência ao antibiótico cefazolina que pertence ao grupo das Cefalosporinas de primeira geração (também membro do grupo dos beta-lactâmicos) 11 amostras. Para cefalexina e cefalotina, foram observadas, respectivamente, 13 e 12 amostras resistentes. Esse resultado foi condizente com o estudo realizado por Zanatta *et al.* (2004), que encontraram resistência a cefalexina e cefalotina em 54,6% das amostras de sua pesquisa. Segundo Gonçalves (2010), a incidência de beta-lactamases de espectro estendido (que conferem resistência aos antimicrobianos

beta-lactâmicos) tem aumentado em todo o mundo, sendo frequentemente descritas em cepas de *Escherichia coli* em isolados clínicos humanos.

Quanto à classe dos Macrolídios, todas as 22 amostras foram resistentes para espiramicina e nenhuma amostra foi sensível para eritromicina. Gonçalves (2005) obteve em um estudo semelhante 100% das amostras resistentes a eritromicina. É sabido que todos os microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* possuem resistência intrínseca aos antimicrobianos do grupo dos macrolídios (Anvisa, 2007).

Para a sulfonamida, 90,91% das amostras foram resistentes. Alta prevalência de resistência a sulfonamida tem sido observada em bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli*, encontradas em animais e em humanos por todo o mundo, de acordo com Wu *et al.* (2010).

Quanto à classe dos aminoglicosídeos (neomicina e gentamicina), os valores foram discrepantes, com 40,9% das amostras resistentes para gentamicina e apenas 1 amostra resistente para neomicina (72,72% das amostras se mostraram sensíveis a ela). No estudo realizado por Yang *et al.* (2004) foi observado um valor aproximado de amostras resistentes a gentamicina (30%).

Para cloranfenicol nenhuma amostra se mostrou resistente. Resultado semelhante foi observado no estudo feito por Gonçalves & Andreatti Filho (2010) que utilizaram 27 amostras de *E. coli* isoladas de aves de diversas idades e finalidades (pintinhos, frango de corte e reprodutoras) com quadros de colibacilose (96,3% das amostras foram sensíveis). No Brasil, o uso do cloranfenicol foi proibido em todos os animais produtores de alimentos, em 2003 (PAMVET, 2009).

Quanto às fluoroquinolonas, no caso da enrofloxacina houve uma distribuição relativamente proporcional entre as amostras resistentes (36,36%), intermediárias (36,36%) e sensíveis (27,28%). Já para a norfloxacina a maioria das amostras foram sensíveis (68,18%). Gonçalves & Andreatti Filho (2010) encontraram 100% das amostras sensíveis para norfloxacina.

Na classe das tetraciclina (tetraciclina e doxiciclina) para cada antibiótico apenas 1 amostra foi resistente. Esse resultado difere de vários outros estudos, como os realizados por Yang *et al.* (2004), Abreu *et al.* (2010), Gonçalves (2005) e Zanatta *et al.* (2004), que encontraram valores elevados de resistência a tetraciclina

(100%, 80%, 100% e 76% respectivamente). O uso da tetraciclina como aditivo em rações é proibido atualmente no Brasil (PAMvet-PR, 2005).

2. PCR (Detecção dos genes de resistência a antimicrobianos pela reação em cadeia da polimerase)

Genes responsáveis por uma variedade de formas de resistência antimicrobiana foram investigados nas 22 amostras de *Escherichia coli*, por PCR. Os resultados estão apresentados na **Tabela 2** em forma de porcentagem de amostras positivas e negativas para a presença dos genes. Apenas em 1 amostra não foi detectado nenhum dos genes de resistência pesquisados.

Tabela 2. Resultados das PCRs em porcentagem de amostras positivas e negativas

Genes	Resistência		
	Antimicrobiana	Amostras positivas	Amostras negativas
sul1	sulfonamida	68,18%	31,82%
SHV	beta-lactâmico	27,27%	72,73%
cat1	cloranfenicol	36,36%	63,64%
aac(3)-I	aminoglicosídeo	27,27%	72,73%
ereA	macrolídeo	50%	50%
tetA	tetraciclina	4,55%	95,45%
tetB	tetraciclina	0%	100%
tetC	tetraciclina	0%	100%

O gene *sul1* foi detectado em 15 amostras (**Figura 2**). Todas elas também se apresentaram como resistentes a sulfonamida no teste do antibiograma. O gene *sul1* tem sido encontrado, quase exclusivamente, em plasmídeos conjugativos de grande peso molecular e em integrons classe 1 (Wu *et al.*, 2010). Integrons classe 1 são os integrons mais comumente encontrados em isolados clínicos de Gram-negativas. Estes possuem o gene *sul1* em sua estrutura (na região conservada 3'), conferindo resistência a sulfonamidas (Sabaté *et al.*, 2002).

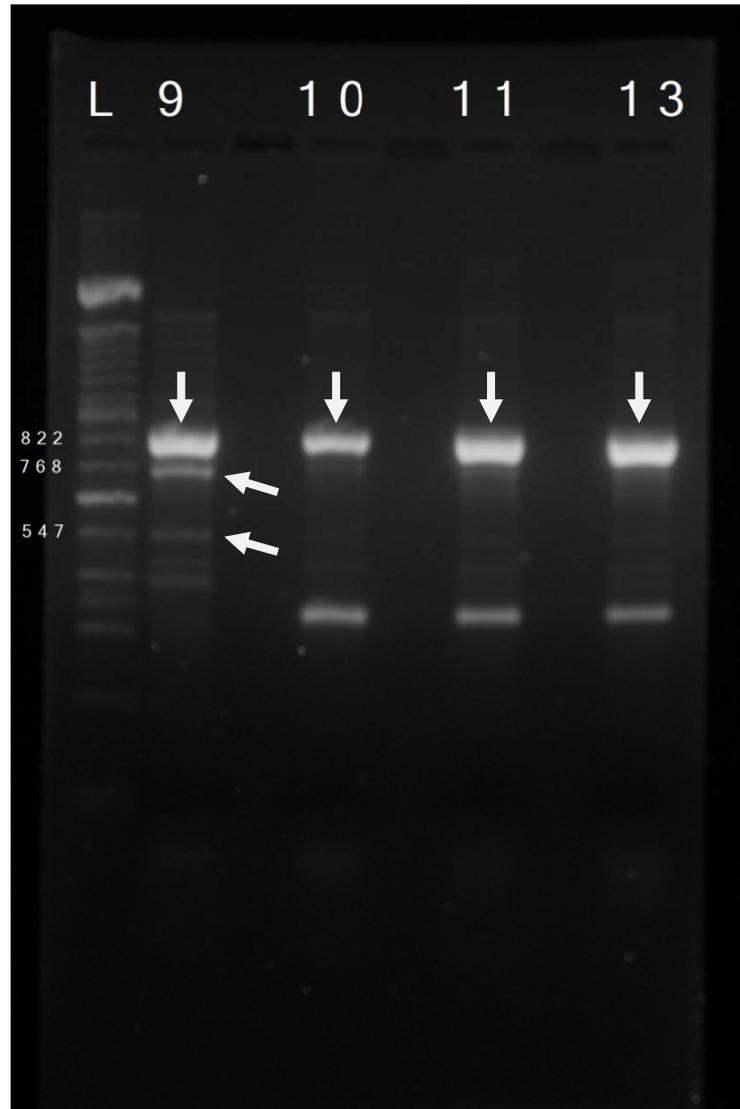


Figura 2. Resultado da multiplex da PCR das amostras 9, 10, 11 e 13 (L = ladder 100bp). Todas são positivas para a presença do gene *sul1*, formando as bandas mais fortes (822 bp). A amostra 9 é positiva para o gene *SHV* (768 bp) e para o gene *cat1* (547 bp) além do gene *sul1*.

O gene *SHV* foi detectado em 6 amostras. Todas elas apresentaram no antibiograma resistência a pelo menos 1 antimicrobiano da classe dos beta-lactâmicos. Enzimas do tipo SHV fazem parte do grupo de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Frequentemente, a expressão de ESBL está associada com resistência a múltiplas drogas e disseminação por plasmídios de resistência (Ozgumus *et al.*, 2008).

O gene *cat1* foi detectado em 8 amostras apesar de nenhuma das 22 amostras testadas no antibiograma ter apresentado resistência ao cloranfenicol. O

fato de portar o gene não significa que a bactéria seja resistente, pois pode ocorrer um baixo nível de expressão. Assim, o desenvolvimento de resistência é dependente do modo e do nível de expressão do gene (Livermore, 1987; Lui *et al.*, 1992 *apud* Remonato *et al.*, 2005).

O gene *aac(3)-I* foi detectado em 6 amostras. Trata-se de uma enzima modificante de aminoglicosídeos do tipo acetiltransferase, relacionada à integrons classe 1, que confere resistência a gentamicina, sisomicina e fortimicina (Riccio *et al.*, 2003; Elbourne & Hall, 2006). Das 6 amostras positivas para o gene, 4 foram resistentes para gentamicina no antibiograma e 2 foram sensíveis.

O gene *ereA* foi detectado em 11 amostras. No teste de antibiograma para o antibiótico eritromicina, 2 destas amostras foram classificadas como intermediárias e as outras 9 foram resistentes. O gene *ereA* (localizado em um integron classe 2) codifica a enzima eritromicina esterase que confere alto nível de resistência a eritromicina (Biskri & Mazel, 2003).

Os genes *tetA*, *tetB* e *tetC* são relacionados à resistência aos antibióticos do grupo das tetraciclina. Destes três genes, apenas o *tetA* foi encontrado neste estudo, ocorrendo somente em 1 amostra. Esta mesma amostra foi a única que se mostrou resistente as tetraciclina (doxiciclina e tetraciclina) no teste de antibiograma. Os genes *tetA*, *tetB* e *tetC* são codificadores de bombas de efluxo e conferem resistências as tetraciclina diminuindo a concentração intracelular do antibiótico (Roberts, 1998).

Em um estudo realizado por Guerra *et al.* (2003) com isolados de *E. coli* de origem aviária, bovina e suína, 42% das amostras foram positivas para o gene *sul1*, 66% para o gene *tetA* e 42% para o gene *tetB*. Já no trabalho de Van *et al.* (2008) que utilizaram isolados de *E. coli* de carne crua (bovina, suína e de frango) e de marisco, 39,5% das amostras foram positivas para o gene *sul1*, 71,1% para o gene *tetA*, 18,4% para o gene *tetB* e 18,43% para o gene *cat1*.

No presente estudo, é possível correlacionar os resultados dos antibiogramas e das PCRs com as informações contidas na **Tabela 3** e na **Tabela 4**.

Tabela 3. Resultado dos antibiogramas dos antimicrobianos que tiveram seu genes pesquisados na PCR. Classificação em resistente (R), sensível (S) e intermediário (I). (Legenda - AM: Ampicilina; CF: Cefalotina; CN: Cefalexina; P: Penicilina; CZ: Cefazolina; AMX: Amoxicilina; S: Sulfonamida; TE: Tetraciclina; DO: Doxiciclina; C: Cloranfenicol; GM: Gentamicina; E: Eritromicina).

GENES AMOSTRAS	SHV						sul1	tetA, tetB, tetC			cat1	aac(3)-I	ereA
	AM	CF	CN	P	CZ	AMX	S	TE	DO	C	GM	E	
1A	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	
1B	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	
2A	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	
2B	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	S	R	
3A	R	I	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	
3B	R	I	S	R	S	R	R	S	S	S	S	I	
4	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	
5	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	
6A	S	S	I	R	S	S	R	S	S	S	S	R	
7	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	
8A	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	I	
9	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	
10	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	
11	S	I	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	
12	I	R	R	R	S	R	R	I	S	S	I	R	
13	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	
14	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	R	
15	R	R	R	R	R	R	R	I	I	S	R	R	
16	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	
17	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	
18	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	R	
19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	

Tabela 4. Resultado da detecção de genes de resistência pela PCR.

AMOSTRAS	<i>sul1</i>	<i>SHV</i>	<i>cat1</i>	<i>aac(3)-I</i>	<i>ereA</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetC</i>
1A	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
1B	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
2A	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
2B	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
3A	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
3B	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
4	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
5	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
6A	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo
7	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
8A	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
9	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo
10	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
11	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
12	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
13	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
14	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
15	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
16	positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
17	positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
18	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
19	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo

O fato de que nem todas as cepas de *Escherichia coli* que se mostraram resistentes nos antibiogramas terem apresentado os genes de resistência traz a hipótese de que as resistências das amostras negativas na PCR podem estar sendo expressas através de outros mecanismos, como os citados anteriormente na revisão bibliográfica (ex.: alteração da permeabilidade aos antibióticos, retirada ativa do antibiótico do meio intracelular, etc.), ou podem estar sendo expressas por outros genes não pesquisados nesse estudo.

Conclusão

Foram observados níveis elevados de resistência antimicrobiana da *Escherichia coli* no presente estudo, inclusive em relação a antibióticos comumente utilizados na medicina humana. Dessa forma, a presença de bactérias resistentes a antibióticos em alimentos destinados ao consumo humano, como a carne de frango, pode se mostrar um risco para a saúde pública.

A maioria das amostras apresentou resistência a pelo menos 5 antimicrobianos. Isso confirma que o fenômeno da multiresistência tem ocorrido com grande frequência na atualidade, demonstrando a necessidade da adoção de medidas que controlem a disseminação de resistência aos antibióticos.

Em um levantamento realizado no Paraná sobre o uso e comercialização de medicamentos veterinários em frango de corte (PAMvet-PR, 2005) foi observado o uso de medicamentos veterinários não recomendados para aves e, também, o uso de medicamentos não recomendados como promotores de crescimento em frangos de corte. Essa questão reforça a possibilidade de que a alta resistência a antimicrobianos observada no presente estudo pode ter sido provocada pelo uso indevido desses fármacos nas granjas de aves de corte das quais as carcaças foram obtidas.

Referências Bibliográficas

AARESTRUP, F. M. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, USA, Editora ASM Press, 73p., 2006.

ABREU, D. L. DA C.; FRANCO, R. M.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. LÉO DE A.; ALVES, F. M. X.; ALMEIDA, J. F. Perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção do gene *iss* pela reação em cadeia da polimerase na tipificação de *Escherichia coli* patogênica em codornas de corte sob inspeção sanitária. Pesquisa Veterinária Brasileira. v. 30, n.5, p.406-410, 2010.

ANDRADE, C.L. Histopatologia e Identificação da *Escherichia coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte. Niterói, 2005. Dissertação (Mestrado em Higiene veterinária e Processamento tecnológico de produtos de origem animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2005.

ANDRADE, C. L.; FERREIRA, G. B.; FRANCO, R. M.; NASCIMENTO, E. R.; TORTELLY, R. Alterações patológicas e identificação da *Escherichia coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte inspecionados em um matadouro de São Paulo. *R. bras. Ci. Vet.*, v. 13, n. 3, p. 139-143, set./dez. 2006.

ANVISA. Curso: Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico. 2007. Acesso em 14/05/2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaudef/controlere/rede_rm/cursos/rm_control/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm>

ANVISA. Curso: *Staphylococcus*. 2008. Acessado em: 04/06/2011. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/servicosaudef/controlere/ap_curso_capacitacao_sentinelas_e_lac_en/staphylococcus_antonio_carlos_pignatari.ppt>

ARTENCIO, J. O. Perfil de Resistência a antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária isoladas no Estado do Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária, Programa de pós-graduação em ciências veterinárias. Porto Alegre, 2007.

BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; CORRÊA, A.; FERREIRA, A. J. P.; CALDERARO, F. F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.69, n.2, p.15-18, abr./jun., 2002.

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J-P; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: Diseases of Poultry. 10th ed. Ed. Calnek, B. D. Ames: University Press, 1997. p. 631-644. 1231p.

BISKRI L, MAZEL D. Erythromycin esterase gene ere(A) is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(10):3326–3331.

BRASIL, Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. Estabelece procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n.59, p.266, 26 mar. 2004. Seção 1.

BRITO, B. G., TAMEHIRO, C. Y.; OKANO, W.; LUZARDO, M. M., BERBEL, M. M.; GUIMARÃES, I. G. Celulite cervical em frangos de corte causada por *Escherichia coli*. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.23, n.01, p.81-84, 2002.

DIAS, V. G. G. Principais mecanismos de resistência antimicrobiana: uma breve revisão. Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília, 2010.

ELBOURNE, L. D. H.; HALL, R. M. Gene Cassette Encoding a 3-*N*-Aminoglycoside Acetyltransferase in a Chromosomal Integron. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 June; 50(6): 2270–2271.

FRANCO, R. M.; MANTILLA, S. P. S.; GOUVÊA, R.; OLIVEIRA, L. A. T. Resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de carne e dejetos suínos. Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.4, n.1, p.31-36, 2010.

GONÇALVES, P. M. R. *Escherichia coli* com detecção do gene *iss* por PCR, micoplasmas e salmonelas na qualidade sanitária de frangos de corte ao abate. Tese de Doutorado. Universidade Federal Fluminense. 84p. 2005.

GONÇALVES, G. A. M., ANDREATTI FILHO, R. L. Susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frango industrial (*Gallus gallus domesticus* - LINNAEUS, 1758) com colibacilose. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.77, n.4, p.715-718, out./dez., 2010.

GONÇALVES, T. M. P., Caracterização de genes que codificam para beta-lactamases de espectro alargado em *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2010.

GUERRA, B., JUNKER, E., SCHROETER, A., MALORNY, B., LEHMANN, S., HELMUTH, R. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2003) **52**, 489–492. DOI: 10.1093/jac/dkg362. Advance Access publication 29 July 2003.

INFORMATIVO CEFAR DE MICROBIOLOGIA. Atualidades Científicas. *Escherichia coli*. Ano III - Ed. 15 - Mai/Jun/2006 - Circulação Bimestral. Acessado em:

25/05/2011. Disponível em:
<http://www.cefarc.com.br/download/jornal_14ed_web.pdf>

KANASHIRO, A. M. I; STOPPA, G. F. Z. Resistência bacteriana antimicrobiana e a indústria avícola. Instituto Biológico, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=134>. Acessado em 20/05/2011.

MOTA, Rinaldo Aparecido *et al.* Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, v. 42, n. 6, 2005. Disponível em <http://www.revistasusp.sibi.usp.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962005000600010&lng=pt&nrm=iso>. Acessos em 23 maio 2011.

NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition*. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NETO, A. A. A.; MIRANDA, C. C. M. Inspeção de aves. Universidade Castelo Branco, Pró-reitoria de pesquisa e pós-graduação. Curso de pós-graduação “*latu sensu*” em higiene e inspeção de produtos de origem animal. Goiânia, 2009.

OZGUMUS, Osman Birol *et al.* Horizontal dissemination of TEM- and SHV-type beta-lactamase genes-carrying resistance plasmids amongst clonal isolates of Enterobacteriaceae. Braz. J. Microbiol., São Paulo, v. 39, n. 4, Dec. 2008 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822008000400007&lng=en&nrm=iso>. access on 06 June 2011.

PAMVET. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. Relatório 2006-2007. Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (5º e 6º anos de atividades). Anvisa, 2009.

PAMvet-PR. Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. Levantamento do Uso e Comercialização de Medicamentos Veterinários em Frango de Corte. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA). 2005.

PEREIRA, S. L. S. Condenações no abate de frangos de corte. Universidade Castelo Branco, Pró-reitoria de pesquisa e pós-graduação. Curso de pós-graduação “latu sensu” em higiene e inspeção de produtos de origem animal e vigilância sanitária em alimentos. Campinas, 2009.

PESSANHA, R.P.; GONTIJO FILHO, P.P.. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de *Enterobacteriaceae* lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v. 53, n. 1, Feb. 2001 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000100018&lng=en&nrm=iso>. access on 07 June 2011.

REMONATTO, G.; BOLZAN, V.; ZANCHI, A. C.; D'AZEVEDO, P. A. Detecção Molecular da Resistência Bacteriana - Ênfase para *Enterococcus* e *Streptococcus*. Curso de Pós Graduação em Ciências Médicas da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre. NewsLab - edição 70 – 2005.

RICCIO, M. L., J. D. DOCQUIER, E. DELL'AMICO, F. LUZZARO, G. Amicosante, and G. M. Rossolini. 2003. Novel 3-*N*-aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ic*, from a *Pseudomonas aeruginosa* integron. Antimicrob. Agents Chemother. 47:1746-1748.

ROBERTS, M. C. Resistance to Tetracyclines, Macrolides, Trimethoprim and Sulfonamides. MOLECULAR BACTERIOLOGY. Methods in Molecular Medicine, 1998, Volume 15, 641-663.

ROBERTS, M. C., J. SUTCLIFFE, P. COURVALIN, L. B. JENSEN, J. ROOD, AND H. SEPPALA. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2823-2830.

SABATÉ, M.; NAVARRO, F.; MIRO, E. *et al.* Novel complex sul1-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*_{CTX-M-9}. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Aug. 2002, p. 2656–2661. Vol. 46, No. 8.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3^o ed. Cold Sping Harbor. Laboratory Press, New York, 2001.

SANTANA, A.P., MURATA, L.S., FREITAS, C.G., DELPHINO, M.K., MACMANNUS, C.P. Causes of condemnation of carcasses from poultry in slaughterhouses located in State of Goiás, Brazil. *Ciência Rural*, v.38, *in press*, 2008.

SOLER, K. A. G. S. Isolamento e identificação molecular de *Vibrio metschnikovii* em amostras ambientais e análise do perfil de suscetibilidade a antibióticos. Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. São Paulo, 2011.

SOUSA JUNIOR, M. A.; FERREIRA, E.S.; CONCEIÇÃO, J. C. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. NewsLab - edição 63 – 2004.

SPINOSA, H; GÓRNIK, S. L; BERNARDI, M. M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 4^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

UBA. União Brasileira de Avicultura. Avicultura Brasileira: Sistema de produção, distribuição geográfica, exportações e importância sócio-econômica. 2009. Acesso: 26 de abril de 2010. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/CAMARAS_CONSELHO_S/CAM_CON_CAMARAS/SETORIAIS/AVES%20E%20SUINOS/APRESENTACOES/XV_RO/APP_TOMELIN_0.PDF>

VAN, T.T.H., CHIN, J., CAHPMAN, T., TRAN, L.T., COLOE, P.J. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *Int. Journal of food microbiology*. 124 (2008) 217-223.

VIEIRA, T. B., FRANCO, R. M., MAGALHÃES, PRAXEDES, H., C. I. S., TORTELLY. Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária: aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. *R. bras. Ci. Vet.*, v. 13, n. 3, p. 174-177, set./dez. 2006.

WU, S.; DALSGAARD, A.; HAMMERUM, A. M.; PORSBO, L. J.; JENSEN, L. B. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2010, 52:47.

YANG, H.; CHEN, S.; WHITE, D.G.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R.; MENG, J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 8, p. 3483-3489, 2004.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia Molecular Básica*. 3ª edição. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003.

ZANATTA, G. F; KANASHIRO, A. M. I.; CASTRO, A. G. M.; CARDOSO, A. L .S. P.; TESSARI, E. N. C. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. Arquivo Instituto Biológico. v.71, n.3, p.283-286, 2004.