

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Enterobacterales* ISOLADAS
DE GALINHAS POEDEIRAS E CAPIRAS EM CONDIÇÕES SEMIÁRIDAS
BRASILEIRAS**

KATIANNY BEZERRA DE MEDEIROS

**PATOS-PB-BRASIL
NOVEMBRO DE 2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Enterobacterales* ISOLADAS
DE GALINHAS POEDEIRAS E CAPIRAS EM CONDIÇÕES SEMIÁRIDAS
BRASILEIRAS**

KATIANNY BEZERRA DE MEDEIROS

**PATOS-PB-BRASIL
NOVEMBRO DE 2021**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Enterobacteriales* ISOLADAS
DE GALINHAS POEDEIRAS E CAPIRAS EM CONDIÇÕES SEMIÁRIDAS
BRASILEIRAS**

**KATIANNY BEZERRA DE MEDEIROS
MÉDICA VETERINÁRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo

Co-orientadora: Prof. Dra. Carolina de Sousa Américo Batista Santos

PATOS-PB-BRASIL

NOVEMBRO DE 2021

M488r Medeiros, Katianny Bezerra de.
Resistência antimicrobiana em *Enterobacteriales* isoladas de galinhas poedeiras e caipiras em condições semiáridas brasileiras / Katianny Bezerra de Medeiros. – Patos, 2022.
72 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2021.
"Orientação: Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo; Coorientação: Prof.^a Dr.^a Carolina de Sousa Américo Batista Santos".
Referências.

1. Galinhas. 2. *Enterobacteriales*. 3. Multirresistência. 4. Antimicrobianos. 5. CTX-M. 6. CMY. I. Azevedo, Sérgio Santos de. II. Santos, Carolina de Sousa Américo Batista. III. Título.

CDU 636.5(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

TÍTULO: “Resistência antimicrobiana em *Enterobacteriales* isoladas de galinhas poedeiras e caipiras em condições semiáridas brasileiras”

AUTORA: Katianny Bezerra de Medeiros

ORIENTADOR: Dr. Sergio Santos Azevedo

CO-ORIENTADORA: Dra. Carolina de Sousa Américo Batista Santos

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO

Dr. Sergio Santos Azevedo
UAMV/UFCEG
Presidente

Dra. Carolina de Sousa Américo Batista
Santos UAMV/UFCEG
Coorientadora

Dr. Tiago Casella FAMERP
1º Examinador

Dra. Rosália Severo de
Medeiros UACB/UFCEG
2º Examinador

Patos- PB, 26 de novembro de 2021

Prof. Dr. José Fábio Paulino de Moura
Coordenador PPGCA/CFSTR/UFCEG
Mat. SIAPE1508999

Prof. Dr. José Fábio Paulino de
Moura Coordenador

Agradecimentos

Gratidão a Deus por nunca desistir de mim nem me abandonar nos momentos que fraquejei, desacreditando nos Seus planos. Toda honra e toda glória ao Senhor.

Aos pais maravilhosos que eu e minha irmã poderíamos ter, duas joias que não viam problema em matar um ou milhares de leões por dia para ver suas filhas realizarem seus sonhos, amo-os imensamente.

A minha irmã pelas orientações, conselhos e motivação para eu não desistir, meu exemplo de mulher determinada que não tem medo de explorar o desconhecido e desafia seus medos, te amo.

Ao meu esposo que esteve e está sempre junto a mim, meu professor, estagiário, companheiro de todas as horas, suas palavras motivacionais e de superação estarão sempre guardadas, e prontas para ajudar quem necessita.

Ao meu orientador Prof. Sérgio Azevedo pelos ensinamentos e por ter confiado a mim o desenvolvimento desse trabalho.

A minha co-orientadora, mentora de grandes ideias, que idealizou esse projeto, sem ela esse trabalho não teria forma. Grata pelos “puxões de orelha” e pela oportunidade de me proporcionar conhecer um pouco mais dessa área de estudo. Sua preocupação em sempre ensinar, colocando seus pupilos a pensar e sair do comodismo enobrece a carreira tão essencial que a senhora segue e faz com amor.

Aos professores doutores Rosália Severo, Tiago Casella e José Givanildo por aceitarem o convite para participar da banca.

Ao Dr. Tiago Casella do Centro de Investigação de Microrganismos FAMERP e Hospital de Base de São José do Rio Preto pela disponibilidade em ajudar nas orientações teóricas e práticas desse projeto, sua participação foi essencial.

Ao laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário da UFCG, Patos-PB, nesse setor conseguir aprender não apenas a identificar bactérias e suas resistências, mas também a como trabalhar em equipe e fazer boas amizades. Grata pelos ensinamentos e companhia Neide, Gisele, Hanna, Débora, Vitória, professora Carol, José Diniz e todos os estagiários que passam por esse setor.

Aos funcionários do Hospital Veterinário que contribuíram direta e indiretamente no desenvolvimento desse trabalho, desde o deslocamento para as propriedades até o fornecimento de papel toalha.

Ao seu Cuité (*in memoriam*) pessoa humilde que não tinha tempo ruim, seu sorriso será sempre lembrado, juntamente com suas ideias inovadoras e disposição para ajudar.

A Neide e Gisele, grandes profissionais e amigas, vocês foram essenciais na minha vida pessoal e de pós-graduanda, obrigada pelas risadas e comidas deliciosas, além dos conselhos mais justos e sinceros, nunca esquecerei de vocês.

A todos os professores e servidores que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

A Universidade Federal de Campina Grande pela oportunidade dado aos alunos a realizem uma pós-graduação e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido.

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Enterobacterales* ISOLADAS DE GALINHAS POEDEIRAS E CAIPIRAS EM CONDIÇÕES SEMIÁRIDAS BRASILEIRAS

RESUMO

A produção avícola de carne e ovos no Brasil está em crescimento e gera emprego e renda não somente aos grandes produtores como também às pequenas famílias rurais, que utilizam esses produtos para subsistência. Para manter a saúde desses animais e aumentar a produtividade, o uso de antimicrobianos de modo empírico e descontrolado se elevaram, e como consequência as bactérias se tornaram reservatórios de genes de resistência aos antimicrobianos, caracterizando um problema de Saúde Pública global. Dessa maneira, os objetivos deste trabalho foram isolar e identificar microrganismos provenientes da cloaca de galinhas poedeiras e caipiras do semiárido brasileiro, caracterizar o perfil de resistência e identificar genes de resistência antimicrobiana dos isolados. Foram colhidos 330 suabes cloacais de galinhas poedeiras e caipiras criadas em condições semiáridas brasileiras (165 suabes de galinhas poedeiras e 165 de galinhas caipiras), no período de setembro de 2019 a setembro de 2020. As amostras foram submetidas a cultivo bacteriano com posterior identificação bioquímica, e nos isolados foram verificados a suscetibilidade aos antimicrobianos, teste fenotípico para produção de ESBL e identificação de genes de resistência, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CMY}. Foram isoladas 152 *Enterobacterales* de galinhas poedeiras e 198 de galinhas caipiras. Os microrganismos mais frequentemente isolados de galinhas poedeiras foram *E. coli* (73,7%), *Klebsiella* spp. (13,2%), *Proteus mirabilis* (5,3%) e *Salmonella* spp. (3,3%), e para galinhas caipiras *E. coli* (68,2%), *Klebsiella* spp. (12,6%), *Edwardsiella* spp. (10,1%) e *Salmonella* spp. (3,6%) foram os mais frequentes. As bactérias isoladas de galinhas poedeiras e caipiras apresentaram maiores susceptibilidade a tetraciclina, ampicilina, norfloxacina, amoxicilina+ácido clavulânico, ertapenem, imipenem e meropenem. Foram observados 69 (45,4%) isolados com multirresistência nas galinhas poedeiras e 36 (18%) de galinhas caipiras. Os genes detectados nas amostras de galinhas poedeiras foram CTX-M em oito isolados com o grupo *bla*_{CTX-M1-like} (quatro *E. coli* e quatro *Klebsiella* spp.), *bla*_{CTX-M2-like} identificado em seis isolados (dois *E. coli*, três *Klebsiella* spp. e um *Salmonella* spp.), *bla*_{CTX-M8-like} em sete isolados (seis *E. coli* e um *Klebsiella* spp.) e o gene CMY-2 em nove *E. coli* e duas *Klebsiella* spp. Para as galinhas caipiras foram observados gene *bla*_{CTX-M1-like}, *bla*_{CTX-M2-like} e *bla*_{CMY-2} em três *E. coli*. Conclui-se que a emergência e disseminação de bactérias produtoras de genes de resistência, em especial a produção de CTX-M e CMY em cloacas de galinhas poedeiras em comparação das galinhas caipiras, alerta para a possível difusão destes genes de resistência na interface humana, animal e nos ecossistemas estudados.

Palavras-chaves: Galinhas, *Enterobacterales*, Multirresistência, Antimicrobianos, CTX-M, CMY.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *Enterobacterales* ISOLATED FROM LAYING HENS AND FREE-RANGE CHICKENS IN SEMI-ARID CONDITIONS IN BRAZIL

ABSTRACT

The poultry production of meat and eggs in Brazil is growing and generates employment and income not only for large producers but also for small rural families, who use these products for subsistence. To maintain the health of these animals and increase productivity, the use of antimicrobials in an empirical and uncontrolled way has increased, and as a consequence bacteria have become reservoirs of antimicrobial resistance genes, characterizing a global public health problem. Thus, the objectives of this study were to isolate and identify microorganisms from the cloaca of laying hens and free-range chickens in the Brazilian semiarid region, characterize the resistance profile and identify antimicrobial resistance genes of the isolates. A total of 330 cloacal swabs from laying hens and free-range chickens raised in Brazilian semiarid conditions (165 swabs from laying hens and 165 swabs from free-range chickens) were collected from September 2019 to September 2020. The samples were subjected to bacterial culture with subsequent biochemical identification, and in the isolates were checked for susceptibility to antimicrobials, phenotypic test for ESBL production and identification of resistance genes, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{CMY}. A total of 152 *Enterobacterales* were isolated from laying hens and 198 from free-range hens. The microorganisms most frequently isolated from laying hens were *E. coli* (73.7%), *Klebsiella spp.* (13.2%), *Proteus mirabilis* (5.3%) and *Salmonella spp.* (3.3%), and *E. coli* (67.5%), *Klebsiella spp.* (12.5%), *Edwardsiella spp.* (10.0%) and *Salmonella spp.* (3.5%) were the most frequent for free-range chickens. Bacteria isolated from laying hens and free-range chickens showed higher susceptibility to tetracycline, ampicillin, norfloxacin, amoxicillin+clavulanic acid, ertapenem, imipenem and meropenem. Sixty-nine (45.4%) isolates with multidrug resistance were observed in laying hens and 36 (18%) from free-range chickens. The genes detected in the samples from laying hens were CTX-M in eight isolates with the *bla*_{CTX-M1-like} group (four *E. coli* and four *Klebsiella spp.*), *bla*_{CTX-M2-like} identified in six isolates (two *E. coli*, three *Klebsiella spp.* and one *Salmonella spp.*), *bla*_{CTX-M8-like} in seven isolates (six *E. coli* and one *Klebsiella spp.*), and the CMY-2 gene in nine *E. coli* and two *Klebsiella spp.* For free-range chickens, *bla*_{CTX-M1-like}, *bla*_{CTX-M2-like} e *bla*_{CMY-2} genes were observed in three *E. coli*. We conclude that the emergence and dissemination of bacteria producing resistance genes, especially the production of CTX-M and CMY in laying hen cloacae compared to free-range hens, alerts to the possible diffusion of these resistance genes at the human-animal interface and in the ecosystems studied.

Keywords: Chickens, *Enterobacterales*, Multiresistance, Antimicrobials, CTX-M, CMY.

Lista de Tabelas

CAPÍTULO I

Tabela 1- Frequência de bactérias isoladas de galinha poedeiras no semiárido brasileiro, no período de setembro de 2019 a fevereiro de 2020.....	33
Tabela 2- Perfil de sensibilidade dos antimicrobianos isolados de galinhas poedeiras no semiárido brasileiro (n=152), no período de setembro de 2019 a fevereiro de 2020.....	33
Tabela 3- Bactérias com perfil de multirresistência determinado pelos índices MAR e MCAR, em galinhas poedeiras do semiárido brasileiro.....	34
Tabela 4- Detecção de genes <i>bla</i> _{CTX-M} e CMY, subtipagem em grupos RFLP isoladas de galinha poedeiras no semiárido brasileiro (n=152), no período de setembro de 2019 a fevereiro de 2020.....	35

CAPÍTULO II

Tabela 1- Frequência de isolados bacterianos (n=198) de galinhas caipiras (<i>Gallus Gallus domesticus</i>) no semiárido brasileiro, no período de fevereiro a agosto de 2020.....	59
Tabela 2- Perfil de sensibilidade dos antimicrobianos dos isolados de galinha caipiras (<i>Gallus Gallus domesticus</i>) no semiárido brasileiro (n=198), período de julho de 2020 a setembro de 2020.....	59
Tabela 3- Bactérias com perfil de multirresistência determinado pelos índices MAR e MCAR, em galinhas caipiras (<i>Gallus Gallus domesticus</i>) do semiárido brasileiro.....	60
Tabela 4- Detecção do gene <i>bla</i> _{CTX-M} e CMY, subtipagem em grupos RFLP em galinhas caipiras (<i>Gallus Gallus domesticus</i>) no semiárido brasileiro (n=198), no período de julho de 2020 a setembro de 2020.....	61

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

%- percentual

(P<0,05)- significância inferior a 5%

(P>0,05) – significância superior a 5%

AmpC- Beta-lactamases cefamicinases

BHI- Brain Heart Infusion

BrCAST- Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

°C- Grau Centígrado

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEUA- Comissão de ética no uso de animais

CLSI- Clinical and laboratory standards intitute

cm- Centímetros

CTX-M- beta-lactamase cefotaximase

CMY- Variante de enzima beta-lactamas

ESBL- beta-lactamase de espectro ampliado

EUCAST- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

h- Horas

kg- Quilograma

MAR- Múltipla resistência antimicrobiana

MCAR- Múltipla resistência a classe antimicrobiana

µg- micrograma

µl- microlitro

mL- Mililitro

mm- Milímetro

PAN-BR-Agro- Plano de ação nacional ara prevenção e controle da resistência aos antimicrobinos no âmbito da agropecuária

PCR- Reação em Cadeia de Polimerase

TSI- Triple Sugar Iron Agar

UFMG- Universidade Federal de Campina Grande

VM- Vermelho de Metila

VP- Voges-Proskauer

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	14
REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO I.....	25
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	27
INTRODUÇÃO.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
Local de estudo, amostragem e colheita de amostras biológicas.....	29
Isolamento e identificação bacteriana.....	30
Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e teste fenotípico de beta-lactamases.....	30
Identificação de genes de resistência.....	32
Análise estatística.....	32
RESULTADOS.....	32
DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	43
CAPÍTULO II.....	51
RESUMO.....	52
ABSTRACT.....	53
INTRODUÇÃO.....	54
MATERIAL E MÉTODOS.....	55
Local de estudo, amostragem e colheita de amostras biológicas.....	55
Isolamento e identificação bacteriana.....	56
Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e teste fenotípico de beta-lactamases.....	56
Identificação de genes de resistência.....	58
Análise estatística.....	58
RESULTADOS.....	58
DISCUSSÃO.....	61

CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	67
CONCLUSÃO GERAL	74

INTRODUÇÃO GERAL

O mercado avícola se mantém em ascensão no mundo, e entre os alimentos mais consumidos globalmente estão a carne de aves e ovos. A demanda por esses produtos tem sido impulsionada pelo crescimento populacional e urbano, fácil acesso e preço baixo, pouca gordura, além de não apresentar barreira religiosa (FAO, 2021). Para o avanço dessa produção foram desenvolvidos tecnologia nutricional, mudança no manejo, abate e processamento, resultando assim em alimentos seguros (FAO, 2021). Dentre os países de maior produção de frango de corte se destacam os Estados Unidos, China e Brasil, correspondendo também os dois primeiros países como maiores consumidores (EMBRAPA, 2021).

Na década de 1950 a produção avícola brasileira iniciou seu desenvolvimento comercial a partir do sistema de produção artesanal, em que os frangos caipiras eram comercializados abatidos ou vivos em feiras, e esse mercado se destacava na região Sudeste até que se expandiu para a região Sul na década de 70 (ZEN et al., 2014). O desenvolvimento tecnológico investido na produção de aves como melhoramento genético e alimentar, formulação de vacinas, sanidade animal e equipamentos levou ao crescimento de grandes agroindústrias envolvidas com o abastecimento de produtos avícolas no mercado, melhorando a produção de ovos, pintainhos e carne de frango (MARTINS et al., 2012; GALLE et al., 2020).

A base alimentar da população brasileira, assim como no mundo, consiste na proteína de origem animal avícola cujo preço atrai o consumidor devido seu baixo custo, em média R\$14,73 o Kg, diferente do preço cobrado na carne bovina que custa R\$ 31,94 o Kg e a carne suína R\$ 22,53 o Kg, tornando-se o produto mais consumido (BEEFPOINT, 2020).

A produção e o abate de aves estão presentes em todas as regiões brasileiras, mantendo a região Sul em alta com 64,41%, seguido das regiões Sudeste (16,02%), Centro-Oeste (15,70%), Nordeste (2,44%) e Norte (1,44%). A maioria (68%) dos produtos elaborados é destinada para o consumo interno, enquanto 32% são para exportação (ABPA, 2020). Os mercados estrangeiros designados a comprar produtos avícolas brasileiros se concentram no Oriente Médio, principal comprador com 1.581.422 toneladas, seguido da Ásia com

1.232.399 toneladas, África 497.537 toneladas, União Europeia 407.440 toneladas e América 369.953 toneladas (TREME; SILVA, 2020).

Devido à procura dos produtos avícolas pela China e no comércio interno brasileiro, estimava-se que a produção de frango crescesse aproximadamente 13,975 milhões de toneladas métricas em 2020 (MENDES, 2019). É possível notar a importância dessa criação na pecuária brasileira, gerando tributos, renda e emprego a aproximadamente 4 milhões de pessoas, de maneira direta ou indireta (ABPA, 2020).

Além da comercialização dos frangos industriais, a produção de galinhas caipiras vem ganhando espaço no mercado. Essas aves eram originalmente destinadas ao consumo familiar ou da comunidade, onde os produtores tinham pouca renda e com a comercialização das galinhas conseguiam gerar lucro e melhorar a qualidade de vida (ALMEIDA et al., 2013). O sistema de produção desses animais é o semi-intensivo, onde as aves possuem abrigo, são alimentadas com rações comerciais, além de serem imunizadas contra doenças (ROCCHI et al., 2019). Essa forma de produção atrai novos consumidores que valorizam o bem-estar animal, e estão preocupados com a saúde, segurança e sustentabilidade (MIELE, 2011; MACHADO, 2018). Embora desenvolvimentos científicos e tecnológicos tenham sido propostos para os produtores elevarem sua produção caipira, existem algumas situações que os criadores desconhecem quanto ao manejo sanitário e as doenças, utilizando empiricamente medicamentos como antimicrobianos no tratamento de doenças virais ou parasitárias (ALEGRIA-MORAN et al., 2017).

O aumento da população mundial contribuiu para criação de animais em função da necessidade de suprir as exigências nutricionais do homem. Dessa forma, a procura por esse tipo de alimento fez com que alguns países como Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul modificassem seu sistema de produção para a pecuária intensiva. Esse novo cenário propiciou o uso de antimicrobianos com finalidade de manter a saúde dos animais, com uso terapêutico ou profilático, além de diminuir a mortalidade e aumentar a produtividade como estimuladores de crescimento (SILVA et al., 2013; ZHU et al., 2013), no entanto, vem favorecendo a seleção de microrganismos no intestino dos animais, com a eliminação daqueles que produzem toxinas (MAHMOOD; GUO, 2020).

Em 2010 o uso dos antibióticos na produção animal fora de 63.151 toneladas, com maiores participantes no consumo a China (23%), Estados Unidos (13%), Brasil (9%), Índia (3%) e Alemanha (3%), com estimativa que esse uso global aumente em 67% (105.596 toneladas) no ano de 2030 (VAN BOECKEL et al., 2015). Para manter em alta a produção da carne, o manuseio desses antibióticos nos animais tornou-se diário e sem controle, e como resultado contribuiu para o aparecimento de bactérias multirresistentes (GARCIA-MIGURA et al., 2014).

A carne de frango pode armazenar microrganismos que atuam como reservatórios de genes de resistência a diversos antimicrobianos de importância clínica, como β -lactâmicos, quinolonas, tetraciclina, entre outros (OLESEN et al., 2005; GAROFALO et al., 2007; DHANJI et al., 2010; RANDALL et al., 2011; LAUBE et al., 2013;).

As bactérias Gram-negativas, principalmente da ordem *Enterobacterales* são reportadas como produtoras da enzima β -lactamases (SILVA; LINCOPAN, 2012). Sua classificação varia de forma molecular, baseada na composição dos aminoácidos e dos genes (classificação de Ambler - A, B, C e D), ou de acordo com as características enzimáticas e o perfil de inibição dos inibidores de β -lactamases (classificação de Bush/Jacoby/Medeiros, entre 1 a 4) (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

As β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) compõe a classe A de Ambler e o grupo 2be de Bush-Jacoby-Medeiros (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995), são capazes de inativar penicilinas, aztreonam e cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações, demonstram sensibilidade a cefamicina e são inibidas pelo ácido clavulânico (GUTKIND et al., 2013). Várias famílias de ESBL estão disseminadas pelo mundo, como a TEM, SHV, CTX-M, SFO, BES, BEL, TLA, GES, PER e VEB, no entanto a que se destaca é CTX-M por ser mais encontrada (BUSH; PALZKILL; JACOBY, 2015; CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012; PATERSON; BONOMO, 2005). No Reino Unido e na Suécia já foi isolada *E. coli* produtora de CTX-M 2 em peito de frango importadas do Brasil (DHANJI et al., 2010; EGERVÄRN et al., 2014; WARREN et al., 2008), preocupando a saúde pública, pois essas bactérias produtoras de enzimas estão associadas a morte em hospitais (HAWKEY, 2015).

A administração dos β -lactâmicos nas produções avícolas para o tratamento de doenças infecciosas, resultou na seleção de *Enterobacterales* produtoras de ESBL e AmpC no trato gastrointestinal das aves (MENDES et al., 2013). Os β -lactâmicos, principalmente as cefalosporinas e os carbapenêmicos, são as classes de antibióticos de eleição para o tratamento de infecções graves do homem e em alguns casos na produção animal, com isso se mostra a importância desses antimicrobianos tanto para a saúde humana como para medicina veterinária (COQUE; BAQUERO; CANTÓN, 2008; WHO, 2012; OIE, 2014).

As AmpC são tipos de β -lactamases pertencentes ao grupo 1 de Bush-Jacob-Medeiros e da classe C de Ambler (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). Essas enzimas são codificadas por genes cromossômicos, e apresentam resistência a maioria das penicilinas, as cefalosporinas de 1º, 2º e 3º geração e ao aztreonam, além de não serem suscetíveis aos inibidores de β -lactamases (BUSH, 2001).

A CMY é uma AmpC plasmidial (pAmpC) que vem se propagando, já tendo sido detectada em *E. coli* isoladas de carne de frango fresca nos EUA e fezes de búfalos no Paraná, além de ser encontrado em *Salmonella enterica* nos frangos produzidos no Rio Grande do Sul (MOLLENKOPF et al., 2011; AIZAWA et al., 2014; MATTIELLO et al., 2015).

Os carbapenêmicos compõem a subclasse dos antibióticos β -lactâmicos da classe dos Penams, sendo representados pelos antimicrobianos imipenem, ertapenem e meropenem, dispostos de uma ampla ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, aeróbicas e anaeróbicas (ZHANEL et al., 2007). A ineficácia dos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos resultou no uso dos carbapenêmicos e na geração de novos padrões de resistência (ANDRADE; DARINI, 2017), que consiste na produção de enzimas β -lactamases, carbapenemases, com maior poder de degradar quase todos os β -lactâmicos (GNIADAK; CARROLL; SIMNER, 2016). As carbapenemases são divididas em dois grupos; a serina-carbapenemase pertencente à classe molecular A de Ambler e ao grupo 2f funcional de Bush-Jacob-Medeiros, sendo encontrada pela primeira vez em uma *Klebsiella pneumoniae* com resistência ao imipenem e meropenem, passando a ser denominada KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase) e com considerável importância nas infecções hospitalares (JACOBY, 2006). O segundo

grupo, metalo-carbapenemase, constitui a classe molecular B de Ambler e ao subgrupo 3 A funcional de Bush-Jacob-Medeiros, com capacidade de hidrolisar todos os β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos (QUEENAN; BUSH, 2007). Essa β -lactamase passou a ser disseminada pelo mundo, ocasionando infecções hospitalares e contaminando o ambiente, sendo a principal metalo- β -lactamase adquirida presente nas *Enterobacterales* (JOHNSON; WOODFORD, 2013; ANDRADE; DARINI, 2015).

Além dos patógenos que contêm genes de ESBL ou pAmpC colaborarem na disseminação da resistência através da carne de aves, animais vivos e considerados saudáveis podem eliminar as bactérias ao meio ambiente, via esterco nos casos dos bovinos, e pela cama aviária que são usadas como adubos, acumulando esses microrganismos no solo que sofrem lixiviação e atingem os lenções freáticos e rios, sendo capaz de se instalar na vegetação (LJUBOJEVIC et al., 2016).

Dessa forma, vem se discutindo a relação do uso excessivo dos antimicrobianos na produção animal, e suas consequências na seleção de bactérias com genes de resistência associados às infecções de difícil tratamento. Com isso, a manutenção desses patógenos resistentes no homem, ambiente e animais promove a permanência e dispersão desses microrganismos (ECONOMOU; GOUSIA, 2015; JINDAL et al., 2015; VAN BOECKEL et al., 2015).

Com o intuito de controlar e prevenir os casos de bactérias resistentes ou super-resistentes, o Ministério da Saúde desenvolveu juntamente com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a Instrução Normativa nº41- Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única, que têm como objetivos capacitar profissionais com atuação das áreas da saúde humana, animal e ambiental em casos de resistência, estabelecer um sistema de vigilância ao uso de antimicrobianos, prevenção e controle de infecções comunitárias, instituir medidas de prevenção e controle de infecções no âmbito da agropecuária (GHUNAIM; ABU-MADI; KARIYAWASAM, 2014; MAPA, 2018). Como parte desse plano foi elaborado o Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Agropecuária-PAN-BR AGRO (IN nº41) devendo ser concluído o plano para o setor agropecuário em quatro anos, de 2018 a 2022, com

o objetivo de monitorar o uso de antimicrobianos e resistência em frangos de corte, indústrias de produtos de origem animal e produtores de alimentação para animais, assegurando a capacidade de manter a eficácia e segurança dos medicamentos quando administrados (MAPA, 2018).

A existência de *Enterobacteriales* crítica na saúde humana e o isolamento de patógenos em frangos com resistência a antimicrobianos tornou-se um risco para o homem, em vista da transferência de materiais genéticos resistentes dos animais para eles. Desse modo, o presente estudo buscou isolar microrganismos com resistência a antibióticos e identificar seu perfil genético a partir de galinhas poedeiras e caipiras do semiárido nordestino, que possui condições específicas, caracterizada por clima seco e quente, com baixa precipitação e bioma correspondido pela caatinga. Essa dissertação é composta por dois capítulos: no capítulo I será abordada a identificação de microrganismos Gram-negativos da cloaca de galinhas poedeiras pertencentes a granjas poedeiras localizadas no semiárido do Brasil, avaliando o perfil de susceptibilidade antimicrobiana, assim como seus índices de resistência múltipla às classes e às drogas, além de caracterizar genotipicamente a produção de ESBL e seus genes *bla_{CTX-M}* e a produção de AmpC com seus genes *bla_{CMY}*, discutindo os impactos que o uso indiscriminado de antimicrobianos causam no ambiente, na saúde animal e humana, e suas consequências na disseminação de cepas resistente. No capítulo II, buscou-se o isolamento de bactérias Gram-negativas de galinhas caipiras de propriedades de subsistência, produtoras de ovos e carne pelos produtores rurais do semiárido brasileiro, conhecendo os isolados e os índices de múltipla resistência às classes e medicamentos testados, além de pesquisar a produção de ESBL e seus genes *bla_{CTX-M}* e AmpC com seus genes *bla_{CMY}*, discutindo a presença desses achados e os impactos que são promovidos na Saúde Pública.

Hipótese: Existem *Enterobacteriaceae*s de prioridade crítica em galinhas poedeiras e caipiras, o isolamento desses microrganismos da cloaca das aves, comparando a frequência das bactérias, a susceptibilidade antimicrobiana e os genes de resistência entre esses diferentes sistemas de criação está relacionada ao contato direto que essas aves possuem com o homem e as doenças transmitidas por elas, assim como o uso contínuo de antimicrobianos como estimuladores de crescimento, profiláticos e terapêuticos relacionados a casos de

bactérias resistentes transmitidas ao homem e responsável por danos à Saúde Pública, além da proliferação desses agentes entre as aves e outras espécies de animais, dificultando o uso de antibióticos pela deficiência do seu mecanismo de ação frente as bactérias modificadas.

REFERÊNCIAS

AIZAWA, J. et al. Identification of fluoroquinolone-resistant extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-8)-producing *Escherichia coli* ST224, ST2179 and ST2308 in buffalo (*Bubalus bubalis*). **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2866–2869, 2014.

ALEGRIA-MORAN, R. et al. First detection and characterization of *Salmonella* spp. In poultry and swine raised in backyard production systems in central Chile. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 15, p. 3180–3190, 2017.

ALMEIDA, E. C. DE J. et al. Características de carcaça de galinha naturalizada Peloco comparada a linhagens de frango caipira. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 11, p. 1517–1523, 2013.

AMBLER, R. P. The Structure of β -Lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980.

ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C. Bacilos Gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse? **Journal of Infection Control**. v. 6, n. 1. 2017. Disponível em: <<http://www.jic.abih.net.br/index.php/jic/article/view/173/pdf>>. Acesso em: 05 mar. 2021.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL-ABPA. **Relatório anual 2020**. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2021.

BEEFPOINT. Com disparada de preço, consumidor trocar carne bovina por porco e frango. 2020. Disponível em: <<https://www.beefpoint.com.br/com-disparada-de-preco-consumidor-trocar-carne-bovina-por-porco-e-frango/>>. Acesso em: 20 mar. 2021.

BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 32, n. 7, p. 1085–9, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A Functional Classification Scheme for β Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.

BUSH, K.; PALZKILL, T.; JACOBY, G. A. **β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes**. 2015. Disponível em: <<https://www.lahey.org/lhmc/research-residencies/research/translational-research/>>. Acesso em: 21 mar. 2021.

CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. **Front Microbiol**, v. 3, p. 110, 2012.

COQUE, T.M; BAQUERO, F.; CANTÓN, R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. **Review articles**. 2008. Disponível em:<
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002018303964?casa_token=nvEurV-DxRsAAAAA:IF9_KlvCXDNJ6TuGKgCwvRGag8AoBs7108JyMnl5bz32wDBdi1JH0EWyG90BpHd0uAcPI53vZho1>. Acesso em: 20 abr. 2021.

DHANJI, H. et al. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia Coli* isolated from raw chicken imported into the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 65, n. 12, p. 2534-2537. 2010.

ECONOMOU, V.; GOUSIA, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. **Infection and Drug Resistance**, v. 8, p. 49–61, 1 abr. 2015.

EGERVÄRN, M. et al. *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. **International Journal of Food Microbiol**, v. 171, p. 8–14, 2014.

EMBRAPA. **Estatística-Mundo-Frango de corte**. 2021. Disponível em:<
<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/mundo>>. Acesso em: 07 jun. 2021.

EMBRAPA. **Estatística-Mundo-Frango de corte**. 2021. Disponível em:<
<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/mundo>>. Acesso em: 07 jun. 2021.

FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Production**. 2021. Disponível em: <<https://www.fao.org/poultry-production-products/production/en/>>. Acesso em: 06 mai. 2021.

GALLE, V. et al. Vantagem comparativa revelada da indústria da carne de frango brasileira e dos principais *players* (2009-2016). **Ver. Elet. Cient. da UERGS**, V.6, n.01, p.42-53, 2020. Disponível em:<
<http://revista.uergs.edu.br/index.php/revuergs/article/view/2374/469>>. Acesso em: 20 jun 2021.

GARCIA-MIGURA, L. et al. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 1–2, p. 1–9, 2014.

GAROFALO, C. et al. Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat. **International Journal of Food Microbiology**. v. 113, n. 979 1, p. 75-83. 2007.

GHUNAIM, H; ABU-MADI, MA; KARIYAWASAM, S. Advances in vaccination against avian pathogenic *Escherichia coli* respiratory disease: Potentials and limitations. **Veterinary Microbiology**. 2014;172(1-2):13-22.

- GNIADK, T.J.; CARROLL, K.C.; SIMNER, P.J. Carbapenem-Resistant Non Glucose-Fermenting Gram-Negative Bacilli: the Missing Piece to the Puzzle. **J Clin Microbiol [Review]**. V.54, n.7, p1700-10, 2016.
- GUTKIND, G. O. et al. β -lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 2, p. 164–208, 2013.
- HAWKEY, P.M. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of globalization. **Journal of Hospital Infect**, 89, pp. 241-247, 2015.
- JACOBY, G.A. Beta-lactamase nomenclature. **Antimicrob Agents Chemother**. 2006 Apr;50(4):1123-9.
- JINDAL, A. K.; PANDYA, K.; KHAN, I. D. Antimicrobial resistance: A public health challenge. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 2, p. 178–181, 1 abr. 2015.
- JOHNSON, A.P.; WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)- mediated carbapenem resistance. **J Med Microbiol**. V.62, p.499-513, 2013.
- LAUBE, H. et al. Longitudinal monitoring os Extended-Spectrum1014 Beta-Lactamase/AmpC- Producing Escherichia Coli at German Broiler Chicken fattening 1015 farms. **Journal Applied and Environmental Microbiology**. v. 79, n. 16, p. 4815-4820. 2013.
- LJUBOJEVIĆ, D. et al. Epidemiological significance of poultry litter for spreading the antibiotic-resistant strains of Escherichia coli. **World's Poultry Science Journal**, v. 72, n. 3, p. 485–494, set. 2016.
- MACHADO, L. P. M. **Curva de Crescimento e Características de Carcaças de Galinhas Canela-Preta em Diferentes Sistemas de Criação**. 2018. Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2018.
- MAHMOOD, T; GUO, Y. Dietary fiber and Chicken microbiome interaction: Where will it lead to? **Animal nutrition**, v.6, 2020.
- MAPA. **PANBR-AGRO**. 2018. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumosagropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/pan-br-agro> >. Acesso em: 04 mar. 2021.
- MARTINS, J.M.S. et al. Melhoramento genético de frangos de corte. **PUBVET**, Londrina, V. 6, N. 18, Ed. 205, Art. 1371, 2012.
- MATTIELLO, S. P. et al. Characterization of antimicrobial resistance in Salmonella enterica strains isolated from Brazilian poultry production. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 5, p. 1227–1238, 3 nov. 2015.
- MENDES, F. R. et al. Utilização de antimicrobianos na avicultura. **Revista Eletrônica Nutrime**, v. 10, n. 2, p. 2352–2389, 2013.
- MENDES, C. Produção de frangos deve crescer 2,5% em 2020, diz USDA. **Avicultura industrial**,2019. Disponível em:<

<https://www.aviculturaindustrial.com.br/imprensa/producao-de-frangos-deve-crescer-25-em-2020-diz-usda/20190821-083535-o022>>. Acesso em: 27 mar. 2021.

MIELE, M. The taste of happiness : free-range chicken. **Environment and Planning A**, v. 43, n. 1, p. 2076–2091, 2011.

MOLLENKOPF, D. F. et al. Salmonella enterica and Escherichia coli Harboring blaCMY in Retail Beef and Pork Products. **Foodborne Pathog Dis**, v. 8, n. 2, p. 333–336, 2011.

OIE. List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. Paris: [s.n.]. Disponível em:< http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf>. Acesso em: 29 mar. 2021.

OLESEN, I. et al. Prevalence of β -lactamases among 1096 Ampicillin-Resistant Escherichia Coli and Salmonella isolated from food Animals in 1097 Denmark. **Microbial Drug Resistance**. v. 10, n. 4, p. 334-340. 2005.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 4, p. 657–686, 2005.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**.v. 20, n.3, 2007.

RANDALL, L. P. et al. Prevalence of Escherichia Coli carrying extended-spectrum β -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2007 and 2009. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66, p. 86-95. 2011.

ROCCHI, L. et al. Assessing the sustainability of different poultry production systems: A multicriteria approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 103–114, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.013>>. Acesso em: 28 mar. 2021.

SILVA, K.C; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012. Disponível em:< <https://www.scielo.br/pdf/jbpml/v48n2/a04v48n2.pdf>>. Acesso em: 24 mar. 2021.

SILVA N.C.C, et al. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in milk of cows with mastitis in Brazil. **Journal of Dairy Science**, 2013;96(11):6856–6862.

TREMEA, F.T; SILVA, A.C. O setor avícola no brasil e sua distribuição regional. **Economia & Região**, Londrina (Pr), v.8, n.1, p.183-200, jan./jun. 2020. Disponível:< <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/ecoreg/article/view/35464/26384> >. Acesso em: 26 mar. 2021.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, mai 2015.

WARREN, R. E. et al. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. **Journal Antimicrob Chemother**, v. 61, n. 3, p. 504–508, 2008.

WHO. **Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe**. Copenhagen, 2012. Disponível em:< WHO/Europe | Publications - Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe>. Acesso em: 02 fev. 2021.

ZEN, S. et al. Evolução da avicultura no Brasil. **Informativo CEPEA**, ed. 1, 4º trimestre, 2014. Disponível em:< <https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/revista/pdf/0969140001468869743.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2021.

Zhanel G.G. et al. Comparative review of the carbapenems. *Drugs [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Review]*. 2007;67(7):1027-52.

ZHU Y-G et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 2013;110(9):3435–3440.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS ISOLADOS DE GALINHAS DE GRANJAS POEDEIRAS (*Gallus Gallus domesticus*) EM CONDIÇÕES SEMIÁRIDAS

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE
A ANTIBIÓTICOS ISOLADOS DE GALINHAS DE GRANJAS POEDEIRAS (*Gallus
Gallus domesticus*) EM CONDIÇÕES SEMIÁRIDAS**

RESUMO

A produção brasileira de ovos e carnes de frango são voltados para o mercado interno e externo, sendo 99,59% dos ovos e 68% da carne aviária produzida destinadas ao consumo interno, e 32% da carne ao mercado estrangeiro, dessa forma o Brasil é considerado um importante fornecedor de alimento avícola para o mundo. Visando manter a saúde das aves foram inseridos antibióticos na alimentação desses animais, resultando no uso indiscriminado e na seleção de bactérias resistentes. Os β -lactâmicos são os antibióticos mais usados na clínica veterinária, humana e na produção animal, conduzindo seu uso na seleção de bactérias resistentes produtoras de β -lactamases, já tendo sido isolados ESBL ou AmpC em amostras de frangos e ovos no Brasil, tornando-se um risco a Saúde Pública. Os objetivos desse trabalho foram isolar e identificar microrganismos da cloaca de galinhas poedeiras no semiárido brasileiro, caracterizar o perfil de resistência e identificar os genes de resistência antimicrobiana dos isolados. As amostras foram coletadas de *swabs* cloacais de galinhas poedeiras, em seguida semeadas em ágar MacConkey. As colônias bacterianas foram identificadas por provas bioquímicas tradicionais e a susceptibilidade aos antimicrobianos foi testada pela técnica de disco-difusão, e para detecção dos genes *bla*_{ESBL} e *bla*_{AmpC} usou-se PCR. Foram avaliadas 165 galinhas poedeiras e obteve-se crescimento de 152 *Enterobacteriales*. Os principais microrganismos isolados foram *Escherichia coli* (73,68%), *Klebsiella* spp. (13,16%), *Proteus mirabilis* (5,26%) e *Salmonella* spp. (3,29%). Apresentando os isolados bacterianos consideráveis índice de resistência frente a tetraciclina (59,21%), ampicilina (56,58%), norfloxacina (42,76%), enrofloxacina (42,11%) e ertapenem (17,76%); dos 152 isolados bacterianos 69 (45,4%) continham multirresistência, e 74 (48,7%) dos isolados com MCAR \geq 0,25. Os genes detectados foram *bla*_{CTX-M}, em oito isolados com o grupo *bla*_{CTX-M1-like} (*E. coli* e *Klebsiella* spp.), *bla*_{CTX-M2-like} identificado em seis isolados (*E. coli*, *Klebsiella* spp e *Salmonella* spp.), *bla*_{CTX-M8-like} em sete isolados (*E. coli* e *Klebsiella* spp.) e o gene CMY-2 em nove *E. coli* e duas *Klebsiellas* spp. Conclui-se que as galinhas poedeiras compõem na sua microbiota intestinal microrganismos carreadores de genes de resistência, relevando a importância desses achados tanto para a Saúde Pública como para a economia, colocando em risco esses dois campos pela falta de recursos para geração de medicamentos eficazes, além de gastos em hospitais com internamento e a espera para formular novos fármacos.

Palavras-chaves: Galinhas Poedeiras, *Enterobacteriales*, Antibióticos, Multirresistência, CTX-M, CMY, Saúde Pública.

CHARACTERIZATION OF MICROORGANISMS WITH SUSCEPTIBILITY PROFILE TO ANTIBIOTICS ISOLATED FROM LAYING HENS (*Gallus Gallus domesticus*) UNDER SEMI-ARID CONDITIONS

ABSTRACT

The Brazilian production of eggs and chicken meat is turned to the domestic and foreign market, with 99.59% of the eggs and 68% of the poultry meat produced for domestic consumption, and 32% of the meat for the foreign market, thus Brazil is considered an important supplier of poultry food to the world. In order to maintain the health of the birds, antibiotics were added to the food of these animals, resulting in the indiscriminate use and selection of resistant bacteria. β -lactams are the most used antibiotics in veterinary, human and animal production, leading to their use in the selection of resistant bacteria producing β -lactamases, having already been isolated ESBL or AmpC in chicken and egg samples in Brazil, making a risk to Public Health. The objectives of this work were to isolate and identify microorganisms from the cloaca of laying hens in the Brazilian semiarid region, characterize the resistance profile and identify the antimicrobial resistance genes of the isolates. Samples were collected using cloacal swabs from laying hens, then inoculated into MacConkey agar. Bacterial colonies were identified by biochemical tests and antimicrobial susceptibility was tested by disk-diffusion, for detection of blaESBL and blaAmpC genes using PCR. 165 laying hens were evaluated and 152 *Enterobacteriales* grew. The main microorganisms isolated were *Escherichia coli* (73.68%), *Klebsiella* spp. (13.16%), *Proteus mirabilis* (5.26%) and *Salmonella* spp. (3.29%). The bacterial isolates presented a considerable resistance index against tetracycline (59.21%), ampicillin (56.58%), norfloxacin (42.76%), enrofloxacin (42.11%) and ertapenem (17.76%); of the 152 bacterial isolates, 69 (45.4%) had multidrug resistance, and 74 (48.7%) of the isolates with MCAR \geq 0.25. The genes detected were bla_{CTX-M}, in 8 isolates with the bla_{CTX-M1-like} group (*E. coli* and *Klebsiella* spp.), bla_{CTX-M2-like} identified in 6 isolates (*E. coli*, *Klebsiella* spp and *Salmonella* spp.) , bla_{CTX-M8-like} in 7 isolates (*E. coli* and *Klebsiella* spp.) and the bla_{CMY-2} gene in nine *E. coli* and two *Klebsiella* spp. It is concluded that laying hens make up, in their intestinal microbiota, microorganisms that carry resistance genes, highlighting the importance of these findings both for Public Health and for the economy, putting these two fields at risk due to the lack of resources to generate effective drugs, in addition to spending on hospitals with hospitalization and waiting to formulate new drugs.

Keywords: Laying Hen, *Enterobacteriales*, Antibiotics, Multiresistance, CTX-M, CMY, Public Health.

INTRODUÇÃO

A produção brasileira de ovos e carnes de frango foram, respectivamente, de 49 bilhões de unidades e 13,245 milhões de toneladas, em 2019. Esses produtos são voltados para o mercado interno e externo, sendo 99,59% dos ovos e 68% da carne aviária destinados ao consumo interno (ABPA, 2020). Mesmo que o Brasil exporte 32% da carne de frango, ainda assim é considerado um importante fornecedor de alimentos para o mundo, devido à elevada produção que associa seu crescimento ao melhoramento genético, sistema de criação e nutrição (ABPA, 2020).

Para manter as aves saudáveis durante o alojamento nos galpões e melhorar a absorção de nutrientes, antibióticos são inseridos na alimentação, e com a ascensão do mercado aviário o uso desses antimicrobianos tornou-se indiscriminado, levando a seleção de bactérias resistentes com capacidade de transferir os materiais genéticos modificados para os humanos pela alimentação (CHANTZIARAS et al., 2014). Em decorrência desse fator, e a inter-relação entre saúde humana, animal e ambiental, o uso de antimicrobianos como melhoradores de desempenho em animais foram suspensos, Portaria nº171, de 13 de dezembro de 2018 (MAPA, 2018).

Os beta-lactâmicos consistem nos principais antibióticos usados na clínica veterinária, humana e na produção animal, e apresentam na sua estrutura um anel beta-lactâmico responsável pela ação desses medicamentos (BUSH; BRADFORD, 2016; CLSI, 2016). Apesar de benefícios para produção avícola, o uso desordenado de antimicrobianos resulta na seleção de bactérias resistentes produtoras de enzimas como as β -lactamases, cefamicinases (AmpC), cefalosporinases, β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases (ANDRADE; DARINI, 2017). As ESBL atuam na degradação das cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos, que podem estar presentes no cromossomo bacteriano ou nos plasmídeos, já sendo descrito diversas famílias de ESBL (TEM, SHV, CTX-M, SFO, BES, BEL, TLA, GES, PER e VEB) (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010; BUSH; PALZKILL; JACOBY, 2015; SAMPAIO; GALES, 2016). Já as AmpC, são responsáveis por degradar principalmente cefamicinas e cefalosporinas de 1º e 2º geração (JACOBY, 2009; ANDRADE; DARINI, 2017). As enzimas são produzidas

por bactérias Gram-negativas, que as codificam através dos genes com localização cromossômicos plasmidial *bla*_{AmpC} (CMY, LAT, ACT, MIR, FOX, MOX, DHA, ACC) (LIVERMORE; WOODFORD, 2006; JACOBY, 2009; CARATTOLI, 2009).

Nas aves, especialmente os frangos, são portadores de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* que produzem AmpC e ESBL, com diferentes variantes. No Brasil, tem-se destacado a enzima CMY-2 para AmpC, e as CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-15 para ESBL, já isoladas em *E. coli* de carne de frango comercializada no mercado interno, assim como produtos exportados para países Europeus (DHANJI et al., 2010; MOLLENKOPF et al., 2011; CASELLA et al., 2015). Do ponto de vista da Saúde Pública as ESBLs tornaram-se um dos principais problemas de saúde global, causando serias implicações no que diz respeito às infecções hospitalares e da comunidade, o que resulta em elevados índices de mortalidade, principalmente em casos de infecção por *Enterobacterales*, destacando-se a rápida disseminação dessas enzimas e o surgimento constante de novas variantes, além de uma série de implicações para o agronegócio brasileiro (HAWKEY, 2015).

O semiárido nordestino é caracterizado por clima seco e quente, com precipitações baixas, vegetação correspondida pela caatinga, bioma exclusivamente brasileiro que ocupa 70% da região nordeste e 11% o território nacional e com fauna diversificada e única (SUASSUNA, 2019; TELES et al., 2020). São essas características peculiares do semiárido que oferecem condições epidemiológicas únicas que precisam ser estudadas de modos distintos de outros lugares do Brasil e do mundo. Desse modo, pesquisas devem ser desenvolvidas com diferentes espécies animais e nos seres humanos, com o objetivo de determinar a importância da resistência antimicrobiana na Saúde Pública nas condições do semiárido. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar bactérias isoladas das cloacas de galinhas poedeiras de granjas do semiárido brasileiro produtoras de ESBL ou AmpC.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo, amostragem e colheita de amostras biológicas

Foram utilizadas uma granja de galinhas poedeiras do estado da Paraíba e duas no estado do Rio Grande do Norte, semiárido do Nordeste do Brasil. O número

mínimo de animais a serem amostrados foi determinado pela fórmula para amostras simples aleatórias (Thrusfield; Christley, 2018), utilizando os seguintes parâmetros: (a) nível de confiança de 95%; (b) frequência esperada de animais positivos de 50% (maximização da amostra) e erro amostral de 10%. Conforme esses parâmetros seriam requeridos 96 animais, no entanto, foram colhidas amostras de *swab* cloacal de 165 galinhas poedeiras no período de setembro de 2019 a fevereiro de 2020.

Os *swabs* cloacais foram acondicionados em tubos de ensaio contendo meio de transporte Stuart e transportados sob refrigeração (2 a 8 °C) ao laboratório de microbiologia do Hospital veterinário da UFCG, campus Patos, onde foram imediatamente processados.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-UFCG sob protocolo de nº 67/2020.

Isolamento e identificação bacteriana

As amostras foram enriquecidas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) por 24 h na temperatura de 37°C e posteriormente semeadas em placas de Petri contendo o meio ágar MacConckey, com espessura de 3 a 4 mm. Após o cultivo, as placas foram incubadas à temperatura de 37°C em aerobiose por 24-48 horas para verificação do crescimento bacteriano. As colônias bacterianas foram submetidas ao exame bacterioscópico pelo método de coloração de Gram e identificadas pelas provas bioquímicas triplo açúcar ferro (TSI), motilidade, malonato, produção de indol, produção de urease, produção de gelatinase, produção de fenilalanina desaminase, utilização de citrato, reação de vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP), fermentação da lactose, hidrólise de esculina, redução de nitrato, catalase, oxidase e coagulase (MURRAY et al., 1999).

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e teste fenotípico de β -lactamases

Foram submetidas ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão em ágar Müeller-Hinton, de acordo com a técnica de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966), conforme recomendado pelo Brazilian Committee on

Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST, 2019) e Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019). A cepa *E. coli* CIP 76.24 (ATCC 25922) da coleção de cepas do Instituto Pasteur, foi utilizada como controle de qualidade neste ensaio por apresentar suscetibilidade conhecida a determinados antimicrobianos.

As seguintes classes de antibióticos foram avaliadas: Aminoglicosídeo-amicacina (30 µg), gentamicina (10 µg); Fluoroquinolonas - enrofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg); Fenicol - cloranfenicol (30 µg); Tetraciclina - tetraciclina (30 µg); cefalosporina de terceira geração- cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ceftazidima (30 µg), ceftiofur (30 µg); carbapenêmicos - ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg); β-lactâmicos aminopenicilícos- ampicilina (10 µg); aminopenicilina associado a inibidor de β-lactamase - amoxicilina/clavulanato (10 µg); cefamicina- cefoxitina (30 µg); cefalosporina de quarta geração- cefepima (30 µg); Monobactâmico - aztreonam (30 µg).

Para detecção de isolados multirresistentes aos antibióticos foi calculado o índice MAR (múltipla resistência antimicrobiana), calculada pela razão entre o número de bactérias com resistência antimicrobiana e o número de antimicrobianos testados, indicando multirresistência quando $MAR \geq 0,2$, enquanto que para avaliar a resistência das classes antimicrobianas foi analisado o índice MCAR (múltipla resistência a classe antimicrobiana), calculado pela razão entre o número de classes consideradas resistentes (ao menos uma droga por classe) e o número total de classes testadas (KRUMPERMAN, 1983). As bactérias que apresentaram fenótipo resistente a pelo menos três classes de antibióticos testados foram consideradas multirresistentes (MCAR maior ou igual a 0,25) (NGOI; THONG, 2013).

Com as colônias obtidas em ágar MacConkey foi realizada suspensão bacteriana em solução de NaCl estéril a 0,9%, comparando a turbidez com a escala 0,5 de McFarland para semear as bactérias no meio ágar Müller-Hinton e posicionar os discos de antibióticos avaliados, com posterior incubação a 37 °C por 18-24 horas. Foi procedida a leitura dos halos com deformação ou aparecimento de uma zona fantasma, formados pelos discos de aztreonam, ceftazidima, cefotaxima ou cefepime em direção a amoxicilina/ácido clavulânico, para identificação fenotípica de amostras produtoras de ESBL (BrCAST, 2019). Para bactérias suspeitas de

produzirem β -lactamase do tipo AmpC, foi avaliado o tamanho do halo de inibição da cefoxitina, inibidores de amoxicilina+ácido clavulânico (SINGH et al., 2013).

Identificação de genes de resistência

Após isolamentos das *Enterobacteriales* o DNA foi extraído pelo método de fervura, que consistiu em suspender 2 a 5 colônias do microrganismo em 200 μ L de água destilada estéril e submeter a 100 °C por 10 minutos. Essa suspensão foi centrifugada a velocidade máxima por 1 minuto, e o sobrenadante foi utilizado para os experimentos moleculares (CASELLA, 2015). Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etílico a 0,8%, em campo elétrico 6V/cm durante 120 minutos. Após a eletroforese, os resultados foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

A detecção dos genes de ESBL ou AmpC foi efetuada pelo uso da técnica de PCR e o ThermoFischer. Para a identificação dos genes *bla*_{CMY-2} e *bla*_{CTX-M} foi usado uma reação de multiplex-PCR e PCR convencional, seguindo a metodologia descrita por Dallenne et al. (2010) e Mammeri et al. (2010).

Análise estatística

Para comparação das frequências das bactérias isoladas das cloacas de galinhas foi utilizado o teste de qui-quadrado de aderência com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no ambiente R (R CORE TEAM, 2018) e interface RStudio.

RESULTADOS

Das 165 aves analisadas 152 (92,12%) apresentaram crescimento de *Enterobacteriales*. Na Tabela 1 são apresentados o número e a frequência de bactérias isoladas, sendo *Escherichia coli* o agente mais frequentemente encontrado (73,68%), seguido de *Klebsiella* spp. (13,16%), *Proteus mirabilis* (5,26%), *Salmonella* spp. (3,29%) e *Edwardsiella* spp. (2,63%). As demais bactérias isoladas apresentaram frequência de 0,66% ($P < 0,001$).

Tabela 1- Frequência de bactérias isoladas de galinha poedeiras no semiárido brasileiro, no período de setembro de 2019 a fevereiro de 2020.

Agentes	Número de swabs positivas	Frequência (%)
<i>Escherichia coli</i>	112	73,68
<i>Klebsiella</i> spp.	20	13,16
<i>Proteus mirabilis</i>	8	5,26
<i>Salmonella</i> spp.	5	3,29
<i>Edwardsiella</i> spp.	4	2,63
<i>Citrobacter</i> spp.	1	0,66
<i>Providencia</i> spp.	1	0,66
<i>Shigella</i> spp.	1	0,66
Total	152	100,00

Foram realizados 152 testes com drogas antimicrobianas neste estudo, dos quais 50 (32,89%) amostras foram consideradas resistentes a pelo menos um antibiótico e 5 (3,29%) com resistência intermediária. Os maiores índices de resistência frente aos antibióticos foram a tetraciclina (59,21%), ampicilina (56,58%), norfloxacina (42,76%), enrofloxacina (42,11%), gentamicina (22,37%), ceftriaxona (21,05%) e ertapenem (17,76%), sem desenvolver resistência ao imipenem e meropenem (Tabela 2).

Tabela 2- Perfil de sensibilidade dos antimicrobianos isolados de galinhas poedeiras no semiárido brasileiro (n=152), no período de setembro de 2019 a fevereiro de 2020.

CLASSES	ANTIMICROBIANOS	SEN. ¹ (%)	INT. ² (%)	RES. ³ (%)
Aminoglicosídeo	Amicacina (30 µg)	96,71	2,63	0,66
	Gentamicina (10 µg)	75,66	1,97	22,37
Aminopenicilínico associado a inibidor de β-lactamases	Amoxicilina +Ác.	92,11	0	7,89
	Clavulânico (10 µg)			

β-lactâmico aminopenicilínico	Ampicilina (10 μ g)	43,42	0	56,58
Cefalosporina 3^o geração	Cefotaxima (30 μ g)	83,55	3,29	13,16
	Ceftriaxona (30 μ g)	71,05	7,90	21,05
	Ceftazidima (30 μ g)	80,92	8,55	10,53
	Ceftiofur (30 μ g)	83,55	3,95	12,50
Cefamicina	Cefoxitina (30 μ g)	88,81	0	11,18
Cefalosporina 4^o geração	Cefepima (30 μ g)	83,55	4,61	11,84
Carbapenêmicos	Ertapenem (10 μ g)	82,24	0	17,76
	Imipinem (10 μ g)	98,03	1,97	0
	Meropinem (10 μ g)	98,03	1,97	0
Monobactâmico	Aztreonam (30 μ g)	73,03	16,45	10,53
Fluorquinolona	Norfloxacin (10 μ g)	55,26	1,97	42,76
	Enrofloxacin (5 μ g)	46,05	11,84	42,11
Fenicol	Clorafenicol (30 μ g)	91,45	0	8,55
Tetraciclinas	Tetraciclina (30 μ g)	38,82	1,97	59,21

¹ Sen.= Sensível;

² Int.= Intermediário;

³ Res.= Resistente.

Os índices de resistência a antimicrobianos (MAR) variaram de 0 a 0,67, com média de 0,19. Foram obtidos 69 (45,4%) isolados com índice MAR \geq 0,2. Com relação ao índice MCAR, os valores variaram de 0 a 0,82 e média de 0,24, e 74 (48,7%) isolados apresentaram MCAR \geq 0,25. Na Tabela 3 são apresentados os números de bactérias com índices MAR \geq 0,2 e MCAR \geq 0,25 com as respectivas médias por agente isolado (Tabela 3).

Tabela 3- Bactérias com perfil de multirresistência determinado pelos índices MAR e MCAR, em galinhas poedeiras do semiárido brasileiro.

Bactérias	No de isolados com MAR \geq 0,2	Média (MAR)	No de isolados com MCAR \geq 0,25	Média (MCAR)
<i>E. coli</i>	57	0,34	59	0,41
<i>Klebsiella</i> spp.	10	0,54	12	0,57
<i>Salmonella</i> spp.	1	0,56	2	0,46
<i>Edwadsia</i> spp.	1	0,28	1	0,36

Catorze amostras de *E. coli*, oito *Klebsiella* spp. e uma *Salmonella* spp. foram positivas para a expressão fenotípica de ESBL, enquanto dez *E. coli* e uma *Klebsiella* spp. para AmpC, sendo identificado uma *Klebsiella* spp. positiva para ESBL e AmpC. As bactérias foram submetidas ao teste genotípico, com identificação de quatro *E. coli* e quatro *Klebsiella* spp. com o gene *bla*_{CTX-M-1} Like, uma *Salmonella* spp., duas *E. coli* e três *Klebsiella* spp. com *bla*_{CTX-M-2} Like, seis *E. coli* com *bla*_{CTX-M-8} Like, e nove *E. coli* e duas *Klebsiella* spp. com *bla*_{CMY-2} (Tabela 4).

Tabela 4- Detecção de genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CMY}, em PCR multiplex isoladas de galinha poedeiras no semiárido brasileiro (n = 152), no período de setembro de 2019 a fevereiro de 2020.

<i>bla</i> _{CTX-M/CMY}	Agentes	Nº de isolados positivos
<i>bla</i> _{CTX-M1} like	<i>E. coli</i>	4
	<i>Klebsiella</i> spp.	4
<i>bla</i> _{CTX-M2} like	<i>E. coli</i>	2
	<i>Klebsiella</i> spp.	3
	<i>Salmonella</i> spp.	1
<i>bla</i> _{CTX-M8} like	<i>E. coli</i>	6
	<i>Klebsiella</i> spp.	1
<i>bla</i> _{CMY-2} like	<i>E. coli</i>	9
	<i>Klebsiella</i> spp.	2

DISCUSSÃO

Dentre as bactérias identificadas a espécie *E. coli* foi a mais frequente. Esse agente está presente com números elevados em diversos estudos, como o de Ferreira (2018) que teve como objetivo avaliar a microbiota de 200 frangos comerciais pertencentes as granjas avícolas do interior do Estado de São Paulo, com o processamento dos swabs cloacais dessas aves foram identificadas 200 bactérias, destas 184 (91,6%) eram *E. coli*; assim como em estudo desenvolvido por Campelo (2018) com objetivo de identificar *E. coli* e seu perfil de resistência antimicrobiana de 181 cloacas de galinhas poedeiras, criadas em propriedades de três municípios do Rio de Janeiro, conseguiu isolar 171 (94,5%) *E. coli*.

Diferentes fatores influenciam a dispersão dessa bactéria no ambiente, uma vez que ela pode sobreviver por longos períodos nas fezes excretadas, em poeira e na água, além dos nutrientes contidos no ambiente favorecerem a sua manutenção, dessa forma a presença de *E.coli* em animais e humanos tendem a aumentar (SAVIOLLI, 2010). Esse microrganismo apresenta relevância a saúde, por estar associada a infecções primárias e secundárias, bem como nos casos de resistência antimicrobiana (MACHADO et al., 2013; WEBER et al., 2015).

Além da *E. coli*, *Klebsiella* spp. também foi uma das bactérias mais isoladas. São encontradas no ambiente, rios, esgotos, solo, vegetação, trato gastrointestinal de humanos e animais, sendo envolvidas em infecções sistêmicas e locais (MELO et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; SHANKAR et al., 2018). Os achados do estudo é semelhante com o trabalho realizado por Vasconcelos (2017) cujo objetivo foi investigar cepas de enterobactérias isoladas de 50 carcaças de frango *in natura*, congelada e refrigerada adquiridas dos comércios das cidades de João Pessoa, Areia e Campina Grande, no Estado da Paraíba. Independente se as galinhas são produtoras de ovos ou carne é comum a presença dos mesmos agentes; elas apresentam um sistema de criação similar, em que o produtor busca o bem-estar da criação, mantendo normalmente as aves em galpões, com dietas balanceadas, além de serem imunizadas e em alguns casos são acompanhadas por veterinários e zootecnistas (WEIS; MACHADO; CAMARGO, 2021).

Cepas de *Klebsiella* spp. são identificadas em amostras cecais de frango de corte, apresentam genes de resistência a antibióticos β -lactâmicos e estão

correlacionadas a riscos zoonóticos, pela transmissão desse patógeno resistente por via alimentar (HIROI; YAMAZAK, 2012). Mesmo com possíveis problemas sanitários na produção agropecuária causados por essas bactérias, elas não fazem parte do Sistema Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana para Bactérias Entéricas (NARMS), não havendo um sistema de vigilância alimentar para esse patógeno (CDC, 2015).

Comumente são isolados microrganismos oportunistas em infecções humanas, como *Proteus* spp. que além de serem encontrados em ambientes hospitalares facilmente é encontrado no solo (KOENIG, 2012). Sua ação deteriorante nos alimentos refrigerados provoca modificações nos aspectos químicos e sensoriais dos ovos, carnes, frangos e pescado (CARVALHO, 2010). Em pesquisa desenvolvida no Distrito Federal que tinha como objetivo delinear o perfil microbiológico de 60 carcaças de frango, foram identificados *E. coli* (22%) e *Proteus* spp. (13,6%), ressaltando a importância que esses agentes representam nas doenças alimentares e a necessidade de um controle microbiano nos alimentos, buscando qualidade nos produtos (SILVA, 2013). Além de *Proteus* ser identificado em carcaças de aves, já foi isolado em ovos de feiras livres, aves silvestres, frangos de cortes e besouros encontrados na cama aviária, enfatizando assim as diversas formas que esse patógeno pode apresentar no ambiente e acometer várias espécies, perpetuando sua existência em diferentes locais (SEGABINAZI et al., 2005; FILHO et al., 2014).

Diversas bactérias da ordem *Enterobacterales* constituem o intestino das galinhas, atuando na digestão e absorção dos nutrientes, além de deteriorar os alimentos a partir do seu crescimento e multiplicação, modificando as condições físicas e químicas dos produtos, causando infecções intestinais e extraintestinais constituindo um risco à Saúde Pública, como é o caso da *Salmonella* (VASCONCELOS, 2018; BERSAN et al., 2019). Em estudo desenvolvido por Rebouças et al. (2020) com ovos de galinhas poedeiras comercializadas em mercados da cidade de Mossoró e Natal, com objetivo a identificação de *Salmonella* spp. na casca e no conteúdo interno dos ovos, do total de 360 ovos avaliados 60 apresentaram crescimento desse agente (4,17%), correspondendo 2,5% na casca e 1,67% na gema, e tal fato pode ser explicado pelo comprometimento na integridade dos ovos e estocagem desse alimento. Ainda que o trabalho tenha sido

desenvolvido com ovos há uma semelhança nos achados da presente pesquisa, sugerindo que durante a postura realizada pelas galinhas há uma contaminação ambiental e dos ovos, em resultado da falta de limpeza dos galpões que contribui para o constante contato dos ovos e das aves com suas fezes infectadas.

Diferentes hospedeiros abrigam *Edwardsiella* spp. sendo frequente seu isolamento em peixes, mas também está presente em aves, répteis e mamíferos (XU; ZHANG, 2014). Os resultados do trabalho corroboram com a pesquisa desenvolvida no Ceará, que teve como objetivo isolar enterobactérias de fezes de patos domésticos, das 65 amostras foi isolado 1,9% dessa enterobactéria, assim como no estudo com amostras fecais de frangos que objetivava identificar patógenos de criação industrial no Ceará, obteve 3,3% de *Edwardsiella* spp. (OLIVEIRA et al., 2004; SILVA et al., 2014). Estudos mostram que esse microrganismo tem importância para aquicultura, no entanto é possível seu isolamento em animais e humanos, com desenvolvimento de doenças gastroenterites, já diagnosticado enterocolite, abscesso hepático, peritonite, osteomielite, meningite e sepse em neonatos (ARYA et al., 2011; GARCIA et al., 2012). O abastecimento de água para as galinhas poedeiras do presente estudo vinha de açudes da propriedade, tendo nesse local peixes e aves migratórias que em contato com os reservatórios poderiam contaminar a água, sugerindo dessa forma, o isolamento da *Edwardsiella*.

Foram isolados também *Citrobacter* spp., *Providencia* spp. e *Shigella* spp. em menor proporção. Essas bactérias estão distribuídas no ambiente e em diferentes espécies, algumas delas tem baixa virulência e permanecem no hospedeiro por longos períodos, logo esses agentes podem acumular material de resistência e transformar-se em patógenos perigosos, a exemplo da *Citrobacter* (GUIMARÃES et al., 2015; CUNHA et al., 2017).

Entre os isolados bacterianos foi verificada resistência para 16 antibióticos, dentre os 18 testados na avaliação de susceptibilidade *in vitro*. Estes antibióticos têm seu uso permitido na medicina veterinária na forma terapêutica, no entanto, não se pode manuseá-lo como promotor de crescimento ou conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2017). Ainda assim, são utilizados com esse propósito de modo incorreto, refletindo na seleção de microrganismos resistentes

capazes de transferir seu material genético de resistência para as bactérias presentes nos animais e no homem (MENDONÇA et al., 2016).

Ferreira et al. (2016) conduziram um estudo com 200 swabs cloacais colhidos de frango de corte comercializado no Estado de São Paulo, cujo objetivo era avaliar a população de enterobactérias e a presença de genes que codificam β -lactamase, na realização do teste de susceptibilidade antimicrobiana com os 16 isolados produtores de ESBL, foi possível detecta uma elevada resistência frente à tetraciclina e à gentamicina. Outra pesquisa (RAU, 2019) realizada com 309 amostras de carne de aves produzidas no Brasil, buscava identificar os sorovares mais prevalentes e a suscetibilidade de *Salmonella*, mostrando-se que esses isolados possuíam altos índices de resistências à tetraciclina, ciprofloxacino, ampicilina, cefotaxima e ceftazidima. Os resultados observados nos estudos citados acima são semelhantes aos encontrados neste, destacando a elevada taxa de resistência para tetraciclina, que pode ser explicado pelo uso desenfreado desse medicamento nas aves do estudo, tanto por parte dos produtores como pelos médicos veterinários que assistem as granjas da pesquisa.

Um surto de *E. coli* foi responsável pela morte de inúmeras aves de uma das granjas avaliadas e o principal medicamento usado para sanar esse problema era a base de tetraciclina, observando alta resistência desse patógeno e a ineficiência do fármaco. Também foi visto no teste de susceptibilidade que algumas bactérias apresentaram resistência ao ertapenem, antibiótico que compõe a classe dos carbapenêmicos, medicamentos de última escolha e de grande importância para saúde humana e animal (SPELLBERG et al, 2011; WHO, 2011). Considerando que a resistência aos antimicrobianos como ceftiofur e cefalosporinas de 1° e 2° geração estão em ascensão, faz-se necessário o tratamento com antibióticos mais potentes, no caso as classes dos carbapenêmicos, ampliando assim a resistência frente aos antibióticos mais importantes para a saúde (JEAN et al., 2005).

Na literatura muitos estudos apontam bactérias com múltipla resistência a antimicrobianos, como foi visto na presente pesquisa e no trabalho desenvolvido por Vasconcelos (2017) em carcaças de frango adquiridas do comércio das cidades de João Pessoa, Campina Grande e Areia, no Estado da Paraíba, que obtiveram 135 bactérias multirresistentes de um total de 151 amostras, além do trabalho de Benevides (2019) que identificou 80 *Salmonella* em granjas de postura do estado

de São Paulo e destas 32 isolados apresentaram padrões de múltipla resistência. Inúmeros relatos de multirresistência aos antimicrobianos são encontrados na medicina veterinária, desde animais de companhia, galinhas poedeiras e de corte até animais silvestres de vida livre, trazendo como consequência o aumento de infecções graves em humanos, com tratamento difícil e elevada mortalidade (ARIAS; CARRILHO, 2012). Portanto, a existência de bactéria com resistência a vários antimicrobianos em aves, indica a necessidade de controlar o uso desses medicamentos seja com propósito terapêutico ou de crescimento, minimizando a dispersão de cepas resistentes entre os animais e no homem (GALDINO et al., 2013; BEZERRA, 2017).

Enterobacteriales produtoras de CTX-M estão difundidas na população humana, em animais e nos produtos de origem animal, sendo as enzimas mais encontradas em aves CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-15 e TEM-52, semelhante com os genes identificados na pesquisa (CASELLA, 2015). Os resultados do trabalho também são similares aos de Conan (2014) cujo objetivo era detectar genes de resistência a diferentes classes de antimicrobianos em 30 amostras de peito de frango cru refrigerado e congelado, provenientes de supermercados, açougue e feiras do município de São Paulo, das amostras avaliadas 17 apresentaram um ou mais genes de resistência identificando através do sequenciamento os genes CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-8. Em amostras clínicas humanas o grupo CTX-M-1 e CTX-M-2 são predominantes, e encontrados em diferentes áreas do mundo já relatado em infecções causadas por *Salmonella enterica* (ROBIN et al., 2017; SANGARE et al., 2017).

Casos de *E. coli* e *Salmonella* spp. contendo CTX-M-2 e CTX-M-8 foram encontrados em carne de frango importado da América do Sul para Suécia e Reino Unido, a presença de ESBL em animais de produção considerados saudáveis e destinados ao consumo humano proporciona uma difusão desses agentes contendo genes que codificam resistência, questionando os riscos à saúde, em virtude de ser um problema emergente a população, além de causar danos ao agronegócio, em vista da importância do Brasil na exportação de frangos (DHANJI et al., 2010; SILVA et al., 2010; EGERVARN et al., 2014; CASELLA et al., 2015).

Alguns estudos relatam a presença de *Klebsiella* spp. produtora de ESBL em carnes de frango com genes e plasmídeos semelhantes aos isolados em humanos,

mostrando que alimentos contaminados com *Klebsiella* spp. podem ser veiculadores de CTX-M para o homem (SMET et al., 2010; EGERVARN et al., 2014). CTX-M-1, CTX-M-10, SHV e CTX-M-15 foram os genótipos de ESBL mais prevalentes em *Klebsiella pneumoniae* no estudo realizado com frangos de cortes na China, em 2013 e 2014, e em Gana, no período de 2015 (GUO et al., 2016; EIBACH et al., 2018), mostrando-se que o gene *bla*_{CTX-M-1} é predominante em diferentes locais do mundo e que acometem tanto aves de corte como de postura.

No estudo realizado com ovos comercializados em feiras livres de alguns municípios do interior do Rio Grande do Norte, que tinha como objetivo relatar a ocorrência de isolados produtores de CTX-M, teve resultado de duas *Klebsiella* spp. produtoras de *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-8}, revelando semelhança aos achados da pesquisa (SOUSA,2020). Tal fato pode ser explicado pela propagação de modo horizontal dos mecanismos de resistência entre as cepas bacterianas, alcançando desde produtos do gênero alimentício até o setor hospitalar de alto risco, como visto no estudo de Tolentino (2009) realizado no Hospital de Base de São José do Rio Preto, que buscava identificar de pacientes internados *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL e investigar genes da família *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}, conseguindo detectar desse microrganismo os *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-1}, *bla*_{SHV-2}, *bla*_{SHV-2a}, *bla*_{SHV-5}, *bla*_{SHV-11}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-25}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{SHV-38}, *bla*_{SHV-62} e *bla*_{SHV-108}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-59}, os dados mostram que a produção de ESBL é responsável principalmente pelo gene CTX-M, sendo descrito essa predominância mundial em diferentes estudos.

Os primeiros relatos de AmpC na América do Sul, iniciou na década de 1990 com *Klebsiella pneumoniae* portadora do FOX-1, após dez anos o CMY-2 foi detectado em *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter koserii*, na Argentina, com isso novos estudos foram realizados evidenciando a disseminação de CMY em diferentes países da América do Sul, sendo identificado em *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis* e *E. coli* (GONZALEZ et al., 1994; RAPOPORT et al., 2008; MARTINEZ et al., 2012; TREVINO et al., 2012; LEAL et al., 2013; BOTELHO et al., 2015).

No Brasil, os isolados clínicos de CMY-2 eram pouco prevalentes, dessa forma havia necessidade de fazer vigilância para evitar a propagação desses genes para bactérias de ambiente hospitalar (ROCHA et al., 2016; MATTIELLO et al.,

2015). Em mercados brasileiros que vendiam carne de frango já foram identificados *E. coli* portadora do *bla*_{CMY-2}, como mostra o trabalho desenvolvido por Ferreira (2018) com 200 swabs cloacais de frangos de cortes, pertencentes as granjas localizadas no interior de São Paulo, que tinha como objetivo de estudo determinar as *Enterobacteriales* que faziam parte da microbiota intestinal de frangos saudáveis e avaliar a presença de gene *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CMY-2} em *E. coli*; e a pesquisa de Botelho et al. (2015) que visava determinar a contaminação de frangos brasileiros com CTX-M e CMY, obtendo amostras de carcaças de frango adquiridas de mercados varejistas do Rio de Janeiro, concluiu-se então a presença desse gene e sua capacidade de se espalhar.

Em alguns casos, bactérias multirresistentes são capazes de produzir múltiplas β -lactamases (MARSIK; NAMBIAR, 2011), com isso pode-se explicar o fato da *Klebsiella* spp. isolada no estudo conter no seu genoma dois genes *bla*_{CTX-M-8 Type} e *bla*_{CMY-2}, a coexistência de duas ou mais β -lactamases não é mais tratada como evento incomum. Nas Filipinas, em Luzon, no período de 2017 foram isolados *E. coli* em cortes de frangos contendo dois ou mais grupos de *bla*_{CTX-M}, esses genes em uma mesma cepa é um cenário normal, tendo em vista a inúmeras regiões homólogas que eles possuem (HE et al., 2013; GUNDRAN et al., 2019).

Entre a β -lactamase plasmidial AmpC, o CMY-2 é frequentemente identificado em *E.coli* presente em animais saudáveis, alimentos, humanos e animais de companhia, estando presentes em quase todos os continentes (BOGAERTS et al., 2015; LALAK et al., 2016). Nesse contexto, fatores de riscos relacionados com a venda interna e exportação de carne com microrganismos resistentes à cefoxitina e outros antibióticos, agregado ao contato íntimo do homem com os animais, proporciona a dispersão dessa cepa, como visto na Holanda, em que isolados de *Enterobacteriaceae* contidas em frango e nos manipuladores desses produtos compartilhavam as mesmas relações genéticas (DIERIKX et al., 2013).

Nesse estudo, os isolados de bactérias associados a resistência antimicrobiana e seus genes encontrado nas aves sadias é preocupante para a saúde e a economia, em vista que são produtor alimentícios frequentemente comercializados. A transmissão de bactérias e seus genes de resistência são especialmente veiculados através dos alimentos de origem animal para os

consumidores, principalmente quando não há higienização correta dos alimentos durante todo o processo, havendo contaminação durante o preparo, transporte, mau cozimento, entre outras formas (CAPITA; ALONSO-CALLEJA, 2012). Em virtude desse fator, o monitoramento desses animais quanto ao uso de antibióticos é imprescindível, a fim de diminuir o impacto na Saúde Pública e consequentemente a resistência bacteriana.

CONCLUSÃO

- Foi possível detectar *Enterobacteriales* da cloaca das galinhas poedeiras, levando em consideração a rica flora bacteriana presente no intestino das aves;
- O perfil de susceptibilidade antimicrobiana mostrou elevados índices de resistência das bactérias frente a diferentes classes de antibióticos, mostrando uma preocupação quanto ao ertapenem, tendo em vista a importância desse fármaco no tratamento de infecções bacterianas graves;
- O isolamento de *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Salmonella* spp., produtoras de blaCTX-M-1 Like, blaCTX-M-2 Like, blaCTX-M-8 Like e blaCMY-2 em galinhas poedeiras do semiárido brasileiro aponta para o impacto desses microrganismos em saúde pública e alerta para a necessidade de ações integradas no sentido de encorajar o uso correto de antibióticos na produção desses animais.

REFERÊNCIAS

ABPA- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual 2020**. 2020. Disponível em:< https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf>. Acesso em: 21 mai. 2021.

ANDRADE, L.N; WOODFORD, N.; DARINI, A.L. **International gatherings and potential for global dissemination of Sao Paulo metallo-beta-lactamase (SPM) from Brazil**. Int J Antimicrob Agents [Letter Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2014 Feb;43(2):196-7.

ARIAS, M.V.B; CARRILHO, C.M.D.M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.775-790, 2012.

ARYA A.V. et al. Crohn's disease exacerbation induced by *Edwardsiella tarda* gastroenteritis. Case Rep. **Gastroenterolog**. V.5, n.3, p.623-627, 2011.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, Chicago, v. 45, p. 493-496, 1966.

BENEVIDES, V.P. **Perfil de existência a antimicrobianos de *Salmonella* spp. isoladas de aves produtoras de ovos de mês na região de Bastos-SP.** 2019. Dissertação (Mestrado), Pós-graduação Microbiologia Agropecuária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2019.

BERSAN, G.O. et al. Qualidade microbiológica de ovos in natura industriais e caipira comercializados no município de Viçosa, Minas Gerais. **Revista UniScientiae**. V.2, n.1, p. 78-87, 2019.

BEZERRA, W. G. A. **Fatores de virulência e resistência à antimicrobianos em *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em granjas de frangos de corte.** 2017. Tese (Doutorado). Programa de pósgraduação em ciências veterinárias. Universidade estadual do Ceará – Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2017.

BOGAERTS, P. et al. Characterization of ESBL- and AmpC- Producing *Enterobacteriaceae* from diseased companion animals in Europe. **Microbial drug resistance**, v. 21, p. 643-50, 2015.

BOTELHO, L. A. B. et al. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 249–254, 2015.

BRASIL, MAPA. **Lista de substâncias proibidas e legislação correspondente.** 2017. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumospecuarios/arquivos-de-insumos-pecuarios/Substanciasproibidas.pdf>>. Acesso em: 13 ago. 2021.

BrCAST. **Manual de antimicrobiano.**2019. Disponível em:< <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/Manual-Antibiograma-BRCAS-2019.pdf>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

BUSK, K.; BRADFORD, P.A. Beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2016 Aug 01;6(8).

BUSH, K.; PALZKILL, T.; JACOBY, G. A. **β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes.** Disponível em: Acesso em: 04 out. 2021.

CAMPELO, D.F.C. **Marcadores de virulência extraintestinal e perfil de resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* isoladas de aves alimentos e ambiente.** 2018. Dissertação (mestrado)-Micobiologia e parasitologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2018.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. **Critical reviews in food Science and nutrition**, v.53, p.11-48, 2012. Disponível em:< https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2010.519837?casa_token=qFh0IB2ZWOsAAAAA%3A432-4G_FlXrGRWhPi_YviYzvNB1xDzfg7_4ILR1UZBbYiIGgP659oGqPDkU73fa7N_Q5eSpvEbpec1gCB>. Acesso em: 08 ago. 2021.

CARATTOLI A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**. 2009 Jun;53(6):2227-38.

CARVALHO, I. T. **Microbiologia dos alimentos**. Escola técnica aberta do Brasil, 2010.

CASELLA, T. et al. **Caracterização molecular de genes de resistência a cefalosporinas de espectro estendido em *Escherichia coli* isoladas de frango e carnes de frango**. 2015. Tese (Doutorado)- Pós-graduação em microbiologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2015.

CASELLA, T. et al. Detection of blaCTX-M-type genes in complex class 1 integrons carried by Enterobacteriaceae isolated from retail chicken meat in Brazil. **Int. J. Food Microbiol**. 197:88- 91, 2015.

CDC. **National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS): Enteric bacteria 2013 human isolates final report**. Centers for disease control and prevention. 2015.

CHANTZIARAS, I. et al. 2014. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **J Antimicrob Chemother**, 69 p. 827-834, 2014. Disponível em:<<https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/2335/1548>>. Acesso em: 02 jun. 2021.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Clinical Lab Standards Institute. 2016; M100S(26th Edition).

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, 29th Edition. Document M100. Pennsylvania, USA, 2019.

COAN, M.M. **Detecção de genes codificadores de resistência a antimicrobianos de importância clínica em amostras de carne de frango**. 2014. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em ciência, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

CUNHA, F.P.L. et al. *Shigella* spp.: Um problema de Saúde Pública. **Higiene alimentar**. V.31, n.264/265, 2017. Disponível em:<<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2017/04/833025/264-265-sitecompressed-52-57.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 2010.

D'ANDREA, M. M. et al. CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. **Int J Med Microbiol**, v. 303, n. 6–7, p. 305–317, 2013.

DHANJI, H. et al. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw Chicken imported into the UK. **J Antimicrob chemother**, Livermore, 65:p. 2534-2537, 2010.

- DIERIKX C. et al. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum β -lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs. **Frontiers in Microbiology**, v.4, n. 242, 2013.
- EGERVARN, M. et al. **Escherichia coli with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and Salmonella on meat imported into Sweden.** Int. J. Food Microbiol., V. 171, p.8-14, 2014.
- EIBACH, D. et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in local and imported poultry meat in Ghana. **Veterinary microbiology**. V. 217, p. 7-12, 2018. Disponível em:<
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113517312518?casa_token=3813CnroGIAAAAAA:jFXtd8J350V4GvIZp6XItYnQurqH0GjdoSv-DOwur3_jKINGXAJ1KB2ilXoTYsXgo9Q-aKtQkLu_#bib0090>. Acesso em: 11 mai. 2021.
- FERREIRA, J. C. et al. Evaluation and characterization of plasmids carrying CTX-M genes in a non-clonal population of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from poultry in Brazil. **Diagnost. Microb. Infect. Dis.**, 85(4), p.444-448, 2016.
- FERREIRA, J. C. **Caracterização fenotípica e molecular de enterobactérias resistentes a antimicrobianos isoladas de aves comerciais de granjas do interior do Estado de São Paulo.** 2018. Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, p.104, 2018.
- FILHO, V.J.R.G. et al. Pesquisa de Salmonella sp. em galinhas criadas em fundo de quintal (*Gallus gallus domesticus*) e ovos comercializados nas feiras livres na cidade de Fortaleza, Ceará. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina. 35(4), p.1855-1864,2014.
- GALDINO, V. M. C. A. et al. Virulência de Salmonella spp. de origem avícola e resistência a antimicrobianos. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 4, p. 932-939, 2013.
- GARCIA, N.V. et al. Edwardsiellosis, common and novel manifestations of the disease: A review. **Revista Colombiana de Ciencia Animal**, v.5, n.1, p.82-90, 2012.
- GONZLES, L.M. et al. Gene sequence and biochemical characterization of FOX-A from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. **Antimicrob. Agents Chemother.**, V.38, p.2150-2157, 1994.
- GUIMARÃES, R.A. et al. Caracterização filogenética molecular e resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de caprinos neonatos com diarreia. **Ciênc. Anim. Bras.** V. 14, n. 4, 2015. Disponível em:<
<https://www.scielo.br/j/cab/a/hfTkZ78G9hzsjsk97JPCzfql/?lang=pt>>. Acesso em: 06 jun. 2021.
- GUNDRAN, R.S. et al. Prevalence and distribution of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} genes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. **BMC Veterinary Research**, v.15, n. 227, 2019. Disponível em:<
<https://link.springer.com/article/10.1186/s12917-019-1975-9>>. Acesso em: 05 jul. 2021.
- GUO, Y. et al. Frequency, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in food samples. **Plos one**. 2016. Disponível em:<
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0153561>>. Acesso em: 13 mai. 2021.

- HAWKEY, P.M. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of globalization. **J Hosp Infect**, 89, p. 241-247, 2015.
- HE, D. et al. CTX-M-123, a Novel Hybrid of the CTX-M-1 and CTX-M-9 group beta-lactamases recovered from *Escherichia coli* isolates in china. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.57, p. 4068-71, 2013. em:<
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00541-13>>. Acesso em: 21 out. 2021.
- HIROI, M; YAMAZAKI, F. Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Food-Producing Animals. **Journal of Veterinary Medical Science** **74**, p. 189–195, 2012.
- JACOBY, G.A. AmpC beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev.**v.22, n.1, p.161-82, 2009, Table of Contents.
- JEAN, S.S. et al. Recurrent infections caused by cefotaxime- and ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serotype choleraesuis treated successfully with imipenem. **Journal of Infection**. V.51, p. 163-165,2005. Disponível em:<
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445304002890?casa_token=k4aG8KJetZcAAAAA:Cda3808D8CHu6O71Kfrp_dAL0Nx79_oYIM16IAclm-2SdyN4P-ct_7ztbfLwSPlkSsH-bF4Farjq>. Acesso em: 14 mai. 2021.
- KOENIG, A. Gram-negative bacterial infections. In: GREENE, C .E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 4. ed., p.349-359, 2012.
- KRUMPERMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk source of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**, v.46, n.1, p.165-170, 1983.
- LALAK, A. et al. Mechanisms of cephalosporin resistance in indicator *Escherichia coli* isolated from food animals. **Veterinary microbiology**, 2016.
- LEAL, A.L. et al. Emergence of resistance to third Generation cephalosporins by *Enterobacteriaceae* causing Community-onset urinary tract infections in hospitals in Colombia. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, V.31, p. 298-303, 2013.
- LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. **The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter**. Trends Microbiol. 2006 Sep;14(9):413-20.
- MACHADO, L. S. et al. PCR na detecção de gene *fel a* de *Escherichia coli* em frangos de corte condenados por aerossaculite pela inspeção sanitária federal. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 80, n. 2, p. 145-149, 2013.
- MAMMERI, H. et al. Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 11, p. 4556–4560, 2010.
- MAPA. **Portaria nº171, de 13 de dezembro de 2018**. 2018. Disponível em:<
https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/55878469/do1-2018-12-19-portaria-n-171-de-13-de-dezembro-de-2018-55878239>. Acesso em: 03 jul. 2021.
- MARSIK, F.J.; NAMBIAR, S. Review of carbapenemases and AmpC β -lactamases. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, p. 1094-1095, 2011.

MARTINEZ, P. et al. CTX-M-producing *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isolated from Community-acquired urinary tract infections in Valledupar, Colombia. **J. infect. Dis.**, V.16, p. 420-425, 2012.

MATTIELLO, S. P. et al. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* strains isolated from Brazilian poultry production. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 5, p. 1227–1238, 2015.

MELO, R.C.A. et al. Presence of *fimH*, *mrkD*, and *irp2* Virulence Genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology** 69, p. 824–831, 2014.

MENDONÇA, N. et al. Microarray evaluation of antimicrobial resistance and virulence of *Escherichia coli* isolates from portuguese poultry. **Antibiotics**, v. 5, n. 1, p. 4, 2016.

MOLLENKOPF, D. F. et al. *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* Harboring *bla*CMY in Retail Beef and Pork Products. **Foodborne Pathog Dis**, v. 8, n. 2, p. 333–336, 2011.

MURRAY, P.R. et al. Manual of Clinical Microbiology. **American Society for Microbiology**. Ed.7. Washington. D.C. 325-337p. 1999.

NGOI, S.T., THONG, K.L. Molecular characterization showed limited genetic diversity among *Salmonella Enteritidis* isolated from humans and animals in Malaysia. **Diag. Microbiol. Infec. Disease**, v.77, p.304-311, 2013.

OLIVEIRA, W.F. et al. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, n.552, p.211-214, 2004.

PEREIRA, P.S. et al. Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents Chemother.**, v.59, p.4453-4456, 2015.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. **Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens**. Int J Med Microbiol. 2010 Aug;300(6):371-9.

RAPOPORT, M. et al. CMY-2-type plasmid-mediated AmpC beta-lactamase finally emerging in Argentina. **J. Antimicrob. Agents**, V.31, p.385-387, 2008.

RAU, R.B. **Caracterização fenotípica e genotípica e avaliação do perfil de suscetibilidade de *Salmonella* isoladas de alimentos de origem animal no Brasil**. 2019. Dissertação (Mestrado), Pós- Graduação em ciência farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

R CORE TEAM, 2018. Disponível em:< <https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 05 nov. 2021.

REBOUÇAS, G.G. et al. Determinación de *Salmonella* spp. and quantification of shell changes and internal content of eggs sold in Natal and Mossoró, Rio grande do Norte. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, 2020.

ROBIN, F. et al. ESBL-producing Enterobacteriaceae in France: inventory assessed by a multicentric study. **Antimicrob. Agent. Chemother.**, 2016.

ROCHA, D. A. C. et al. Frequency of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Urine Samples in São Paulo, Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 321–327, 2016.

SAMPAIO, J.L.; GALES, A.C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on beta-lactams and polymyxins. **Braz J Microbiol**, 2016 Oct 25.

SANGARE, S. A. et al. Very high prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in bacteriemic patients hospitalized in teaching hospitals in Bamako, Mali. **PLoS One**, V.12, n.2, 2012.

SEGABINAZI, S.D. Bactérias da família Enterobacteriaceae em *Alphitobius diaperinus* oriundos de granjas avícolas dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil*. **Acta Scientiae Veterinariae**. ed. 1, v. 33, p. 51-55, 2005.

SHANKAR, C. et al. Whole genome analysis of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates from community and hospital acquired bloodstream infection. **BMC Microbiology** 18, p.1–9, 2018.

SILVA, E. E. et al. Pesquisa de enterobactérias em patos domésticos (*Cairina moschata*) de propriedades localizadas em quatro municípios do Ceará, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81(1), p.16-21, 2014.

SILVA, K. C. et al. Dissemination of CTX-M-2-type extended spectrum β -lactamase-producing *Salmonella* spp. in poultry farms in Brazil. In: **50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 50, Boston, EUA. Anais: divulgação digital, C2 687, Boston: ICAAC, 2010.

SILVA, R.F. **Frequência de bactérias da família Enterobacteriaceae em amostras de carcaças de frangos provenientes de indústrias do Distrito Federal**. Universidade Católica de Brasília (UCB), 2013.

SINGH, R. K. M. et al. A simplified method of Three Dimensional technique for the detection of AmpC beta-lactamases. **Archives of Clinical Microbiology** 3, p. 1-7, 2013.

SMET, A. et al. Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* Isolates in Belgian broiler farms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 4, p. 1238–1243, 2008.

SPELLBERG, B. et al. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. **Clin Infect Dis**. 52:p.397–428, 2011.

SUASSUNA, J. Semiárido: proposta de convivência com a seca. **FUNDAJ**, 2019. Disponível em: < <https://www.gov.br/fundaj/pt-br/destaques/observa-fundaj-itens/observa-fundaj/artigos-de-joao-suassuna/semi-arido-proposta-de-convivencia-com-a-seca>>. Acesso em: 16 out. 2021.

TELES, J.L.R. et al. Potencial antimicrobiano de plantas da família *verbenaceae* no semiárido nordestino: uma revisão sistemática. **Rev. Multidisciplinar de educação e meio ambiente**, v.1, nº1, 2020. Disponível em: <

<https://editoraime.com.br/revistas/index.php/rema/article/view/291/157>>. Acesso em: 11 ago. 2021.

THRUSFIELD, M; CHRISTLEY, R. **Veterinary epidemiology**. Public Health e Statistics. 2018.

TOLENTINO, F.M. **Detecção e identificação dos genes de beta-lactmases *blaSHV*, *blaTEM* e *blaCTX-M* em *Klebsiella pneumoniae* isoladas em um Hospital Terciário do Estado de São Paulo**. 2009. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2009.

TREVINO, M. et al. Plasmid-mediated AMPc producing *Proteus mirabilis* in the Health care are of Santiago de Compostela: molecular and epidemiological analysis by rep-PCR and MALDI-TOF. **Re. Esp. Quimioter.**, V. 25, p.122-128, 2012.

VASCONCELOS, P.C. **Perfil de resistência das enterobactérias encontradas em carcaças de frango**. 2017. Dissertação (Mestrado). Pós-graduação em zootecnia, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2017.

VILA, J.; MARCOS, M. A.; JIMENEZ DE ANTA, M. T. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. **Journal of Medical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 482–489, 1 jun. 1996.

XU, T; ZHANG, X-H. *Edwardsiella tarda*: na intrinsuing problem in aquaculture. **Aquaculture**, 431, p. 129-135, 2014.

WEBER, T. et al. Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. **Trends in Biotechnology**, v.33, n.1, p.15-26, 2015.

WEIS, N.A.; MACHADO, S.S.; CAMARGO, S.C. Desempenho zootécnico e condenação ao abate de frangos criados em aviários dark house e convencional. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n. 7, p. 69837-69849, 2021. Disponível em:< <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/32733/pdf>>. Acesso em: 12 out. 2021.

WHO. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 3rd Revision. 2011.

CAPÍTULO II

Caracterização de *Enterobacterales* multirresistentes isolados de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) criadas em condições semiáridas e seu impacto na Saúde Única

Caracterização de *Enterobacteriales* multirresistentes isolados de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) criadas em condições semiáridas e seu impacto na Saúde Única

RESUMO

No semiárido a falta de recursos hídricos faz com que as famílias que moram no campo retirem sua renda e alimentação através da produção de animais. Sendo comum o uso de antimicrobianos em galinhas caipiras sem uma orientação profissional e de modo empírico, para diminuir a mortalidade e prevenir doenças. Com isso a seleção de bactérias resistentes vem avançando e com elas a produção de ESBL e AmpC. Os objetivos desse trabalho foram isolar e identificar microrganismos da cloaca de galinhas caipiras no semiárido brasileiro, e caracterizar o perfil de resistência e identificar os genes de resistência antimicrobiana dos isolados. As amostras foram coletadas através de *swabs* cloacais de galinhas caipiras, em seguida inoculada em ágar MacConkey. As bactérias foram identificadas pelas provas bioquímicas e a susceptibilidade aos antimicrobianos foi testada pelo disco-difusão, para detecção dos genes *bla*_{ESBL} e *bla*_{AmpC} uso-se PCR. Foram avaliadas 165 galinhas caipiras e obteve-se crescimento de 198 *Enterobacteriales*, tendo 37 galinhas expressado crescimento de duas ou mais colônias bacterianas. Os principais microrganismos isolados foram *E. coli* (68,2%), *Klebsiella* spp. (12,6%) e *Edwardsiella* spp. (10,1%). Apresentando consideráveis índice de resistência para a tetraciclina (44,4%), ampicilina (28%), amox.+ ác. Clavulânico (21%), cefepima (20,5%), ertapenem (16,5%), meropenem (3,50%) e imipenem (3%); dos 200 isolados bacterianos 36 (18%) continham multirresistência e 50 (25%) isolados apresentaram MCAR $\geq 0,25$. Os genes detectados foram *bla*_{CTX-M1-like}, *bla*_{CTX-M2-like} e *bla*_{CMY-2} em três diferentes *E. coli*. Conclui-se que as galinhas caipiras são reservatórios de genes resistentes, implicando em sérios problemas a Saúde Única, uma vez que os alimentos são originados de um sistema simples de produção que não deveriam utilizar antibióticos, mas que os produtores manuseiam de forma constantemente.

Palavras-chave: Galinhas Caipiras, Antimicrobianos, Multirresistência, ESBL, AmpC, *Enterobacteriales*, Saúde Única.

Characterization of multiresistant *Enterobacterales* isolated from free-range chickens (*Gallus gallus domesticus*) reared in semiarid conditions and their impact on One Health

ABSTRACT

In the semiarid region, the lack of water resources makes families who live in the countryside withdraw their income and food through the production of animals. It is common to use antimicrobials in free-range chickens without professional guidance and empirically, to reduce mortality and prevent diseases. With this, the selection of resistant bacteria has been advancing and with them the production of ESBL and AmpC. The objectives of this work were to isolate and identify microorganisms from the cloaca of free-range chickens in the Brazilian semiarid region, and to characterize the resistance profile and identify the antimicrobial resistance genes of the isolates. Samples were collected using free-range chicken cloacal swabs, then inoculated into MacConkey agar. Bacteria were identified by biochemical tests and antimicrobial susceptibility was tested by disk-diffusion, to detect the blaESBL and blaAmpC genes using PCR. A total of 165 free-range chickens were evaluated and 200 *Enterobacterales* grew, with 37 chickens expressing the growth of two or more bacterial colonies. The main microorganisms isolated were *E. coli* (67.50%), *Klebsiella* spp. (12.50%) and *Edwardsiella* spp. (10.00%). Showing considerable resistance index to tetracycline (44.40%), ampicillin (28.00%), amox.+ ác. Clavulanic (21.00%), cefepime (20.50%), ertapenem (16.50%), meropenem (3.50%) and imipenem (3.0%); of the 200 bacterial isolates 36 (18%) contained multidrug resistance and 50 (25%) isolates had MCAR \geq 0.25. The genes detected were bla_{CTX-M1-like}, bla_{CTX-M2-like} and bla_{CMY-2} in three different *E. coli*. It is concluded that free-range chickens are reservoirs of resistant genes, implying serious One Health problems, since the food originates from a simple production system that should not use antibiotics, but that producers handle constantly.

Keywords: Free-range Chickens, Antimicrobials, Multiresistance, ESBL, AmpC, Enterobacterales, Unique Health.

INTRODUÇÃO

No semiárido, a falta de recursos hídricos dificulta a produção agrícola, dessa forma a alternativa para gerar renda e alimentos às famílias rurais correspondem a produção de animais. Assim, a criação de galinhas, suínos, cabras, ovelhas e vacas se elevaram, estando seus produtos e subprodutos direcionados para o consumo familiar e na comercialização dos excedentes (MELO; VOLTOLINI, 2020).

A criação de galinhas caipiras se concentra em quintais, com exigência de longos prazos para produzirem carne e ovos. Seus alimentos são apreciados no mercado, uma vez que os consumidores consideram como saudável, rico em nutriente, com sabor incomparável e criadas de modo natural (VIVAS et al., 2013; MELO; VOLTOLINI, 2020). Algumas produções não contêm instalações e manejos adequados para produção desses animais, não atendendo aos requisitos sanitários necessários para controlar os patógenos no ambiente e possivelmente nas aves, de maneira que esses animais podem atuar como reservatórios de diferentes microrganismos (ALCÂNTARA, 2015).

O uso de antimicrobianos na produção de galinha caipira é comum no semiárido, e geralmente são administrados sem orientação profissional, de modo empírico e indiscriminado, cujo objetivo é promover crescimento, diminuir a mortalidade e prevenir doenças (GISKE et al., 2011). Com isso, este procedimento fortalece a seleção de bactérias, como exemplo, as *Enterobacterales* resistentes a antibióticos e possivelmente são transmissíveis para humanos, através do contato direto com esses animais ou a partir da cadeia alimentar, resultando em problemas emergentes que afetam a saúde humana e animal, além de acarretar prejuízos econômico, social e ambiental, de modo que tal situação deve ser encarada como um problema de Saúde Única (NGUYEN-VIET et al., 2017; CARDOZO, 2019).

Dentre as bactérias que apresentam um crescimento contínuo e de importância epidemiológica para a medicina humana e veterinária, destacam-se as *Enterobacterales* (ALVIM; COUTO; GAZZINELLI, 2019). Essas bactérias produzem enzimas β -lactamases capazes de degradar o anel β -lactâmico dos antibióticos β -lactâmicos, sendo as principais enzimas as cefamicinases (AmpC), β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases (ANDRADE; DARINI, 2017).

Patógenos do trato gastrointestinal das aves produzem ESBL com maior frequência ao longo dos anos, com aumento de 3% em 2003 para 15% em 2008, sendo as aves os principais reservatórios de bactérias produtoras de ESBL (LEVERSTEIN-VAN et al., 2011).

A ESBL compreende o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em isolados de *E. coli*, capazes de inativar as penicilinas, monobactâmicos e cefalosporinas de 2º, 3º e 4º geração, sendo encontrados nos cromossomos ou plasmídeos bacterianos enzimas da família TEM, SHV e CTX-M, dentre famílias existentes (GUTKIND et al., 2013). Além das *E. coli*, *klebsiella* e *Salmonella* também são produtoras de ESBL, sendo capazes ainda de desenvolver enzimas AmpC, que promovem resistência as cefalosporinas, penicilinas, cefamicinas, monobactâmicos, contendo as AmpC enzimas da família CMY (CARATTOLI, 2013; SAMPAIO; GALES, 2016). No Brasil, estudos apontam que animais de produção como frangos de corte, suínos e búfalos apresentam bactérias carreadoras de *Enterobacteriales* produtoras de CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-15 e CMY-2 (AIZAWA et al., 2014; DA SILVA et al., 2017).

Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi investigar a presença de *Enterobacteriales* produtores de ESBL e AmpC em bactérias isoladas de cloacas de galinhas caipiras localizadas em propriedades rurais do semiárido brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo, amostragem e colheita de amostras biológicas

Foram utilizadas cinco propriedades rurais localizadas no Estado da Paraíba e no Estado do Rio Grande do Norte, semiárido do Nordeste do Brasil. As galinhas eram criadas soltas em quintais e mantinham contato com outros animais como patos (*Anas platyrhynchos domesticus*) e galinha D'Angola (*Numida meleagris*). A alimentação era a base de milho e restos de alimentos humanos, enquanto a água era originada dos açudes locais. Essas propriedades não apresentavam tecnificação para produção, que era destinada para suprir a família e os excedentes eram vendidos no mercado local. O número mínimo de animais a serem amostrados foi determinado pela fórmula para amostras simples aleatórias

(Thrusfield; Christley, 2018), utilizando os seguintes parâmetros: (a) nível de confiança de 95%; (b) frequência esperada de animais positivos de 50% (maximização da amostra) e erro amostral de 10%. Conforme esses parâmetros seriam requeridos 96 animais, no entanto, foram colhidas amostras de *swab* cloacal de 165 galinhas caipiras no período de fevereiro a agosto de 2020.

Os *swabs* cloacais foram acondicionados em tubos de ensaio contendo meio de transporte Stuart e transportadas sob refrigeração (2 a 8 °C) ao laboratório de microbiologia do Hospital Veterinário da UFCG, onde foram imediatamente processadas.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-UFCG sob protocolo de nº 67/2020.

Isolamento e identificação bacteriana

As amostras foram enriquecidas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) por 24 h na temperatura de 37°C e posteriormente semeadas em placas de Petri contendo o meio ágar MacConkey, com espessura de 3 a 4 mm. Após o cultivo, as placas foram incubadas à temperatura de 37°C em aerobiose por 24-48 horas para verificação do crescimento bacteriano. As colônias bacterianas foram submetidas ao exame bacterioscópico pelo método de coloração de Gram e identificadas pelas provas bioquímicas de triplo açúcar ferro (TSI), motilidade, malonato, produção de indol, produção de urease, produção de gelatinase, produção de fenilalanina desaminase, utilização de citrato, reação de vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP), fermentação da lactose, hidrólise de esculina, redução de nitrato, catalase, oxidase e coagulase (MURRAY et al., 1999).

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e teste fenotípico de β -lactamases

As cepas isoladas foram submetidas ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão em ágar Müller-Hinton, de acordo com a técnica de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966), conforme recomendado pelo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST, 2019) e

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019). A cepa *E. coli* CIP 76.24 (ATCC 25922) da coleção de cepas do Instituto Pasteur, foi utilizada como controle de qualidade neste ensaio por apresentar suscetibilidade conhecida a determinados antimicrobianos.

As seguintes classes de antibióticos foram avaliadas: Aminoglicosídeo-amicacina (30 µg), gentamicina (10 µg); Fluoroquinolonas - enrofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg); Fenicol - cloranfenicol (30 µg); Tetraciclina - tetraciclina (30 µg); cefalosporina de terceira geração- cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ceftazidima (30 µg), ceftiofur (30 µg); carbapenêmicos - ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg); β-lactâmicos aminopenicilícos- ampicilina (10 µg); aminopenicilina associado a inibidor de β-lactamase - amoxicilina/clavulanato (10 µg); cefamicina- cefoxitina (30 µg); cefalosporina de quarta geração- cefepima (30 µg); Monobactâmico - aztreonam (30 µg).

Para detecção de isolados multirresistentes aos antibióticos foi calculado o índice MAR (múltipla resistência antimicrobiana), calculada pela razão entre o número de antimicrobianos resistentes e o número de antimicrobianos testados, indicando multirresistência quando $MAR \geq 0,2$, enquanto que para avaliar a resistência das classes antimicrobianas foi analisado o índice MCAR (múltipla resistência a classe antimicrobiana), calculado pela razão entre o número de classes consideradas resistentes (ao menos uma droga por classe) e o número total de classes testadas (KRUMPERMAN, 1983). As bactérias que apresentaram fenótipo resistente a pelo menos três classes de antibióticos testados foram consideradas multirresistentes (MCAR maior ou igual a 0,25) (NGOI; THONG, 2013).

Com as colônias obtidas em ágar MacConkey foi realizada suspensão bacteriana em solução de NaCl estéril a 0,9%, comparando a turbidez com a escala 0,5 de McFarland para semear as bactérias no meio ágar Müller-Hinton e posicionar os discos de antibióticos avaliados, com posterior incubação a 37 °C por 18-24 horas. Foi procedida a leitura dos halos com deformação ou aparecimento de uma zona fantasma, formados pelos discos de aztreonam 30 µg, ceftazidima 30 µg, cefotaxima 30 µg ou cefepime 30 µg em direção a amoxicilina/ácido clavulânico 10 µg (inibidor β-lactâmico), para identificação fenotípica de amostras produtoras de β-lactamase (BrCAST, 2019). Para bactérias suspeitas de produzirem β-lactamase

do tipo AmpC, foi avaliado o tamanho do halo de inibição da cefoxitina (30 µg) (SINGH et al., 2013).

Identificação dos genes de resistência

Após isolamentos das *Enterobacteriales* o DNA foi extraído pelo método de fervura, que consistiu em suspender 2 a 5 colônias do microrganismo em 200 µL de água destilada estéril e submeter a 100 °C por 10 minutos. Essa suspensão foi centrifugada a velocidade máxima por 1 minuto, e o sobrenadante foi utilizado para os experimentos moleculares (CASELLA, 2015). Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etílico a 0,8%, em campo elétrico 6V/cm durante 120 minutos. Após a eletroforese, os resultados foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

A detecção dos genes de ESBL ou AmpC foi efetuada pelo uso da técnica de PCR e o ThermoFischer. Para a identificação dos genes *bla*_{CMY-2} e *bla*_{CTX-M} foi usado uma reação de multiplex-PCR e PCR convencional, seguindo a metodologia descrita por Dallenne et al. (2010) e Mammeri et al. (2010).

Análise estatística

Para comparação das frequências das bactérias isoladas das cloacas de galinhas foi utilizado o teste de qui-quadrado de aderência com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no ambiente R (R CORE TEAM, 2018) e interface RStudio.

RESULTADOS

Das 165 aves analisadas 100% apresentaram crescimento de *Enterobacteriales*, tendo 37 galinhas expressando crescimento de duas ou mais colônias em uma amostra totalizando 198 isolados. *Escherichia coli* foi a bactéria mais frequentemente encontrada (Tabela 1), ocorrendo em 135 amostras (68,2%), seguido de *Klebsiella* spp. em 25 (12,6%) e *Edwardsiella* spp. em 20 (10,1%). As demais bactérias identificadas apresentaram menor frequência ($P < 0,001$).

Tabela 1- Frequência de isolados bacterianos (n = 198) de galinhas caipiras no semiárido brasileiro, no período de fevereiro a agosto de 2020.

Agentes	Número de amostras positivas	Frequência (%)
<i>Escherichia coli</i>	135	68,2
<i>Klebsiella</i> spp.	25	12,6
<i>Edwardsiella</i> spp	20	10,1
<i>Salmonella</i> spp.	7	3,6
<i>Citrobacter</i> spp.	6	3
<i>Enterobacter</i> spp.	4	2
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0,5
Total	198	100

No teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, as bactérias apresentaram maiores índices de resistência a tetraciclina (44,4%), ampicilina (28%), amoxicilina+ác. Clavulânico (21%), cefepima (20,5%), ertapenem (16,5%) e ceftriaxona (14,5%) (Tabela 2).

Tabela 2- Perfil de sensibilidade dos antimicrobianos dos isoladas de galinha caipiras no semiárido brasileiro (n = 198), período de julho de 2020 a setembro de 2020.

CLASSES	ANTIMICROBIANOS	SEN. ¹ (%)	INT. ² (%)	RES. ³ (%)
Aminoglicosídeo	Amicacina (30 µg)	85,5	10,5	4
	Gentamicina (10 µg)	90	5	5
Aminopenicilínico associado a inibidor de β-lactamases	Amoxicilina +Ác. Clavulânico (10 µg)	79	0	21
	Ampicilina (10 µg)	72	0	28
β-lactâmico aminopenicilínico	Cefotaxima (30 µg)	90,5	4,5	5
	Ceftriaxona (30 µg)	75	10,5	14,5
	Ceftazidima (30 µg)	73,5	15	11,5

Cefamicina	Ceftiofur (30 µg)	91	4,5	4,5
	Cefoxitina (30 µg)	87,5	0	12,5
Cefalosporina de 4º geração	Cefepima (30 µg)	62	17,5	20,5
Carbapenêmicos	Ertapenem (10 µg)	83,5	0	16,5
	Imipinem (10 µg)	95	2	3
	Meropenem (10 µg)	93	3,5	3,5
Monobactâmico	Aztreonam (30 µg)	71	19	10
Fluorquinolona	Norfloxacin (10 µg)	89	5	6
	Enrofloxacin (5 µg)	83,5	13	3,5
Fenicol	Clorafenicol (30 µg)	95,5	0	4,5
Tetraciclina	Tetraciclina (30 µg)	52,5	3	44,5

¹ Sen.= Sensível;

² Int.= Intermediário;

³ Res.= Resistente.

Os índices de resistência a antimicrobianos (MAR) variaram de 0 a 0,94, com média de 0,12. Foram obtidos 36 (18%) isolados com índice MAR \geq 0,2. Com relação ao índice MCAR, os valores variaram de 0 a 1 e média de 0,16, e 50 (25%) isolados apresentaram MCAR \geq 0,25. Na Tabela 3 são apresentados os números de bactérias com índices MAR \geq 0,2 e MCAR \geq 0,25 com as respectivas médias por agente isolado (Tabela 3).

Tabela 3- Bactérias com perfil de multirresistência determinado pelos índices MAR e MCAR, em galinhas caipiras do semiárido brasileiro.

Bactérias	No de isolados com MAR \geq 0,2	Média (MAR)	No de isolados com MCAR \geq 0,25	Média (MCAR)
<i>E. coli</i>	22	0,43	31	0,45
<i>Klebsiella</i> spp.	3	0,30	4	0,41
<i>Edwadsiella</i> spp.	6	0,48	8	0,47
<i>Salmonella</i> spp.	2	0,28	3	0,33
<i>Citrobacter</i> spp.	1	0,28	2	0,36

<i>Enterobacter</i> spp.	1	0,22	1	0,36
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	1	0,28	1	0,27

Dos isolados de *E. coli* e *Klebsiella* spp., 13 e 1 respectivamente, foram positivas para a expressão fenotípica de ESBL, enquanto seis *E. coli*, uma *Klebsiella* spp. e uma *Salmonella* spp. para AmpC. Os genes *bla*_{CTX-M-1 Like}, *bla*_{CTX-M-2 Like} e *bla*_{CMY-2} foram isolados de três *E. coli* (Tabela 4).

Tabela 4- Detecção de genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CMY}, em PCR multiplex isoladas de galinha caipiras (*Gallus gallus domesticus*) no semiárido brasileiro (n = 198), no período de julho de 2020 a setembro de 2020.

<i>bla</i> _{CTX-M/CMY}	Agentes	Nº de isolados positivos
<i>bla</i> _{CTX-M1 like}	<i>E. coli</i>	1
<i>bla</i> _{CTX-M2 like}	<i>E. coli</i>	1
<i>bla</i> _{CMY-2 like}	<i>E. coli</i>	1

DISCUSSÃO

Oito gêneros e espécies de diferentes *Enterobacterales* foram identificados, destacando a *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Edwardsiella* spp. e *Salmonella* spp., consistindo alguns desses agentes como parte principal da microbiota do trato intestinal das aves e que desempenham um papel relevante para a saúde, nos casos de contaminação ambiental e na transmissão desses agentes responsáveis por doenças (SHOAIB et al., 2016). Os resultados do presente trabalho são semelhantes aos do estudo de Ojo et al. (2012), que teve como objetivo averiguar a suscetibilidade antimicrobiana de *Enterobacterales* presente em fezes de galinhas caipiras criadas ao ar livre em fazendas de Abeocutá, na Nigéria, com identificação de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. e *Enterobacter*, bem como o estudo de Shoaib et al. (2016), no Paquistão, que isolaram *E. coli*,

Salmonella spp, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. e *Enterobacter* spp. de fígados de frango de corte e de galinhas caipiras.

A criação de galinhas caipiras do presente estudo compartilhava o espaço com patos e galinhas d'angola, além de terem contato com animais silvestres, como o teiú, e aves migratórias que passavam pelas propriedades a procura de alimentos, esse contato entre espécies pode favorecer a dispersão de bactérias entre os animais e o ambiente, podendo contribuir no aumento das infecções ocasionada pela *Enterobacteriales*. Pesquisas apontam que frangos de cortes compõe uma maior quantidade de bactérias no intestino, diferente da microbiota intestinal de galinhas caipiras, a explicação para esse achado consiste na alimentação que os frangos apresentam, tendo em vista que é uma dieta enriquecida de nutrientes e que auxiliam a proliferação dos microrganismos, enquanto que as galinhas de quintal colhem os alimentos livre do ambiente, podendo ingerir substâncias com ação anti-inflamatória e antimicrobiano reduzindo a quantidade de bactérias (SALAH-ELDIN et al., 2015; KAMBOY et al., 2015).

Muitos casos de *Enterobacteriales* são relatados em doenças transmissíveis por alimentos, com ênfase para *E. coli*, *Salmonella*, *Proteus* e *Klebsiella* que contribuem para os problemas ligados a Saúde Pública e a economia dos países em desenvolvimento, em virtude das constantes perdas na produção (YULISTIANI et al., 2019). Estima-se que anualmente cerca de 48 milhões de pessoas são acometidas por infecções alimentares, correspondendo desse total 128.000 hospitalizados e 3.000 mortes (CDC, 2018).

Patógenos como a *E. coli* podem contaminar alimentos e causar doenças intestinais, além de infecções extra intestinais, envolvendo o trato urinário e infecções graves, como meningite, endocardite, septicemia, diarreia em adultos e crianças (FARUQUE et al., 2019). Outro agente de perigo para a Saúde Pública é a *Salmonella* spp., facilmente ela é dispersa no ambiente, e o controle desse patógeno consiste na identificação e eliminação dos fatores relacionados à sua multiplicação (MENDONÇA, 2016).

As aves são os principais reservatórios da *Salmonella* e estão envolvidas no comprometimento da segurança alimentar e humana, tendo em vista o envolvimento dessa bactéria nos surtos de infecções alimentares. A epidemiologia da *Salmonella* na produção de aves é complexa, uma vez que esse microranismo

pode ser encontrada no ambiente aviário, em partículas de poeiras, cama e fezes, outro ponto que contribui a sua dispersão é a falha higiênica no processamento ou armazenamento do alimento, comprometendo a qualidade microbiológica da carne e dos seus subprodutos (SURESH et al., 2011; BONI; CARRIJO; FASCINA, 2011; HOWARD et al., 2012).

O conhecimento da resistência frente às bactérias que integram o intestino das galinhas se faz necessário, tendo em vista a possibilidade desses microrganismos serem reservatórios de genes de resistência, como apontam pesquisas que isolaram *Enterobacteriales* resistentes a vários antimicrobianos de importância clínica, a exemplo do estudo com galinhas de fundo de quintal no Nepal que teve como objetivo investigar a presença de *Enterobacteriales* produtora de ESBL e cabapenemase da cloaca de aves saudáveis, dentre as bactérias isoladas foi realizado o teste de suscetibilidade antimicrobiana, avaliando elevada resistência a amoxicilina, cefoxitina e gentamicina (KOGA et al., 2015).

Outra pesquisa realizada no Paraná buscou avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana e os genes de ESBL/AmpC de *Escherichia coli* isolados de 15 carcaças de aves caipiras, obtendo altos níveis de resistência a tetraciclina, sulfametoxazol+trimetoprima, ampicilina, cloranfenicol, gentamicina e cefazolina, e no estudo com frangos de aldeias localizadas na Malásia cujo objetivo era descrever a resistência antimicrobiana de isolados de *Salmonella*, tendo como resultado níveis considerados de resistência a tetraciclina, ampicilina, clindamicina e ciprofloxacina (JAJERE et al., 2020; SUBRAMANYA et al., 2020). Esses achados são semelhantes com o da presente pesquisa que obtiveram altos índices de resistência a tetraciclina, ampicilina, amoxicilina com ácido clavulânico e cefepima. A alta frequência de resistência a esses antibióticos pode ser explicada pelo custo relativamente baixo e pelo fácil acesso, como pode-se observar nos medicamentos a base de tetraciclina, sendo um dos fármacos de eleição utilizados pelas famílias rurais para prevenir ou tratar doenças em galinhas caipiras.

Quando os antibióticos são administrados de modo incorreto nas aves, com dose e tempo inapropriado, algumas bactérias tornam-se resistentes e capazes de transferir o material genético modificado para outras bactérias e para o homem, outros fatores relacionados na difusão da resistência é a alimentação e o modo de administrar os medicamentos, vez que os proprietários utilizam água como meio de

fornecer o fármaco, dessa forma há o acesso dos antibióticos tanto pelas galinhas doentes e saudáveis, como pelos animais que compartilham o mesmo espaço, contribuindo para o aumento dos casos de bactérias multirresistentes (FIELDING et al., 2012; MELO; VOLTOLINI, 2020).

O isolamento das bactérias presentes nas galinhas caipiras do estudo com elevados níveis de resistência a classe dos carbapenêmicos é preocupante, por se tratar de um alimento de subsistência, além desses medicamentos serem utilizados como um dos últimos recursos para o tratamento de infecções graves. Como os criadores não relataram uso desses antibióticos na produção, a presença dos genes de resistência frente ao ertapenem, meropenem e imipenem pode ser justificado pelo contato dessas galinhas com o produtor que faça uso desses antimicrobianos resistências cruzadas, conseqüentemente levando a resistência a outro antimicrobiano, e/ou pelo fato das aves terem acesso aos dejetos contaminados por bactérias resistentes.

A presença de microrganismos isolados em galinhas de fundo de quintal com múltipla resistência antimicrobiana é um indicador que suas cepas sofrem processos seletivos e mutação genética, tornando-se uma ameaça aos patógenos de origem animal e humano, como visto em *E. coli* isoladas de aves com resistência a mais de um antimicrobiano (MELLATA, 2013). Esse fenômeno prejudica a resposta clínica pela dificuldade de antimicrobianos eficazes, tendendo a comprometer a economia pelos custos na produção de novos medicamentos, além dos gastos hospitalares em virtude dos períodos prolongados de internação (CLARDY et al., 2009; HUGHES, 2014).

Na década de 60 foi registrada a primeira *Salmonella* com multirresistência, após esse achado no Reino Unido diversos casos envolvendo animais de produção e humanos com infecções promovidas por *Salmonella* com resistência a ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclina e furazolidona foi exposto (CARDOZO, 2019). Algumas pesquisas mostram que swabs cloacais, carcaças de frangos e seus subprodutos carregam genes multirresistentes, como visto na presente pesquisa e em trabalhos com galinhas do centro-sul da Península da Malásia, no Egito e na China (ABDEL-MAKSOUND et al., 2015; ZHANG et al., 2018; JAJERE et al., 2020).

A multirresistência às classes de antimicrobianos avaliados nas galinhas caipiras no presente estudo se contrapôs a um estudo desenvolvido com frangos de subsistência em propriedades localizadas no Paraná, cujo objetivo era determinar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *E. coli* isolados de frangos de corte de criação intensiva e frangos de subsistência, verificando que as aves de subsistência não apresentaram resistência a três ou mais classes dos antibióticos testados, enquanto que as criações intensivas desenvolveram (KORB et al., 2015). Nota-se que nas produções caipiras desse estudo há uma similaridade da resistência com as criações industriais de frango, que utilizam em demasia antibióticos na sua produção, observando assim a evolução rotineira dos pequenos produtores com a manipulação desses medicamentos nas diferentes formas de criação.

A descoberta desses agentes contendo múltipla resistência aos antibióticos é preocupante, mostrando o frequente uso desses medicamentos pelos produtores, juntamente com a prática agrícola ao ar livre que permite o contato e a contaminação desses animais a água e solo não tratado pelo homem, e que abrigam patógenos resistentes a antibióticos (LEE et al., 2018; TYRRELL et al., 2019). É possível considerar também, que o fornecimento dos restos de comida do homem para as galinhas seja um veiculador de bactérias com genes de resistência para esses animais, sendo essa resistência aos antibióticos retornada ao homem quando estes utilizam as aves na alimentação, mantendo-se um círculo de infecção (JAJERE et al., 2020).

Enterobacterales como a *E. coli* são capazes de abrigar enzimas de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e β -lactamases plasmídicas de classe C encontrados nos animais e humanos, representando um importante reservatório de resistência (SILVA; LINCOPAN, 2012). Alguns surtos de infecções nosocomiais acometidos por *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Proteus mirabilis* estão relacionados no aumento dos grupos de CTX-M que predominam na América do Sul, Espanha e Leste Europeu (CORTÉS et al., 2010; HIROI et al., 2011; DE JONG et al., 2014).

ESBL do tipo CTX-M está dispersa em hospitais e clínicas humanas, como também em comunidades, animais de companhia e de produção, avaliando que as bactérias e os genes são capazes de propagar-se no mundo e se potencializar (CARATTOLI, 2008; SEIFFERT et al., 2013). A presença de cepas de *Escherichia*

coli contendo CTX-M-1 e CTX-M-2 foi observado no estudo desenvolvido por Cunha (2017), cujo objetivo era detectar cepas de *E. coli* multirresistentes e genes de resistência em carcaças de frangos produzidas em assentamentos rurais no norte do Paraná concordando com a presente pesquisa, mas diferencia dos achado do trabalho feito por Borzi et al. (2018), com 56 swabs cloacais de galinhas d'angola pertencentes a pequenas propriedades do interior de São Paulo, que tinha como objetivo detectar e caracterizar *E. coli* resistentes a drogas com genes de virulência, e obteve resultados de *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}. Outra pesquisa desenvolvida com frangos caipiras, frango de corte e comercializado em mercados locais da Colômbia, com objetivo de caracterizar os genes, plasmídeos e cepas de *E. coli* produtora de ESBL e AmpC, conseguiu identificar *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-5}, *bla*_{SHV-12} e *bla*_{CMY-2} (CASTELLANOS et al., 2017), com similaridade para alguns achados da pesquisa.

Observa-se notoriamente que os grupos CTX-M, CMY e SHV são isolados em cloacas de galinhas criadas de forma alternativa, frangos de corte e amostras hospitalares no Brasil e no mundo, considerando o CMY e SHV prevalente nas cepas através da transmissão horizontal dos plasmídeos (KOGA et al., 2015; FERREIRA et al., 2016; ROBIN et al., 2016; CASTELLANOS et al., 2017).

Os achados de CMY-2 em humanos originados de alimentos avícolas eram raramente identificados, logo apresentavam baixa transmissibilidade. No entanto, com a evolução das pesquisas modificaram-se esse conhecimento, assim sendo visto que na União Europeia *E. coli* excedeu a presença de ESBL das carnes avícolas, suínas e bovinas, mostrando a distribuição do CMY-2 em humanos, animais de produção e seus alimentos (VALENZA et al., 2014; EFSA; ECDC, 2017).

Nesse estudo, os isolados de bactérias associados a resistência antimicrobiana e seus genes encontrados nas galinhas caipiras é preocupante para a saúde, em vista que são produtos destinados a alimentação e que deveriam conter menores casos de microrganismos resistentes, considerando que a produção é familiar e relativamente pequena, não necessitando do uso de antibióticos com maior frequência em comparação as grandes industriais avícolas. Esses fatores mostram a necessidade de avaliar esse tipo de criação quanto às bactérias e ao uso dos antibióticos, a fim de diminuir o impacto na Saúde Pública e, conseqüentemente, a resistência bacteriana.

Tendo em vista o risco que a Saúde Pública enfrenta com a falta de cuidados na segurança alimentar e a interação do homem com a interface animal-ambiente, estando os agricultores, médicos veterinários, manipuladores de alimentos e consumidores expostos ao risco de infecção de bactérias resistentes através da cadeia alimentar, a iniciativa Saúde Única (*One Health*) busca implementar medidas visando o combate das infecções de bactérias com tratamento ineficaz, controle da resistência antimicrobiana, segurança dos alimentos e preservação dos antibióticos para as futuras gerações, instigando os países em desenvolvimento e agricultores a seguir as orientações da Organização Mundial da Saúde, Organização Mundial para Saúde Animal e Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas, construindo assim uma relação equilibrada e preservando a saúde entre a comunicação humana, animal e ambiental (WHO, 2015).

CONCLUSÃO

- Foi possível detectar *Enterobacteriales* como *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Edwardsiella* spp. em galinhas caipiras no semiárido brasileiro;
- Essas bactérias apresentaram variados perfis de resistência antimicrobiana, com susceptibilidade ao ertapenem, meropenem e imipinem, preocupando esses achados, uma vez que esses antibióticos são utilizados como de última escolha em tratamentos, além de terem sido encontrados em animais de subsistência;
- Conseguiu-se caracterizar genotipicamente a produção de ESBL e AmpC, isolando *E.coli* produtoras de *bla*_{CTX-M1} like, *bla*_{CTX-M2} like e *bla*_{CMY-2} like;
- Essas bactérias apresentaram variados perfis de resistência, e para reduzir a frequência desses agentes e seus impactos à Saúde Pública sugere-se medidas ligadas a sensibilização dos produtores frente à importância dos antibióticos, desmistificando a cultura e cresças da utilização desses medicamentos de forma empírica.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MAKSOU, M. et al. Genetic characterisation of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotypes isolated from poultry in Cairo, Egypt. *Afr. J. Lab. Med.*, v.4, n. 7, 2015. Disponível em:<[10.4102/ajlm.v4i1.158](https://doi.org/10.4102/ajlm.v4i1.158)>. Acesso em: 17 set. 2021.

ALCÂNTARA, J.B. **Pesquisa de *Salmonella sp.* em aves criadas em sistema industrial e alternativo.** 2015.Tese (Doutorado), Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Animal, Goiânia, 2015.

ALVIM, A.L.S.; COUTO, B.R.G.M.; GAZZINELLI, A. Epidemiological profile of health care-associated infections caused by Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Ver. Esc. Enferm.** 2019. Disponível em:<<https://www.scielo.br/j/reeusp/a/yvvTqMmJZ9XPkFrbTkt7k4H/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 28 set. 2021.

ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C. Bacilos Gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse? **Journal of Infection Control.** v. 6, n. 1. 2017. Disponível em:<<https://jic-abih.com.br/index.php/jic/article/view/173/pdf>>. Acesso em: 05 de junho de 2017.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, Chicago, v. 45, p. 493-496, 1966.

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

BORZI, M.M. et al. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from free-range helmeted guineafowl. **Brazil. Journal of Microbiology**, v.49. ed.1, p.107-122, 2018. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838218301400?via%3Dihub>>. Acesso em:02 nov. 2021.

BrCAST. **Manual de antimicrobiano.**2019. Disponível em:<<https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/Manual-Antibiograma-BRCAS-2019.pdf>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

CARDOZO, S.P. ***Salmonella spp.* excretas, carcaças e ovos de *Gallus Gallus* comercializados em feiras livres de Goiânia, Goiás.** 2019. Tese (Doutorado). Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.

CARATTOLI, A. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Rome, Italy. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 1, p. 103–108, 2008.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **Inter. Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 298-304, 2013. Disponível em:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422113000167?casa_token=LbXfc20IIlgAAAAA:MobrGvKqDyMx-LWJpxjh5voTXeToqXv6Yfthxs5MNNjCN7d_Re3cEK3wrQYV7eqgloiHDhk3sl-0>. Acesso em: 26 set. 2021.

CASELLA, T. **Caracterização molecular de genes de resistência a cefalosorinas de espectro estendido em *Escherichia coli* isoladas de frango e carnes de frango.** 2015. Tese (Doutorado)- Pós-graduação em microbiologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2015.

CASTELLANOS, L. R. et al. High heterogeneity of *Escherichia coli* sequence types harbouring ESBL/AMPC genes on Inc1 plasmids in the Colombian poultry chain. **Plos one**, 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0170777>>. Acesso em: 23 out. 2021.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Foodborne Germs and Illnesses**, 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>>. Acesso em: 17 set. 2021.

CLARDY, J. et al. The natural history of antibiotics. **Curr Biol.**, v.19. n.11, p. 437-441. 2009.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, 29th Edition. Document M100. Pennsylvania, USA, 2019.

CORTÉS, P. et al. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from Chicken and pig farms in Spain. **Appl Environ Microbiol**, v.76, n.9, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2863447/>>. Acesso em: 12 out. 2021.

CUNHA, M.C.G.C. **Genes de resistência e virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de carcaças de frango criado de forma caipira**. 2017. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Mestrado Profissional em Clínica Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

D'ANDREA, M. M. et al. CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. **Int J Med Microbiol**, v. 303, n. 6–7, p. 305–317, 2013.

DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 2010.

DA SILVA, K. C. et al. High virulence CMY-2-and CTX-M-2-producing avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from commercial turkeys. **Diagnost. Microb. and Infect. Dis.**, v.87, n.1, p. 64-67, 2017.

DE JONG, A. et al. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from healthy pigs and chickens (2008-2011). **Veterinary Microbiology**, v. 171, n.3-4, p.298-306, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113514000650?casa_token=e-lwxlwLcEgAAAAA:1bCGcKJaaRYG8lJedd-SDbyPi9KcePfxPZSy0hVAm0fKNLfs7FMyQBrRSH5x9LKG6C1D-14HLISC>. Acesso em: 01 out. 2021.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY); ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. **EFSA JOURNAL**, v. 13, ed. 2, 2015. Disponível em: <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2015.4036>>. Acesso em: 09 out.2021.

FARUQUE, M.O. et al. Bacteriological analysis and public health impact of broiler meat: a study on Nalitabari Paurosova, Sherpur e Bangladesh. **Advances in Microbiology**, V. 9,

n.7, 2019. Disponível em:< <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=93787>>. Acesso em: 06 nov. 2021.

FERREIRA, J. C. et al. Evaluation and characterization of plasmids carrying CTX-M genes in a non-clonal population of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from poultry in Brazil. **Diagnost. Microb. Infect. Dis.**, 85(4), p.444-448, 2016.

FIELDIN, B. C. et al. Antimicrobial-resistant *Klebsiella* species isolated from free-range Chicken samples in an informal settlement. **Archives of Medical Science**, 2012. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3309434/>>. Acesso em: 29 out. 2021.

FOUNOU, L.L.; FOUNOU, R.C.; ESSACK, S.Y. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. **Review article**, 2016. Disponível em:< <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>>. Acesso em: 20 out. 2021.

GISKE CG, GEZELIUS L, SAMUELSEN Ø, WARNER M, SUNDSFJORD A, WOODFORD N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. **Clin Microbiol Infect.** 2011;17(4):552-6.

GUTKIND, G. O. et al. β -lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 2, p. 164–208, 2013.

HIROI, M. et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. **Vet. Med. Sci**, v.74, p.189-195, 2012. Disponível em:< https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/advpub/0/advpub_11-0372/_article/-char/ja>. Acesso em: 03 set. 2021.

HOWARD, Z.R. et al. Salmonella Enteritidis in shell eggs: current issues and prospects for control. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 755-764, 2012.

HUGHES, D. Selection and Evolution of resistance to antimicrobial drugs. **IUB MB Life.**, v.66, n.8, p. 521-529, 2014.

JAJERE, S.M. et al. Antibigram profiles and risk factors for multidrug resistance of *Salmonella* entérica recovered from village chickens (*Gallus Gallus domesticus* Linnaeus) and Other environmental sources in the central and Southern peninsular Malaysia. **National Library of Medicine**, v.9, n. 10, p.701, 2020. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33076451/>>. Acesso em: 23 set. 2021.

KAMBOH A.A. et al. Flavonóides: fitoquímicos promotores da saúde para a produção animal - Uma revisão. **J. Anim. Health Prod.** V.3, n.1, p.06-13, 2015.

KOGA, V. L. et al. Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. **Food. Pathog. Dis.**, v.12, n.6, p.479-485, 2015.

KORB, A. et al. Tipagem molecular e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* de frangos de cote e de tratadores na região metropolitana de Curitiba,

Paraná. **Pesquisa Vet. Brasileira**, v.35, n.3, 2015. Disponível em:< <https://www.scielo.br/j/pvb/a/WRf8mxQMGgBPBBDzCRzsp6D/?lang=pt&format=html>>. Acesso em: 19 out. 2021.

KRUMPERMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk source of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**, v.46, n.1, p.165-170, 1983.

LEE, J.H. et al. Antibiotic resistance in soil. **Lancet Infect. Diseases**, v.18, n.12, p.1306-1307, 2018. Disponível em:< [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(18\)30675-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(18)30675-3/fulltext)>. Acesso em: 07 nov. 2021.

LEVERSTEIN-VAN, H. M. et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. **J. Clin. Microb. Infect.** v.17, p. 873-880, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x>>. Acesso em: 12 out. 2021.

MAMMERI, H. et al. Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 11, p. 4556–4560, 2010.

MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 916-932, 2013.

MELO, R.; VOLTOLINI, T.V. Agricultura familiar dependente de chuva no semiárido. **EMBRAPA**, Brasília, 2019. Disponível em :< (PDF) Agricultura familiar dependente de chuva no semiárido (researchgate.net)>. Acesso em: 02 set. 2021.

MENDONÇA, E.P. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na Saúde Pública, isolados de frangos de corte no Brasil**. 2016. Tese (Doutorado). Pós-Graduação em ciência veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

MURRAY, P.R. et al. Manual of Clinical Microbiology. **American Society for Microbiology**. Ed.7. Washington. D.C. 325-337p. 1999.

NGOI, S.T., THONG, K.L. Molecular characterization showed limited genetic diversity among *Salmonella* Enteritidis isolated from humans and animals in Malaysia. **Diag. Microbiol. Infect. Disease**, v.77, p.304-311, 2013.

NGUYEN-VIET, H. et al. Reduction of antimicrobial use and resistance needs sectoral collaborations with a One Health approach: perspectives from Asia. **Int J Public Health**, v. 62, n.1, p. 3-5, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27942743> >. Acesso em: 07 out. 2021.

OJO O. E. et al. Antibiograma de enterobacteriaceae de galinhas caipiras. **Veterinario. Arhiv.** V. 82, p. 577-589, 2012.

PADUNGTOD, P. et al. Livestock production and foodborne diseases from food animals in Thailand. **J. Vet. Med. Sci.** V.70, p.873-879, 2008. Disponível em:< 10.1292/jvms.70.873>. Acesso em 01 nov.2021.

R CORE TEAM, 2018. Disponível em:< <https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 05 nov. 2021.

ROBIN, F. et al. ESBL-producing Enterobacteriaceae in France: inventory assessed by a multicentric study. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 2016. Disponível em:<10.1128/AAC.01911-16>. Acesso em: 20 out. 2021.

SALAH-ELDIN T. A. et al. Avaliação nutricional do nanocompósito de selênio-metionina como novo suplemento dietético para poedeiras comerciais. *J. Anim. Health Prod.* V.3, n. 3, p.64-72, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.14737/journal.jahp/2015/3.3.64.72>>. Acesso em: 13 out. 2021.

SAMPAIO, J.L.M.; GALES, A.C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on beta-lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol*, v.47, n. 1, p. 31-37, 2016. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5156504/>>. Acesso em: 22 out. 2021.

SEIFFERT, S.N. et al. Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: Na emerging problem for human health? *Drug Resistance Updates*, v.16, ed. 1-2, p. 22-45, 2013. Disponível em:< https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368764613000022?casa_token=a7mPg1UilkkAAAAA:llGw6ec6-3QtQ6LC5qhcqjuZnt3wAkA5TUsoac_zE5M9nvKlo5iS4eAiAeXYnycGf6bRUyJqXk>. Acesso em: 24 out. 2021.

SHOAIB, M. et al. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in commercial broilers and backyard chickens. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, v.4, p. 209-214, 2016.

SILVA, C.K.; LINCOPAN, N. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: clinical impact and implications for agribusiness. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* v.48, n.2, 2012.

SINGH, R.K.M. et al. A simplified method of Three Dimensional technique for the detection of AmpC beta-lactamases. *Archives of Clinical Microbiology*, v.3, p.1-7, 2013.

SUBRAMANYA, S.H. et al. Detection and characterization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from the gut of healthy chickens, *Gallus Gallus domesticus* in rural Nepal: dominance of CTX-M-15-non-ST131 *Escherichia coli* clones. *Journals plos org.*, 2020. Disponível em:< <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0227725>>. Acesso em: 07 nov. 2021.

SURESH, T. et al. Prevalence and distribution of Salmonella serotypes in marketed broiler chickens and processing environment in Coimbatore City of southern India. *Food Research International*, v. 44, n. 3, p. 823-825, 2011.

THRUSFIELD, M; CHRISTLEY, R. *Veterinary epidemiology*. Public Health e Statistics. 2018.

TYRRELL, C. et al. Antibiotic resistance in grass and soil. *Biochem Soc Trans*, v.47, n.1, p.477-486, 2019. Disponível em:< <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article-abstract/47/1/477/106/Antibiotic-resistance-in-grass-and-soil>>. Acesso em: 27 set. 2021.

VALENZA, G. et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as intestinal colonizers in the German Community. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2014. Disponível em:<

<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.01993-13>>. Acesso em: 10 nov. 2021.

VILA, J.; MARCOS, M. A.; JIMENEZ DE ANTA, M. T. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. **Journal of Medical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 482–489, 1 jun. 1996.

VIVAS, D. N. et al. **Perfil do consumidor de ovos de poedeiras comerciais no município de Ilha Solteira – SP.** 2013. Disponível em:<

<http://www.feis.unesp.br/Home/Eventos/encivi/viencivi-2013/36---perfil-do-consumidor-deovos-de-poedeiras-comerciais-no-municipiode-ilha-solteira---sp.pdf>>.

Acesso em: 07 set. 2021.

YULISTIANI, R. et al. Contamination level and prevalence of foodborne pathogen *Enterobacteriaceae* in broiler and backyard Chicken meats sold at traditional markets in Surabaya, Indonesia. **Malays. Appl. Biol.** V. 48, n.3, p. 95-103, 2019. Disponível em:<

<https://jms.mabjournal.com/index.php/mab/article/view/1844/313> RATNA>. Acesso em: 28 set. 2021.

ZHANG, L. et al. Prevalent Multidrug-Resistant Salmonella From Chicken and Pork Meat at Retail Markets in Guangdong, China. **Front. Microbiol.**, v.9, 2018. Disponível em<

[10.3389/fmicb.2018.02104](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02104)>. Acesso em: 01 nov. 2021.

World Health Organization (WHO). *Worldwide Country Situation Analysis: Response to Antimicrobial Resistance*. Geneva: **World Health Organization**. 2015.

CONCLUSÃO GERAL

- Ainda que o sistema de criação das galinhas poedeiras e caipiras sejam diferentes, foi possível observar alguns resultados semelhantes. Tal fato pode ser justificado pelas mutações bacterianas com a troca de material genético entre elas, somado ainda ao contato dos produtores com antibióticos e sua utilização indiscriminada;
- Foram isoladas *Enterobacterales* de galinhas poedeiras e galinhas caipiras no semiárido brasileiro, sendo observado um número elevado dessas bactérias nas amostras de galinhas caipiras;
- Quando realizado o teste de susceptibilidade, ambos estudos apresentaram resistência as cefalosporinas, carbapenêmicos, tetraciclina, quinolonas, e em menor proporção as outras classes antimicrobianas estudada;
- Casos de multirresistência a antimicrobianos foram avaliados nos dois estudos, mostrando-se diferença entre os índices MCAR das galinhas caipiras frente as galinhas poedeiras, observando a primeira um baixo índice de resistência as classes de antibióticos;
- As variantes CTX-M foram as mais prevalentes, principalmente nos isolados de galinhas poedeiras que apresentaram maiores números de bactérias com esses genes;
- Conseguiu-se identificar também amostras contendo CMY, tornando esses achados uma questão relevante e de risco para Saúde Pública, visto que esses achados se originam de alimentos destinados ao homem, causando riscos a saúde, a economia e ao agronegócio.