

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE DE *SALMONELLA* ISOLADAS DE ALIMENTOS DE ORIGEM
ANIMAL NO BRASIL

RENATA BATISTA RAU

PORTO ALEGRE, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE DE *SALMONELLA* ISOLADAS DE ALIMENTOS DE ORIGEM
ANIMAL NO BRASIL

Dissertação apresentada por **Renata
Batista Rau** para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Porto Alegre, 2019

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.03.2019, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Juliana Caierão

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Marcelo Pilonetto

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR)

Rau, Renata Batista
Caracterização fenotípica e genotípica e avaliação
do perfil de suscetibilidade de Salmonella isoladas de
alimentos de origem animal no Brasil / Renata Batista
Rau. -- 2019.
119 f.
Orientador: Afonso Luís Barth.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2019.

1. Salmonella. 2. Sorovares. 3. Resistência
Antimicrobiana. 4. mcr-1. I. Barth, Afonso Luís,
orient. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus avós, Dirceu (in memoriam) e Aneith (in memoriam), que sempre foram meus grandes exemplos de amor, paciência e perseverança. Sei que estariam orgulhosos de mais esta conquista. Saudades...

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Catia e Carlos Roberto, por terem sempre me incentivado, me apoiado e acreditado no meu potencial, mais até do que eu mesma.

Ao meu filho, João Gabriel, meu mais importante parceiro desde a faculdade, que me fez aprender coisas que nenhuma pós-graduação é capaz de ensinar; e que me ensina, todos os dias, muito mais do que ele imagina.

Ao meu amor, Aldemir, que sempre me inspirou e me deu o maior incentivo para a realização do mestrado. Agradeço de coração por todo o apoio técnico, operacional e principalmente psicológico durante esse período. Te admiro muito tanto como pessoa, quanto como profissional.

Ao Prof. Afonso Luís Barth, pela orientação, conselhos e confiança durante a realização desse trabalho. Obrigada por ter aceitado a proposta de abordar a resistência antimicrobiana sob o ponto de vista da cadeia de produção de alimentos.

Aos colegas do LABRESIS, Amanda, Daiana, Evelyn, Maiara, Helena, Lisiane, Marina, Otávio, Priscila e Tanise, por terem me recebido tão bem no grupo e por terem me ajudado sempre que eu precisei. Meu agradecimento especial à Daiana, pela paciência e disposição em me apresentar ao universo da biologia molecular e do sequenciamento de genomas bacterianos.

Ao LANAGRO/RS, por sempre incentivar o aperfeiçoamento dos seus servidores, tornando possível a realização desse trabalho. Tenho muito orgulho de fazer parte dessa equipe há mais de 10 anos.

Aos mais que colegas, amigos do RPM, Caroline, Cristina, Daniel, Fabiano, Louíse, Lucas e Tamara, pela convivência e risadas diárias e pela compreensão nos momentos que precisei me ausentar do laboratório. É muito bom trabalhar com pessoas queridas e competentes como vocês.

Aos colegas da MIC, Aldemir, Carolina, Denis, Lara, Matheus, Nilo, Norton, Orlando, Paulo, Rita, Sílvio e Tiago, por disponibilizarem os insumos e a estrutura laboratorial necessários para realização de parte deste trabalho.

Aos colegas do SAT, Deise, Dienifer, João, Leonardo, Gianinna e Suelen pelo apoio na esterilização dos materiais utilizados nas análises.

À Comissão sobre Prevenção da Resistência aos Antimicrobianos em Animais (CPRA) do Ministério da Agricultura, em especial à Suzana Bresslau e ao Leonardo Novo, pelo apoio e confiança durante a realização deste trabalho, e pelo

convite para participação em eventos, treinamentos e reuniões sobre controle e prevenção da resistência antimicrobiana na cadeia de produção de alimentos no Brasil.

Ao LANAGRO/SP, pela disponibilização das amostras e pela realização de parte das análises.

A todas as pessoas que, mesmo não citadas aqui, contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho.

RESUMO

Objetivos: Realizar a identificação dos sorovares mais prevalentes e determinar o perfil de suscetibilidade de isolados de *Salmonella* obtidos de carnes de aves e suínos produzidas no Brasil. Pesquisar a presença do gene *mcr-1*, de resistência às polimixinas, e caracterizar molecularmente os isolados que apresentaram esse mecanismo de resistência. **Métodos:** Foram avaliados, em carnes de aves, 146 isolados de *Salmonella* obtidos no ano de 2014 e 163 isolados no ano de 2017; e em carcaças suínas, 114 isolados de *Salmonella* obtidos entre os anos de 2014 e 2015. A determinação dos sorovares foi realizada por ribotipagem automatizada e o perfil suscetibilidade foi avaliado através de microdiluição em caldo, utilizando 13 antimicrobianos. O gene *mcr-1* foi pesquisado por PCR, utilizando *primers* específicos, em 490 isolados de *Salmonella* obtidos de carnes de aves, perus e suínos. Os isolados positivos para o gene *mcr-1* foram submetidos a análises de sequenciamento de genoma completo e a experimentos de conjugação. **Resultados:** *S. Heidelberg* (2014 - 38%; 2017 - 57%) e *S. Minnesota* (2014 - 12%; 2017 - 24%) foram os sorovares mais prevalentes em carne de aves, enquanto *S. Typhimurium* 4,[5],12:i:- (23%), *S. Derby* (21%), *S. Typhimurium* (15%) e *S. Panama* (15%) foram os predominantes em carcaças de suínos. Isolados de *Salmonella* de carne de frango apresentaram resistência principalmente à tetraciclina (2014 – 60,3%; 2017 – 82,8%), ácido nalidíxico (2014 – 57,5%; 2017 – 86,5%), ciprofloxacino (2014 – 56,9%; 2017 – 89,0%), ampicilina (2014 – 56,2%; 2017 – 76,7%), cefotaxima (2014 – 52,1%; 2017 – 76,1%) e ceftazidima (2014 – 50,0%; 2017 – 76,1%), com aumento significativo da resistência a esses antimicrobianos no período avaliado. *Salmonella* de carcaças suínas foram resistentes principalmente a ácido nalidíxico (64,9%), tetraciclina (60,5%), ciprofloxacino (57,2%), ampicilina (47,4%) e cloranfenicol (33,3%). Foi identificado a presença do gene *mcr-1* em 8 (1,6%) isolados de *Salmonella* obtidos de alimentos de origem animal, sendo a maioria pertencente ao sorovar *S. Typhimurium*, ST 19. Os plasmídeos contendo o gene *mcr-1* pertenciam ao grupo de incompatibilidade IncX4 e foram capazes de se transferir por conjugação. **Conclusões:** *Salmonella* de alimentos de origem animal do Brasil apresentaram altos níveis de resistência a importantes antibióticos. Foi possível identificar, embora em baixa prevalência, o gene *mcr-1* em um importante patógeno de origem alimentar.

Palavras-chave: *Salmonella*, sorovares, resistência antimicrobiana, *mcr-1*.

ABSTRACT

Phenotypic and genotypic characterization and evaluation of the susceptibility profile of *Salmonella* isolated from food of animal origin in Brazil

Objectives: To identify the most prevalent serovars and to determine the susceptibility profile of *Salmonella* isolates obtained from poultry and pork meat produced in Brazil. To investigate the presence of the polymyxin resistance *mcr-1* gene and to characterize molecularly the isolates that presented this mechanism of resistance. **Methods:** We evaluated, in poultry meat, 146 *Salmonella* isolates obtained in 2014 and 163 obtained in 2017; and in swine carcasses, 114 *Salmonella* isolates obtained between 2014 and 2015. The serovars were determined by automated ribotyping and the susceptibility profile was evaluated by broth microdilution, using 13 antimicrobials. The *mcr-1* gene was screened by PCR, using specific primers, in 490 *Salmonella* isolates obtained from poultry, turkey and pork meats. Positive isolates for the *mcr-1* gene were submitted to complete genome sequencing and conjugation experiments. **Results:** *S. Heidelberg* (2014 - 38%; 2017 - 57%) and *S. Minnesota* (2014 - 12%; 2017 - 24%) were the most prevalent serovars in poultry meat, while *S. Typhimurium* 4,[5],12:i:- (23%), *S. Derby* (21%), *S. Typhimurium* (15%) and *S. Panama* (15%) were predominant in swine carcasses. *Salmonella* isolates from poultry meat presented resistance mainly to tetracycline (2014 – 60.3%; 2017 – 82.8%), nalidixic acid (2014 – 57.5%; 2017 – 86.5%), ciprofloxacin (2014 – 56.9%; 2017 – 89.0%), ampicillin (2014 – 56.2%; 2017 – 76.7%), cefotaxime (2014 – 52.1%; 2017 – 76.1%) and ceftazidime (2014 – 50.0%; 2017 – 76.1%), with a significant increase in resistance to these antimicrobials in the evaluated period. *Salmonella* isolates from swine carcasses were resistant mainly to nalidixic acid (64.9%), tetracycline (60.5%), ciprofloxacin (57.2%), ampicillin (47.4%) and chloramphenicol (33.3%). The *mcr-1* gene was identified in 8 (1.6%) *Salmonella* isolates obtained from food of animal origin, most belonging to serovar *S. Typhimurium*, ST 19. Plasmids harboring the *mcr-1* gene belonged to the IncX4 incompatibility group and were able to conjugate. **Conclusions:** *Salmonella* isolated from foods of animal origin in Brazil showed high levels of resistance to important antibiotics. It was possible to identify, although in low prevalence, the *mcr-1* gene in an important foodborne pathogen.

Keywords: *Salmonella*, serovars, antimicrobial resistance, *mcr-1*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Determinação de sorovares de <i>Salmonella</i> por ribotipagem automatizada. Adaptado de DuPont Qualicon RiboPrinter® System.....	25
Figura 2: Distribuição dos sorovares de <i>Salmonella</i> de carcaças suínas.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições do teste de suscetibilidade e critérios de interpretação	89
Tabela 2: Número de isolados analisados por estado e contribuição de cada estado para o total de abate de suínos no Brasil.	90
Tabela 3: Padrões de resistência de <i>Salmonella</i> de carcaça suína no Brasil.	91
Tabela 4: Resistência antimicrobiana de <i>Salmonella</i> de carcaça suína no Brasil	92
Tabela 5: Perfis de resistência de <i>Salmonella</i> de carcaça suína no Brasil.	93
Tabela 6: Distribuição de valores de CIM de <i>Salmonella</i> de carcaça suína no Brasil.	94
Tabela 7: Padrões de resistência de <i>Salmonella</i> de carne de frango no Brasil.....	115
Tabela 8: Perfis de resistência de <i>Salmonella</i> de carne de frango no Brasil em 2014 (n=146).....	116
Tabela 9: Perfis de resistência de <i>Salmonella</i> de carne de frango no Brasil em 2017 (n=163).....	117
Tabela 10: Distribuição de valores de CIM de <i>Salmonella</i> de carne de frango no Brasil em 2014.	118
Tabela 11: Distribuição de valores de CIM de <i>Salmonella</i> de carne de frango no Brasil em 2017.	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AGISAR	<i>Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance</i>
AMP	Ampicilina
AMR	<i>Antimicrobial Resistance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AZM	Azitromicina
CAZ	Ceftazidima
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHL	Cloranfenicol
CIP	Ciprofloxacino
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CST	Colistina
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTAs	Doenças Transmitida por Alimentos
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ECOFF	<i>Epidemiological Cut-Off Values</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ESBLs	B-Lactamases de Espectro Estendido
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FAO	<i>Food and Agricultural Organization of the United Nations</i> - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GEN	Gentamicina
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCR	<i>Mobile Colistin Resistance</i>
MEM	Meropenem
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>

MS	Ministério da Saúde
NAL	Ácido Nalidíxico
NARMS	<i>National Antimicrobial Resistance Monitoring System</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NTS	<i>Non-Typhoidal Salmonella</i>
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i> - Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAN-BR	Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHAC	<i>Public Health Agency of Canada</i>
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Eletrophoresis</i>
PMQR	<i>Plasmid-Mediated Quinolone Resistance</i>
PNCP	Programa Nacional de Controle de Patógenos
QRDRs	<i>Quinolone-Resistance Determining Region</i>
RAM	Resistência aos Antimicrobianos
RAST	<i>Rapid Annotation using Subsystems Technology</i>
rep-PCR	<i>Repetitive Element Palindromic-Polymerase Chain Reaction</i>
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossomal
SXT	Sulfametoxazol/Trimetoprim
ST	<i>Sequence Type</i>
TET	Tetraciclina
TGC	Tigeciclina
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 <i>Salmonella</i>	23
3.1.1 Determinação de sorovares	23
3.1.2 Importância do monitoramento dos sorovares	26
3.1.3 Infecção por <i>Salmonella</i> em aves e suínos	27
3.1.4 Infecção por <i>Salmonella</i> em humanos	28
3.1.5 <i>Salmonella</i> em alimentos	29
3.2 Resistência a antimicrobianos na produção de alimentos.....	30
3.2.1 Resistência a antimicrobianos em <i>Salmonella</i>	32
3.2.2 Resistência a quinolonas e fluorquinolonas em <i>Salmonella</i>	33
3.2.3 Resistência a cefalosporinas de terceira geração em <i>Salmonella</i>	35
3.2.4 Resistência a polimixinas e gene <i>mcr-1</i>	38
3.3 Prevenção e controle da resistência antimicrobiana	42
3.3.1 Monitoramento integrado da resistência antimicrobiana	43
3.3.1.1 Origem das amostras	44
3.3.1.2 Microrganismos a serem monitorados.....	45
3.3.1.3 Estratégias de amostragem.....	45
3.3.1.4 Metodologias laboratoriais.....	46
3.3.1.5 Análise dos dados e elaboração de relatórios.....	46
3.3.2 O uso do sequenciamento de genoma completo (WGS) no monitoramento da resistência antimicrobiana	47
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	49
Artigo I – Emergence of <i>mcr-1</i> producing <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium from retail meat: first detection in Brazil.	49
Manuscrito II – Multidrug resistant <i>Salmonella enterica mcr-1</i> positive from food in Brazil	53
Manuscrito III – Nontyphoidal <i>Salmonella</i> from poultry meat in Brazil: serovars and antimicrobial resistance	69

5 RESULTADOS ADICIONAIS.....	89
6 DISCUSSÃO GERAL.....	95
7 CONCLUSÕES.....	101
REFERÊNCIAS	103
ANEXOS.....	115

1 INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos (RAM) é um problema que vem crescendo e ameaçando a saúde pública em todo o mundo (WHO, 2015). O uso incorreto ou excessivo de antibióticos é o principal fator que leva ao desenvolvimento da resistência. Os antibióticos estão entre as classes de medicamentos mais comumente prescritas na medicina humana, mas também possuem extenso uso na medicina veterinária e em animais de produção (CDC, 2013). Na produção agropecuária, os antimicrobianos são utilizados de forma profilática, metafilática, terapêutica e como promotores de crescimento (HUDSON *et al.*, 2017).

Dados sobre o consumo de antibióticos na cadeia de produção de alimentos a nível mundial ainda são escassos. No entanto, evidências sugerem que o montante seja, no mínimo, equivalente ao utilizado por humanos. Nos países do BRICS (Brasil, Rússia, China, Índia e África de Sul), estima-se que o consumo de antibióticos por animais produtores de carne possa aumentar 99% entre 2010 e 2030. Além disso, nos Estados Unidos, mais de 70% das vendas de antibióticos de importância médica são destinadas ao uso em animais de produção (O'NEILL, 2015).

Para que se possa combater a resistência aos antimicrobianos de forma efetiva, é necessária uma abordagem multidisciplinar, alinhada ao conceito de Saúde Única ("*One Health*"), abrangendo os setores de medicina humana, medicina veterinária, produção agropecuária e meio ambiente, de forma harmonizada, e em escala global. Nesse sentido, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em seu "Plano de Ação Global sobre Resistência Antimicrobiana", publicado em 2015, passou a ressaltar a importância da colaboração da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para obtenção de resultados efetivos no desafio do combate à resistência aos antimicrobianos (WHO, 2015).

Seguindo as diretrizes propostas pelo "Plano de Ação Global" da OMS, o Brasil publicou, recentemente, o seu "Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única" (PAN-BR). Entre os objetivos do PAN-BR está o de "*construir e estabelecer o sistema nacional de vigilância e monitoramento integrado da RAM*" (objetivo 4) (MS, 2018b). Programas integrados de monitoramento avaliam a resistência aos antimicrobianos

ao longo de toda a cadeia alimentar, e têm como objetivo aumentar o entendimento sobre o trânsito de bactérias e genes de resistência entre animais e humanos através dos alimentos. Além disso, programas de monitoramento consistentes podem fornecer informações relevantes para a tomada de decisões, para o estabelecimento de políticas públicas e para a alocação de recursos apropriados nas ações de prevenção e contenção da RAM na cadeia de produção de alimentos (FOUNOU *et al.*, 2016).

Salmonella, por ser um dos principais patógenos de origem alimentar em todo o mundo, é considerado o microrganismo prioritário para inclusão em programas integrados de monitoramento da resistência antimicrobiana (WHO, 2017b). A maioria dos genes de resistência encontrados em *Salmonella* está localizada em elementos genéticos móveis, que permitem a transferência horizontal da resistência a outras bactérias, patogênicas ou comensais, no ambiente intestinal. A ingestão de alimentos de origem animal contaminados por *Salmonella* é, portanto, uma importante via de transferência de mecanismos de resistência entre animais e humanos (MAKA; POPOWSKA, 2016).

Já foram relatadas cepas de *Salmonella* de origem animal resistentes a importantes classes de antimicrobianos para a medicina humana, incluindo fluorquinolonas e cefalosporinas de terceira geração, que são os medicamentos de escolha para o tratamento de casos graves de infecção por *Salmonella*, e polimixinas, que são uma importante opção terapêutica para o tratamento de infecções por bactérias Gram negativas produtoras de carbapenemases (SCHWARZ; JOHNSON 2016; KARP *et al.*, 2018; MCDERMOTT *et al.*, 2018).

As polimixinas têm sido utilizadas por décadas na medicina veterinária e na produção agropecuária. A colistina, principal antibiótico da classe, é utilizada tanto no tratamento e prevenção de infecções gastrintestinais, principalmente em aves e suínos submetidos a sistema de criação intensiva, quanto na promoção de crescimento de animais de produção (POIREL *et al.*, 2017). Em 2012, o uso estimado de colistina na produção de alimentos era de 12 mil toneladas por ano, com expectativa de chegar a 16,6 mil toneladas em 2021 (AL-TAWFIQ *et al.*, 2017). No Brasil, o uso de colistina como aditivo zootécnico melhorador de desempenho (promotor de crescimento) foi proibido pelo Ministério da Agricultura em novembro de 2016 (BRASIL, 2016b).

Por muitos anos, acreditava-se que a resistência às polimixinas estava restrita a mutações cromossômicas. No entanto, em 2015, foi descrito pela primeira vez o gene *mcr-1*, capaz de conferir resistência à colistina. A localização plasmidial do gene *mcr-1* passou a permitir a transmissão horizontal desse mecanismo de resistência a outras bactérias, facilitando sua disseminação (LIU *et al.*, 2016). O gene *mcr-1* tem sido amplamente descrito em isolados bacterianos obtidos de animais de produção e de alimentos de origem animal em diversos países, indicando uma provável relação entre o uso de colistina na produção agropecuária e a disseminação desse mecanismo de resistência (SCHWARZ; JOHNSON 2016).

Diante do exposto, o presente trabalho tem por objetivo realizar um levantamento situacional do perfil de resistência de *Salmonella* isoladas de alimentos de origem animal produzidos em diferentes regiões do Brasil, como forma de subsidiar o desenvolvimento de um programa integrado de monitoramento da resistência aos antimicrobianos em patógenos de origem alimentar, além de pesquisar a presença do gene *mcr-1* nesses isolados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Realizar a caracterização fenotípica e genotípica, bem como avaliar o perfil de suscetibilidade de isolados de *Salmonella* obtidos de alimentos de origem animal produzidos no Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os sorovares de *Salmonella*;
- Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados frente a um painel de antimicrobianos, através da determinação da concentração inibitória mínima;
- Pesquisar a presença do gene *mcr-1* de resistência às polimixinas;
- Avaliar a presença e características dos plasmídeos carreadores do gene *mcr-1* em *Salmonella*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Salmonella*

Salmonella é um gênero da família *Enterobacteriaceae*, composto por bacilos Gram-negativos, oxidase negativos, catalase positivos, flagelados, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, com genoma entre 4460 e 4875 kb. *Salmonellae* podem ser naturalmente encontradas no meio ambiente e no trato gastrointestinal de humanos, animais domésticos e selvagens, incluindo aves, suínos, cães, gatos, anfíbios, répteis, roedores e insetos (GUT *et al.*, 2018; HEREDIA; GARCÍA, 2018).

O gênero *Salmonella* consiste em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. Além disso, a espécie *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Atualmente, já foram descritos mais de 2600 sorovares diferentes de *Salmonella*, sendo mais de 1500 pertencentes à subespécie *enterica*, que possui grande importância clínica e veterinária, e que representa mais de 99,5% das cepas de *Salmonella* isoladas. Os sorovares de *S. enterica* subsp. *enterica* são designados por um nome, geralmente relacionado à localização geográfica onde foram isolados pela primeira vez. Os sorovares das demais subespécies de *S. enterica* e de *S. bongori* são denominados de acordo com sua fórmula antigênica, conforme o esquema de White-Kauffmann-Le Minor (GRIMONT; WEILL, 2007; ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014).

3.1.1 Determinação de sorovares

A metodologia considerada padrão ouro para classificação de sorovares de *Salmonella* é a sorotipagem, que se baseia na reação de anticorpos com três tipos de antígenos bacterianos de superfície: antígenos somáticos (O), antígenos flagelares (H) e antígenos capsulares (Vi). O antígeno O é um polissacarídeo, composto por cinco a seis moléculas de açúcar, presente no lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa das bactérias. Atualmente, já foram identificados 46 variantes diferentes de antígenos O. Os antígenos H são a porção filamentosa do flagelo bacteriano, sendo compostos de subunidades de flagelina. Até o momento 114 variantes do antígeno H já foram descritas. Alguns sorovares de *Salmonella* possuem duas cópias diferentes do gene que codifica para a proteína flagelar. No

entanto, são capazes de expressar apenas um tipo de proteína flagelar de cada vez. Esses sorovares são denominados bifásicos em relação ao antígeno flagelar, enquanto os sorovares que são capazes de expressar apenas um tipo de antígeno H são chamados de monofásicos. Os antígenos capsulares Vi atuam como fatores de virulência e são mais comumente encontrados em *Salmonella* ser. Typhi, podendo ser eventualmente identificados também em *Salmonella* ser. Dublin e *Salmonella* ser. Paratyphi C (RYAN *et al.*, 2017; ROBERTSON *et al.*, 2018).

Apesar de ser uma ferramenta importante para a caracterização de isolados de *Salmonella*, a sorotipagem é uma técnica bastante trabalhosa e demorada, que necessita de mão-de-obra especializada, e exige mais de 250 tipos diferentes de antisoros, de qualidade comprovada, para a sua execução. Além disso, por depender da expressão de antígenos bacterianos, possui algumas limitações. Por exemplo, cepas rugosas não expressam o antígeno O; cepas imóveis não expressam os antígenos flagelares; e cepas mucóides produzem uma cápsula ao redor da bactéria que bloqueia a detecção do antígeno somático pelo antisoro (SHI *et al.*, 2015).

As deficiências inerentes ao método fenotípico de sorotipagem aumentaram o interesse científico em abordagens moleculares que pudessem ser correlacionadas com o esquema de White-Kauffmann-Le Minor. Métodos moleculares de subtipagem possuem muitas vantagens em relação aos métodos tradicionais, como aumento do poder discriminatório, melhor padronização e maior reprodutibilidade, além de serem de mais simples execução e utilizarem uma variedade menor de insumos. Os métodos moleculares de identificação de sorovares de *Salmonella* podem ser divididos em quatro categorias: (i) métodos de subtipagem baseados em padrões de bandas de DNA cromossômico ou plasmidial (PFGE, rpotipagem, rep-PCR); (ii) métodos de subtipagem baseados em sequências de nucleotídeos (MLST); (iii) métodos baseados na identificação direta e caracterização dos genes que codificam as vias de biossíntese dos antígenos O e H (multiplex PCR, técnicas de microarranjos de DNA); e (iv) sequenciamento de nova geração (NGS) (SHI *et al.*, 2015).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) vem utilizando, desde 2007, o método de rpotipagem para identificação de sorovares de *Salmonella*. Esse método se baseia na análise dos fragmentos genômicos de *operons* de rRNA, gerados pela ação de uma enzima de restrição (*PvuII*). As regiões

mais conservadas do *operon* permitem a identificação da bactéria em nível de gênero e espécie, enquanto as regiões variáveis e adjacentes do *operon* permitem a discriminação dos sorovares. Essa técnica é realizada de forma automatizada pelo equipamento RiboPrinter® System (DuPont Qualicon), sendo necessário que o operador realize apenas as etapas de inativação da amostra e lise bacteriana. O processo completo de determinação do sorovar leva em torno de oito horas, e está demonstrado na Figura 1. A ribotipagem automatizada permite o processamento de um número maior de amostras em menor tempo, quando comparada com a sorotipagem tradicional. Porém, o banco de dados utilizado para determinação do resultado pode ser considerado uma limitação, uma vez que não contempla a totalidade dos sorovares de *Salmonella* identificados pelo esquema de White-Kauffmann-Le Minor (DE CESARE *et al.*, 2001; SHI *et al.*, 2015). No entanto, estima-se que cerca de 30 sorovares possam representar 90% dos isolados de *Salmonella* em um determinado país, o que torna o método adequado para a finalidade de vigilância epidemiológica (GRIMONT; WEILL, 2007).



Figura 1: Determinação de sorovares de *Salmonella* por ribotipagem automatizada. Adaptado de DuPont Qualicon RiboPrinter® System

3.1.2 Importância do monitoramento dos sorovares

A identificação dos sorovares de *Salmonella* é de extrema importância para a saúde pública, a segurança dos alimentos e o comércio nacional e internacional de alimentos, principalmente os de origem animal. O conhecimento dos sorovares mais prevalentes em uma determinada região geográfica ou em produtos específicos, como carnes de aves e suínos, é uma importante ferramenta epidemiológica em qualquer país, pois permite que sejam adotadas medidas mais efetivas de prevenção e controle da contaminação por *Salmonella*.

Alguns sorovares de *Salmonella* possuem disseminação global, como é o caso de *Salmonella ser. Enteritidis* e *Salmonella ser. Typhimurium*, que são os principais sorovares encontrados em infecções de humanos em todos os continentes, em uma proporção geral de 43,5% e 17,1%, respectivamente. Outros sorovares, como *Salmonella ser. Infantis* também apresentam distribuição mundial, mas com menor prevalência (HENDRIKSEN *et al.*, 2011). Por outro lado, alguns sorovares possuem distribuição restrita a determinadas regiões. *Salmonella ser. Heidelberg*, por exemplo, é um dos 5 principais sorovares responsáveis por salmoneloses nos Estados Unidos e no Canadá. No entanto, é raramente encontrada em humanos ou em animais na Europa (FOLEY *et al.*, 2011; PHAC, 2017). Sorovares que não possuem distribuição mundial também podem representar riscos, devido a questões como viagens e comércio de alimentos (WAGENAAR *et al.*, 2013).

Medidas de detecção e controle associadas a sorovares específicos de *Salmonella* podem causar uma alteração da distribuição desses em uma determinada região. Estima-se que, quando ocorre uma queda na prevalência de um determinado sorovar, outros passam a ocupar o nicho ecológico (FOLEY *et al.*, 2011). Como exemplo, podemos citar as medidas adotadas por diversos países, incluindo o Brasil, para erradicação ou diminuição da prevalência de *Salmonella ser. Enteritidis* e *Salmonella ser. Typhimurium* em animais de produção, em especial as aves, devido ao grande número de infecções humanas associadas a esses sorovares (BRASIL, 2003b).

No Brasil, após a implementação dessas medidas pelo MAPA, foi possível identificar um declínio na prevalência de *Salmonella ser. Enteritidis* em aves, com aumento da prevalência de sorovares como Minnesota e Mbandaka (COSTA *et al.*, 2013). Nos Estados Unidos, o declínio da prevalência de *Salmonella ser. Enteritidis*

em aves fez com que os sorovares Kentucky e Heidelberg passassem a ser os mais frequentemente isolados (FOLEY *et al.*, 2011).

O acompanhamento das alterações na distribuição e prevalência de sorovares de *Salmonella* ao longo do tempo, tanto em humanos quanto em animais e alimentos, permite que sejam identificados sorovares emergentes no país. Dessa forma, é possível adotar medidas mais efetivas de controle desses microrganismos, reduzindo o risco de contaminação. Além disso, essas informações podem ser usadas para subsidiar a revisão de regulamentos de produção e controle de alimentos de origem animal na região.

3.1.3 Infecção por *Salmonella* em aves e suínos

A infecção por *Salmonella* em aves, especialmente galinhas e perus, em geral é assintomática. Apenas os sorovares Gallinarum e Pullorum são considerados patogênicos para as aves, podendo causar perdas significativas na indústria de produção. No entanto, esses sorovares não são capazes de causar infecções em humanos. O contato das aves com *Salmonella* spp. pode ocorrer de forma horizontal ou vertical. A infecção horizontal ocorre geralmente por via fecal-oral, através de água e alimentos contaminados, ou pelo contato com camas de aviários, solo e pessoas na granja. Na rota de transmissão vertical, a infecção da ave ocorre ainda no ovo. Nesse caso, a contaminação decorre da colonização do aparelho reprodutivo da galinha ou do contato do ovo com fezes ou ambiente contaminados. Diferentes sorovares de *Salmonella* podem colonizar o sistema gastrintestinal de aves, podendo ocorrer uma variação de acordo com a localização geográfica e o período do ano (CHLEBICZ; SLIZEWSKA, 2018).

Em suínos, a infecção por *Salmonella* também é considerada assintomática, não afetando nem o crescimento nem os índices de produção dos animais. A única exceção é o sorovar Choleraesuis, que é patogênico tanto para os suínos quanto para os humanos. A infecção dos animais pode ocorrer pela ingestão de alimentos contaminados, pelo contato com animais de outras propriedades, por vetores, como insetos, pulgas, pássaros, cachorros ou gatos ou pelo próprio ambiente de criação. A contaminação da carne suína, por sua vez, ocorre no abatedouro, através do contato direto ou indireto da carcaça com o conteúdo intestinal ou fezes (CHLEBICZ; SLIZEWSKA, 2018).

3.1.4 Infecção por *Salmonella* em humanos

Em humanos, a infecção por *Salmonella* pode apresentar diferentes manifestações clínicas: febre entérica (também conhecida como febre tifóide ou febre paratífóide), gastroenterite, bacteremias e complicações extraintestinais (ENG *et al.*, 2015).

A febre entérica é uma infecção sistêmica e invasiva, causada pelos sorovares Typhi e Paratyphi A, B e C, que são encontrados exclusivamente em humanos, única fonte de transmissão desses patógenos. A presença dessas bactérias em água ou alimentos está relacionada à superpopulação em áreas com falta de condições sanitárias adequadas. O maior número de casos de febre entérica é observado na África e nas regiões sudoeste e central da Ásia. Os sintomas típicos incluem dor de cabeça, dor de estômago, febre, diarreia ou constipação e perda de apetite, podendo evoluir para problemas respiratórios e neurológicos, hepato e esplenomegalias, perfuração intestinal e morte. O período médio de incubação é de 14 dias, com sintomas persistindo por até três semanas (GAL-MOR *et al.*, 2014; CHLEBICZ; SLIZEWSKA, 2018).

A gastroenterite é a manifestação mais comumente associada à infecção por *Salmonella*, sendo causada pelos sorovares conhecidos como não-tifóides (NTS), principalmente *Salmonella ser. Enteritidis*, *Salmonella ser. Typhimurium*, *Salmonella ser. Newport* e *Salmonella ser. Heidelberg*. (GUT *et al.*, 2018). A infecção por NTS ocorre pela ingestão de água e alimentos contaminados, como carnes de aves e suínos, produtos lácteos, ovos, frutas e vegetais (MAKA; POPOWSKA, 2016). Os principais sintomas incluem diarreia, dor de cabeça, dor abdominal, náusea, vômito, febre e desidratação, e começam a aparecer de seis a 48 horas após o contato com o patógeno. Esse tipo de infecção pode afetar pessoas de todas as idades, mas a maior incidência ocorre em indivíduos menores de cinco anos e maiores de 60 anos (URIBE; SUÁREZ, 2006). Na maioria dos casos, as infecções são auto-limitantes, com sintomas desaparecendo em até sete dias, não sendo necessário o tratamento com antibióticos (CHLEBICZ; SLIZEWSKA, 2018).

Aproximadamente 5% dos pacientes infectados com NTS podem desenvolver bacteremias e complicações extraintestinais, como infecções urinárias, pneumonia, endocardite e meningite. Esses tipos de manifestações ocorrem quando a *Salmonella* consegue entrar na corrente sanguínea, após invasão da barreira intestinal, sendo mais comum em pacientes imunocomprometidos. Quase todos os

sorovares de *Salmonella* são capazes de causar infecções invasivas, mas a maioria dos casos está associada à *Salmonella ser. Dublin* e *Salmonella ser. Choleraesuis*. Em condições graves, a resposta imune desencadeada por esse tipo de infecção pode levar ao choque séptico, com alta taxa de mortalidade (ENG *et al.*, 2015). Nesses casos, é necessário o tratamento com fluorquinolonas em adultos ou cefalosporinas de terceira geração em crianças, devido à gravidade da situação (CHLEBICZ; SLIZEWSKA, 2018).

3.1.5 *Salmonella* em alimentos

Estima-se que infecções por *Salmonella* causem mais de 90 milhões de casos de diarreia por ano em todo o mundo, sendo 85% dos casos associados a alimentos (CHLEBICZ; SLIZEWSKA, 2018). Nos Estados Unidos, dados do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) indicam que *Salmonella* cause cerca de 1,2 milhões de casos de doenças por ano, dos quais 1 milhão têm origem alimentar (CDC, 2018). Na União Europeia, apesar da aplicação de normas regulatórias para manter os níveis de *Salmonella* sob controle tanto em animais quanto em humanos, o número de casos de salmonelose humana vem aumentando desde 2013 (DE CESARE, 2018). No Brasil, dados do Ministério da Saúde indicam que a *Salmonella* é o principal agente etiológico de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), sendo identificada em 35,0% dos casos. No entanto, na maioria das vezes não há registros de quais os alimentos estão associados aos surtos (MS, 2018a). De uma forma geral, alimentos de origem animal, principalmente carne de frango e ovos, são considerados as principais fontes de infecção por *Salmonella* (ANTUNES *et al.*, 2016).

A carne de frango é a mais consumida pela população brasileira, com um consumo anual estimado em 42,07kg por pessoa. Além disso, o Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador de carne de frango no mundo (ABPA, 2018). A presença de *Salmonella* em carne de frango é avaliada pelo Ministério da Agricultura através do Programa Nacional de Controle de Patógenos (PNCP). No período entre fevereiro de 2017 e março de 2018, por exemplo, 132 abatedouros de frango com inspeção federal tiveram amostras de carcaças de frango coletadas para o PNCP. Das 2.592 amostras analisadas por laboratórios oficiais do MAPA, 466 (17,97%) apresentaram presença de *Salmonella* (MAPA, 2018). Índices semelhantes de prevalência já haviam sido identificados nos programas de 2014 e 2016 (MAPA,

2017b). Na União Européia, em 2016, a presença de *Salmonella* em carne de frango foi identificada em 6,39% das amostras analisadas (DE CESARE, 2018).

A carne de porco também é uma importante fonte de contaminação por *Salmonella*. O consumo anual estimado de carne de porco pela população brasileira é de 14,7kg por pessoa, e o Brasil é o quarto maior produtor e exportador desse tipo de carne no mundo (ABPA, 2018). A presença de *Salmonella* em carcaças suínas foi avaliada pelo MAPA de forma exploratória entre outubro de 2014 e julho de 2015. Os resultados finais dessa avaliação indicaram a presença de *Salmonella* em 10,3% das amostras de carcaças coletadas antes do resfriamento e 5,55% das coletadas após o resfriamento. Os resultados do programa exploratório do MAPA foram utilizados como base para inclusão de carcaças suínas no PNCP, o que deve ocorrer em julho de 2019, de acordo com a Instrução Normativa nº 60, de 20 de dezembro de 2018 (BRASIL, 2018). Na Europa, em 2016, o índice de detecção de *Salmonella* em carne suína foi de 2,38% (DE CESARE, 2018).

3.2 Resistência a antimicrobianos na produção de alimentos

A resistência a antimicrobianos (RAM) é um problema que vem crescendo e ameaçando a saúde pública em todo o mundo. Infecções por microrganismos resistentes podem resultar em aumento do tempo de duração das doenças, prolongamento da estadia hospitalar, elevação do risco associado a cirurgias e procedimentos médicos e aumento da taxa de mortalidade e dos custos diretos e indiretos relacionados às doenças infecciosas (WHO, 2015).

O uso incorreto ou excessivo de antibióticos é o principal fator que leva ao desenvolvimento de resistência em todo o mundo. Os antibióticos estão entre as classes de medicamentos mais comumente prescritas na medicina humana. No entanto, também possuem extenso uso na medicina veterinária e em animais de produção (CDC, 2013).

É difícil estimar a quantidade de antibióticos que são utilizados na produção de alimentos em nível mundial, uma vez que atualmente apenas 42 países possuem sistemas de coleta de dados sobre utilização de antimicrobianos na pecuária (FAO, 2019). No entanto, evidências sugerem que o montante seja, no mínimo, equivalente ao utilizado por humanos. Nos países do BRICS (Brasil, Rússia, China, Índia e África do Sul), estima-se que o consumo de antibióticos por animais produtores de carne possa aumentar 99% entre 2010 e 2030. Além disso, nos Estados Unidos, mais de

70% dos antibióticos considerados de importância médica são utilizados também em animais (O'NEILL, 2015).

Na produção agropecuária, os antibióticos são utilizados de forma terapêutica para o tratamento de infecções respiratórias e entéricas, principalmente de animais submetidos a sistemas de produção intensiva (WHO, 2011). No entanto, grande parte desses medicamentos é utilizada também em animais saudáveis, de forma profilática, para impedir o desenvolvimento de infecções em rebanhos, e também como promotores de crescimento (O'NEILL, 2015).

O uso de antibióticos para promoção de crescimento é bastante controverso, uma vez que se baseia em doses subterapêuticas do medicamento para acelerar o ritmo de ganho de peso dos animais, o que pode levar à promoção do desenvolvimento de genes de resistência nas bactérias (O'NEILL, 2015; FAO, 2016). A União Europeia, ainda em 2006, banuiu o uso de antibióticos como aditivos para alimentação animal, justamente pelo risco de aumento da RAM devido a essa prática (UNIÃO EUROPEIA, 2003).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), vem proibindo gradativamente a utilização de alguns antibióticos ou classes de antibióticos na fabricação de produtos destinados à alimentação animal com finalidade de promotores de crescimento ou melhoradores de desempenho animal, como é o caso da avoparcina, antibióticos arsenicais e antimoniais, cloranfenicol e nitrofuranos, olaquinox, carbadox, anfenicóis, tetraciclina, β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas, espiramicina e eritromicina, e colistina (MAPA, 2017a). Essas proibições baseiam-se tanto na toxicidade de alguns medicamentos quanto na possibilidade de desenvolvimento de RAM.

A utilização indiscriminada de antibióticos na produção agropecuária pode fazer com que cepas de bactérias resistentes passem para o ser humano através de três vias distintas: (i) pelo contato direto entre humanos e animais; (ii) através da cadeia alimentar, tanto pelo preparo quanto pelo consumo de alimentos contaminados; e (iii) indiretamente pela excreção dos animais tanto de bactérias resistentes quanto de antibióticos não metabolizados, causando uma pressão seletiva no ambiente, que leva à resistência a esses medicamentos (O'NEILL, 2015). Além disso, o comércio internacional de animais e de produtos de origem animal contribui para a disseminação da RAM também em países geograficamente distantes de onde o problema teve início (WHO, 2011).

3.2.1 Resistência a antimicrobianos em *Salmonella*

Infecções por *Salmonella* resistentes a antimicrobianos podem levar a hospitalizações, prolongamento dos sintomas, falhas no tratamento, aumento do risco de complicações, como doenças invasivas, e aumento do risco de morte associada à infecção (MAKA; POPOWSKA, 2016). *Salmonellae* resistentes são consideradas uma grave ameaça à saúde pública nos Estados Unidos (CDC, 2013).

A ingestão de alimentos contaminados, principalmente carne de aves, suínos, produtos lácteos e ovos, é uma importante via de transmissão de bactérias resistentes de animais para humanos, uma vez que bactérias patogênicas e comensais podem trocar elementos genéticos móveis mediadores de resistência no ambiente intestinal (MAKA; POPOWSKA, 2016).

Os principais mecanismos de resistência encontrados em *Salmonella* são: (i) produção de enzimas que inativam o agente antimicrobiano através de degradação ou modificação estrutural; (ii) redução da permeabilidade celular bacteriana aos antibióticos; (iii) superprodução de bombas de efluxo; e (iv) modificação de proteínas alvo através de alteração da sequência de aminoácidos ou de inclusão de grupamentos químicos que alterem a conformação espacial protéica, impedindo a ligação da molécula do antibiótico (HUR *et al.*, 2012; MAKA; POPOWSKA, 2016).

Já foram reportadas cepas de *Salmonella* de origem animal resistentes às principais classes de antibióticos utilizadas na medicina humana e veterinária, como quinolonas e fluorquinolonas, sulfonamidas e trimetoprim, penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, cloranfenicol, tetraciclina, macrolídeos e polimixinas. Além disso, a presença de *Salmonella* multirresistente, apresentando resistência a três ou mais classes de antibióticos tem sido identificada em países de todos os continentes, destacando a abrangência global do problema (MAKA; POPOWSKA, 2016; CAMPOS *et al.*, 2016; NA *et al.*, 2017; ABDI *et al.*, 2017; WANG, Y. *et al.*, 2017).

Estudos relatam que *Salmonella* isoladas de aves, principalmente perus e frangos de corte, tendem a ser mais resistentes do que as encontradas em suínos. Isolados de suínos, por sua vez, apresentam maior resistência do que os de bovinos. A frequência de resistência ou multirresistência é variável em diferentes sorovares de *Salmonella*. Enquanto nos Estados Unidos, perfis de multirresistência em *Salmonella* de origem animal têm sido associados principalmente aos sorovares

Kentucky e Typhimurium, na Europa a multirresistência está mais frequentemente associada à *Salmonella ser. Infantis*. (MCDERMOTT *et al.*, 2018).

A maioria dos genes de resistência encontrados em *Salmonella* está localizada em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e cassetes gênicos em integrons de classe I, o que facilita a transferência horizontal de genes. Genes de resistência a importantes classes de antibióticos, como fluorquinolonas, β -lactâmicos e polimixinas podem ser encontrados em plasmídeos com capacidade para se transferir por conjugação para outras bactérias da mesma ou de outra espécie, demonstrando o potencial de disseminação de genes de resistência a partir de bactérias encontradas em alimentos (MAKA; POPOWSKA, 2016).

3.2.2 Resistência a quinolonas e fluorquinolonas em *Salmonella*

As quinolonas, e principalmente as fluorquinolonas, estão entre os antibióticos mais utilizados para o tratamento de salmonelose tanto em infecções humanas quanto veterinárias, devido ao seu amplo espectro de ação. A OMS considera as quinolonas como uma classe de antibióticos criticamente importante para a medicina humana (WHO; AGISAR, 2017). Além disso, *Salmonellae* resistentes a fluoroquinolonas são considerados patógenos de alta prioridade para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos (WHO, 2017a).

A resistência a fluorquinolonas em *Salmonella* geralmente está associada a mutações cromossômicas pontuais em regiões determinantes de resistência a quinolonas (QRDRs). Essas mutações causam substituições em aminoácidos que modificam a DNA girase (genes *gyrA* e *gyrB*) ou a topoisomerase IV (genes *parC* e *parE*), impedindo a ligação do antibiótico a seus alvos. As alterações mais frequentemente relatadas são: Ser83→Phe (*gyrA*), Asp87→Gly,Tyr (*gyrA*) e Ser80→Ile, Arg (*parC*) (MAKA; POPOWSKA, 2016). Mutações nos genes *gyrB* e *parE* são menos frequentes (CORREIA *et al.*, 2017). Em *Salmonella*, mutações nas QRDRs estão relacionadas com resistência ao ácido nalidíxico e suscetibilidade reduzida ao ciprofloxacino (FERRARI *et al.*, 2013).

Resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) também tem sido descritos em *Salmonella*, e envolve três mecanismos principais: (i) genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*), que codificam uma proteína de 218 aminoácidos que protege as enzimas alvos; (ii) gene *aac(6')-Ib-cr*, que media a acetilação de algumas

quinolonas; e (iii) gene *qepA*, que codifica uma bomba de efluxo específica para quinolonas, e gene *oqxAB*, capaz de produzir bombas de efluxo que causam resistência a várias classes de antimicrobianos (FERRARI *et al.*, 2013; PRIBUL *et al.*, 2017; KARP *et al.*, 2018). Importante ressaltar que os genes *qnr* conferem resistência às fluorquinolonas, mas não ao ácido nalidíxico (EFSA; ECDC, 2018).

Plasmídeos contendo genes de resistência a quinolonas também podem carrear genes de resistência a outras classes de antibióticos, principalmente cefalosporinas (que também são utilizadas no tratamento de salmoneloses). Nesses casos, o uso de um antibiótico pode co-selecionar resistência a outros antimicrobianos, limitando as possibilidades de tratamento. Além disso, a localização plasmidial facilita a disseminação desses genes, que podem ser transferidos de forma horizontal a outras bactérias (KARP *et al.*, 2018).

Altas taxas de resistência a fluoquinolonas têm sido relatadas em *Salmonella* isoladas de aves em vários países. Na União Européia, em 2016, 61,5% dos isolados de *Salmonella* de carnes frango apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e 64,7% eram resistentes ao ciprofloxacino. Os sorovares Kentucky e Infantis foram os mais associados à resistência a fluorquinolonas (EFSA; ECDC, 2018). Na Colômbia, um estudo identificou 66,0% de resistência ao ácido nalidíxico e 41,2% de resistência ao ciprofloxacino em isolados de carnes de frango vendidas no varejo (DONADO-GODOY *et al.*, 2015). Na China, Zhu *et al.* (2017), avaliando isolados de *Salmonella* obtidos de frangos de corte durante o abate e processamento em um frigorífico local, identificaram 99,5% de resistência ao ácido nalidíxico e 48,7% ao ciprofloxacino.

No Brasil, um estudo de meta-análise identificou um aumento significativo da resistência ao ácido nalidíxico em isolados de *Salmonella* de humanos e aves, entre 1995 e 2014 (VOSS-RECH *et al.*, 2017). Por outro lado, níveis extremamente baixos de resistência a fluorquinolonas têm sido encontrados no Canadá e nos Estados Unidos (PHAC, 2018; FDA, 2017), onde essa classe de antibióticos não tem uso aprovado para frangos de corte (MAINALI *et al.*, 2014; FDA, 2018b). Entretanto, é importante ressaltar que a União Europeia adota pontos de corte mais conservadores ($R > 0,06\text{mg/L}$) para avaliação da resistência ao ciprofloxacino quando comparado com os Estados Unidos ($R > 0,5\text{mg/L}$).

Em isolados de suínos, as taxas de resistência a fluorquinolonas em geral são menores do que as observadas em aves. Na União Européia, os níveis de

resistência ao ácido nalidíxico e ao ciprofloxacino mantiveram-se baixos e praticamente constantes na maioria dos países no período entre 2009 e 2015, em isolados de *Salmonella* de carne suína. Em 2015, dos 750 isolados avaliados, apenas 3,2% apresentou resistência ao ácido nalidíxico e 4,3% ao ciprofloxacino (EFSA; ECDC, 2017).

Nos Estados Unidos, o uso de enrofloxacino é permitido para o tratamento e controle de colibacilose e doenças respiratórias em suínos. No entanto, os níveis de resistência a fluorquinolonas são extremamente baixos, variando entre 0% e 1,2% para o ácido nalidíxico, e entre 0% e 0,6% para o ciprofloxacino, no período entre 2012 e 2015, em isolados de *Salmonella* de origem suína (FDA, 2017). A pequena elevação observada na resistência ao ciprofloxacino deve-se a genes plasmidiais (PMQR), sendo esse um fenômeno recente no país (TYSON *et al.*, 2017).

No Brasil, Lopes *et al.* (2015) avaliaram o perfil de resistência de isolados de *Salmonella* obtidos de carcaças suínas entre 2008 e 2011, na região sul. Os resultados obtidos mostraram que 43,1% dos isolados apresentavam resistência ao ácido nalidíxico e 0,8%, ao ciprofloxacino.

3.2.3 Resistência a cefalosporinas de terceira geração em *Salmonella*

As cefalosporinas de espectro estendido são os antibióticos de escolha para o tratamento de salmoneloses em crianças, sendo também utilizadas para os casos de infecções invasivas por *Salmonella* (IWAMATO *et al.*, 2017). Além disso, a OMS considera que as cefalosporinas de terceira geração são uma classe de antibióticos criticamente importante para a medicina humana (WHO; AGISAR, 2017).

Em *Enterobacteriaceae*, a resistência a cefalosporinas é geralmente atribuída a produção de β -lactamases do tipo AmpC e a β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) (Ziech *et al.*, 2016). *Salmonellae* não apresentam o gene *ampC* de forma constitutiva no cromossomo. No entanto, genes de β -lactamases do tipo AmpC podem ser encontrados em plasmídeos (SALIU *et al.*, 2017). CMY-2 é a principal AmpC β -lactamase encontrada em *Salmonella*, sendo reportada principalmente em países da América (CAMPOS *et al.*, 2018).

Genes de ESBLs são encontrados principalmente em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, integrons e transposons, mas também podem ser encontrados no cromossomo bacteriano. Plasmídeos contendo genes ESBL

frequentemente carregam genes de resistência a outros antibióticos ou a metais pesados, o que pode fazer com que sejam co-selecionados (SALIU *et al.*, 2017). Os genes de ESBLs *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX} e *bla*_{OXA} já foram encontrados em *Salmonella* (MAKA; POPOWSKA, 2016).

Diversos sorovares de *Salmonella* (Enteritidis, Heidelberg, Infantis, Kentucky, Typhimurium, Virchow), isolados principalmente de aves (animais e alimentos), têm sido associados à disseminação global de ESBLs e de β -lactamases plasmidiais do tipo AmpC. As enzimas CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-15, TEM-52 e CMY-2 são as mais frequentemente encontradas em aves e em carnes de aves. A transmissão desses genes tem sido associada a diversas famílias plasmidiais, como IncI1 (*bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM-52} e *bla*_{CMY-2}), IncA/C (*bla*_{CMY-2}) e IncHI2 (*bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-9}) (ANTUNES *et al.*, 2016).

Na Europa, em 2016, os isolados de *Salmonella* de frango de corte apresentaram resistência média de 2,6% a cefalosporinas de terceira geração (cefotaxima), sendo que 16 dos 19 países que fizeram essa avaliação reportaram ausência de resistência a essa classe de antibióticos (EFSA; ECDC, 2018). Em 2014, o relatório da EFSA (*European Food Safety Authority*) indicou que 60% dos isolados de frangos de corte que apresentaram fenótipo de ESBL pertenciam ao sorovar Infantis (EFSA; ECDC, 2016).

No Canadá, o monitoramento da resistência a antimicrobianos em carne de frango indicou índices de 9,6% a 29,9% de resistência a cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona) entre 2006 e 2011. No entanto, na metade de 2014, a indústria de aves, voluntariamente, definiu que antimicrobianos de importância para a medicina humana não seriam mais utilizados com o propósito de prevenção de doenças em animais. Após essa decisão, foi verificada uma redução significativa da resistência à ceftriaxona em *Salmonella* isoladas de carne de frango, de 26,2% em 2013 para 6,6% em 2016. Isolados humanos de *Salmonella* não tifóide também apresentaram redução da resistência à ceftriaxona nesse período, variando de 6,4% em 2013 para 4,0% em 2016. Entre os isolados de carne de frango, os principais sorovares associados a resistência a cefalosporinas de terceira geração são *Salmonella ser.* Heidelberg e *Salmonella ser.* Kentucky (PHAC, 2018).

Nos Estados Unidos, após um pico de 37,9% de resistência à ceftriaxona em isolados de carne de frango, em 2009, o FDA (*Food and Drug Administration*) restringiu o uso de algumas cefalosporinas em animais de produção em 2012. Após

a adoção dessa medida, foi verificado um gradativo declínio na resistência a cefalosporinas de terceira geração em isolados de carne de frango, chegando a 12,7% em 2015 (MCDERMOTT *et al.*, 2018; FDA, 2017). A resistência à ceftriaxona nos Estados Unidos está associada principalmente com os sorovares *Salmonella ser. Kentucky* em aves de corte, *Salmonella ser. Typhimurium* em carne de frango, *Salmonella ser. Heidelberg* em perus e *Salmonella ser. Newport* em bovinos. Dados do sistema de monitoramento americano (NARMS – *National Antimicrobial Resistance Monitoring System*) indicam que esse tipo de resistência é mediada principalmente por genes *bla_{CMY}*. No entanto, ocorrências de ESBLs passaram a ser identificadas entre 2012 e 2014, principalmente devido a genes da família *bla_{CTX-M}* (MCDERMOTT *et al.*, 2018).

No Brasil, índices elevados de resistência à ceftriaxona (75,0%) e ao ceftiofur (43,8%) foram verificados em isolados de *Salmonella ser. Heidelberg* de carcaças de frango (MEDEIROS *et al.*, 2011). Em um estudo avaliando isolados de *Salmonella* de carcaças de aves e produtos comerciais obtidos entre 2007 e 2011, Costa *et al.* (2013) identificaram um aumento exponencial no número de perfis de multiresistência e de sorovares que apresentavam resistência a cefalosporinas de terceira geração. O uso de ceftiofur, cefalosporina de amplo espectro de uso veterinário, em pintinhos de um dia para o controle da mortalidade por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* é um importante fator que pode levar à resistência a essa classe de medicamentos (COSTA *et al.*, 2013).

O monitoramento da resistência a cefalosporinas de terceira geração em isolados de *Salmonella* de origem suína indicam baixas taxas de resistência. Na União Européia, em 2015, apenas 1,1% dos isolados obtidos de carcaças suínas apresentaram resistência a cefotaxima. A resistência a cefalosporinas de terceira geração foi reportada apenas em cinco países (Bélgica, República Checa, Alemanha, Portugal e Espanha), todos em baixos índices (0,8% a 4,3%). A avaliação desses isolados revelou a presença de fenótipos ESBL, AmpC e combinação de ESBL com AmpC (EFSA; ECDC, 2017). Nos Estados Unidos, dados do NARMS sobre resistência em isolados de *Salmonella* de suínos indicam uma variação de resistência a ceftriaxona de 1,6% a 5,5% no período de 2004 a 2015 (FDA, 2017). No Brasil, um estudo que avaliou a resistência antimicrobiana em 225 isolados de *Salmonella* obtidos em diferentes etapas da cadeia de produção de

suínos na região sul identificou 100% de suscetibilidade à cefotaxima e ceftazidima (LOPES *et al.*, 2015).

3.2.4 Resistência a polimixinas e gene *mcr-1*

As polimixinas são antibióticos polipeptídicos catiônicos que atuam sobre a membrana externa de bactérias Gram negativas, causando desestabilização do lipopolissacarídeo (LPS), aumento da permeabilidade da membrana celular, extravasamento do conteúdo citoplasmático e morte bacteriana (POIREL *et al.*, 2017).

As polimixinas tiveram uso bastante restrito na medicina humana por muitos anos, devido ao seu potencial de causar nefrotoxicidade e neurotoxicidade. No entanto, o aumento de casos de bactérias Gram negativas multiresistentes fez com que essa classe de antibióticos voltasse a ser tornar uma importante opção terapêutica, principalmente para o tratamento de infecções por bactérias produtoras de carbapenemases (POIREL *et al.*, 2017). Atualmente, as polimixinas são consideradas uma classe de antibióticos criticamente importante para a medicina humana (WHO; AGISAR, 2017).

Por outro lado, as polimixinas têm sido utilizadas por décadas na medicina veterinária e na produção agropecuária. A colistina (polimixina E), principal antibiótico da classe, é utilizada tanto no tratamento e prevenção de infecções gastrintestinais, principalmente em aves e suínos submetidos a sistemas de criação intensiva, quanto na promoção de crescimento de animais de produção (POIREL *et al.*, 2017). Em 2015, o uso estimado de colistina na produção de alimentos era de 12 mil toneladas por ano, com a expectativa de chegar a 16,5 mil toneladas em 2021 (AL-TAWFIQ *et al.*, 2017). No Brasil, o uso de colistina como aditivo zootécnico melhorador de desempenho (promotor de crescimento) foi proibido pelo Ministério da Agricultura em novembro de 2016 (BRASIL, 2016b).

O mecanismo mais comum de resistência às polimixinas ocorre através da adição de grupamentos catiônicos ao lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa das bactérias Gram negativas, de forma a impedir a ligação das moléculas do antibiótico (POIREL *et al.*, 2017). Por muitos anos, esse mecanismo ficou restrito a mutações cromossômicas, envolvendo principalmente os genes *pmrAB*, *phoPQ* e *mgrB*, que permitem apenas a transmissão vertical da resistência (LIU *et al.*, 2016).

Em 2015, foi descrito pela primeira vez, na China, o gene *mcr-1*, que codifica uma proteína capaz de adicionar um grupamento fosfoetanolamina ao lipídeo A, tornando o LPS mais catiônico, de forma similar ao que já ocorre nas mutações cromossômicas de resistência às polimixinas. A localização plasmidial do gene *mcr-1* passou a permitir a transmissão vertical desse mecanismo de resistência a outras bactérias, facilitando sua disseminação (LIU *et al.*, 2016).

Após a primeira descrição, o gene *mcr-1* passou a ser identificado em diversos países, em todos os continentes. O gene *mcr-1* tem sido reportado em diferentes espécies de enterobactérias, incluindo *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei* e *Salmonella enterica*, isoladas de humanos, animais, ambiente e alimentos (carnes e vegetais) (POIREL *et al.*, 2017). Em *Salmonella*, o gene *mcr-1* tem sido descrito em diversos sorovares, incluindo Albany, Anatum, Derby, Indiana, Infantis, Java, Newport, Paratyphi B, Rissen, Schwartzengrund, Typhimurium, Virchow, 1,4,[5],12:i:- e 4,[5],12:i:- (SCHWARZ; JOHNSON, 2016; CARNEVALI *et al.*, 2016; CHIOU *et al.*, 2017; WANG, J. *et al.*, 2017; CARFORA *et al.*, 2018). No Brasil, o gene *mcr-1* foi reportado em *E. coli* isoladas de animais, pacientes, água do mar e alimentos (LENTZ *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2017; MONTE *et al.*, 2017; PILLONETTO *et al.*, 2019), em *K. pneumoniae* de pacientes (AIRES *et al.*, 2017; DALMOLIN *et al.*, 2018) e em *S. enterica* de alimentos (RAU *et al.*, 2018; MORENO *et al.*, 2019).

Plasmídeos contendo o gene *mcr-1* também podem carrear genes de resistência a outras importantes classes de antibióticos, como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, fosfomicina, sulfonamidas e tetraciclina. Nesses casos, a utilização de outros antibióticos, que não as polimixinas, também poderia colaborar para a seleção e disseminação de isolados contendo o gene *mcr-1* (POIREL *et al.*, 2017).

O gene *mcr-1* tem sido encontrado em diversos grupos de incompatibilidade de plasmídeos. No entanto, mais de 90% dos plasmídeos descritos pertencem aos grupos IncHI2, IncI2 e IncX4. Os plasmídeos IncHI2 apresentam o maior tamanho, com sequências de até 267 kb, e podem carrear diversos outros genes de resistência, inclusive ESBLs. A ocorrência de *mcr-1* e *bla*_{CTX-M-1} em um mesmo plasmídeo IncHI2 foi identificada em isolados de *E. coli* de frangos na Tunísia, e de

Salmonella ser. Typhimurium de alimentos e bezerros com sinais clínicos de infecção, em Portugal e na França, respectivamente (MATAMOROS *et al.*, 2017).

Plasmídeos IncI2 carreando o gene *mcr-1* são encontrados principalmente na Ásia, tendo baixa prevalência em outras regiões (MATAMOROS *et al.*, 2017). De fato, o primeiro plasmídeo carreando o gene *mcr-1* descrito, na China, pertencia ao grupo de incompatibilidade IncI2 (LIU *et al.*, 2016). Esse tipo de plasmídeo também pode carrear genes de ESBL. Yang *et al.* (2016) identificaram a co-ocorrência de *bla*_{CTX-M-55} e *mcr-1* em plasmídeos IncI2 obtidos de *Salmonella enterica* de frangos na China.

Plasmídeos IncX4 contendo o gene *mcr-1* são distribuídos globalmente, sendo encontrados na Europa, na Ásia e também em outras regiões. Esse tipo de plasmídeo, em geral, não possui outros genes de resistência; no entanto, podem ser encontrados em bactérias que apresentam perfil de multirresistência (CAMPOS *et al.*, 2016). No Brasil, o gene *mcr-1* foi reportado em plasmídeos IncX4 em todos os casos relatados até o momento, incluindo diferentes espécies e diferentes origens (FERNANDES *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2017; MONTE *et al.*, 2017; AIRES *et al.*, 2017; DALMOLIN *et al.*, 2018). Em isolados de *Salmonella*, o gene *mcr-1* tem sido reportado em plasmídeos IncX4 de diferentes sorovares, incluindo *Salmonella ser.* Typhimurium, *Salmonella ser.* 1,4,[5],12:i:-, *Salmonella ser.* Rissen, *Salmonella ser.* Java, *Salmonella ser.* Anatum, *Salmonella ser.* Schwartzengrund e *Salmonella ser.* Derby (TORPHDAL *et al.*, 2016; CAMPOS *et al.*, 2016; VELDMAN *et al.*, 2016; GARCIA-GRAELLS *et al.*, 2018).

Em relação ao ambiente genético, o gene *mcr-1* geralmente está localizado de forma adjacente ao gene *pap2*. Os genes *mcr-1-pap2* podem ser encontrados tanto entre 2 cópias da sequência de inserção IS*Ap1*, produzindo um transposon composto, quanto com apenas uma cópia de IS*Ap1* em um dos lados ou até na ausência desse elemento genético móvel (QUIROGA *et al.*, 2019). A descoberta do gene *mcr-1* em um plasmídeo conjugativo contendo IS*Ap1* fez com que essa sequência de inserção passasse a ser associada com a capacidade do gene se mobilizar e se disseminar entre diferentes cepas e espécies. No entanto, plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncX4 não possuem nenhuma cópia de IS*Ap1* (LUO *et al.*, 2017). O exato mecanismo relacionado com a disseminação da resistência a polimixinas em plasmídeos IncX4 requer maiores investigações, mas parece estar associado a sequência *mcr-1-pap2* (LI, A. *et al.*, 2016). Dessa forma, tem sido

proposto que a presença ou a ausência da sequência de inserção IS*ApI1* esteja relacionada com a adaptação do gene *mcr-1* a um novo hospedeiro. Um transposon composto indicaria uma aquisição recente do gene, enquanto a ausência da IS*ApI1* ou a presença de uma única cópia sugeriria que já ocorreu uma adaptação (QUIROGA *et al.*, 2019).

Até o momento, diversas variantes do gene *mcr-1* já foram descritas na literatura (*mcr-1.2* a *mcr-1.8*) ou depositadas no GenBank (*mcr-1.9*, *mcr-1.11*, *mcr-1.12* e *mcr-1.13*). Essas variantes diferem entre si por um aminoácido e possuem efeitos similares ao *mcr-1*. Além disso, várias outras determinantes do gene *mcr* (*mcr-2* a *mcr-8*) têm sido reportadas em diferentes bactérias (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enterica* ser. Typhimurium, *S. enterica* ser. Paratyphi B dTa+ e *Moraxella sp.*), tanto de humanos quanto de animais de produção, em diferentes países (Bélgica, Suíça, Malásia, Tailândia, Estados Unidos, Alemanha, Grã-Bretanha e China) (ABUOUN *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018; QUIROGA *et al.*, 2019). Na América Latina, além do gene *mcr-1*, há relato apenas do gene *mcr-5*, identificado em *E. coli* de paciente com infecção urinária na Colômbia, e *mcr-5.3*, relatado em *E. coli* co-produtora de CTX-M-8 de um equino infectado, no Brasil (WISE *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2018).

Apesar de haver uma forte relação entre o uso de colistina na medicina veterinária e na produção agropecuária e o desenvolvimento de resistência a polimixinas, os níveis de resistência reportados, tanto em animais quanto em alimentos de origem animal, ainda são baixos. Na Europa, isolados de *Salmonella* de carne de frango apresentaram uma média de 1,4% de resistência à colistina, e, 2016, sendo que cepas resistentes foram reportadas por cinco países, em taxas variando de 1,2% a 16,7%. Em isolados de *Salmonella* de frangos de corte, foi observado 2,5% de resistência à colistina (EFSA; ECDC, 2018). Resultados similares foram obtidos em isolados de *Salmonella* de carcaças suínas, que apresentaram uma média de 1,3% de resistência, em 2015, em níveis variando de 0,8% a 6,3% em seis países. A resistência à colistina foi observada em diferentes sorovares de *Salmonella*, não existindo predominância de algum sorovar em particular. Em 2015, não foi identificada resistência em isolados de *Salmonella* de suínos de engorda em países da União Européia (EFSA; ECDC, 2016).

No Brasil, dados sobre a resistência a colistina em isolados de animais e alimentos ainda são escassos. Voss-Rech *et al.* (2015) avaliaram o perfil de

resistência de isolados de *Salmonella* de frangos de corte, obtidos entre 2009 e 2010, em três estados do Brasil, obtendo 100% de suscetibilidade à colistina. Nos Estados Unidos, a colistina não está disponível para uso em animais de produção. Dessa forma, o NARMS não realiza avaliação fenotípica de resistência a esse antimicrobiano nos monitoramentos de rotina (MCDERMOTT *et al.*, 2018).

3.3 Prevenção e controle da resistência antimicrobiana

O crescimento do número de casos de resistência antimicrobiana nos últimos anos tem levado a uma intensificação das discussões sobre estratégias de controle e prevenção da RAM. Nesse sentido, a OMS publicou, em 2015, um “Plano de Ação Global em Resistência Antimicrobiana”, com o objetivo de garantir, pelo maior tempo possível, o tratamento eficaz e a prevenção de doenças infecciosas, através de medicamentos seguros e de qualidade, utilizados de modo responsável, e acessíveis a todos os que necessitam (WHO, 2015).

O “Plano de Ação Global em Resistência Antimicrobiana” da OMS define cinco objetivos estratégicos para o combate à RAM em nível mundial: (i) melhorar a conscientização e a compreensão sobre resistência antimicrobiana; (ii) fortalecer o conhecimento por meio de vigilância e pesquisa; (iii) reduzir a incidência de infecções; (iv) otimizar o uso de agentes antimicrobianos; e (v) assegurar um investimento sustentável para o combate à resistência antimicrobiana.

Além disso, o “Plano de Ação Global” destaca que ações efetivas de combate à RAM requerem uma abordagem multidisciplinar, alinhada ao conceito de Saúde Única (“*One Health*”), envolvendo de forma internacional os setores de medicina humana e veterinária, agricultura, finanças, meio ambiente, além de consumidores bem informados (WHO, 2015).

Como forma de assegurar o envolvimento dos setores de agropecuária e medicina veterinária no desafio global de combate à RAM, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) publicaram, em 2016, suas estratégias específicas de combate à resistência antimicrobiana, alinhadas ao Plano de Ação Global da OMS (FAO, 2016; OIE, 2016).

A partir da publicação do “Plano de Ação Global”, a OMS espera que cada país desenvolva seu próprio plano de ação nacional, levando em consideração suas particularidades e prioridades nacionais e regionais. Para isso, OMS, FAO e OIE

publicaram, em conjunto, um “Manual para o Desenvolvimento de Planos de Ação Nacionais”, como forma de orientar os países que estão em fase de desenvolvimento ou aperfeiçoamento de seus planos de ação nacionais, de forma alinhada com os objetivos estratégicos do Plano de Ação Global (WHO; FAO; OIE, 2016).

No último relatório de monitoramento do progresso global no combate à resistência antimicrobiana, 93 países (60,4%) informaram que já haviam desenvolvido um plano de ação nacional em resistência antimicrobiana; 51 países (33,1%) relataram estar em fase de desenvolvimento; e 10 (6,5%) indicaram que não tiveram avanços nesse sentido (WHO; FAO; OIE, 2018).

O Brasil publicou recentemente o seu Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (PAN-BR). O PAN-BR foi elaborado em convergência com os objetivos definidos pela aliança tripartite entre OMS, FAO e OIE, apresentados no Plano de Ação Global sobre Resistência aos Antimicrobianos, e tem vigência de cinco anos, entre 2018 e 2022. Foram definidos 14 objetivos principais, 33 intervenções estratégicas e 75 atividades, com participação principalmente do Ministério da Saúde (MS), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Agricultura (MAPA) (MS, 2018b).

3.3.1 Monitoramento integrado da resistência antimicrobiana

Um importante objetivo estratégico do “Plano de Ação Global”, presente também no PAN-BR, é o fortalecimento do conhecimento e das bases científicas da RAM por meio de ações de vigilância e pesquisa. Lacunas importantes que precisam ser preenchidas através de ações relacionadas a esse objetivo incluem: (i) informações sobre incidência e prevalência de patógenos e padrões de resistência em diferentes regiões geográficas; (ii) entendimento sobre como a resistência se desenvolve e se dissemina, e como circula entre seres humanos e animais, através da água, alimentos e meio ambiente; e (iii) capacidade de detecção e elucidação de mecanismos de resistência emergentes (WHO, 2015).

As respostas para essas lacunas dependem da implementação de um programa integrado de monitoramento da resistência antimicrobiana ao longo de toda a cadeia alimentar, ou seja, que envolva animais de produção, alimentos e patógenos humanos de origem alimentar. Programas de monitoramento

consistentes podem fornecer informações relevantes para a tomada de decisões, para o estabelecimento de políticas públicas e para a alocação de recursos financeiros apropriados nas ações de prevenção e controle da resistência antimicrobiana. Os programas de monitoramento dos Estados Unidos (NARMS), da Holanda (MARAN) e da Dinamarca (DANMAP) podem ser considerados como exemplos a serem seguidos, pois combinam dados de várias origens através de parcerias com diversas entidades, possibilitando a obtenção de dados ao longo de toda a cadeia de produção de alimentos (FOUNOU *et al.*, 2016).

Para orientar os países que estão em fase de elaboração de programas de monitoramento, o Grupo Consultivo em Vigilância Integrada de Resistência Antimicrobiana (AGISAR) da OMS estabeleceu alguns requisitos mínimos a serem observados para garantir a obtenção de resultados de suscetibilidade harmonizados e comparáveis nacional e internacionalmente. Entre esses requisitos, encontram-se recomendações relativas à origem das amostras, aos microrganismos a serem monitorados, forma de amostragem, metodologias laboratoriais, análise dos dados e elaboração de relatórios (WHO, 2017b).

3.3.1.1 Origem das amostras

De acordo com a orientação da OMS, um programa integrado de monitoramento da resistência antimicrobiana na cadeia alimentar deve avaliar bactérias isoladas de, pelo menos, as seguintes origens, nessa ordem de prioridade: (i) humanos (pessoas em estabelecimentos de saúde e na comunidade); (ii) alimentos de origem animal obtidos no varejo; e (iii) animais de produção (doentes e saudáveis). Os isolados de todas as origens devem ser testados quanto à suscetibilidade antimicrobiana usando métodos reconhecidos e comparáveis, e usando agentes antimicrobianos semelhantes. Dependendo dos recursos disponíveis, é possível que a implementação desses monitoramentos seja feita de forma gradual ou através da definição de populações de estudo prioritárias (WHO, 2017b).

Os isolados obtidos de humanos para a finalidade de monitoramento da resistência antimicrobiana devem incluir tanto casos esporádicos quanto surtos de DTAs. Amostras de fezes são as fontes mais comuns de patógenos bacterianos relacionados a alimentos. No entanto, como as infecções extra-intestinais estão

associadas a maior morbidade e mortalidade, é importante testar uma proporção maior de isolados que causem doenças invasivas (WHO, 2017b).

Alimentos de origem animal representam a maior via de exposição de humanos a patógenos alimentares que apresentam resistência bacteriana. A seleção do tipo de alimento em que deve ser realizado o monitoramento (carne bovina, suína, de aves, etc.) deve refletir o padrão de consumo da população e a provável prevalência de resistência antimicrobiana em cada setor produtivo. É recomendável que seja feita uma alternância entre os alimentos a serem monitorados a cada ano (ex: aves em um ano, bovinos e suínos no outro) para que se possa obter dados representativos da maior parte da produção agropecuária (WHO, 2017b).

Isolados bacterianos de animais saudáveis devem ser o foco principal da vigilância, uma vez que fornecem uma medida mais realista da resistência antimicrobiana em animais de produção. As amostras devem ser coletadas de animais das mesmas espécies que estão sendo alvo de monitoramento em alimentos de varejo, para permitir a realização de comparações entre os dados obtidos (WHO, 2017b).

3.3.1.2 Microrganismos a serem monitorados

Em todo o mundo, *Salmonella* é o microrganismo prioritário para inclusão em programas integrados de monitoramento da resistência antimicrobiana. *Campylobacter* spp. também é um importante patógeno alimentar comumente incluído em programas de monitoramento, principalmente em países que possuem sistemas já bem estabelecidos. Além desses, podem ser avaliados também microrganismos considerados sentinelas, como *E. coli* e *Enterococcus* spp., que podem atuar como reservatórios de genes de resistência no trato gastrointestinal (WHO, 2017b).

3.3.1.3 Estratégias de amostragem

As estratégias utilizadas para a coleta e seleção das amostras podem afetar a interpretação dos resultados obtidos. Em amostras clínicas, é importante diferenciar isolados bacterianos obtidos de pessoas da comunidade ou que estão sendo admitidas em estabelecimentos de saúde, daqueles obtidos de pacientes após diversos dias de hospitalização. Da mesma forma, alimentos do varejo devem ser

diferenciados em relação à manipulação ou não no ponto de venda (ex: carne moída ou peça inteira). Em relação a amostras de animais de produção, os isolados bacterianos podem ser obtidos em diferentes pontos ao longo da cadeia de produção: (i) na fazenda, diretamente dos animais individualmente; (ii) na fazenda, no ambiente de criação (ex: camas de aviários); (iii) no frigorífico, a partir de amostras cecais; ou (iv) no frigorífico, a partir de amostras de carcaças. Cada um desses possíveis pontos de amostragem tem suas vantagens e desvantagens em relação à facilidade de coleta e interpretação dos resultados de suscetibilidade. Portanto, as estratégias de amostragem utilizadas em cada um dos pontos do monitoramento integrado da resistência antimicrobiana devem estar claramente descritas, de forma a permitir a correta interpretação dos resultados e a comparação com outros programas de vigilância (WHO, 2017b).

3.3.1.4 Metodologias laboratoriais

Os laboratórios que participam dos programas integrados de monitoramento devem ser capazes de isolar e identificar os microrganismos de interesse e realizar os testes de suscetibilidade a partir de métodos internacionalmente aceitos. Testes de controle de qualidade devem ser realizados de acordo com diretrizes internacionais, em frequência adequada. Além disso, também é recomendável a participação em programas externos de garantia da qualidade (ensaios de proficiência) nessa área. A seleção dos antimicrobianos a serem incluídos no programa integrado de monitoramento da resistência deve levar em consideração as particularidades do uso de antimicrobianos em cada país, e permitir a comparação com outros laboratórios e outros países. Alguns agentes antimicrobianos possuem relevância clínica, enquanto outros são incluídos devido à sua importância epidemiológica (WHO, 2017b).

3.3.1.5 Análise dos dados e elaboração de relatórios

Os dados gerados pelos programas de monitoramento integrados de resistência antimicrobiana devem ser avaliados de forma abrangente, contemplando todos os tipos de amostras analisadas, com ênfase na saúde humana. Dados epidemiológicos sobre as amostras analisadas devem estar disponíveis para serem avaliados conjuntamente com os resultados dos testes suscetibilidade (WHO, 2017b).

Os resultados de suscetibilidade devem ser avaliados de forma quantitativa através dos valores de concentração inibitória mínima ou de zonas de inibição. A interpretação categórica (resistente, intermediário ou sensível) possui um potencial menor de fornecer informações a respeito das características epidemiológicas da resistência. Resultados quantitativos, por outro lado, permitem a caracterização dos isolados baseada nos níveis de resistência, a identificação de subpopulações bacterianas, a e a reanálise de dados utilizando diferentes critérios interpretativos (WHO, 2017b).

Quando possível, os dados de monitoramento devem ser avaliados em conjunto com outras informações disponíveis, como uso de antimicrobianos, resultados de tipagem molecular (PFGE, MLST), sequenciamento de genes de resistência, WGS e tipagem plasmidial, e investigações de surtos alimentares (WHO, 2017b).

3.3.2 O uso do sequenciamento de genoma completo (WGS) no monitoramento da resistência antimicrobiana

Nos últimos anos, a redução nos custos dos reagentes e equipamentos e a evolução das ferramentas de bioinformática tem tornado o sequenciamento de genomas bacterianos uma tecnologia cada vez mais rápida e acessível, que vem sendo adotada por diversos laboratórios, inclusive com foco em segurança alimentar. Nos Estados Unidos, o FDA vem construindo, desde 2012, uma rede internacional de laboratórios para sequenciamento de patógenos alimentares, a Genome Trakr. As sequências genômicas geradas por esses laboratórios são depositadas em um banco de dados público, contendo a informação geográfica do local onde o patógeno foi isolado (outros metadados também podem ser incluídos). Análises filogenéticas desses dados facilitam a identificação de surtos alimentares, a determinação dos alimentos envolvidos nos surtos, bem como as possíveis origens geográficas desses alimentos (WHO, 2017b; FDA, 2018a).

Em programas integrados de monitoramento da resistência antimicrobiana, os dados gerados pelo sequenciamento de genoma completo (WGS) ajudam a entender, em detalhes, como a resistência se dissemina ao longo da cadeia alimentar (do campo à mesa), permitindo a adoção de intervenções mais direcionadas e efetivas. Além disso, o WGS possui um poder discriminatório maior

do que outros métodos de tipagem bacteriana, como sorotipagem, PFGE e perfis de resistência (WHO, 2018).

A substituição dos métodos tradicionais de identificação e caracterização dos isolados bacterianos, que incluem diversas análises individuais, pelo WGS pode permitir um aumento da vigilância integrada da resistência antimicrobiana, devido à redução do tempo de análise, dos custos e da mão de obra necessária. Um maior número de amostras, de uma variedade maior de origens, poderá ser analisado no mesmo tempo e com custos equivalentes ou até inferiores (WHO, 2018).

A implementação do WGS para patógenos alimentares permite uma avaliação mais completa da resistência antimicrobiana, uma vez que identifica o conjunto de genes de resistência presentes nos microrganismos. Estudos envolvendo bactérias de origem alimentar identificaram alto grau de correlação entre a presença de genes de resistência adquiridos, identificados por WGS, e resistência clínica. Apesar de, recentemente, o Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST) ter concluído que não há evidências suficientes para tomada de decisões clínicas a partir de dados de suscetibilidade inferidos pelo WGS, o Comitê reconheceu que esta abordagem pode substituir os testes fenotípicos para fins de vigilância em um futuro próximo (WHO, 2018).

Outra importante vantagem do WGS em relação ao monitoramento da resistência antimicrobiana é a possibilidade de realizar análises retrospectivas para avaliação de riscos emergentes, sem a necessidade de novas análises laboratoriais. Um exemplo recente e importante nesse sentido foi a descoberta do gene *mcr-1*. Após a primeira descrição de um gene plasmidial capaz de conferir resistência à colistina, diversos centros de pesquisa passaram a procurar o gene *mcr-1* em suas coleções de cepas. Para os institutos com bases de dados de WGS, essa pesquisa envolveu apenas análises de bioinformática, não sendo necessário cultivar novamente as cepas e realizar novas análises laboratoriais (WHO, 2017b).

Devido a todas essas vantagens, cada vez mais países vêm adotando essa ferramenta em seus programas de monitoramento de patógenos alimentares, contando com o apoio de OMS e FAO (FAO; WHO, 2016; WHO, 2018).

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo 1 – Emergence of *mcr-1* producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from retail meat: first detection in Brazil.

Artigo publicado no periódico Foodborne Pathogens and Disease.

Emergence of *mcr-1* Producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from Retail Meat: First Detection in Brazil

Renata Batista Rau,^{1,2,*} Daiana de Lima-Morales,^{2,*} Priscila Lamb Wink,² Aldemir Reginato Ribeiro,¹ Andreza Francisco Martins,^{2,3} and Afonso Luis Barth²

Dear Editor:

RESISTANCE TO POLYMYXINS is of great concern to public health as these are the last resource for treatment of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Polymyxin resistance determinants were restricted to chromosomal mutations until 2015, when a plasmid carrying the *mcr-1* gene was described (Liu *et al.*, 2016). The *mcr-1* gene was detected worldwide in *Escherichia coli* and less often in other Enterobacteriaceae species, including *Salmonella* sp. (Poirel *et al.*, 2017). The *mcr-1* gene in *Salmonella* was first described in Europe (Petrillo *et al.*, 2016) and later in China (Yang *et al.*, 2016). Recently, the Pan American Health Organization published an epidemiological alert describing colistin resistant *mcr-1* *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, isolated from patients, in Colombia (PAHO/WHO, 2016). In Brazil the *mcr-1* was detected first in *E. coli* isolates, from diverse origin (Fernandes *et al.*, 2016; Lentz *et al.*, 2016; Dalmolin *et al.*, 2017; Sellera *et al.*, 2017) and recently in *Klebsiella pneumoniae* (Aires *et al.*, 2017).

In view of the concerning spread of *mcr-1* gene among food-producing animals, we screened, by polymerase chain reaction as previously described (Liu *et al.*, 2016), 40 *Salmonella* isolates, obtained from animal products between 2011 and 2017. One isolate, collected from a retail frozen pork in 2016, at a commercial establishment, in southern Brazil, was positive for *mcr-1* and was named *Salmonella* Typhimurium SLRe1.

Conjugation experiments confirmed the transferable origin of the *mcr-1*. The minimal inhibitory concentration (MIC) of several antibiotics was evaluated by broth microdilution for the *Salmonella* Typhimurium SLRe1 and its transconjugant (Table 1). The transconjugant presented the same MIC for colistin (8 mg/L) as *Salmonella* Typhimurium SLRe1. Although the isolate *Salmonella* Typhimurium SLRe1 is susceptible to cephalosporins and meropenem, it is resistant to clinical important antibiotics such as chloramphenicol, ciprofloxacin, and tetracycline. Nevertheless, colistin resis-

tance was the only resistance marker which was transferred by conjugation, showing that the plasmid carrying *mcr-1* confers resistance only to colistin. Other plasmids were present in the clinical isolate, but these were not selected in the conjugation experiment performed in this study.

Brazil is the fourth largest pork producer in the world and exports to more than 70 countries. In this context, Polymyxins, which were commonly used as growth promoters in animal production, are forbidden in Brazil since November 2016. For this reason, a regular random sampling should be implemented to monitor the presence of the *mcr-1* gene in retail meat, after polymyxin prohibition. To the best of our knowledge, this is the first report of *mcr-1* in *Salmonella* Typhimurium in Brazil, highlighting the spread of this gene.

TABLE 1. MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION (MG/L), PERFORMED BY BROTH MICRODILUTION, OF SEVERAL ANTIBIOTICS FOR *SALMONELLA* TYPHIMURIUM SLRe1, TRANSCONJUGANT SLRe1, AND *ESCHERICHIA COLI* J53

	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> <i>SLRe1</i>	<i>Transconjugant</i> <i>SLRe1</i>	<i>E. coli</i> <i>J53</i>
Colistin	8	8	0.25
Ampicillin	>256	8	8
Cefotaxime	1	0.5	0.5
Ceftazidime	0.25	0.25	0.25
Meropenem	≤0.03	≤0.03	≤0.03
Nalidixic acid	>128	4	4
Ciprofloxacin	>8	0.5	0.13
Tetracycline	>64	1	1
Gentamicin	2	2	2
Trimethoprim	16	4	4
Chloramphenicol	>32	8	8
Azithromycin	≤0.125	0.5	≤0.125
Tigecycline	2	0.13	0.25

¹LANAGRO-RS, Laboratório Nacional Agropecuário no Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²LABRESIS, Laboratory de Pesquisa em Resistência Bacteriana, HCPA—Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

³ICBS—Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*These authors contributed equally to this work.

LETTER TO THE EDITOR

59

threatening the use of polymyxins as a last resort antibiotic in clinical practice.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Aires CAM, da Conceição-Neto OC, Tavares E Oliveira TR, Dias CF, Montezzi LF, Picão RC, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef APD. Emergence of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 392 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:1–3.
- Dalmolin TV, Castro L, Mayer FQ, Zavascki AP, Martins AF, Lima-Morales D, Barth AL. Co-occurrence of *mcr-1* and *blaKPC-2* in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:2404–2406.
- Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, Moura Q, Pérez-Chaparro PJ, Esposito F, Sartori L, Dropa M, Matté MH, Lira DP, Mamizuka EM, Lincopan N. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human infection in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:6415–6417.
- Lentz SA, de Lima-Morales D, Cupertino VM, Nunes Lde S, da Motta AS, Zavascki AP, Barth AL, Martins AF. *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. *Euro Surveill* 2016;21:1–2.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016;16:161–168.
- Pan American Health Organization/World Health Organization. *Epidemiological Alert: Enterobacteriaceae with Plasmid-Mediated Transferable Colistin Resistance, Public Health Implications in the Americas*. Washington, DC: PAHO/WHO, 2016.
- Petrillo M, Angers-Loustau A, Kreysa J. Possible genetic events producing colistin resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect Dis* 2016;16:280.
- Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev* 2017;30:557–596.
- Sellera FP, Fernandes MR, Sartori L, Carvalho MP, Esposito F, Nascimento CL, Dutra GH, Mamizuka EM, Pérez-Chaparro PJ, McCulloch JA, Lincopan N. *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated *mcr-1* and *blaCTX-M* genes in infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *J Antimicrob Chemother* 2017;72:1255–1256.
- Yang YQ, Zhang AY, Ma SZ, Kong LH, Li YX, Liu JX, Davis MA, Guo XY, Liu BH, Lei CW. Co-occurrence of *mcr-1* and ESBL on a single plasmid in *Salmonella enterica*. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:2336–2338.

Address correspondence to:

Afonso Luis Barth, PhD

Research Laboratory in Bacterial Resistance (LABRESIS)

HCPA—Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre

CEP 90035-903

Brazil

E-mail: albarth@hcpa.edu.br

Manuscrito II – Multidrug resistant *Salmonella enterica mcr-1* positive from food in Brazil

Running title: *Salmonella mcr-1* positive from food in Brazil

Renata Batista Rau^{1,2,3}, Daiana de Lima-Morales², Priscila Lamb Wink², Aldemir Reginato Ribeiro¹ and Afonso Luis Barth^{2,3*}

1 Laboratório Nacional Agropecuário no Rio Grande do Sul (LANAGRO/RS), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) - Estrada da Ponta Grossa, 3036, Porto Alegre, RS, Brazil.

2 Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre(HCPA) - Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, Brazil.

3 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Avenida Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author:

Prof. Afonso Luis Barth, PhD

Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS)

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP: 90035-903

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 (51) 3359-8607

E-mail: albarth@hcpa.edu.br

ABSTRACT

The *mcr-1* gene has been identified worldwide in bacterial isolates obtained from humans, animals, environment and food, including *Salmonella* spp., which is one of the major foodborne pathogens in the world. The aim of this study was to evaluate the presence of *mcr-1* gene in *Salmonella* spp. from food produced in Brazil and to characterize the isolates harboring this gene. A total of 490 *Salmonella* spp. isolates from the Brazilian National Program for the Control of Foodborne Pathogens were screened for the presence of *mcr-1* gene by PCR. Whole genome sequencing was performed in positive isolates in order to characterize the sequence type, plasmid families and resistance genes. Antimicrobial susceptibility tests were performed by broth microdilution. Selected isolates were submitted to conjugation experiments using the *Escherichia coli* J53 as a receptor. We detected 8 isolates harboring the *mcr-1* gene; seven belonged to serovar Typhimurium and its monophasic variant 4,[5],12:i:-, and one belonged to serovar Saintpaul. Seven of the *mcr-1* positive isolates displayed a high rate of resistance to other antibiotics in addition to colistin. Analysis of the WGS indicated that the ST19 was the most common sequence type among the *mcr-1* positive isolates. The *mcr-1* gene was located in an IncX4 plasmid of approximately 33kb, with no additional resistance genes and with high identity with a plasmid obtained from a clinical isolate of *Escherichia coli mcr-1* positive in Brazil. All plasmids harboring the *mcr-1* gene were able to conjugate. Our results suggest the spread of a single plasmid type in Brazil harboring the *mcr-1* among *Salmonella* spp. The horizontal transfer of this mobile element has been contributing to the spread of the colistin resistance in the country.

Keywords: *Salmonella*, polymyxin resistance, *mcr-1*

INTRODUCTION

The use of polymyxins in human medicine has recently regained importance due to the increasing number of infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in the last years. In fact, polymyxins have been used for decades in veterinary medicine and agricultural production. Colistin (polymyxin E) is commonly prescribed for treatment and prevention of enteric diseases, mainly in poultry and pigs submitted to intensive husbandry systems. Furthermore, it has been extensively used as growth promoter worldwide (Poirel *et al.*, 2017). In Brazil, the use of colistin as zootechnical additive in animal feed was prohibited only in November 2016 (Brazil, 2016).

Polymyxin resistance is mainly associated with the addition of cationic groups to lipopolysaccharide (LPS) in the outer membrane of Gram-negative bacteria, preventing antibiotic binding (Rhouma *et al.*, 2016). It was believed that this mechanism was restricted to chromosomal mutations, which allowed only vertical transmission of this resistance determinant. However, in 2015, a plasmid transferable polymyxin resistance, mediated by the *mcr-1* gene was described for the first time. The *mcr-1* gene encodes a protein that is responsible for the addition of a phosphoethanolamine group to the lipid A, resulting in a more cationic LPS and conferring resistance to colistin (Liu *et al.*, 2016).

The *mcr-1* gene has been identified worldwide in bacterial isolates obtained from humans, animals, environment, and food (meat and vegetables). Mostly in *Escherichia coli*, but also in others *Enterobacteriaceae*, such as *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, and *Salmonella enterica* (Schwarz and Johnson, 2016; Poirel *et al.*, 2017). In Brazil, *mcr-1* was described in *E. coli* isolated from animals, inpatients, seawater, and food (Lentz *et al.*, 2016; Fernandes *et al.*, 2016; Fernandes *et al.*, 2017; Monte *et al.*, 2017; Pilonetto *et al.*, 2019), in *K. pneumoniae* from hospitalized patients (Aires *et al.*, 2017; Dalmolin *et al.*, 2018), and in *Salmonella enterica* from food (Rau *et al.*, 2018; Moreno *et al.*, 2019).

In the view of the extensive use of colistin in the food chain production and the importance of *Salmonella* spp. as one of the major foodborne pathogens in the world, the aim of this study was to evaluate the presence of the *mcr-1* gene in *Salmonella*

spp. obtained from food produced in Brazil, as well as to characterize phenotypically and genotypically the isolates harboring this gene.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates and identification procedures

A total of 490 *Salmonella* spp. isolates were randomly selected from the Brazilian National Program for the Control of Foodborne Pathogens of Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. All the isolates were obtained according to ISO 6579:2002 procedures, from retail poultry, turkey, and pork meat, produced in Brazil between 2014 and 2017, and from pork carcasses, in 2014 and 2015. Additional identification was performed by ribotyping, using RiboPrinter® System (DuPont Qualicon) and *PvuII* restriction enzyme, in order to determine the serotype of the isolates.

Identification of *mcr-1* gene

Salmonella spp. isolates were evaluated for the presence of the *mcr-1* gene by pooling 7 isolates together and submitting them to DNA extraction and conventional PCR, with specific primers CLR5-F (5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3') and CLR5-R (5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3') as previously described (Liu *et al.*, 2016). All isolates from a pool with *mcr-1* positive result were re-tested individually by the same conventional PCR in order to identify the isolate(s) which presented the gene. For DNA extraction, pure colonies were transferred to TE buffer (TrisHCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0) and submitted to heat shock at 80°C for 20 minutes, followed by freezing at -20°C. The amplicon of isolates with PCR positive for the *mcr-1* gene were sequenced by Sanger method to confirm the *mcr-1* gene sequence.

Antimicrobial susceptibility testing

Minimal inhibitory concentration (MIC) of 13 antimicrobials was determined by broth microdilution, according to ISO 20776-1:2006 procedures. The tested antibiotics included: ampicillin, azithromycin, cefotaxime, ceftazidime, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, meropenem, nalidixic acid, sulfamethoxazole/trimethoprim, tetracycline, tigecycline and colistin. Results were

interpreted according to EUCAST clinical breakpoints (2018 - version 8.0). For those antibiotics which do not have defined breakpoints for *Salmonella* spp., the results were interpreted with the EUCAST epidemiological cut-off values (ECOFFs). *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality controls.

Whole genome sequencing

Total DNA was extracted with the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation). Libraries were prepared with Nextera XT DNA sample preparation kit and sequenced on an Illumina MiSeq analyzer using a 250bp paired-end library, according to the manufacturer's instructions. Sequences were assembled on SPAdes Assembly version 3.9 (Nurk *et al.*, 2013). Genome annotation was carried out using the RAST Server (Rapid Annotations using Subsystems Technology) version 2.0 (Aziz *et al.*, 2008). Multilocus sequence typing (MLST) and plasmid incompatibility family were determined using the Center for Genomic Epidemiology tools (MLST 1.8 and PlasmidFinder 1.3), as well as acquired antimicrobial resistance genes and chromosomal point mutations (ResFinder 3.0) (Larsen *et al.*, 2012; Zankari *et al.*, 2012; Carattoli *et al.*, 2014). Detailed analyses were performed in Geneious 11.0.4 software.

Conjugation experiments

Plasmid transferability was evaluated by conjugation experiments using *Escherichia coli* J53. Each of *mcr-1* positive isolates was incubated with the *E. coli* J53 on a cellulose membrane, in a Luria-Bertani (LB) agar plate. After incubation at 37°C for 24h, colistin-resistant transconjugants were selected on culture media supplemented with azide and colistin.

RESULTS

Prevalence and characteristics of *mcr-1*-positive *Salmonella enterica*

We detected 8 (1.6%) positive isolates from the 490 *Salmonella* spp. screened by PCR for the presence of *mcr-1* gene (Table 1), among which 2 were from 2014, 5 were from 2015 and 1 was from 2016. Five of the isolates were obtained from pork

carcasses, 1 from poultry meat, 1 from turkey meat and 1 from pork meat. According to ribotyping, the isolates belonged to serovar Typhimurium and its monophasic variant 4,[5],12:i:-, except for the isolate SLRe1401 which belonged to serovar Saintpaul.

Antimicrobial susceptibility

Antimicrobial susceptibility testing indicated that most of the *mcr-1* positive isolates displayed a high rate of resistance to other antibiotics in addition to colistin; most isolates were resistant to ampicillin (7 isolates), tetracycline (6 isolates), nalidixic acid (5 isolates), chloramphenicol (5 isolates), ciprofloxacin (5 isolates) and gentamicin (5 isolates). In contrast, none of the isolates was resistant to cefotaxime, ceftazidime or meropenem. Minimal inhibitory concentration (MIC) for colistin varied from 4 to 8 mg/L, which were just above the breakpoint to be classified as resistant by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (Table 1).

Genetic characterization and plasmid analysis

Genome analysis using Center for Genomic Epidemiology tools revealed that 6 isolates belonged to the Sequence Type (ST) 19 and two isolates (SLRe1401 and SLRe1503) belonged to ST50 and ST 4556, respectively. Different types of plasmids were identified among the *mcr-1* positive isolates by the *in silico* analysis of WGS data. However, all 8 isolates carried an IncX4 plasmid harboring the *mcr-1* gene. No additional resistance genes were found in IncX4 plasmids. Nevertheless, several other acquired antibiotic resistance-encoding genes, as well as chromosomal point mutations, were identified according to ResFinder 3.0; these genetic determinants were associated to resistance to aminoglycoside, beta-lactam, fluoroquinolone, sulphonamide and tetracycline classes. None of the isolates had mutations in the *pmrAB*, *phoPQ* or *mgrB* genes associated with colistin resistance.

Detailed whole genome sequencing (WGS) analysis indicated that the IncX4 plasmids presented approximately 33kb. The insertion sequence IS*ApI1* was not found neither upstream nor downstream the *mcr-1* gene. However, the *mcr-1-pap2* sequence and the transposase IS26 were present in all IncX4 plasmids analyzed. Alignment with pICBEC72H*mcr*, a plasmid obtained from a clinical isolate of *E. coli mcr-1* positive from Brazil (GenBank CP015977.1), indicated 99% of identity.

Transfer of *mcr-1* gene

In order to investigate the transference potential of the plasmids harboring the *mcr-1* gene, four of the *Salmonella enterica* isolates were submitted to conjugation experiments using the *E. coli* J53 as a recipient strain. Results demonstrated that all plasmids were able to conjugate. The presence of the *mcr-1* gene in the transconjugants was confirmed by PCR.

DISCUSSION

In this study, we have detected and confirmed the presence of the *mcr-1* gene in 8 *Salmonella* isolates from meat (turkey, poultry and pork origin), belonging to 2 different serotypes. Our data showed that most of the isolates (7 isolates) which harbored the *mcr-1* gene were *Salmonella ser.* Typhimurium or its monophasic variant 4,[5],12:i:-. Although *mcr-1* bearing plasmids have been identified in different *Salmonella* serovars, Typhimurium seems to be the most often serotype associated with this resistance gene. This association still needs further investigation; however it may indicate the requirement of a specific genetic background for acquisition and maintenance of *mcr-1* harboring plasmids (Doumith *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016a; Cui *et al.*, 2017a).

The antimicrobial susceptibility profile varied significantly among different *Salmonella* spp. *mcr-1* positive isolates although the vast majority of isolates (except isolate SLRe1401), displayed a multidrug resistance profile, being resistant to three or more classes of antibiotics. In fact, multiple resistance genes were detected by *in silico* analysis of WGS in most isolates. Although the frequency of multiresistance varies in different *Salmonella* serotypes, *Salmonella ser.* Typhimurium is commonly associated to this pattern worldwide (Małka and Popowska, 2016). It is important to highlight that none of the isolates were resistant to third-generation cephalosporins or to carbapenems, which are considered critically important antimicrobials for human medicine, according to the World Health Organization (WHO) (WHO, 2016).

Regarding the genetic context, MLST analysis revealed that most isolates belonged to ST19. *Salmonella* spp. *mcr-1* positive of this ST has been described only in Denmark (Torpdahl *et al.*, 2017). Of note, most reports of *mcr-1* *Salmonella* Typhimurium are associated to ST34, including reports from Asia, Europe and the

only reported case in Latin America, in Colombia (Doumith *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016a; Saavedra *et al.*, 2017). ST19 differs from ST34 by a single nucleotide change in the *dnaN* locus (Li *et al.*, 2017).

To the best of our knowledge, this is the first report of ST50 in *S. enterica* ser. Saintpaul and the ST4556 in *S. enterica* ser. Typhimurium harboring the *mcr-1* gene. ST4556 has a single nucleotide change in the *sucA* locus when compared to ST19.

Several plasmid incompatibility groups have already been associated with the *mcr-1* gene. However, the global dissemination seems to be associated with 3 major groups: IncX4, IncI2 and IncHI2 (Matamoros *et al.*, 2017). Among all of our isolates, the *mcr-1* gene was located in IncX4 plasmids, with approximately 33kb. IncX4 plasmids have been reported in different *Salmonella* serotypes, mainly in Europe (Torpdahl *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2016; Veldman *et al.*, 2016; Garcia-Graells *et al.*, 2018) and Asia (Cui *et al.*, 2017b; Chiou *et al.*, 2017). There are no reports of IncX4 plasmids harboring *mcr-1* gene in *Salmonella* isolates in Latin America, except in Brazil (Moreno *et al.*, 2019). Indeed, all *mcr-1* reports in Brazil are associated with IncX4 plasmids, including *E. coli* from humans, foods, and environment (Fernandes *et al.*, 2016; Fernandes *et al.*, 2017; Monte *et al.*, 2017; Pillonetto *et al.*, 2019), and *K. pneumoniae* from inpatients (Aires *et al.*, 2017; Dalmolin *et al.*, 2018).

The high identity between the IncX4 plasmids harboring *mcr-1* gene from our study and pICBEC72Hmcr (GenBank CP015977.1) suggests the spread of a single plasmid type in Brazil, probably of the same origin, which can be found in different bacteria from distinct sources. This fact underlines the potential for horizontal transfer of the *mcr-1* through the IncX4 plasmids. However, *in silico* analysis showed the absence of the mobile element IS*ApI1* in all of our plasmids (the same was found in pICBEC72Hmcr). This insertion sequence is associated with the mobilization and dissemination of *mcr-1* gene among different bacterial strains and species, but is not present in IncX4 plasmids (Luo *et al.*, 2017). The exact mechanism related to the dissemination of polymyxin resistance by IncX4 plasmids requires more investigation, but it seems to be associated with the *mcr-1-pap2* sequence (Li *et al.*, 2016b), which was present in all 8 isolates that we have sequenced.

Conjugation experiments demonstrated that all the four *Salmonella* isolates tested were able to transfer their *mcr-1* bearing plasmids to *E. coli* J53, which is in concordance with earlier findings about the conjugative nature of IncX4 plasmids (Campos *et al.*, 2016; Cui *et al.*, 2017a; Cui *et al.*, 2017b).

CONCLUSION

In conclusion, we reported eight *mcr-1* positive *Salmonella* isolates from food in Brazil. Our results suggest the spread of a single plasmid type in Brazil harboring the *mcr-1* gene, indicating that horizontal transfer of this mobile genetic element has been contributing to the spread of the colistin resistance in the country. The presence of *mcr-1* gene in a relevant foodborne pathogen emphasizes the importance of monitoring the antimicrobial resistance (AMR) in the food-production chain and the need of promoting the responsible use of antibiotics in agriculture and livestock.

SEQUENCE DATA

Sequences were deposited to GenBank under accession numbers RXNI00000000, RXNJ00000000, RXNK00000000, RXNL00000000, RXNM00000000, RXNN00000000, RXNO00000000 and RXNP00000000.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by “Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência a Antimicrobianos” (INPRA) and by Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply from Brazil (MAPA).

REFERENCES

Aires CAM, Conceição-Neto OC, Oliveira TRT, Dias CF, Montezzi LF, Picão RC, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef APD. Emergence of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumonia* Sequence Type 392 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e00317-17.

Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJonghM, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 2008; 9:75.

Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Normative Instruction nº 45, of 22 November 2016. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos->

agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-45-de-22-de-novembro-de-2016.pdf/view

Campos J, Cristino L, Peixe L, Antunes P. MCR-1 in multidrug-resistant and copper-tolerant clinically relevant *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- and S. Rissen clones in Portugal, 2011 to 2015. *Euro Surveill* 2016; 21: pii=30270.

Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, Aarestrup FM, Hasman H. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58:3895-3903.

Chiou C-S, Chen Y-T, Wang Y-W, Liu Y-Y, Kuo H-C, Tu Y-H, Lin A-C, Liao Y-S, Hong Y-P. Dissemination of *mcr-1*-carrying plasmids among colistin-resistant *Salmonella* strains from humans and food-producing animals in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:pii=e00338-17.

Cui M, Zhan J, Gu Z, Li R, Chan EW-C, Yan M, Wu C, Xu X, Chen S. Prevalence and molecular characterization of *mcr-1* positive *Salmonella* strains recovered from clinical specimens in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2017a; 61:e02471-16.

Cui M, Zhang J, Zhang C, Li R, Chan EW-C, Wu C, Wu C, Chen S. Distinct mechanisms of acquisition of *mcr-1*-bearing plasmid by *Salmonella* strains recovered from animals and food samples. *Sci Rep* 2017b; 7:13199.

Dalmolin TV, Martins AF, Zavaski AP, Lima-Morales D, Barth AL. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018; 90:132-133.

Doumith M, Godbole G, Aston PA, Larkin L, Dallman T, Day M, Day M, Muller-Pebody B, Ellington MJ, de Pinna E, Johnson AP, Hopkins KL, Woodford N. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71:2300-2305.

Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello AM, Moura Q, Pérez-Chaparro PJ, Esposito F, Sartori L, Dropa M, Matté MH, Lira DPA, Mamizuka EM, Lincopan N. First report of globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 isolate from a human infection in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60:6415-6417.

Fernandes MR, Sellera FP, Esposito F, Sabino CA, Cerdeira L, Lincopan N. Colistin-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* on public beaches, and infectious threat emerging in recreational waters. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e00234-17.

Garcia-Graells C, De Keersmaecker SCJ, Vanneste K, Pochet B, Vermeersch K, Roosens N, Dierick K, Botteldoorn N. Detection of plasmid-mediated colistin resistance, *mcr-1* and *mcr-2* genes, in *Salmonella* spp. isolated from food at retail in Belgium from 2012 to 2015. *Foodborne Pathog Dis* 2018; 15:114-117.

Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing and resistance mechanisms encoded by plasmid or chromosomes. *Clin Microbiol Rev* 2017; 30: 557-596.

Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O. Multilocus Sequence Typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* 2012; 50:1355-1361.

Lentz SA, Lima-Morales D, Cuppertino VM, Nunes LS, Motta AS, Zavascki AP, Barth AL, Martins AF. Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. *Euro Surveill* 2106; 21:pii=30267.

Li X-P, Fang L-X, Song J-Q, Xia J, Huo W, Fang J-T, Liao X-P, Liu Y-H, Feng Y, Sun J. Clonal spread of *mcr-1* in PMQR-carrying ST34 *Salmonella* isolates from animals in China. *Sci Rep* 2016a; 6:38511.

Li A, Yang Y, Miao M, Chavda KD, Mediavilla J, Xie X, Feng P, Tang Y-W, Kreiswirth BN, Chen L, Du H. Complete sequences of *mcr-1*-harboring plasmids from extended-spectrum- β -lactamase and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016b; 60:4351-4354.

Li W, Li Y, Liu Y, Shi X, Jiang M, Lin Y, Qiu Y, Zhang Q, Chen Q, Zhou L, Sun Q, Hu Q. Clonal expansion of biofilm-forming *Salmonella* Typhimurium ST34 with multidrug-resistance phenotype in the southern coastal region of China. *Front Microbiol* 2017; 8:2090.

Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu L-F, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu J-H, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016; 16:161-168.

Luo Q, Yu W, Zhou K, Guo L, Shen P, Lu H, Huang C, Xu H, Xu S, Xiao Y, Li L. Molecular epidemiology and colistin resistant mechanism of *mcr*-positive and *mcr*-negative clinical isolated *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2017; 8:2262.

Małka Ł, Popowska M. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food. *Rocz Panstw Zakl Hig* 2016; 67:343-358.

Matamoros S, van Hattem JM, Arcilla MS, Willemse N, Melles DC, Penders J, Vinh TN, Hoa NT, COMBAT consortium, de Jong MD, Schultsz C. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Sci Rep* 2017; 7:15364.

Monte DF, Mem A, Fernandes MR, Cerdeira L, Esposito F, Galvão JA, Franco BDGM, Lincopan N, Landgraf M. Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *mcr-1* genes in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e02718-16.

Moreno LZ, Gomes VTM, Moreira J, de Oliveira CH, Peres BP, Silva APS, Thakur S, La Ragione RM, Moreno AM. First report of *mcr-1*-harboring *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolated from poultry meat in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019; 93:376-379.

Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich A, Korobeynikov A, Lapidus A, Prjibelsky A, Pyshkin A, Sirotkin A, Sirotkin Y, Stepanauskas R, McLean J, Lasken R, Clingenpeel SR, Woyke T, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. Assembling genomes and mini-metagenomes from highly chimeric reads. *RECOMB 2013*; 7821: 158-70.

Pillonetto M, Mazzetti A, Becker GN, Siebra CA, Arend LNVS, Barth AL. Low level of polymyxin resistance among nonclonal *mcr-1*-positive *Escherichia coli* from human sources in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019; 93:140-142.

Rau RB, de Lima-Morales D, Wink PL, Ribeiro AR, Martins AF, Barth AL. Emergence of *mcr-1* producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from retail meat: first detection in Brazil. *Foodborne Pathog Dis* 2018; 15:58-59.

Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A. Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and One Health perspectives. *Front Microbiol* 2016; 7:1789.

Saavedra SY, Diaz L, Wiesner M, Correa A, Arévalo SA, Reyes J, Hidalgo AM, de la Cadena E, Perenguez M, Montaña LA, Ardila J, Ríos R, Ovalle MV, Díaz P, Porras P, Villegas MV, Arias CA, Beltrán M, Duarte C. Genomic and molecular characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* harboring *mcr-1* in Colombia, 2002 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e00841-17.

Schwarz S, Johnson AP. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71:2066-2070.

Torpdahl M, Hasman H, Litrup E, Skov RL, Nielsen EM, Hammerum AM. Detection of *mcr-1*-encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Salmonella* isolates from human infection in Denmark. *Int J Antimicrob Agents* 2017; 49:261-262.

Veldman K, van Essen-Zandbergen A, Rapallini M, Wit B, Heymans R, van Pelt W, Mevius D. Location of colistin resistance gene *mcr-1* in *Enterobacteriaceae* from livestock and meat. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71:2340-2342.

World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine, 5th rev. 2016.

Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:2640-2644.

Table 1: Epidemiological features and phenotypic and genotypic characterization of *mcr-1* positive isolates of *Salmonella enterica* from Brazil

Isolate	Serotype	Source of isolate	Date of isolation	Antibiotic Phenotypic resistance	Colistin MIC (mg/L)	MLST	<i>mcr-1</i> Plasmid Type	<i>mcr-1</i> Plasmid size (bp)	Other acquired AMR genes	Chromosomal point mutations associated with AMR	Other plasmid types
SLRe1401	Saintpaul	Turkey meat	May 2014	CST, CHL	4	ST50	IncX4	33,437	<i>aac(6')-Iaa</i>	-	IncFIB
SLRe1402	Typhimurium	Poultry meat	August 2014	CST, AMP, CIP, GEN, NAL, TET	4	ST19	IncX4	33,578	<i>aph(3'')-Ib, aac(6')-Iaa, aac(3)-IId, aadA2, aph(6)-Id, bla_{TEM-1B}, sul2, tet(B)</i>	<i>gyrA</i> p.S83F	IncFIB, IncFIB(S), IncFII(S)
SLRe1501	Typhimurium/4,[5],12:i:-	Pork carcass	February 2015	CST, AMP, CHL, CIP, GEN, NAL, SXT, TET, TGC*	4	ST19	IncX4	33,578	<i>aac(6')-Iaa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, aadA1, aac(3)-IIa, bla_{TEM-1B}, qnrE1, floR, sul1, tet(A), dfrA1</i>	<i>gyrA</i> p.S83Y	IncFIA, IncHI2, IncHI2A
SLRe1502	Typhimurium	Pork carcass	February 2015	CST, AMP, CHL, CIP, GEN, NAL, SXT, TET	4	ST19	IncX4	33,491	<i>aac(3)-IIa, aadA1, strA, strB, bla_{TEM-1B}, qnrE, sul1, tet(A), dfrA1</i>	<i>gyrA</i> p.S83Y	IncHI2A, IncFIA, IncHI2
SLRe1503	Typhimurium/4,[5],12:i:-	Pork carcass	March 2015	CST, AMP, CIP, NAL	4	ST4556	IncX4	33,376	<i>aac(6')-Iaa, bla_{TEM-1B}</i>	<i>gyrA</i> p.D87N	-
SLRe1504	Typhimurium	Pork carcass	September 2015	CST, AMP, CHL, CIP, GEN, NAL, TET, TGC*	4	ST19	IncX4	33,473	<i>aadA1, aac(3)-IIa, bla_{TEM-1B}, qnrE, sul1, tet(A)</i>	<i>gyrA</i> p.S83Y	IncFIA, IncHI2, IncHI2A
SLRe1505	Typhimurium	Pork carcass	September 2015	CST, AMP, AZM, GEN, SXT, TET	4	ST19	IncX4	32,374	<i>aph(4)-Ia, aph(3')-Ia, aac(3)-IVa, aadA1, strB, aadA2, strA, bla_{TEM-1B}, mph(A), sul2, sul1, tet(A), tet(B), dfrA12</i>	-	IncHI2, IncA/C2, IncFIB, ColpVC, IncHI2A
SLRe1601	Typhimurium	Pork meat	June 2016	CST, AMP, CHL, TET, TGC*	8	ST19	IncX4	33,255	<i>strB, strA, aph(6)-Ic, aph(3')-IIa, aadA1, bla_{TEM-1B}, catA1, sul1, tet(B)</i>	-	IncHI1B(R27), IncHI1A, ColpVC, IncFIA(HI1), p0111

CST - colistin; AMP - ampicillin; AZM - azithromycin; CHL - chloramphenicol; CIP - ciprofloxacin; GEN - gentamicin; NAL - nalidixic acid; SXT – sulfamethoxazole/trimethoprim; TET – tetracycline; TGC -tigecycline; * Intermediate resistance

Manuscrito III – Nontyphoidal *Salmonella* from poultry meat in Brazil: serovars and antimicrobial resistance

Renata Batista Rau^{1,2,3}, Aldemir Reginato Ribeiro¹, Amaury dos Santos⁴, Afonso Luís Barth^{2,3}

1 Laboratório Nacional Agropecuário no Rio Grande do Sul (LANAGRO/RS), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) - Estrada da Ponta Grossa, 3036, Porto Alegre, RS, Brazil.

2 Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Hospital de Clínica de Porto Alegre (HCPA) - Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, Brazil.

3 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Avenida Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS, Brazil.

4 Laboratório Nacional Agropecuário em São Paulo (LANAGRO/SP), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) - Rua Raul Ferrari, s/n, Campinas, SP, Brazil.

*Corresponding author:

Prof. Afonso Luis Barth, PhD

Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS)

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP: 90035-903

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 (51) 3359-8607

E-mail: albarth@hcpa.edu.br

ABSTRACT

The use of antimicrobials in food production can lead to development of bacterial resistance. Food of animal origin represents the major route of human exposure to foodborne pathogens with antimicrobial resistance. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolates from poultry meat in Brazil, and to identify the main serovars associated with resistance. We evaluated 146 *Salmonella* isolates from poultry meat in 2014, as well as 163 isolates obtained in 2017. Minimal inhibitory concentrations of 13 antimicrobials were determined by broth microdilution, and serotype determinations were performed by automated ribotyping. Results indicated the *Salmonella* isolates from poultry meat in Brazil presented resistance mainly to nalidixic acid (2014 – 57.53%; 2017 – 86.50%), ampicillin (2014 – 56.16%; 2017 – 76.69%), cefotaxime (2014 – 52.05%; 2017 – 76.07%), ceftazidime (2014 – 50.00%; 2017 – 76.07%), ciprofloxacin (2014 – 56.85%; 2017 – 88.96%) and tetracycline (2014 – 60.27%; 2017 – 82.82%). In addition, it was possible to verify a significant increase in resistance to these antibiotics in the evaluated period. *Salmonella ser.* Heidelberg and *Salmonella ser.* Minnesota were the main serovars expressing resistance to these antimicrobials. Multidrug resistance was found in 50.7% of the isolates from 2014, and in 77.3% of the isolates from 2017 ($p < 0.05$). None of the isolates were resistant azithromycin or meropenem, and only a few isolates presented intermediate resistance to tigecycline. In conclusion, our findings indicated high and increasing rates of resistance in *Salmonella* from poultry meat in Brazil, mainly associated with *Salmonella ser.* Heidelberg and *Salmonella ser.* Minnesota, stressing the importance of a continuous monitoring of antimicrobial resistance in the poultry chain.

Keywords: *Salmonella*, antimicrobial resistance, serovar, poultry meat

INTRODUCTION

Antimicrobial resistance (AMR) is a problem that has been growing and threatening public health worldwide. Antibiotics are among the classes of drugs most commonly prescribed in human medicine. However, they also have been extensively used in veterinary medicine and in the food production chain. The incorrect or excessive use of antibiotics in animals and food production can also lead to development of resistance (CDC, 2013). Therefore, to address bacterial resistance effectively, it is necessary a multidisciplinary approach, including human and animal health, food production and environment sectors, aligned with the One Health concepts (WHO, 2015).

In food animals, antibiotics are used therapeutically for the treatment of respiratory and enteric infections, mainly in animals submitted to intensive production systems. However, these drugs are also used in healthy animals, prophylactically, to prevent the development of infections in herds, and also as growth promoters (WHO, 2011).

The indiscriminate use of antibiotics in food production leads to resistance in bacteria which can be transmitted to humans through 3 distinct ways: (i) by direct contact between humans and animals; (ii) through preparation and consumption of contaminated food, and (iii) indirectly, due to the excretion of resistant bacteria and unmetabolized antibiotics by animals, causing additional selective pressure in the environment (O'Neill, 2015). Thus, it is very important to include the food production chain in surveillance programs on antimicrobial resistance, to provide information that enables the adoption of measures of prevention and control of AMR in this sector.

According to WHO recommendations, integrated surveillance programs should evaluate foodborne pathogens or sentinel microorganisms in human clinical samples, retail food and healthy food-production animals, in this order of priority. Noteworthy, food of animal origin represents the major route of human exposure to foodborne pathogens with antimicrobial resistance. *Salmonella* is usually the bacteria considered as first priority for inclusion in surveillance programs in the food chain (WHO, 2017a).

The last report of WHO showed that the development and implementation of national action plans on AMR is occurring in different degrees among countries (WHO, 2018). Considering that in Brazil the national plan has been recently

developed (Brazil, 2018), the objective of this study was to provide baseline information to guide the construction of an integrated surveillance on AMR in foodborne pathogens. In order to achieve the objective, we evaluated the serotype distribution and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolates from poultry meat in Brazil, from 2 different years, 2014 and 2017, with the purpose to identify possible trends or changes in serotype distribution or susceptibility profile over this period.

MATERIALS AND METHODS

Isolates selection and identification

We selected systematic random *Salmonella enterica* isolates from the MAPA collection, in two periods. The *Salmonella* isolates were obtained from poultry carcasses by the MAPA's laboratory network, in the years of 2014 and 2017, according to the Brazilian National Program for the Control of Foodborne Pathogens. All the isolates were obtained according to ISO 6579:2002 procedures (ISO, 2002). Serotype was determined by automated ribotyping, using RiboPrinter™ System (DuPont Qualicon) and *PvuII* restriction enzyme, according to the manufacturer's instructions.

Antimicrobial susceptibility testing

Minimal inhibitory concentrations (MIC) of 13 antimicrobials were determined for the *Salmonella* spp. isolates by broth microdilution, according to ISO 20776-1:2006. The tested antibiotics included (breakpoint for resistance): ampicillin – AMP (MIC >8mg/L); azithromycin – AZM (MIC >16mg/L), cefotaxime – CTX (MIC >2mg/L), ceftazidime – CAZ (MIC >4mg/L), chloramphenicol – CHL (MIC >8mg/L), ciprofloxacin – CIP (MIC > 0.06mg/L), colistin – CST (MIC >2mg/L), gentamicin – GEN (MIC >4mg/L), meropenem – MEM (MIC >8mg/L), nalidixic acid – NAL (MIC > 16mg/L), tetracycline – TET (MIC >8mg/L), tigecycline – TGC (MIC >2mg/L), trimethoprim/sulfamethoxazole – SXT (MIC >4mg/L – expressed as trimethoprim concentration). Results were interpreted according to EUCAST clinical breakpoints (2018, version 8.1). For those antibiotics that do not have defined breakpoints for *Salmonella*, the results were compared with EUCAST epidemiological cut-off values (ECOFFs) or European Food Safety Authority (EFSA) recommendations (EFSA,

2017). *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality controls.

Statistical analysis

Fisher's exact test was used to determine confidence intervals. Pearson's chi-square correlation coefficient was used to compare variables of interest and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Bacterial isolates

A total of 146 isolates were selected from 58 different slaughterhouses under federal inspection in 56 cities and 11 states, obtained between January and November of 2014. In the second period, 163 isolates were selected from 82 slaughterhouses in 78 cities and 12 states, which were obtained from March to December 2017. The number of isolates selected per state and the contribution of each state in the total poultry slaughter in Brazil are listed in Table 1.

Serotype distribution

We identified 29 different serotypes among the *Salmonella enterica* isolates from 2014. The most prevalent were *S. Heidelberg* (37.7%), *S. Minnesota* (11.6%), *S. Schwarzengrund* (6.8%), *S. Infantis* (6.2%) and *S. Saintpaul* (4.1%). Among the isolates from 2017, we found 18 different serotypes, with *S. Heidelberg* (57.1%), *S. Minnesota* (24.4%) and *S. Saintpaul* (5.1%) being the most frequent (Figure 1).

The geographical distribution of the two most prevalent serotypes indicated that *S. Heidelberg* was present in the states of PR, RS, SC and SP in 2014, and in the states of GO, MG, MS, MT, PR, RS, SC and SP in 2017; while *S. Minnesota* was found in GO, MG, MS, MT, PR and SC in 2014, and in ES, GO, MG, MS, MT, PA, PR, SC and SP in 2017.

Antimicrobial resistance

Nalidixic acid, ampicillin, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin and tetracycline presented the highest percentage of resistance in both years (Table 2). In addition, it was possible to verify a significant increase in resistance to these

antibiotics from 2014 to 2017. Serotypes Heidelberg and Minnesota accounted for more than 60% of the isolates expressing resistance to these antibiotics in 2014 and for more than 85% in 2017 (Figure 2).

Conversely, there was a decrease in the rate of resistance to chloramphenicol between 2014 and 2017. None of the isolates were resistant to azithromycin or meropenem, and few isolates showed intermediate resistance to tigecycline (5% in 2014 and 4% in 2017). Among the 2014 *Salmonella* isolates, 17.8% were susceptible to all antimicrobials tested, while in 2017, only 6.1% of the isolates presented a pan-susceptible profile.

Multidrug resistance (MDR, resistance to three or more unrelated antimicrobial classes) was found in 50.7% of the isolates from 2014, and in 77.3% of the isolates from 2017, indicating a significant increase of this profile ($p < 0,05$). Among the investigated serovars, *S. Heidelberg* and *S. Minnesota* exhibited high MDR, with resistance from 3 to 6 antimicrobial classes. Among *S. Heidelberg* isolates, 78.2% were MDR in 2014 and 93.3% presented this profile in 2017, while among *S. Minnesota* isolates, 67.7% were MDR in 2014 and 86.8% were MDR in 2017.

A diversity of antimicrobial resistance patterns (2014, $n = 33$; 2017, $n = 18$) was observed among the isolates. However, the most prevalent profile, i.e., resistance to AMP-CAZ-CIP-CTX-NAL-TET, was the same in both periods. This multidrug resistance profile was found in 27% of the isolates from 2014 and in 67% of the isolates from 2017. In 2014, 88% of the isolates with this resistance profile belonged to serotype Heidelberg, while in 2017, 70% were *S. Heidelberg* and 26% were *S. Minnesota*. Combined resistance to ciprofloxacin and cefotaxime was detected in 37.0% of the isolates in 2014, and 72.4% in 2017, also mainly associated with Heidelberg and Minnesota serotypes.

DISCUSSION

Brazil is the second largest producer and largest exporter of broiler chicken in the world (USDA, 2018). Chicken is the most consumed meat by the Brazilian population, with an estimated annual consumption of 42.07kg per inhabitant (ABPA, 2018). Our study evaluated nontyphoidal *Salmonella* isolates from states responsible for more than 97% of chicken meat production in Brazil, providing representative data of this important foodborne pathogen in the Brazilian poultry production chain.

The present study identified several different *Salmonella* serotypes from poultry carcasses, with Heidelberg and Minnesota being the most common in both periods (2014 and 2017) (Figure 1). *Salmonella* ser. Heidelberg was reported by Costa *et al.* (2013) in rates varying from 0.8 to 5% in isolates from commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil, from 2007 to 2011. Fitch *et al.* (2016) described Heidelberg as the most frequent serovar (29.1%) in poultry meat in Brazil, being found in isolates from Rio Grande do Sul (RS) in 2009, and from Paraná (PR) and São Paulo (SP) in 2011. Our results showed *S.* Heidelberg as the most prevalent serovar in poultry carcasses in both years (2014 and 2017), accounting for 38% of the isolates in 2014 and 57% in 2017. Therefore, it is possible to identify a trend of increasing prevalence of serovar Heidelberg in Brazil. The geographic distribution of *S.* Heidelberg among all states in Brazil confirms this trend. While in 2014, *S.* Heidelberg isolates were restricted to the Southern region of Brazil (RS, SC, PR and SP), in 2017 it has spread to Southeast and Midwest regions, being found also in MG, GO, MT and MS.

Salmonella ser. Minnesota has been reported as one of the five most prevalent serotypes in poultry carcasses from Brazil between 2007 and 2011, in rates varying from 9.1% to 40.24% (Costa *et al.*, 2013; Voss-Rech *et al.*, 2015; Fitch *et al.*, 2016). Regarding the geographic distribution, Fitch *et al.* (2016) described *S.* Minnesota in poultry from the states of Goiás (GO), Mato Grosso do Sul (MS) and Rio Grande do Sul (RS), while Voss-Rech *et al.* (2015) reported *S.* Minnesota in broiler farms from the state of MS. Our results indicated that *S.* Minnesota is the second most common serovar in poultry carcasses in Brazil, in both 2014 and 2017, accounting for 12% and 24% respectively. Despite the prevalence of *S.* Minnesota being similar to previous reports, we can verify the spread of this serovar among the states producing broiler chickens in Brazil. In 2014, *S.* Minnesota was found in 6 states (SC, PR, MG, GO, MS, MT), while in 2017 we identified this serovar also in ES, PA and SP, encompassing all regions related to chicken meat production in Brazil.

S. Heidelberg is infrequently reported in human and animal sources from European countries (Campos *et al.*, 2018). However, *S.* Heidelberg is the second most prevalent serovar in retail poultry meat in Colombia. In the United States and Canada, *S.* Heidelberg is among the top five serovars detected in poultry and is frequently associated with invasive human infections (Foley *et al.*, 2011; CIPARS,

2017). Conversely, *S. Minnesota* has not been related to clinical infections and is rarely described in animals in countries other than Brazil.

The shift in the predominant *Salmonella* serovars that occurred in the last years in Brazil is probably associated with the implementation of the control of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in poultry farms by the Brazilian Ministry of Agriculture in 2003 (Brazil, 2003). The decline in prevalence of *S. Enteritidis*, which was the most prevalent serovar in poultry isolates from Brazil until then, would have allowed occupation of this ecological niche by others serovars, such as *S. Heidelberg* and *S. Minnesota*. Similar phenomenon has occurred in the United States, where *S. Heidelberg* and *S. Kentucky* supplanted *S. Enteritidis* as the predominant serovars in poultry (Foley *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013).

Salmonella isolates in this study presented high rates of resistance, as 82.2% of the isolates were resistant to at least one antibiotic in 2014, while in 2017, 93.3% of the isolates were resistant to one or more drugs. The highest rate of resistance in 2014 was to tetracycline (60.27%), which increased to 82.82% in 2017. Although tetracyclines are prohibited as zootechnical additives since 1998 in Brazil (Brazil, 2009), this class of antimicrobial was one of the first used in animal production and is still approved for therapeutic purposes. Voss-Rech *et al.* (2015) also found high resistance to tetracycline (52.44%) in broiler farms in Brazil. Similar results were reported in USA (30.2% in 2015) (FDA, 2017), Canada (33.9% in 2016) (CARSS, 2018), and in State Members from European Union (46.1% in 2016) (EFSA, 2018) from broiler isolates.

Fluoroquinolones are critically important antimicrobials for human medicine (WHO, 2017b) and are the drug of choice to treat invasive salmonellosis in adults (Nair *et al.*, 2018). Our results indicated high rates of resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin among *Salmonella* isolates from poultry meat. Similar results were also reported by State Members from European Union, with rates of 61.5% of resistance for nalidixic acid and 64.7% for ciprofloxacin, in 2016, of *Salmonella* isolates in broiler meat (EFSA, 2018). In the same way, Colombia reported 66.0% of resistance for nalidixic acid and 41.2% for ciprofloxacin in poultry meat, while in China 99.5% of the *Salmonella* isolates from broiler chickens were resistant to nalidixic acid, and 48.7% to ciprofloxacin (Donado-Godoy *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2017). Voss-Rech *et al.* (2017), in a meta-analysis study of the temporal evolution of antimicrobial resistance of nontyphoidal *Salmonella* from humans and poultry in Brazil, had already reported

significant increasingly levels of resistance to nalidixic acid in humans and poultry isolates. Nalidixic acid can be an indicator of emerging resistance to fluoroquinolones (CARSS, 2018). On the other hand, fluoroquinolone resistance has been consistently low in *Salmonella* isolates from chicken meat in Canada and in the United States (CARSS, 2018; FDA, 2017), where fluoroquinolones are not approved for the use in poultry (Mainali *et al.*, 2014; FDA, 2018). However, it is important to highlight that the European breakpoint for ciprofloxacin resistance (MIC >0.06mg/L) is significantly more conservative than the United States (MIC >0.5mg/L). Considering the MIC distribution (data not shown), 56.9% of the isolates from 2014 would be classified as decreased susceptibility to ciprofloxacin (DCS \geq 0.125mg/L) and none as resistant, according to CLSI breakpoints. In 2017, only 1.2% would be considered as resistant and 87.7% as DSC according to CLSI.

Resistance to extended-spectrum cephalosporins is also a serious concern, since these are the antibiotics of choice for treating invasive salmonellosis in children (Nair *et al.*, 2018). Our results indicated high and increasing rates of resistance to cefotaxime and ceftazidime, which were used to evaluate resistance to third-generation cephalosporins (Table 2). In Brazil, ceftiofur (a third-generation cephalosporin of exclusive veterinary use) has been used during the first day of life of chicks to control early mortality, which can enhance the selection of resistant strains (Costa *et al.*, 2013). Brazilian data of resistance to ceftiofur and ceftriaxone of *S. Heidelberg* obtained from retail chicken carcasses was reported as 43.8% and 75.0%, respectively (Medeiros *et al.*, 2011). In the United States, no resistance to ceftriaxone was detected in *Salmonella* before the approval of ceftiofur use in livestock and poultry. The increasing rates of resistance to ceftriaxone due to the use of ceftiofur in animal production have caused several countries to limit the use of cephalosporins in the food production chain (McDermott *et al.*, 2018). Noteworthy, in Canada, resistance to third-generation cephalosporins, which was mainly associated with *S. Heidelberg* among retail chicken meat, decreased from 21.0% in 2014 to 6.6% in 2016, in *Salmonella* isolates from chicken meat, after the national poultry industry banned the use of ceftiofur in broiler chickens in mid-2014 (CARSS, 2018).

Combined resistance to fluoroquinolones and third-generation cephalosporins also deserves special attention, once the treatment options for human salmonellosis become restricted. In our study, we found 37.0% of the isolates as resistant to both ciprofloxacin and cefotaxime in 2014, and 72.4% in 2017. This resistance phenotype

was mainly associated to *S. Heidelberg*, which accounted for 72.2% of the isolates with this resistance pattern in 2014, and 68.6% in 2017. However, 11 different serovars also showed this combined resistance profile, including *S. Minnesota* and *S. Typhimurium*. Of note, among the countries of the European Union, this pattern of resistance is very rare, having been detected only in two *Salmonella spp.* isolates from broiler meat in Belgium, in 2016 (EFSA, 2018).

Resistance to polymyxins has regained importance in the last years due to the increasing number of infections caused by carbapenemase producing *Enterobacterales* and the description of a transmissible colistin resistance mediated by the *mcr-1* gene (Liu *et al.*, 2016). Colistin has been used for decades in veterinary medicine and in agricultural production, including as growth promoter (Poirel *et al.*, 2017). In Brazil, colistin was prohibited as zootechnical additive in November 2016 (Brazil, 2016). We found low rates of colistin resistance (3.42% in 2014 and 0.61% in 2017). However, the *mcr-1* gene has already been described in *Salmonella* isolates from pork (Rau *et al.*, 2018) and poultry meat (Moreno *et al.*, 2019) in Brazil, highlighting the importance of monitoring the resistance to colistin in the food chain. In Europe, resistance to colistin was reported by 5 countries in *Salmonella* isolates from broilers meat in 2016, in rates varying from 1.2% to 16.7% (EFSA, 2018). In the United States, colistin is not marketed or available for use in food animals, so the national surveillance program (NARMS) do not test for colistin resistance in routine (McDermott *et al.*, 2018).

In regard to other critically important antibiotics, *Salmonella* isolates in our study showed very high rates of resistance to ampicillin (56.16% in 2014 and 76.69% in 2017), which is one of the oldest antibiotics used in veterinary medicine (Voss-Rech *et al.*, 2017). Medeiros *et al.* (2011) had already reported high rates (38.0%) of ampicillin resistance in *Salmonella* isolates from chicken carcasses in Brazil. Similarly, high resistance rates in broiler chickens were described in China (87.8%) (Zhu *et al.*, 2017), Turkey (85.2%) (Yildirim *et al.*, 2011) and Mexico (82.9%) (Miranda *et al.*, 2009). On the other hand, Canada reported declining trends in resistance to ampicillin seen from 2011 (31.6%) to 2016 (7.1%) (CARSS, 2018).

Noteworthy, no resistance was detected to azithromycin, meropenem and tigecycline among the *Salmonella* isolates included in this study. Similar findings were reported by Member States of European Union, where resistance to meropenem was not detected, and resistance to azithromycin and tigecycline were

registered by few countries and in low levels (EFSA, 2018). We also found low levels of resistance to gentamicin and to trimethoprim/sulfamethoxazole, with no trends of increasing, while resistance to chloramphenicol decreased significantly over the assessed period. Data from the United States regarding *Salmonella* isolates from poultry showed similar rates of resistance for these antibiotics (FDA, 2017).

CONCLUSION

This study provided important baseline information about serotype distribution and antimicrobial resistance of nontyphoidal *Salmonella* isolates from poultry meat in Brazil. The data presented in this study represent various regions in our country and, therefore, can be used to develop and implement an Integrated Surveillance Program on Antimicrobial Resistance in Foodborne Pathogens in Brazil. Our findings indicated that *S. Heidelberg* and *S. Minnesota* are the most frequent serotypes associated with poultry meat in Brazil. High and increasing rates of resistance were reported for nalidixic acid, ampicillin, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin and tetracycline. These results stress the importance of a continuous monitoring of antimicrobial resistance in the poultry chain and the need to expand this surveillance to other food production animals. Moreover, hygiene and infection prevention measures should be strengthened in order to tackle antimicrobial resistance in the food production chain.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by “Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência a Antimicrobianos” (INPRA) and by Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply from Brazil (MAPA).

REFERENCES

[ABPA] Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2015. São Paulo, 2015. 245 pp. Available at: <http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/c59411a243d6dab1da8e605be58348ac.pdf> Accessed November 11, 2018.

[ABPA] Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2018. São Paulo, 2018. 177 pp. Available at: <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf> Accessed November 11, 2018.

Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Normative Instruction SDA no. 78, of 3 November 2003. Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium. Diário Oficial da União, 05 nov. 2003; 3-5.

Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Normative Instruction no. 26, of 9 July 2009. Regulamento Técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Diário Oficial da União, 10 jul. 2009; 14-16.

Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Normative Instruction no. 45, of 22 November 2016. Proibir, em todo o território nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Diário Oficial da União, 30 nov. 2016; 6.

Brazil. Ministry of Health. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única: 2018-2022. Brasília, DF. 2018. 23 pp. Available at: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/20/af-pan-br-17dez18-20x28-csa.pdf>. Accessed January 28, 2019.

Campos J, Mourão J, Silveira L, Saraiva M, Correia CB, Maçãs AP, Peixe L, Antunes P. Imported poultry meat as a source of extended-spectrum cephalosporin-resistant CMY-2-producing *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota in the European Union, 2014-2015. Int J Antimicrob Agents 2018; 51:151-154.

[CARSS] Canadian Antimicrobial Resistance Surveillance System: 2017 Report. Public Health Agency of Canada, 2018. 119 pp. Available at: <https://www.canada.ca/content/dam/phac-aspc/documents/services/publications/drugs-health-products/canadian-antimicrobial-resistance-surveillance-system-2017-report-executive-summary/CARSS-Report-2017-En.pdf> Accessed November 17, 2018

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. US Department of Health and Human Services, 2013. 113 pp. Available at: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf> Accessed November 04, 2018.

[CIPARS] Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance: 2015 Annual Report. Public Health Agency of Canada, 2017. 259 pp. Available at: http://publications.gc.ca/collections/collection_2017/aspc-phac/HP2-4-2015-eng.pdf Accessed November 17, 2018.

Costa RG, Festivo ML, Araujo AS, Reis EMF, Lázaro NS, Rodrigues DP. Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil. *J Food Prot* 2013; 76:2011-2017.

Donado-Godoy P, Byrne BA, León M, Castellnanos R, Vanegas C, Coral A, Arevalo A, Clavijo V, Vargas M, Zuñiga JJR, Tafur McA, Pérez-Gutierrez E, Smith W. Prevalence, resistance patterns, and risk factors for antimicrobial resistance in bacteria from retail chicken meat in Colombia. *J Food Prot* 2015; 78:751-759.

[EFSA] European Food Safety Authority and [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 2016. *EFSA J* 2018; 16:5182. 270 pp.

[EFSA] European Food Safety Authority. Manual for reporting on antimicrobial resistance within the framework of Directive 2003/99/EC and Decision 2013/652/EU for information deriving from the year 2016. EFSA Supporting Publication 2017:EN-1176. 35 pp.

[FDA] Food and Drug Administration. Animal & Veterinary. NARMS Now: Integrated Data. Silver Spring, 2017. Available at: <https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/ucm416741.htm> Accessed November 18, 2018.

[FDA] Food and Drug Administration. Extralabel use and antimicrobials. Silver Spring, 2018. Available at: <https://www.fda.gov/animalveterinary/safetyhealth/antimicrobialresistance/ucm421527.htm> Accessed November 20, 2018.

Fitch FM, Carmo-Rodrigues MS, Oliveira VGS, Gaspari MV, dos Santos A, de Freitas JB, Pignatari ACC. B-lactam resistance genes: characterization, epidemiology and first detection of *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-14} in *Salmonella* spp. isolated from poultry in Brazil – Brazil Ministry of Agriculture's Pathogen Reduction Program. *Microb Drug Resist* 2016; 22:164-171.

Foley S, Nayak R, Hanning IB, Johnson TJ, Han J, Ricke SC. Populational dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77:4273-4279.

[ISO] International Organization for Standardization. ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of *Salmonella*. Geneva, 2002. 27 pp.

Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu L-F, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu J-H, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016; 16:161-168.

Mainali C, McFall M, King R, Irwin R. Evaluation of antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* isolates from broiler chickens at slaughter in Alberta, Canada. *J Food Prot* 2014; 77:485-492.

McDermott PF, Zhao S, Tate H. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Microbiol Spectr* 2018; 6:261-287.

Medeiros MAN, de Oliveira DCN, Rodrigues DP, de Freitas DRC. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Rev Panam Salud Publica* 2011; 30:555-560.

Miranda JM, Mondragón AC, Martínez B, Guarddon M, Rodríguez JA. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *J Food Prot* 2009; 72:966-971.

Moreno LZ, Gomes VTM, Moreira J, de Oliveira CH, Peres BP, Silva APS, Thakur S, La Ragione RM, Moreno AM. First report of *mcr-1*-harboring *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolated from poultry meat in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019; 93:376-379.

Nair DVT, Venkitanarayanan K, Johny AK. Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotics alternatives for control. *Foods* 2018; 7:pii=E167.

O'NEILL, J. (org.). Antimicrobials in Agriculture and the Environment: Reducing Unnecessary Use and Waste. Review on Antimicrobial Resistance, 2015. 40pp. Available at: <https://amr-review.org/sites/default/files/Antimicrobials%20in%20agriculture%20and%20the%20environment%20-%20Reducing%20unnecessary%20use%20and%20waste.pdf> Accessed November 04, 2018.

Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymixins: Antibacterial activity, susceptibility testing and resistance mechanisms encoded by plasmid or chromosomes. *Clin Microbiol Rev* 2017; 30:557-96.

Rau RB, de Lima-Morales D, Wink PL, Ribeiro AR, Martins AF, Barth AL. Emergence of *mcr-1* producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from retail meat: first detection in Brazil. *Foodborne Pathog Dis* 2018; 15:58-59.

[USDA] United States Department of Agriculture. Foreign Agriculture Service. Market and Trade Data. PSD Online. Graphical Query: Stats By Commodity. Washington, DC, 2018. Available at: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/statsByCommodity> Accessed November 11, 2018.

Voss-Rech D, Vaz CSL, Alves L, Caodebella A, Leão JA, Rodrigues DP, Back A. A temporal study of *Samonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. *Poult Sci* 2015; 94:433-441.

Voss-Rech D, Potter L, Vaz CSL, Pereira DIB, Sangioni LA, Vargas AC, Botton SA. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* isolated from human and poultry-related samples in Brazil: 20-year meta-analysis. *Foodborne Pathog Dis* 2017; 14:116-124.

[WHO] World Health Organization. Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. Copenhagen, 2011. 65 pp. Available at: http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0005/136454/e94889.pdf Accessed November 04, 2018.

[WHO] World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva, 2015. 19 pp. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763_eng.pdf?ua=1 Accessed November 04, 2018.

[WHO] World Health Organization. Integrated surveillance of antimicrobial resistance in foodborne bacteria: application of a one health approach. Geneva, 2017a. 76 pp. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255747/9789241512411-eng.pdf?sequence=1> Accessed November 04, 2018.

[WHO] World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine. 5th rev. Geneva, 2017b. 76 pp. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255027/9789241512220-eng.pdf?sequence=1> Accessed November 18, 2018.

[WHO] World Health Organization. Monitoring global progress on addressing antimicrobial resistance: analysis report of the second round of results of AMR country self-assessment survey 2018. Geneva, 2018. 59 pp. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/273128/9789241514422-eng.pdf?ua=1> Accessed November 04, 2018.

Yildirim Y, Gonulalan Z, Pamuk S, Ertas N. Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. on raw chickens carcasses. *Food Res Int* 2011; 44:725-728

Zhu Y, Lai H, Zou L, Yin S, Wang C, Han X, Xia X, Hu K, He L, Zhou K, Chen S, Ao X, Liu S. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. *Int J Food Microbiol* 2017; 259:43-51.

Table 1: Number of isolates selected per state and contribution of each state in the total poultry slaughter in Brazil

States	2014		2017	
	N. of samples (%)	% slaughtering ^(a)	N. of samples (%)	% slaughtering ^(b)
BA	4 (2.74)	0.74	-	-
DF	1 (0.68)	1.46	1 (0.61)	0.52
ES	-	-	1 (0.61)	0.66
GO	26 (17.81)	6.5	7 (4.29)	7.15
MG	11 (7.53)	7.12	23 (14.11)	7.10
MS	4 (2.74)	3.09	2 (1.23)	3.23
MT	3 (2.05)	4.40	10 (6.13)	3.99
PA	-	-	2 (1.23)	0.73
PR	46 (31.51)	32.26	69 (42.33)	34.32
RS	12 (8.22)	14.24	7 (4.29)	13.82
SC	29 (19.86)	16.96	22 (13.50)	16.21
SP	9 (6.16)	10.61	16 (9.82)	9.32
TO	1 (0.68)	0.38	3 (1.84)	0.40
TOTAL	146 (100)	97.76	163 (100)	97.45

(a) ABPA, 2015; (b) ABPA, 2018; BA – Bahia; DF – Distrito Federal; ES – Espírito Santo; GO – Goiás; MG – Minas Gerais; MS – Mato Grosso do Sul; MT – Mato Grosso; PA – Pará; PR – Paraná; RS – Rio Grande do Sul; SC – Santa Catarina; SP – São Paulo; TO – Tocantins;

Table 2: Prevalence of antimicrobial-resistant among *Salmonella enterica* from poultry meat in Brazil

ATB	2014 (n=146)		2017 (n=163)		p-value ^(b)
	N. of samples (%)	CI ^(a)	N. of samples (%)	CI ^(a)	
AMP	82 (56.16)	47.72-64.36	125 (76.69)	69.43-82.94	<0.05
AZM	0 (0.00)	0.00-2.49	0 (0.00)	0.00-2.24	-
CAZ	73 (50.00)	41.62-58.38	124 (76.07)	68.78-82.40	<0.05
CHL	10 (6.85)	3.33-12.24	1 (0.61)	0.02-3.37	<0.05
CIP	83 (56.85)	48.40-65.01	145 (88.96)	83.11-93.32	<0.05
CST	5 (3.42)	1.12-7.81	1 (0.61)	0.02-3.37	0.074
CTX	76 (52.05)	43.64-60.38	124 (76.07)	68.78-82.40	<0.05
GEN	9 (6.16)	2.86-11.38	10 (6.13)	2.98-10.99	0.991
MEM	0 (0.00)	0.00-2.49	0 (0.00)	0.00-2.24	-
NAL	84 (57.53)	49.09-65.67	141 (86.50)	80.28-91.34	<0.05
SXT	11 (7.53)	3.82-13.08	7 (4.29)	1.74-8.65	0.225
TET	88 (60.27)	51.85-68.27	135 (82.82)	76.14-88.27	<0.05
TGC	0 (0.00)	0.00-2.49	0 (0.00)	0.00-2.24	-

(a) Fisher's exact test (95% CI); (b) Pearson's chi-square; AMP - ampicillin; AZM - azithromycin; CAZ - ceftazidime; CHL - chloramphenicol; CIP - ciprofloxacin; CST - colistin; CTX - cefotaxime; GEN - gentamicin; MEM - meropenem; NAL - nalidixic acid; SXT - sulfamethoxazole/trimethoprim; TET - tetracycline; TGC - tigecycline.

Figure 1: Distribution of *Salmonella* serovars from poultry isolates in the years of 2014 and 2017.

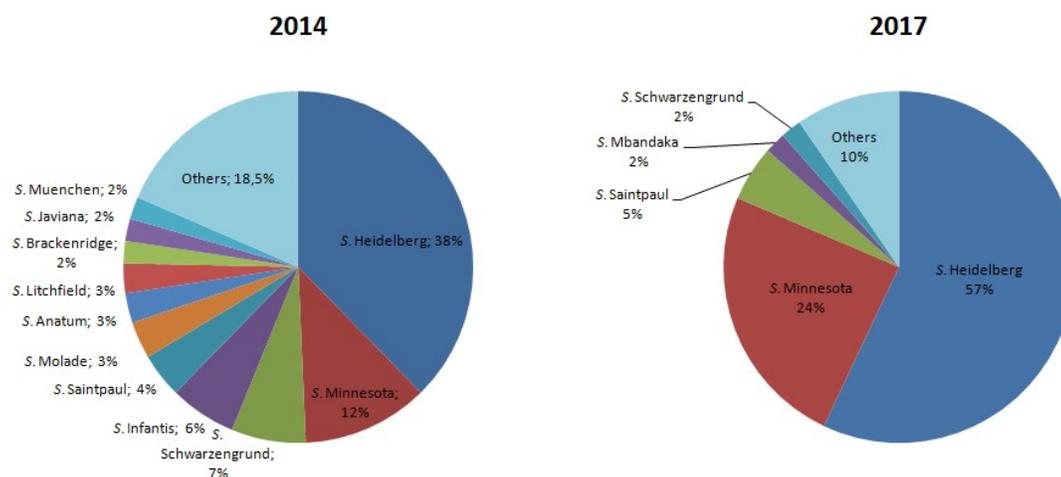
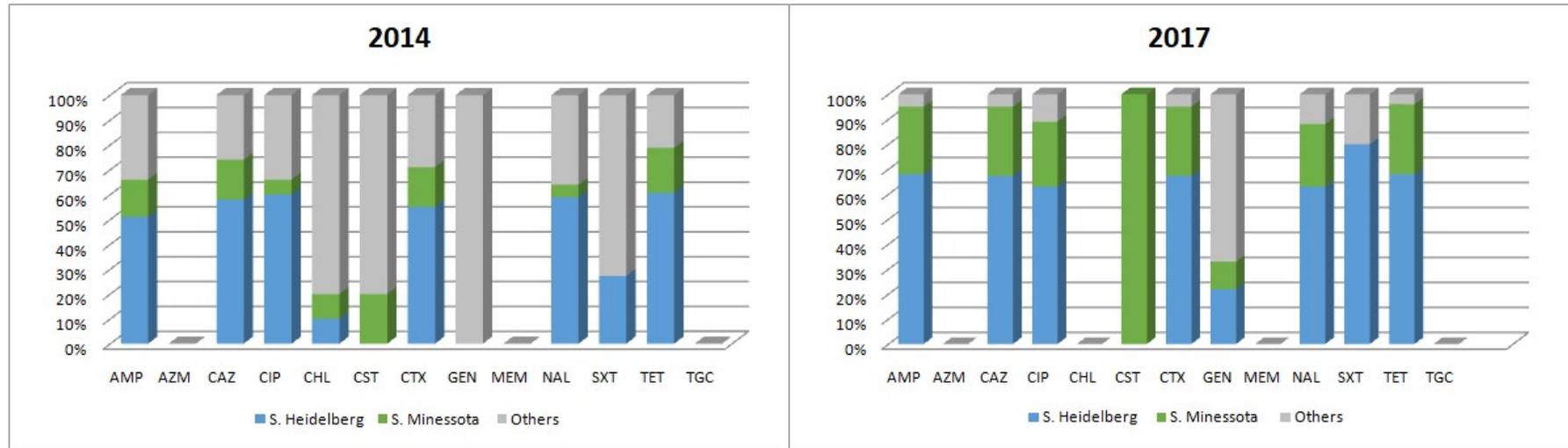


Figure 2: Contribution of the serotypes Heidelberg and Minnesota for antimicrobial resistance in each year.



5 RESULTADOS ADICIONAIS

De forma complementar, foram avaliados também isolados de *Salmonella* obtidos de carcaças suínas, através de programa exploratório do MAPA, realizado entre outubro de 2014 e setembro de 2015 (BRASIL, 2014).

Todos os isolados foram obtidos de acordo com os procedimentos da ISO 6579:2002 (ISO, 2002). A determinação dos sorovares foi realizada por ribotipagem automatizada, utilizando a enzima de restrição *PvuII*. A suscetibilidade dos isolados a 13 diferentes antibióticos foi determinada por microdiluição em caldo, de acordo com a ISO 20776-1:2006 (ISO, 2006). Os antibióticos testados, a faixa de concentração avaliada e os critérios de interpretação utilizados estão descritos na Tabela 1. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizados como controle de qualidade.

Tabela 1: Condições do teste de suscetibilidade e critérios de interpretação

Antibióticos	Faixa de concentração (mg/L)	Critério de interpretação de resistência ^(a)
Ampicilina (AMP)	0,125-64	>8
Azitromicina (AZM)	0,125-64	>16 ^(b)
Cefotaxima (CTX)	0,01-4	>2
Ceftazidima (CAZ)	0,02-8	>4
Cloranfenicol (CHL)	0,25-128	>8
Ciprofloxacino (CIP)	0,02-8	>0.06
Colistina (CST)	0,03-16	>2
Gentamicina (GEN)	0,06-32	>4
Meropenem (MEM)	0,03-16	>8
Ácido Nalidíxico (NAL)	0,25-128	>16 ^(c)
Tetraciclina (TET)	0,125-64	>8 ^(c)
Tigeciclina (TGC)	0,02-8	>2
Trimetoprim/ Sulfametoxazol (SXT)	0,06-32	>4 ^(d)

(a) Ponto de corte clínico do EUCAST 8.1 (2018) - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*.

(b) Ponto de corte clínico e valores de corte epidemiológicos (ECOFF) não disponíveis para *Salmonella*. Adotada recomendação da EFSA (EFSA, 2017).

(c) Ponto de corte clínico não disponível para *Salmonella*. Foram adotados os valores de corte epidemiológicos (ECOFF) do EUCAST.

(d) Trimetoprim/sulfametoxazol avaliado na proporção de 1:19. Pontos de corte expressos como concentração de trimetoprim.

Ao todo, foram analisados 114 isolados de *Salmonella*, obtidos de 39 estabelecimentos de abate de suínos sob inspeção federal, de 37 cidades e cinco estados do Brasil. O número de isolados analisados por estado e a contribuição de cada estado para o total de abate de suínos no Brasil estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Número de isolados analisados por estado e contribuição de cada estado para o total de abate de suínos no Brasil.

Estados	Número de amostras (%)	% abate ^(a)
MG	17 (14.91)	11.40
PR	28 (24.56)	21.47
RS	24 (21.05)	20.69
SC	27 (23.68)	27.40
SP	18 (15.79)	4.75
TOTAL	114 (100)	85.71

(a) Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2016 (ABPA, 2016).

Foram identificados 21 sorovares diferentes de *Salmonella* entre os isolados de carcaças suínas. Os sorovares mais prevalentes foram *Salmonella ser.* Typhimurium variante monofásica 4,[5],12:i- (23%), *Salmonella ser.* Derby (21%), *Salmonella ser.* Typhimurium (15%) e *Salmonella ser.* Panama (15%). A distribuição dos sorovares encontrados está representada na Figura 2.

Os resultados dos testes de suscetibilidade indicaram que 12,3% dos isolados eram sensíveis a todos os antibióticos testados, e 45,6% apresentaram multirresistência (resistência a 3 ou mais classes de antibióticos) (Tabela 3). A prevalência de isolados de *Salmonella* de carcaça suína resistentes a cada uma dos antibióticos testados está apresentada na Tabela 4. Foram identificados 37 perfis de resistência diferentes, sendo que os mais prevalentes foram os que apresentaram resistência a NAL-CIP-TET (12%) e NAL (11%) (Tabela 5). Os valores de concentração inibitória mínima, bem como os valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ estão apresentados na Tabela 6.

Os resultados acima serão publicados, oportunamente, na forma de artigo científico.

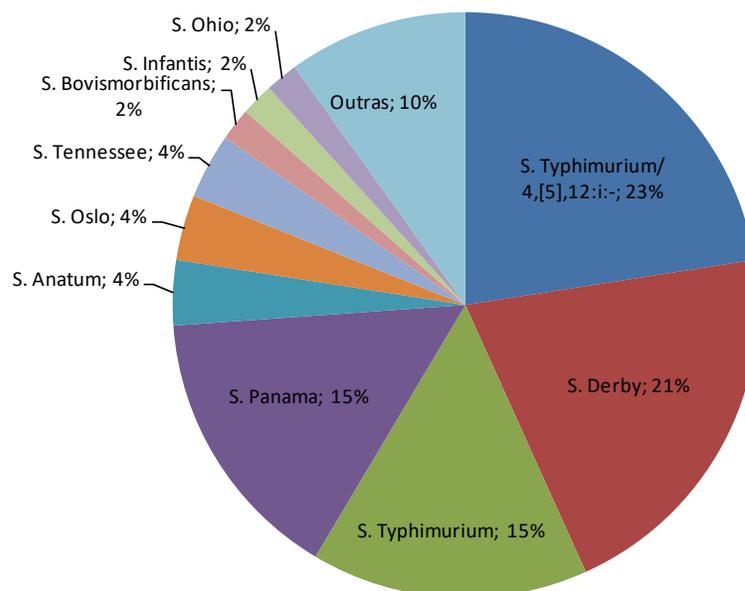


Figura 2: Distribuição dos sorovares de *Salmonella* de carcaças suínas.

Tabela 3: Padrões de resistência de *Salmonella* de carcaça suína no Brasil.

Padrão de resistência	Número de amostras (%)
Sem resistência	14 (12,3%)
Resistência a 1 classe	26 (22,8%)
Resistência a 2 classes	22 (19,3%)
Resistência a 3 classes	13 (11,4%)
Resistência a 4 classes	18 (15,8%)
Resistência a 5 classes	15 (13,2%)
Resistência a 6 classes	3 (2,6%)
Resistência a 7 classes	2 (1,8%)
Resistência a 8 classes	1 (0,9%)
Multirresistência	52 (45,6%)

Tabela 4: Resistência antimicrobiana de *Salmonella* de carcaça suína no Brasil

Antibiótico	Nº de isolados resistentes (%)	Intervalo de confiança (%) [*]
AMP	54 (47.37)	37.94-56.94
AZM	0 (0.00)	0.00-3.18
CAZ	1 (0.88)	0.02-4.79
CHL	38 (33.33)	24.78-42.77
CIP	65 (57.02)	47.41-66.25
CST	13 (11.40)	6.21-18.71
CTX	1 (0.88)	0.02-4.79
GEN	21 (18.42)	11.78-26.77
MEM	0 (0.00)	0.00-3.18
NAL	74 (64.91)	55.41-73.62
SXT	20 (17.54)	11.06-25.79
TET	69 (60.53)	50.94-69.55
TGC	1 (0.88)	0.02-4.79

^{*}Teste exato de Fischer (95% CI)

Tabela 5: Perfis de resistência de *Salmonella* de carcaça suína no Brasil.

Perfil de resistência	Número de amostras (%)
Sem resistência	14 (12,3)
CIP-NAL-TET	14 (12,3)
NAL	11 (9,6)
TET	9 (7,9)
AMP-CHL-CIP-NAL-TET	9 (7,9)
AMP-CHL-CIP-GEN-NAL-TET	6 (5,3)
CIP-NAL	5 (4,4)
AMP-CIP-NAL	5 (4,4)
AMP-CHL-TET	3 (2,6)
AMP-CHL-SXT-TET	3 (2,6)
AMP-CIP-GEN-NAL-TET	3 (2,6)
AMP-SXT-TET	2 (1,8)
AMP- CHL-CIP-NAL	2 (1,8)
AMP-CIP-CST-NAL	2 (1,8)
AMP- CHL-CIP-NAL-SXT-TET	2 (1,8)
AMP-CHL-CIP-CST-GEN-NAL-SXT	2 (1,8)
AMP-CIP-CST-GEN-NAL-SXT-TET	2 (1,8)
CST	1 (0,9)
AMP-NAL	1 (0,9)
NAL-TET	1 (0,9)
AMP-CHL-NAL	1 (0,9)
AMP-CIP-TET	1 (0,9)
CIP-NAL-SXT	1 (0,9)
AMP-CIP-SXT-TET	1 (0,9)
CHL-CIP-NAL-TET	1 (0,9)
CIP-NAL-SXT-TET	1 (0,9)
AMP-CHL-CIP-GEN-NAL	1 (0,9)
AMP-CST-GEN-SXT-TET	1 (0,9)
AMP- CAZ- CIP-CTX-NAL-TET	1 (0,9)
AMP- CHL-CIP-CST-NAL-TET	1 (0,9)
AMP-CHL-CIP-GEN-NAL-SXT	1 (0,9)
AMP-CIP-CST-GEN-NAL-TET	1 (0,9)
AMP-CIP-GEN-NAL-SXT-TET	1 (0,9)
CHL-CIP-CST-NAL-SXT-TET	1 (0,9)
CHL- CIP-GEN-NAL-SXT-TET	1 (0,9)
AMP-CHL-CIP-CST-GEN-NAL-TET	1 (0,9)
AMP-CHL-CIP-CST-GEN-NAL-SXT-TET-TGC	1 (0,9)

Tabela 6: Distribuição de valores de CIM de *Salmonella* de carcaça suína no Brasil.

	0.01	0.02	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128	MIC ₅₀	MIC ₉₀
AMP					-	-	-	21.9	28.1	2.6	-	-	-	-	47.4		2	>64
AZI					-	-	0.9	58.8	28.9	9.6	0.9	0.9	-	-			1	4
CAZ		-	-	-	-	7.0	63.2	28.1	0.9	0	0.9						0.5	1
CHL						-	-	-	2.6	50.0	14.0	0.9	-	14.0	14.9	3.5	4	128
CIP		29.8	5.3	7.9	23.7	18.4	7.0	-	1.8	6.1	-						0.125	0.5
CST			-	-	-	7.9	9.6	27.2	43.9	11.4	-	-					2	4
CTX	-	-	-	10.5	64.0	15.8	8.8	-	-	-	0.9						0.125	0.25
GEN				-	-	1.8	13.2	32.5	30.7	3.5	-	1.8	14.0	2.6			2	32
MEM			4.4	88.6	7.0	-	-	-	-	-	-	-					0.06	0.125
NAL						-	-	-	-	9.6	20.2	5.3	14.0	7.0	2.6	41.2	64	>128
SXT				9.6	36.0	31.6	5.3	-	-	-	-	0.9	-	16.7			0.25	>32
TET					-	1.8	4.4	24.6	7.0	1.8	-	0.9	2.6	36.0	21.1		64	>64
TGC		-	-	-	-	3.5	48.2	33.3	14.0	0.9	-						0.5	2

Os campos em verde representam a faixa de diluições testadas. Os valores de CIM iguais ou inferiores à concentração mais baixa testada são apresentados como a concentração mais baixa. Os valores de CIM superiores à concentração mais alta no intervalo são apresentados como uma diluição acima do intervalo.

6 DISCUSSÃO GERAL

A resistência aos antimicrobianos é um problema que vem crescendo nos últimos anos devido ao uso incorreto ou excessivo de antibióticos não apenas na medicina humana, mas também na medicina veterinária e na produção agropecuária. Para que se possa combater a RAM de forma efetiva, é necessária uma abordagem alinhada ao conceito de Saúde Única (“*One Health*”), que envolva o monitoramento da resistência nas áreas de medicina humana, medicina veterinária, produção agropecuária e meio ambiente. Os alimentos são uma importante via de transmissão de bactérias e genes de resistência entre animais e humanos. Dessa forma, o monitoramento da RAM ao longo da cadeia alimentar pode fornecer informações relevantes para a adoção de medidas eficazes de controle da resistência.

No presente trabalho, foram avaliados isolados de *Salmonella* obtidos de carne de frango e de carcaças suínas, com o objetivo de determinar o perfil de suscetibilidade. De forma complementar, foram determinados os sorovares mais prevalentes em cada uma das cadeias produtivas avaliadas, tendo em vista a importância dessa informação para a saúde pública, a segurança alimentar e o comércio nacional e internacional de alimentos.

Em relação à carne de frango, foram analisados isolados de *Salmonella* obtidos em 2014 (n=146) e 2017 (n=163), através de programas de controle e monitoramento de patógenos do MAPA (IN 70/2003 e IN 20/2016) (BRASIL, 2003a; BRASIL, 2016a). Os resultados obtidos indicaram que os sorovares *Salmonella ser.* Heidelberg (2014 - 38%; 2017 - 57%) e *Salmonella ser.* Minnesota (2014 - 12%; 2017 - 24%) foram os mais prevalentes em ambos os anos. *Salmonella ser.* Heidelberg é um dos cinco sorovares mais prevalentes em carnes de aves nos Estados Unidos e no Canadá, estando frequentemente associados a infecções invasivas (FOLEY *et al.*, 2011; PHAC, 2017). *Salmonella ser.* Minnesota já foi relatada como um dos cinco principais sorovares encontrados em carne de frango no Brasil, entre 2007 e 2011 (COSTA *et al.*, 2013). Na Europa, os sorovares *Salmonella ser.* Heidelberg e *Salmonella ser.* Minnesota são raramente reportados, tanto em humanos quanto em animais (CAMPOS *et al.*, 2018).

Os testes de suscetibilidade mostraram que os isolados de *Salmonella* de carne de frango possuíam altas taxas de resistência à tetraciclina (2014 – 60,27%;

2017 – 82,82%), ácido nalidíxico (2014 – 57,53%; 2017 – 86,50%), ciprofloxacino (2014 – 56,85%; 2017 – 88,96%), ampicilina (2014 – 56,16%; 2017 – 76,69%), cefotaxima (2014 – 52,05%; 2017 – 76,07%), ceftazidima (2014 – 50,00%; 2017 – 76,07%), tanto em 2014 quanto em 2017. Além disso, foi possível verificar um aumento significativo da resistência a esses antibióticos no período avaliado. Índices elevados de resistência às quinolonas e fluorquinolonas (ácido nalidíxico e ciprofloxacino) e às cefalosporinas de terceira geração (cefotaxima e ceftazidima) são um resultado preocupante, uma vez que essas classes de antibióticos, além de serem consideradas criticamente importantes para a saúde humana (WHO; AGISAR, 2017), são o tratamento de escolha para infecções graves causadas por *Salmonella* (NAIR *et al.*, 2018). No nosso estudo, o perfil de resistência combinada a fluorquinolonas e cefalosporinas de terceira geração está associado principalmente a *Salmonella ser.* Heidelberg e a *Salmonella ser.* Minnesota.

Altas taxas de resistência às fluorquinolonas em isolados de *Salmonella* de carne de aves têm sido relatadas em países como China, Colômbia e Estados Membros da União Européia (DONADO-GODOY *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2017; EFSA; ECDC, 2018). Por outro lado, índices extremamente baixos de resistência às fluorquinolonas são reportados nos Estados Unidos e no Canadá (PHAC, 2018; FDA, 2017), onde essa classe de antimicrobianos não é aprovada para uso de aves de corte (MAINALI *et al.*, 2014; FDA, 2018b).

No Brasil, a resistência às cefalosporinas de terceira geração tem sido associada ao uso de ceftiofur em pintinhos de um dia para controle da mortalidade precoce por *E. coli* e *S. aureus* (Costa *et al.*, 2013). No Canadá, onde a resistência a essa classe de antimicrobianos também está fortemente associada à *Salmonella ser.* Heidelberg, foi verificada uma redução significativa na resistência às cefalosporinas de terceira geração após a indústria nacional ter banido o uso de ceftiofur em frangos de corte (PHAC, 2018).

Em relação à carne suína, foram analisados isolados de *Salmonella* obtidos entre 2014 e 2015 (n=114), através de um programa exploratório do MAPA de pesquisa de *Salmonella* em carcaças (Norma Interna DIPOA nº 05/2014) (BRASIL, 2014). Os resultados obtidos indicaram que *Salmonella ser.* Typhimurium monofásica 4,[5],12:i- (23%), *Salmonella ser.* Derby (21%), *Salmonella ser.* Typhimurium (15%) e *Salmonella ser.* Panama (15%) foram os sorovares mais prevalentes nos isolados analisados. Resultados similares foram encontrados na

Europa, onde *Salmonella ser. Derby*, *Salmonella ser. Typhimurium* monofásica e *Salmonella ser. Typhimurium* são os três sorovares mais frequentemente encontrados tanto em suínos de engorda quanto em carne suína (EFSA; ECDC, 2017).

O monitoramento da resistência aos antimicrobianos nesses isolados indicou índices elevados de resistência ao ácido nalidíxico (64,9%), tetraciclina (60,5%), ciprofloxacino (57,2%) e ampicilina (47,4%). A resistência à ampicilina e tetraciclina também tem sido frequentemente reportada em isolados de *Salmonella* de carcaça suína na Europa. No entanto, a resistência ao ácido nalidíxico e ao ciprofloxacino é baixa tanto em isolados avaliados na Europa quanto nos Estados Unidos (EFSA; ECDC, 2017; FDA, 2017).

Ao contrário dos resultados obtidos para isolados de carne de frango, as taxas de resistência a cefalosporinas de terceira geração em *Salmonella* de carcaça suína são extremamente baixas, de forma similar ao reportado na Europa e nos Estados Unidos (EFSA; ECDC, 2017; FDA, 2017). A avaliação da suscetibilidade indicou, ainda, importantes índices de resistência ao cloranfenicol (33,3%). Mais estudos são necessários para entender o contexto genético dessa resistência, uma vez que o uso de cloranfenicol em animais é proibido no Brasil desde 2003 (MAPA, 2017a). Estudos indicam que pode haver co-seleção da resistência ao cloranfenicol pela utilização de outros antimicrobianos, como sulfametoxazol, tetraciclina, kanamicina e florfenicol (BISCHOFF *et al.*, 2005; EFSA; ECDC, 2017).

O presente trabalho avaliou também a resistência às polimixinas, devido ao extenso uso dessa classe de antibióticos na medicina veterinária e na produção agropecuária, tanto para prevenção e tratamento de infecções, quanto para promoção de crescimento (POIREL *et al.*, 2017). As polimixinas são uma importante opção terapêutica para o tratamento de infecções por bactérias Gram negativas produtoras de carbapenemases. A descrição de um mecanismo plasmidial de resistência às polimixinas, em 2015, mediado pelo gene *mcr-1*, causou grande preocupação em todo o mundo (LIU *et al.*, 2017). Desde então, o gene *mcr-1* tem sido amplamente descrito em isolados bacterianos obtidos de animais de produção e de alimentos de origem animal em diversos países, indicando uma provável relação entre o uso de colistina na produção agropecuária e a disseminação desse mecanismo de resistência (SCHWARZ; JOHNSON, 2016).

As análises de suscetibilidade realizadas nos isolados de *Salmonella* de carne de aves indicaram baixa taxa de resistência (3,42% em 2014 e 0,61% em 2017) à colistina (polimixina E), sem diferença significativa entre os dois anos de avaliação. Já as análises realizadas em isolados de *Salmonella* de carcaça suína mostraram uma taxa de resistência mais elevada, de 11,40%, indicando possivelmente um maior uso desse antimicrobiano na cadeia produtiva de suínos, quando comparado às aves (dados sobre a utilização de antimicrobianos na produção animal no Brasil não estão disponíveis). Na Europa, isolados de *Salmonella* de carne de aves resistentes à colistina foram reportados por cinco países, em taxas variando entre 1,2% e 16,7%; enquanto a resistência em isolados de carcaça suína foi reportada por seis países, em taxas entre 0,8% e 6,3% (EFSA; ECDC, 2017; EFSA; ECDC, 2018). Nos Estados Unidos, a colistina não está disponível para uso em animais de produção. Dessa forma, o programa nacional de monitoramento (NARMS) não avalia a resistência à colistina na rotina (MCDERMOTT *et al.*, 2018).

Além de avaliar a resistência às polimixinas através de testes de suscetibilidade, o presente trabalho pesquisou também a presença do gene *mcr-1* em isolados de *Salmonella* obtidos de carnes de frango, peru e suíno produzidas no Brasil entre 2014 e 2017, além dos isolados de carcaça suína obtidos entre 2014 e 2015 (n=490). A presença do gene *mcr-1* foi detectada e confirmada em oito isolados (1,6%) de *Salmonella*, sendo cinco de carcaça suína, um de carne de frango, um de carne de peru e um de carne suína.

Entre os isolados positivos para o gene *mcr-1*, sete pertenciam ao sorovar *Salmonella ser.* Typhimurium e sua variante monofásica 4,[5],12:i:-, e um isolado pertencia ao sorovar *Salmonella ser.* Saintpaul. Estudos já identificaram a presença do gene *mcr-1* em diferentes sorovares de *Salmonella*. No entanto, o sorovar *Salmonella ser.* Typhimurium parece ser o mais frequentemente associado a esse gene de resistência (CUI *et al.*, 2017).

Os valores de concentração inibitória mínima dos isolados positivos para o gene *mcr-1* variaram entre 4mg/L e 8mg/L, concentrações pouco superiores ao ponto de corte estabelecido pelo EUCAST. Além disso, foi possível identificar que sete isolados possuíam perfil de multirresistência, sendo resistentes a três ou mais classes de antibióticos. No entanto, nenhum dos isolados apresentou resistência a cefalosporinas de terceira geração ou a carbapenêmicos.

Todos os isolados carreando o gene *mcr-1* foram analisados também por sequenciamento de genoma completo, com o objetivo de caracterizar geneticamente os isolados e os plasmídeos carreando o gene de resistência de interesse. A análise *in silico* de MLST indicou que seis isolados pertenciam ao ST 19. A maioria dos relatos de *Salmonella ser.* Typhimurium positivas para o gene *mcr-1*, no entanto, está associada ao ST34 (DOUMITH *et al.*, 2016; LI, X-P *et al.*, 2016).

Em todos os isolados analisados o gene *mcr-1* estava localizado em plasmídeos pertencentes ao grupo de incompatibilidade IncX4; nenhum outro gene de resistência foi identificado nesses plasmídeos. O grupo de incompatibilidade IncX4 está fortemente associado com a disseminação mundial do gene *mcr-1* (MATAMOROS *et al.*, 2017), sendo reportado em isolados de *Salmonella* de diferentes sorovares, principalmente na Europa e na Ásia (VELDMAN *et al.*, 2016; CHIOU *et al.*, 2017). No Brasil, todos os relatos do gene *mcr-1* estão associados a plasmídeos IncX4, incluindo *E. coli* de humanos, alimentos e ambiente (FERNANDES *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2017; MONTE *et al.*, 2017), e *K. pneumoniae* de pacientes (AIRES *et al.*, 2017; DALMOLIN *et al.*, 2018). Experimentos de conjugação realizados com quatro isolados contendo o gene *mcr-1* demonstraram que todos os plasmídeos foram capazes de se transferir para a *E. coli* J53, confirmando achados anteriores a respeito da natureza conjugativa dos plasmídeos IncX4 (CAMPOS *et al.*, 2016; CUI *et al.*, 2017).

Em conclusão, o presente trabalho permitiu a identificação dos sorovares de *Salmonella* mais prevalentes em carne de frango e carcaças suínas produzidas no Brasil, nos períodos avaliados, bem como determinou o perfil de suscetibilidade dos isolados de *Salmonella* presentes nesses produtos. As informações geradas podem ser utilizadas como base para a implementação de um programa de monitoramento integrado da resistência antimicrobiana em patógenos alimentares no Brasil, permitindo a adoção de medidas mais efetivas de prevenção e controle da RAM. Além disso, foi possível identificar e caracterizar a presença do gene *mcr-1* em isolados de *Salmonella* obtidos de alimentos de origem animal produzidos no Brasil, possibilitando um melhor entendimento sobre a disseminação desse mecanismo de resistência no país, através dos alimentos.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no trabalho, é possível concluir que:

- Os principais sorovares encontrados em isolados de *Salmonella* de carne de frango produzida no Brasil são *Salmonella ser.* Heidelberg e *Salmonella ser.* Minnesota;
- Os principais sorovares encontrados em isolados de *Salmonella* de carcaças suínas produzidas no Brasil são *Salmonella ser.* Typhimurium 4,[5],12:i:-, *Salmonella ser.* Derby, *Salmonella ser.* Typhimurium e *Salmonella ser.* Panama;
- Isolados de *Salmonella* de carne de frango no Brasil apresentam resistência principalmente ao ácido nalidíxico, ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacino e tetraciclina;
- Isolados de *Salmonella* de carcaças suínas no Brasil apresentam resistência principalmente ao ácido nalidíxico, ampicilina, ciprofloxacino, cloranfenicol e tetraciclina.
- O gene *mcr-1* foi identificado em oito isolados de *Salmonella* obtidos de alimentos de origem animal produzidos no Brasil.
- Os plasmídeos contendo o gene *mcr-1* pertencem ao grupo de incompatibilidade IncX4 e são capazes de se transferir, por conjugação, para bactérias de outras espécies.

REFERÊNCIAS

ABDI, R.D.; MENGSTIE, F., BEYI, A.F.; BEYENE, T.; WAKTOLE, H.; MAMMO, B.; AYANA, D.; ABUNNA, F. Determination of the sources and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolated from the poultry industry in Southern Etiopia. **BMC Infectious Disease**, v. 17, n. 1, p. 352, 2017.

ASSOCIACÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2016**. São Paulo: ABPA, [2016].133 p.

ASSOCIACÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2018**. São Paulo: ABPA, [2018]. 177p.

ABUOUN, M.; STUBBERFIELD, E.J.; DUGGETT, N.A.; KIRCHNER, M.; DORMER, L.; NUNEZ-GARCIA, J.; RANDALL, L.P.; LEMMA, F.; CROOK, D.W.; TEALE, C.; SMITH, R.P.; ANJUN, M.F. *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**,v. 73, n. 10, p. 2904, 2018.

AIRES, C.A.M.; CONCEIÇÃO-NETO, O.C.; OLIVEIRA, T.R.T.; DIAS, C.F.; MONTEZZI, L.F.; PICÃO, R.C.; ALBANO, R.M.; ASENSI, M.D.; CARVALHO-ASSEF, A.P.D. Emergence of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumonia* Sequence Type 392 in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, pii: e00317-17, 2017.

AL-TAWFIQ, J.A.; LAXMINARAYAN, R.; MENDELSON, M. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 54, p. 77-84, 2017.

AN, R.; ALSHALCHI, S.; BREIMHURST, P.; MUNOZ-AGUAYO, J.; FLORES-FIGUEROA, C.; VIDOVIC, S. Strong influence of livestock environments on the emergence and disseminations of distinct multidrug-resistant phenotypes among the population of non-typhoidal *Salmonella*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179005, 2017.

ANTUNES, P.; MOURÃO, J.; CAMPOS, J.; PEIXE, L. Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**,v. 22, n. 2, p. 110-121, 2016.

BISCHOFF, K.M., WHITE D.G., HUME, M.E., POOLE, T.L., NISBET, D.J. The chloramphenicol resistance gene *cmIA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, n. 1, p. 285-291, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. Instituir o Programa de Redução de Patógenos Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus . **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 10 out. 2003a. Seção I, p. 9-10.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 78, de 03 de novembro de 2003. Aprovar as

Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 05 nov. 2003b. Seção I, p.3-5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Norma Interna DIPOA/SDA nº 5, de 12 de setembro de 2014**. Aprovar os procedimentos do programa exploratório para coleta de amostra e pesquisa de *Salmonella* spp. em carcaças de suínos abatidos em estabelecimentos registrados junto ao Serviço de Inspeção Federal (SIF). Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016. Ficam estabelecidos o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), com objetivo de reduzir a prevalência desse agente e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 25 out. 2016a. Seção I, p. 13-16.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Instrução Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016. Proíbe, em todo o território nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 30 nov. 2016b. Seção I, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 60, de 20 de dezembro de 2018. Fica estabelecido o controle microbiológico em carcaça de suínos e em carcaça e carne de bovinos em abatedouros frigoríficos, registrados no Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), com objetivo de avaliar a higiene do processo e reduzir a prevalência de agentes patogênicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 24 dez. 2018. Seção I, p.4-6.

CAMPOS, J.; CRISTINA, L.; PEIXE, L.; ANTUNES, P. MCR-1 in multidrug-resistant and copper-tolerant clinically relevant *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- and S. Rissen clones in Portugal, 2011 to 2015. **Euro Surveillance**, v. 21, n. 26, pii=30270, 2016.

CAMPOS, J.; MOURÃO, J.; SILVEIRA, L.; SARAIVA, M.; CORREIA, C.B.; MAÇÃS, A.P.; PEIXE, L.; ANTUNES, P. Imported poultry meat as a source of extended-spectrum cephalosporin-resistant CMY-2-producing *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota in the European Union, 2014-2015. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 1, p. 151-154, 2018.

CARFORA, V.; ALBA, P.; LEEKITCHAROENPHON, P.; BALLARÒ, D.; CORDARO, G.; DI MATTEO, P.; DONATI, V.; IANZANO, A.; IURESCIA, M.; STRAVINO, F.; TAGLIAFERRI, T.; BATTISTI, A.; FRANCO, A. Colistin Resistance Mediated by *mcr*-

1 in ESBL-Producing, Multidrug Resistant *Salmonella* Infantis in Broiler Chicken Industry, Italy (2016-2017). **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1880, 2018.

CARNEVALI, C.; MORGANTI, M.; SCALTRITI, E.; BOLZONI, L.; PONGOLINI, S.; CASADEI, G. Occurrence of *mcr-1* in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates Recovered from Humans and Animals in Italy, 2012 to 2015. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7532-7534, 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. [Washington, DC]: US Department of Health and Human Services, 2013. 113 p.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Salmonella: questions and answers**. [Atlanta, 2018]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>. Acesso em: 28 dez. 2018.

CHIOU, C-S.; CHEN, Y-T.; WANG, Y-W.; LIU, Y-Y.; KUO, H-C.; TU, Y-H.; LIN, A-C.; LIAO, Y-S.; HONG, Y-P. Dissemination of *mcr-1*-Carrying Plasmids among Colistin-Resistant *Salmonella* Strains from Humans and Food-Producing Animals in Taiwan. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, pii: e00338-17, 2017.

CHLEBICZ, A.; SLIZEWSKA, K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 15, n. 5, pii:E863, 2018.

CORREIA, S.; POETA, P.; HÉBRAUD, M.; CAPELO, J.L.; IGREJAS, G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 551-559, 2017.

COSTA, R.G.; FESTIVO, M.L.; ARAUJO, A.S.; REIS, E.M.F.; LÁZARO, N.S.; RODRIGUES, D.P. Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 12, p. 2011-2017, 2013.

CUI, M.; ZHANG, J.; GU, Z.; LI, R.; CHAN, E.W.; YAN, M.; WU, C.; XU, X.; CHEN, S. Prevalence and Molecular Characterization of *mcr-1*-Positive *Salmonella* Strains Recovered from Clinical Specimens in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, pii: e02471-16, 2017.

DALMOLIN, T.V.; MARTINS, A.F.; ZAVASKI, A.P.; DE LIMA-MORALES, D.; BARTH, A.L. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumonia* ST437/CC258, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 2, p. 132-133, 2018.

DE CESARE, A.; MANFREDA, G.; DAMBAUGH, T.R.; GUERZONI, M.E.; FRANCHINI, A. Automated ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular typing of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* strains isolated in Italy. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 780-785, 2001.

DE CESARE, A. *Salmonella* in Foods: A Reemerging Problem. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 86, p. 137-179, 2018.

DONADO-GODOY, P.; BYRNE, B.A.; LEÓN, M.; CASTELLNANOS, R.; VANEGAS, C.; CORAL, A.; AREVALO, A.; CLAVIJO, V.; VARGAS, M.; ZUÑIGA, J.J.R.; TAFUR, M.C.A.; PÉREZ-GUTIERREZ, E.; SMITH, W. Prevalence, resistance patterns, and risk factors for antimicrobial resistance in bacteria from retail chicken meat in Colombia. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 4, p. 751-759, 2015.

DOUMITH, M.; GODBOLE, G.; ASHTON, P.; LARKIN, L.; DALLMAN, T.; DAY, M.; DAY, M.; MULLER-PEBODY, B.; ELLINGTON, M.J.; DE PINNA, E.; JOHNSON, A.P.; HOPKINS, K.L.; WOODFORD, N. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 71, n. 8, p. 2300-2305, 2016.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Manual for reporting on antimicrobial resistance within the framework of Directive 2003/99/EC and Decision 2013/652/EU for information deriving from the year 2016. **EFSA supporting publication**, 2017:EN-1176. 35 p

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY; 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 2014. **EFSA Journal**, v. 14, n. 2, p. 4380, 2016.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY; 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. 15, n. 2, p. 4694, 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY; 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 2016. **EFSA Journal**, v. 16, n. 2, p. 5182, 2018.

ENG, S-K.; PUSPARAJAH, P.; MUTALIB, N-S.A.; SER, H-L.; CHAN, K-G.; LEE, L-H. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 284-293, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Applications of whole genome sequencing in food safety management**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. 21 p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Animal & veterinary: NARMS now - integrated data**. Silver Spring, 1 nov. 2017. Disponível em: <https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/ucm416741.htm>. Acesso em: 30 dez. 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food: whole genome sequencing (WGS) program**. Silver Spring, 15 fev. 2018a. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/WholeGenomeSequencingProgram/WGS/default.htm>. Acesso em: 11 jan. 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Animal & veterinary: extralabel use and antimicrobials**. Silver Spring, 24 ago. 2018b. Disponível em: <https://www.fda.gov/animalveterinary/safetyhealth/antimicrobialresistance/ucm421527.htm>. Acesso em: 30 dez. 2018.

FERNANDES, M.R.; MCCULLOCH, J.A.; VIANELLO, A.M.; MOURA, Q.; PÉREZ-CHAPARRO, P.J.; ESPOSITO, F.; SARTORI, L.; DROPA, M.; MATTÉ, M.H.; LIRA, D.P.; MAMIZUKA, E.M.; LINCOPAN, N. First report of globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 isolate from a human infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6415-6417, 2016.

FERNANDES, M.R.; SELLERA, F.P.; ESPOSITO, F.; SABINO, C.P.; CERDEIRA, L.; LINCOPAN, N. Colistin-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* on public beaches, and infectious threat emerging in recreational waters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, pii:e00234-17, 2017.

FERNANDES, M.R.; CERDEIRA, L.; SILVA, M.M.; SELLERA, F.P.; MUÑOZ, M.; JÚNIOR, F.G.; AZEVEDO, S.S.; POWER, P.; GUTKIND, G.; LINCOPAN, N. Novel *mcr-5.3* variant in a CTX-M-8-producing *Escherichia coli* ST711 isolated from an infected horse. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 12, p. 3520-3522, 2018.

FERRARI, R.; GALIANA, A.; CREMADES, R.; RODRÍGUEZ, J.C.; MAGNANI, M.; TOGNIM, M.C.B.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; ROYO G. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and mutations in the topoisomerase genes of *Salmonella enterica* strains from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 651-656, 2013.

FOLEY, S.; NAYAK, R.; HANNING, I.B.; JOHNSON, T.J.; HAN, J.; RICKE, S.C. Populational dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4273-4279, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The FAO action plan on antimicrobial resistance 2016-2020**: supporting the food and agriculture sectors in implementing the global action plan on antimicrobial resistance to minimize the impact of antimicrobial resistance. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. 17p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Antimicrobial resistance: animal production**. [Rome, 2019]. Disponível em: <http://www.fao.org/antimicrobial-resistance/key-sectors/animal-production/en/>. Acesso em: 6 jan. 2019.

FOUNOU, L.L.; FOUNOU, R.C.; ESSACK S.Y. Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1881, 2016.

GAL-MOR, O.; BOYLE, E.C.; GRASSL, G.A. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. **Frontiers in Microbiology**. v. 5, p. 391, 2014.

GARCIA-GRAELLS, C.; DE KEERSMAECKER, S.C.J.; VANNESTE, K.; POCHET, B.; VERMEERSCH, K.; ROSENS, N.; DIERICK, K.; BOTTELDOORN, N. Detection of plasmid-mediated colistin resistance, *mcr-1* and *mcr-2* genes, in *Salmonella* spp. isolated from food at retail in Belgium from 2012 to 2015. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 2, p. 114-117, 2018.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F-X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed. Paris: Institut Pasteur, 2007. 166 p.

GUT, A.M.; VASILJEVIC, T.; YEAGER, T.; DONKOR, O.N. *Salmonella* infection – prevention and treatment by antibiotics and probiotics yeasts: a review. **Microbiology**, v. 164, n. 11, p. 1327-1344, 2018.

HENDRIKSEN, R.S.; VIEIRA, A.R.; KARLSMOSE, S.; LO FO WONG, D.M.A.; JENSEN, A.B.; WEGENER, H.C.; AARESTRUP, F.M. Global Monitoring of *Salmonella* Serovar Distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: Results of Quality Assured Laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 8, p. 887-900, 2011.

HEREDIA, N.; GARCÍA, S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 250-255, 2018.

HUDSON, J.A.; FREWER L.J.; JONES, G.; BRERETON, P.A.; WHITTINGHAM M.L.; STEWART, G. The agri-food chain and antimicrobial resistance: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 131-147, 2017.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J.H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 819-830, 2012.

ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for the detection of *Salmonella*. Geneva: International Organization for Standardization, 2002. 27 p.

ISO 20776-1. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1 - Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobials agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. Geneva: International Organization for Standardization, 2006. 19 p.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P.I.; WEILL, F-X. Supplement 2008-2010 (no.48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526-530, 2014.

IWAMOTO, M.; REYNOLDS, J.; KARP, B.E.; TATE, H.; FEDORKA-CRAY, P.J.; PLUMBLEE, J.R.; HOEKSTRA, R.M.; WHICHARD, J.M.; MAHON, B.E. Ceftriaxone-Resistant Nontyphoidal *Salmonella* from Humans, Retail Meats, and Food Animals in the United States, 1996-2013. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 2, p. 74-83, 2017.

KARP, B.E.; CAMPBELL, D.; CHEN, J.C.; FOLSTER, J.P.; FRIEDMAN, C.R. Plasmid-mediated quinolone resistance in human non-typhoidal *Salmonella* infections: An emerging public health problem in the United States. **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 7, p. 838-849, 2018.

LENTZ, S.A.; DE LIMA-MORALES, D.; CUPPERTINO, V.M.; NUNES, L. DE S.; DA MOTTA, A.S.; ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L.; MARTINS, A.F. Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. **Euro Surveillance**, v. 21, n. 26, pii=30267, 2016.

LI, A.; YANG, Y.; MIAO, M.; CHAVDA, K.D.; MEDIAVILLA, J.R.; XIE, X.; FENG, P.; TANG, Y.W.; KREISWIRTH, B.N.; CHEN, L.; DU, H. Complete sequences of *mcr-1*-harboring plasmids from extended-spectrum- β -lactamase and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 4351-4354, 2016.

LI, X-P.; FANG, L-X.; SONG, J-Q.; XIA, J.; HUO, W.; FANG, J-T.; LIAO, X-P.; LIU, Y-H.; FENG, Y.; SUN, J. Clonal spread of *mcr-1* in PMQR-carrying ST34 *Salmonella* isolates from animals in China. **Scientific Reports**, v. 6, p. 38511, 2016.

LIU, Y-Y.; WANG, Y.; WALSH, T.R.; YI, L-X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L-F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J-H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p.161-168, 2016.

LOPES, G.V.; PISSETTI, C.; PELLEGRINI, D.C.P.; DA SILVA, L.E.; CARDOSO, M. Resistance Phenotypes and Genotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Isolates from Feed, Pigs, and Carcasses in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 2, p. 407-413, 2015.

LUO, Q.; YU, W.; ZHOU, K.; GUO, L.; SHEN, P.; LU, H.; HUANG C.; XU, H.; XU, S.; XIAO, Y.; LI, L. Molecular epidemiology and colistin resistant mechanism of *mcr*-positive and *mcr*-negative clinical isolated *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2262, 2017.

MAINALI, C.; MCFALL, M.; KING, R.; IRWIN, R. Evaluation of antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* isolates from broiler chickens at slaughter in Alberta, Canada. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 3, p. 485-492, 2014.

MAKA, Ł.; POPOWSKA, M. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food. **Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny**, v. 67, n. 4, p. 343-358, 2016.

MATAMOROS, S.; VAN HATTEM, J.M.; ARCILLA, M.S.; WILLEMSE, N.; MELLES, D.C.; PENDERS, J.; VINH, T.N.; HOA, N.T.; COMBAT CONSORTIUM; DE JONG, M.D.; SCHULTSZ, C. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15364, 2017.

MCDERMOTT, P.F.; ZHAO, S.; TATE, H. Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 261-287, 2018.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários. **Substâncias proibidas**. Brasília, 02 out. 2017a. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-de-insumos-pecuarios/Substanciasproibidas.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2019.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Anuário dos programas de controle de alimentos de origem animal do DIPOA**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017b. v. 3, 27 p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Anuário dos programas de controle de alimentos de origem animal do DIPOA**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018. v. 4, 31 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília, DF, jun. 2018a. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única: 2018-2022 (PAN-BR)**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2018b. 23 p.

MONTE, D.F.; MEM, A.; FERNANDES, M.R.; CERDEIRA, L.; ESPOSITO, F.; GALVÃO, J.A.; FRANCO, B.D.G.M.; LINCOPAN, N.; LANDGRAF, M. Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *mcr-1* genes in

South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, pii:e02718-16, 2017.

MORENO, L.Z.; GOMES, V.T.M.; MOREIRA, J.; DE OLIVEIRA, C.H.; PERES, B.P.; SILVA, A.P.S.; THAKUR, S.; LA RAGIONE, R.M.; MORENO, A.M. First report of *mcr-1*-harboring *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolated from poultry meat in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 93, v.4, p. 376-379, 2019.

NAIR, D.V.T, VENKITANARAYANAN, K., JOHNY, A.K. Antibiotic-Resistant *Salmonella* in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control. **Foods**, v. 7, n. 10, pii: E167, 2018.

O'NEILL, J. (org.). **Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste: the review on antimicrobial resistance**. [London]: Review on Antimicrobial Resistance, 2015. 40 p.

PILLONETTO, M.; MAZZETTI, A.; BECKER, G.N.; SIEBRA, C.A.; AREND, L.N.V.S.; BARTH, A.L. Low level of polymyxin resistance among nonclonal *mcr-1*-positive *Escherichia coli* from human sources in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 93, n. 2, p. 140-142, 2019.

POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 557-596, 2017.

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. **Canadian integrated program for antimicrobial resistance surveillance (CIPARS): 2015 annual report**. Ottawa: Public Health Agency of Canada, 2017. 259p

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. **Canadian antimicrobial resistance surveillance system: 2017 report**. Ottawa: Public Health Agency of Canada, 2018. 119 p.

QUIROGA, C.; NASTRO, M.; DI CONZA, J. Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 51, n. 1, p. 93-100, 2019.

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

RAU, R.B.; DE LIMA-MORALES, D.; WINK, P.L.; RIBEIRO, A.R.; MARTINS, A.F.; BARTH, A.L. Emergence of *mcr-1* producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from retail meat: first detection in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 1, p. 58-59, 2018.

ROBERTSON, J.; YOSHIDA, C.; GURNIK, S.; MCGROGAN, M.; DAVIS, K.; ARYA, G.; MURPHY, S.A.; NICHANI, A.; NASH, J.H.E. An improved DNA array-based

classification method for the identification of *Salmonella* serotypes shows high concordance between traditional and genotypic testing. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0207550, 2018.

RYAN, M.P.; O'DWYER, J.; ADLEY, C.C. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 3782182, 2017.

SALIU, E-M.; VAHJEN, W.; ZENTEKM J. Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in poultry. **Animal Health Research Reviews**, v. 18, n. 1, p. 46-57, 2017.

SCHWARZ, S.; JOHNSON, A.P. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2066-2070, 2016.

SHI, C.; SINGH, P.; RANIERI, M.L.; WIEDMANN, M.; SWITT, A.I.M. Molecular methods for serovar determination of *Salmonella*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 309-325, 2015.

TORPDAHL, M.; HASMAN, H.; LITRUP, E.; SKOV, R.L.; NIELSEN, E.M.; HAMMERUM, A.M. Detection of *mcr-1*-encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Salmonella* isolates from human infection in Denmark. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, v. 2, p. 261-262, 2017.

TYSON, G.H.; TATE, H.P.; ZHAO, S.; LI, C.; DESSAI, U.; SIMMONS, M.; MCDERMOTT, P.F. Identification of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Salmonella* Isolated from Swine Ceca and Retail Pork Chops in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 10, pii: e01318-17, 2017.

UNIÃO EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2003, relativo aos aditivos destinados à alimentação animal. **Jornal Oficial da União Europeia**. [Bruxelas], 18 out. 2003, L. 268/29.

URIBE, C.; SUÁREZ, M.C. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. **Colombia Médica**, v. 37, n. 2, p. 151-158, 2006.

VELDMAN, K.; VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A.; RAPALLINI, M.; WIT, B.; HEYMANS, R.; VAN PELT, W.; MEVIUS, D. Location of colistin resistance gene *mcr-1* in *Enterobacteriaceae* from livestock and meat. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2340-2342, 2016.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C.S.L.; ALVES, L.; CELDEBELLA, A.; LEÃO, J.A.; RODRIGUES, D.P.; BACK, A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 433-441, 2015.

VOSS-RECH, D.; POTTER, L.; VAZ, C.S.L.; PEREIRA, D.I.B.; SANGIONI, L.A.; VARGAS, A.C.; BOTTON, S.A. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* isolated from human and poultry-related samples in Brazil: 20-year meta-analysis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 2, p. 116-124, 2017.

WAGENAAR, J.A.; HENDRIKSEN, R.S.; CARRIQUE-MAS, J. Practical considerations of surveillance of *Salmonella* serovars other than Enteritidis and Typhimurium. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 32, n. 2, p. 509-519, 2013.

WANG, J.; LI, X.; LI, J.; HURLEY, D.; BAI, X.; YU, Z.; CAO, Y.; WALL, E.; FANNING, S.; BAI, L. Complete genetic analysis of a *Salmonella enterica* serovar Indiana isolate accompanying four plasmids carrying *mcr-1*, ESBL and other resistance genes in China. **Veterinary Microbiology**, v. 210, p. 142-146, 2017.

WANG, Y.; CAO, C.; ALALI, W.Q.; CUI, S.; LI, F.; ZHU, J.; WANG, X.; MENG, J.; YANG, B. Distribution and Antimicrobial Susceptibility of Foodborne *Salmonella* Serovars in Eight Provinces in China from 2007 to 2012 (Except 2009). **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 7, p. 393-399, 2017.

WANG, X.; WANG, Y.; ZHOU, Y.; LI, J.; YIN, W.; WANG, S.; ZHANG, S.; SHEN, J.; SHEN, Z.; WANG, Y. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 122, 2018.

WISE, M.G.; ESTABROOK, M.A.; SAHM, D.F.; STONE, G.G.; KAZMIERCZAK, K.M. Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant *Enterobacteriaceae* collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195281, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe**. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe, 2011. 65 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global action plan on antimicrobial resistance**. Geneva: World Health Organization, 2015. 19 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. [Geneva]: World Health Organization, 2017a. 7p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Integrated surveillance of antimicrobial resistance in foodborne bacteria: application of a one health approach**. Geneva: World Health Organization, 2017b. 76p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Whole genome sequencing for foodborne disease surveillance: landscape paper**. Geneva: World Health Organization, 2018. 42 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; ADVISORY GROUP ON INTEGRATED SURVEILLANCE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE. **Critically important antimicrobials for human medicine: ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use**. 5th revision. Geneva: World Health Organization, 2017. 41 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH.

Antimicrobial resistance: a manual for developing national action plans, version 1. Geneva: World Health Organization, 2016. 25p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH.

Monitoring global progress on addressing antimicrobial resistance: analysis report of the second round of results of AMR country self-assessment survey 2018. Geneva: World Health Organization, 2018. 59 p.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **The OIE strategy on antimicrobial resistance and the prudent use of antimicrobials.** [Paris]: World Organisation for Animal Health, 2016. 12 p.

YANG, Y-Q.; ZHANG, A-Y.; MA, S-Z.; KONG, L-H.; LI, Y-X.; LIU, B-H.; LEI, C-W.; WANG, H-N. Co-occurrence of *mcr-1* and ESBL on a single plasmid in *Salmonella enterica*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2336-2338, 2016.

YANG, Y-Q.; LI, Y-X.; LEI, C-W.; ZHANG, A-Y.; WANG, H-N. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1791-1795, 2018.

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

ZIECH, R.E.; LAMPUGNANI, C.; PERIN, A.P.; SERENO, M.J.; SFACIOTTE, R.A.P.; VIANA, C.; SOARES, V.M.; PINTO, J.P.A.N.; BERSOT, L.S. Multidrug resistance and ESBL-producing *Salmonella* spp. isolated from broiler processing plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 191-195, 2016.

ANEXOS

Resultados relacionados à avaliação do perfil de suscetibilidade de isolados de *Salmonella* de carne de frango, não incluídos em artigo científico.

Tabela 7: Padrões de resistência de *Salmonella* de carne de frango no Brasil.

Padrão de resistência	Número de amostras (%)	
	2014 (n=146)	2017 (n=163)
Sem resistência	26 (17,8%)	10 (6,1%)
Resistência a 1 classe	19 (13,0%)	11 (6,7%)
Resistência a 2 classes	27 (18,5%)	16 (9,8%)
Resistência a 3 classes	12 (8,2%)	7 (4,3%)
Resistência a 4 classes	49 (33,6%)	112 (68,7%)
Resistência a 5 classes	11 (7,5%)	5 (3,1%)
Resistência a 6 classes	1 (0,7%)	2 (1,2%)
Resistência a 7 classes	1 (0,7%)	-
Multirresistência	74 (50,7%)	126 (77,3%)

Tabela 8: Perfis de resistência de *Salmonella* de carne de frango no Brasil em 2014 (n=146).

Perfil de resistência	Número de amostras (%)
Sem resistência	26 (17,8)
AMP- CAZ- CIP-CTX-NAL-TET	40 (27,4)
CIP-NAL	12 (8,2)
CIP-NAL-TET	12 (8,2)
AMP-CAZ-CTX	7 (4,8)
AMP-CAZ-CTX-TET	7 (4,8)
TET	4 (2,7)
AMP-CAZ-CTX-NAL-TET	4 (2,7)
AMP-CAZ-CIP-CTX-GEN-NAL-TET	4 (2,7)
AMP-CHL-SXT-TET	3 (2,1)
NAL	2 (1,4)
AMP-CAZ-CIP-CTX-NAL	2 (1,4)
AMP-CAZ-CHL-CTX-NAL-TET	2 (1,4)
AMP-CAZ-CIP-CTX-NAL-SXT-TET	2 (1,4)
AMP	1 (0,7)
AMP-CTX	1 (0,7)
AMP-SXT	1 (0,7)
CHL-CST	1 (0,7)
CHL-NAL	1 (0,7)
GEN-TET	1 (0,7)
NAL-TET	1 (0,7)
CAZ-CTX-NAL	1 (0,7)
CIP-NAL-SXT	1 (0,7)
AMP-CAZ-CHL-CTX	1 (0,7)
CIP-GEN-NAL-TET	1 (0,7)
CIP-NAL-SXT-TET	1 (0,7)
AMP-CAZ-CTX-NAL-TET	1 (0,7)
AMP-CAZ-CIP-CST-CTX-NAL	1 (0,7)
AMP-CHL-CIP-NAL-SXT-TET	1 (0,7)
AMP-CIP-CST-GEN-NAL-TET	1 (0,7)
AMP-CAZ-CIP-CST-CTX-NAL-TET	1 (0,7)
AMP-CAZ-CHL-CST-CTX-GEN-SXT	1 (0,7)
AMP-CIP-CTX-GEN-NAL-SXT-TET	1 (0,7)

Tabela 9: Perfis de resistência de *Salmonella* de carne de frango no Brasil em 2017 (n=163).

Perfil de resistência	Número de amostras (%)
NO RESISTANCE	10 (6,1)
AMP-CAZ-CIP-CTX-NAL-TET	110 (67,5)
CIP-NAL-TET	13 (8,0)
CIP-NAL	9 (5,5)
AMP-CAZ-CTX-GEN	3 (1,8)
AMP-CAZ-CIP-CTX-GEN-NAL-TET	3 (1,8)
CIP-NAL-SXT	2 (1,2)
AMP-CAZ-CTX-TET	2 (1,2)
AMP-CAZ-CIP-CTX-NAL-SXT-TET	2 (1,2)
GEN	1 (0,6)
NAL	1 (0,6)
CIP-GEN-NAL	1 (0,6)
CIP-NAL-SXT-TET	1 (0,6)
AMP-CAZ-CIP-CTX-NAL	1 (0,6)
AMP- CAZ-CTX-GEN-TET	1 (0,6)
AMP-CIP-NAL-SXT-TET	1 (0,6)
AMP-CAZ-CHL-CIP-CTX-NAL-SXT-TET	1 (0,6)
AMP-CAZ-CIP-CST-CTX-GEN-NAL-TET	1 (0,6)

Tabela 10: Distribuição percentual de valores de CIM de *Salmonella* de carne de frango no Brasil em 2014.

	0.01	0.02	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128	MIC ₅₀	MIC ₉₀
AMP					-	-	5.5	28.1	7.5	2.1	0.7	-	2.7	26	27.4		64	>64
AZI					-	-	9.6	62.3	24.0	3.4	0.7	-	-	-			1	2
CAZ		-	-	-	2.7	22.6	21.2	1.4	0.7	1.4	7.5	42.5					4	>8
CHL						-	-	-	19.9	63.0	10.3	3.4	-	0.7	2.7		4	8
CIP		34.9	4.1	4.1	24.7	22.6	9.6	-	-	-	-						0.125	0.25
CST			-	-	3.4	11.6	28.1	30.1	23.3	3.4	-	-					1	2
CTX	-	-	0.7	21.2	24.0	0.7	1.4	-	-	0.7	51.4						>4	>4
GEN				-	-	6.2	41.8	36.3	9.6	-	-	2.7	3.4				1	2
MEM			34.2	37.7	27.4	0.7	-	-	-	-	-	-					0.06	0.125
NAL						-	-	-	2.7	20.5	13.7	5.5	12.3	3.4	-	41.8	32	>128
SXT				28.1	34.2	21.9	7.5	0.7	-	-	-	0.7	1.4	5.5			0.125	0.5
TET					-	1.4	8.2	21.2	5.5	3.4	-	0.7	13.7	39.0	6.8		32	64
TGC		-	-	-	0.7	17.8	53.4	22.6	5.5	-	-						0.5	1

Os campos em verde representam a faixa de diluições testadas. Os valores de CIM iguais ou inferiores à concentração mais baixa testada são apresentados como a concentração mais baixa. Os valores de CIM superiores à concentração mais alta no intervalo são apresentados como uma diluição acima do intervalo.

Tabela 11: Distribuição percentual de valores de CIM de *Salmonella* de carne de frango no Brasil em 2017.

	0.01	0.02	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128	MIC ₅₀	MIC ₉₀
NAL						-	-	-	-	9.2	1.2	3.1	11.7	10.4	3.1	61.3	>128	>128
AMP					-	-	1.2	13.5	5.5	3.1	-	-	-	4.9	71.8		>64	>64
AZI					-	-	3.7	54.0	36.2	6.1	-	-	-	-			1	2
CTX	-	-	0.6	6.1	14.1	3.1	-	-	-	1.2	74.8						>4	>4
CAZ		-	-	-	-	6.1	17.2	0.6	-	-	2.5	73.6					>8	>8
CIP		10.4	-	0.6	30.7	37.4	19.6	1.2	-	-	-						0.25	0.5
CHL						-	-	-	6.1	76.7	16.6	-	0.6	-	-		4	8
GEN				-	-	0.6	33.1	55.2	4.9	-	-	0.6	5.5				1	2
MEM			57.7	41.7	-	0.6	-	-	-	-	-	-					<0.03	0.06
TET					-	0.6	1.2	11.0	2.5	1.8	-	0.6	6.1	65.0	11.0		64	>64
TGC		-	-	-	-	1.2	57.1	37.4	4.3	-	-						0.5	1
SXT				25.2	38.0	25.2	5.5	1.8	-	-	-	-	-	4.3			0.125	0.5
COL			-	-	1.2	2.5	29.4	42.3	23.9	0.6	-	-					1	2

Os campos em verde representam a faixa de diluições testadas. Os valores de CIM iguais ou inferiores à concentração mais baixa testada são apresentados como a concentração mais baixa. Os valores de CIM superiores à concentração mais alta no intervalo são apresentados como uma diluição acima do intervalo.