

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Caracterização de determinantes de resistência a antimicrobianos em
isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* provenientes da cadeia produtiva de
suínos no sul do Brasil**

GRACIELA VOLZ LOPES

PORTO ALEGRE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Caracterização de determinantes de resistência a antimicrobianos em
isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* provenientes da cadeia produtiva de
suínos no sul do Brasil**

Autora: Graciela Volz Lopes*

Tese apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências Veterinárias
Especialidade na área de
Bacteriologia

Orientadora: Profa. Dra. Marisa
Ribeiro de Itapema Cardoso

PORTO ALEGRE

2014

*Médica Veterinária MSc

CIP - Catalogação na Publicação

Lopes, Graciela Volz

Caracterização de determinantes de resistência a antimicrobianos em isolados de Salmonella enterica subsp. enterica provenientes da cadeia produtiva de suínos no sul do Brasil / Graciela Volz Lopes. -- 2014.

179 f.

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Salmonella. 2. Resistência a antimicrobianos.
I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema, orient. II.
Título.

Graciela Volz Lopes

Caracterização de determinantes de resistência a antimicrobianos em isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* provenientes da cadeia produtiva de suínos no sul do Brasil

Aprovada em 24 de Março de 2014.

APROVADA POR

Profa. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Orientadora e Presidente da Comissão

APROVADA POR

Profa. Dra. Gertrudes Corção

Membro da Comissão

APROVADA POR

Profa. Dra. Mercedes Passos Geimba

Membro da Comissão

APROVADA POR

Profa. Dra. Sílvia Dias de Oliveira

Membro da Comissão

Dedico este trabalho aos meus pais, Evoni e Selmar (in memoriam), e aos meus irmãos
Daniela e Samuel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades de aprendizado e por todo cuidado.

A **Profa. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso** pela excelente orientação, pelo interesse em compartilhar seus conhecimentos e pela amizade ao longo desta jornada.

Ao **Dr. Stefan Schwarz** pela orientação e agradável convívio durante o período em que estive no Friedrich-Loeffler Institut, na Alemanha.

A **Dra. Geovana Brenner Michael** pela orientação e apoio em todos os níveis durante o período em que estive na Alemanha. Agradeço imensamente pela leitura cuidadosa dos artigos e pelas valiosas sugestões.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de estudos no Brasil.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela bolsa de estudos no exterior.

Aos colegas **Luis Eduardo Silva, Débora Pellegrini e Caroline Pissetti** pelo isolamento das cepas que fizeram parte desta tese.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS **Andréia Ferronato, Carine Wingert, Carla Escopelli, Caroline Pissetti, Cristiane Moraes, Débora Pellegrini, Daniel Paim, Eduardo Costa, Elusa Assunção, Everton Juffo, Gabriela Werlang, Gustavo Machado, Héber Hein, Jane Both, Juliana Velasco, Lilian Girardini, Lisiane Moreira, Marjo Bessa, Mônica Maciel, Priscila Guerra, Renata Rodrigues, Tatiana Vieira, Thaís Campos, Vanessa Laviniki, Verônica Machado, Waldemir Santiago** e a técnica **Vanessa Dias** por compartilharem suas experiências e pelos agradáveis momentos de convivência.

Aos membros do grupo de pesquisa do Dr. Schwarz: **Roswitha Becker, Regina Ronge, Vivian Hensel, Ute Beermann e Kerstin Meyer** pela excelente assistência técnica. Bem como os demais **Kristina Kadlec, Andrea Feßler, Sonya Weiß, Sarah Wendlandt, Moni Fuß e Anne Riesenber** pelo convívio e oportunidade de contato com a cultura alemã.

A minha família pelo imenso companheirismo, palavras de motivação e compreensão nos momentos de ausência.

Finalmente, a todos que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

Caracterização de determinantes de resistência a antimicrobianos em isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* provenientes da cadeia produtiva de suínos no sul do Brasil

Autora: Graciela Volz Lopes¹

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

RESUMO

Salmonella enterica subsp. *enterica* (*S.*) é considerada uma das causas mais comuns de doenças transmitidas por alimentos e a carne suína é responsável por um número significativo de casos de salmonelose humana. Além do risco apresentado por *Salmonella* como patógeno transmitido por alimentos, existe a preocupação mundial com a emergência de cepas resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos. Esta tese compreende três estudos que visam determinar as bases fenotípicas e genotípicas da resistência aos agentes antimicrobianos entre isolados de *Salmonella* obtidos em diferentes etapas da cadeia produtiva de suínos. Um total de 225 isolados obtidos de fábricas de ração, ambiente, carcaças e conteúdo intestinal de suínos foram submetidos ao teste de suscetibilidade frente a doze agentes antimicrobianos através da técnica de disco difusão. A concentração inibitória mínima (MIC) para a ciprofloxacina foi avaliada através da técnica de diluição em ágar e genes de resistência a antimicrobianos foram investigados através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) [Capítulo 2]. Resistência a, pelo menos, um agente antimicrobiano foi observada em 76 % dos isolados testados e multi-resistência foi encontrada em 40,4 % dos isolados. A resistência ocorreu mais frequentemente à tetraciclina (54,5 %), sulfonamidas (39,6 %) e estreptomicina (33,7 %). A reduzida suscetibilidade à ciprofloxacina foi observada em 94,1 % dos isolados resistentes ao ácido nalidíxico. Foi possível observar que isolados de ambiente, conteúdo intestinal e carcaças apresentaram perfis genotípicos comuns. Vinte e sete isolados multi-resistentes de *S. Derby* foram investigados quanto a sua relação genética através da técnica de macro-restrição do DNA total, genes de resistência e presença de integrons de classe 1 e 2 através da PCR [Capítulo 3]. Mesmo sendo provenientes de diferentes abatedouros, os isolados foram indistinguíveis em seus perfis fenotípicos e genotípicos de resistência e perfil de macro-restrição. Eles carregavam cassetes gênicos associados a integrons de classe 1 com uma nova variante do gene *aadA*, denominada *aadA26*, conferindo resistência à estreptomicina e espectinomicina. Os integrons de classe 1 foram identificados supostamente no cromossomo de *S. Derby*, uma vez que a hibridização não revelou sinal quando DNA plasmidial foi utilizado como alvo. A análise das sequências que flanqueiam o cassete gênico e a amplificação do gene *merA* sugerem a localização em elementos transponíveis da família Tn21. Quarenta e cinco isolados multi-resistentes de *S. Typhimurium* foram analisados quanto a sua relação genética através da técnica de macro-restrição do DNA total. Genes de resistência, integrons e genes plasmidiais mediando resistência adquirida às quinolonas (PMQR) foram investigados por PCR. Os amplicons da região variável dos integrons e da região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) foram sequenciados. Os plasmídeos foram caracterizados por lise alcalina, conjugação e identificação dos grupos de incompatibilidade [Capítulo 4]. Isolados multi-resistentes de *S. Typhimurium* apresentaram variabilidade em sua estrutura genômica e perfis fenotípicos e genotípicos de resistência. Apenas substituições únicas foram observadas em QRDR do gene *gyrA* e PMQR não foram encontrados. Integron de classe 1 abrigando o cassete gênico *aadA* ou um integron de

classe 1 atípico com o cassete gênico *dfrA12-orfF-aadA27* foram caracterizados. Ambos foram localizados em grandes plasmídeos conjugativos. Os genes de virulência plasmidiais de *Salmonella* *spvR*, *spvA*, *spvB*, *rck* e *pefA* foram identificados em um plasmídeo de resistência IncFIB. Os estudos realizados permitem concluir que cepas originárias de animais e carcaças apresentaram maior frequência de resistência quando comparadas com cepas de fábrica de ração, demonstrando que cepas resistentes selecionadas na granja podem chegar ao produto final e suínos podem servir como reservatórios de cepas multi-resistentes de *Salmonella* para humanos. Nesse sentido, a localização de genes de resistência em elementos genéticos móveis contribui para a manutenção e disseminação da resistência em isolados de *Salmonella* provenientes da cadeia produtiva de suínos.

¹ Tese de Doutorado, Doutorado em Ciências Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. (179p) Março, 2014.

Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from pig production chain in Southern Brazil

Author: Graciela Volz Lopes¹

Supervisor: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

ABSTRACT

Salmonella enterica subsp. *enterica* (*S.*) is considered one of the most common causes of food-borne diseases and pork has been associated with a significant number of human cases of salmonellosis. Additionally to the risk presented by *Salmonella* as a food-borne pathogen, there is a global concern about the emergence of antimicrobial multi-resistant isolates. This thesis comprises three studies that aimed to determine the phenotypic and genotypic basis of antimicrobial resistance among *Salmonella* isolates from different steps of the swine production system. A total of 225 *Salmonella* isolates from feed mills, lairage environment, carcasses and intestinal content of the pigs were tested for antimicrobial susceptibility against twelve different antimicrobial agents by agar disc diffusion. The minimum inhibitory concentration (MIC) for ciprofloxacin was screened by agar dilution and antimicrobial resistance genes were investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR) assays [Chapter 2]. Among tested isolates, 76 % showed resistance to at least one antimicrobial agent and 40.4 % were multi-resistant. Resistance occurred most frequently to tetracycline (54.5 %), sulphonamides (39.6 %) and streptomycin (33.7 %). Thirty-two (94.1 %) nalidixic acid-resistant isolates exhibited decreased susceptibility to ciprofloxacin. It was observed that strains from lairage, carcasses and intestinal contents displayed common resistance gene profiles. Twenty-seven multi-resistant *S. Derby* were investigated for their molecular relationships by macrorestriction analysis, genotypic resistance and presence of the class 1 and 2 integrons by PCR assays [Chapter 3]. The isolates from different slaughterhouses displayed the same phenotypic and genotypic resistance, as well as indistinguishable macrorestriction pattern. They carried class 1 integron-associated gene cassette with a new *aadA* variant, designated *aadA26*, encoding for streptomycin and spectinomycin resistance. Since the hybridization experiments did not yield signals when using plasmid DNA as targets, the class 1 integrons are supposed to be located in the chromosomal DNA of *S. Derby*. The sequence of the flanking regions of this gene cassette and the amplification of the *merA* gene may indicate the location of the class 1 integron into a Tn21-related transposon. Forty-five multi-resistant *S. Typhimurium* isolates were analysed for their molecular relationships by macrorestriction analysis. Resistance genes, integrons and plasmid-mediated quinolone resistance genes (PMQR) were identified by PCR. Amplicons for the variable part of class 1 integrons and from the quinolone resistance-determining regions (QRDR) were sequenced. Plasmids were characterized by alkaline lysis, conjugation and replicon typing [Chapter 4]. Multi-resistant *S. Typhimurium* isolates showed high variability in their genomic structure and resistance properties. Only single substitutions were found in the QRDR of *gyrA* and no PMQR were found. Class 1 integron with *aadA23* gene cassette or an unusual integron carrying *dfrA12-orfF-aadA27* gene cassette were characterized. Both located on large and conjugative plasmids. *Salmonella* plasmid-located virulence genes *spvR*, *spvA*, *spvB*, *rck* and *pefA* were found on a multi-resistance IncFIB plasmid. The studies conducted demonstrate that strains from pigs and carcasses displayed higher resistance frequency to most antimicrobial tested compared with isolates from feed mills, demonstrating that resistance genes selected on farm can be found in pork and pigs may

serve as reservoirs of multi-resistant *Salmonella* strains. In this sense, the location of resistance genes on mobile genetic elements contributes to the maintenance and spread of antimicrobial resistance among *Salmonella* isolates from swine production systems.

¹ Doctoral Thesis, Doctor of Veterinary Science, Department of Preventive Veterinary Medicine, Graduate Program in Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. (p. 179) March, 2014.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Etapas do abate de suínos com os pontos críticos para a contaminação de <i>Salmonella</i> mostrados em vermelho.	26
FIGURA 2 – Estrutura química da a) penicilina e da b) cefalosporina.	30
FIGURA 3 – Estrutura química da tetraciclina.	37
FIGURA 4 – Estrutura química da estreptomicina.	39
FIGURA 5 – a) Estrutura química da sulfonamida e b) trimetoprima.	43
FIGURA 6 – Estrutura química do ácido nalidíxico.	45
FIGURA 7 – Transferência horizontal de genes de resistência por conjugação, transformação e transdução (Copyright © Science Photo Library).	48
FIGURA 8 – Representação esquemática de um integron classe 1 e um modelo para a aquisição de cassetes gênicos.	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Principais características das ESBLs e das β -lactamases AmpC.	32
TABELA 2 – β -lactamases de espectro estendido TEM e SHV em sorovares de <i>Salmonella</i>	33
TABELA 3 – β -lactamases de espectro estendido CTX-M em sorovares de <i>Salmonella</i> de origem animal.	34
TABELA 4 – β -lactamases de espectro estendido CTX-M em sorovares de <i>Salmonella</i> de humanos.	35
TABELA 5 – β -lactamases do tipo AmpC em sorovares de <i>Salmonella</i> de diversas origens.	36

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Características do Gênero <i>Salmonella</i>	18
3.2 <i>Salmonella</i> em Humanos: Potencial Patogênico e Epidemiologia	20
3.3 Contaminação por <i>Salmonella</i> na Cadeia Produtiva de Suínos	23
3.4 Resistência de <i>Salmonella</i> aos Agentes Antimicrobianos.....	27
3.4.1 Resistência aos β -lactâmicos	29
3.4.2 Resistência às Tetraciclinas	37
3.4.3 Resistência aos Aminoglicosídeos.....	39
3.4.4 Resistência aos Fenicóis	41
3.4.5 Resistência à Sulfonamidas e Trimetoprima	43
3.4.6 Resistência às Quinolonas e Fluoroquinolonas	44
3.5 Transferência Horizontal de Genes de Resistência.....	47
3.5.1 Plasmídeos	48
3.5.2 Transposons	50
3.5.3 Ilhas Genômicas.....	51
3.5.4 Integrons	52
3.6 Teste de Suscetibilidade.....	54
3.6.1 Testes Fenotípicos de Suscetibilidade	54
3.6.2 Testes Genotípicos de Suscetibilidade.....	56
CAPÍTULO 2.....	58
Antimicrobial resistance patterns in <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> isolated from feed, pigs and carcasses in Brazil	58
CAPÍTULO 3.....	90
Identification and characterization of <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Derby isolates carrying a new <i>aadA26</i> gene cassette in a class 1 integron obtained at pig slaughterhouses.....	90
CAPÍTULO 4.....	115

Antimicrobial resistance and class 1 integron-associated gene cassettes in	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium isolated from pigs at	
slaughter in Southern Brazil	115
CONCLUSÕES	149
REFERÊNCIAS.....	151

CAPÍTULO 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores mundiais de carne suína. Em 2013, a China ocupou o primeiro lugar no ranking de produção mundial de carne suína, seguida pelos países da União Europeia (UE) e Estados Unidos (EUA). O Brasil ocupou o quarto lugar nesse ranking, produzindo 3,37 milhões de toneladas. O setor industrial da carne suína está concentrado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e os três estados que mais produzem são Santa Catarina (25,1 %), Rio Grande do Sul (19,3 %) e Paraná (17 %). Devido ao potencial de mercado e os investimentos em modernização da produção, o Brasil permanece como o quarto maior exportador, com 581 mil toneladas exportadas (ABIPECS, 2012). A conquista do mercado externo exige a produção de alimentos seguros. A ausência de micro-organismos patogênicos, principalmente aqueles causadores de zoonoses, nos produtos de origem animal é uma exigência de regulamentos nacionais e internacionais. Entre esses micro-organismos, *Salmonella* tem sido a grande preocupação na cadeia produtiva de suínos.

As bactérias do gênero *Salmonella* estão entre as causas mais comuns de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em humanos. O sistema de vigilância dos Estados Unidos relatou um total de 19.531 infecções causadas por alimentos e *Salmonella* foi o agente mais frequentemente encontrado, sendo responsável por 7.800 casos de doença (CDC, 2011). Os produtos de origem animal, principalmente carne de frango e ovos, são comumente envolvidos em surtos. A carne suína é considerada também uma importante fonte de salmonelose humana. No Brasil, 4,9 % dos surtos de DTA registrados apresentam produtos de origem suína como alimento envolvido (BRASIL, 2011). A presença de *Salmonella* em carcaças e produtos de origem suína representa um risco para a saúde pública, além de gerar barreiras para a exportação.

A produção intensiva de suínos faz uso dos agentes antimicrobianos para fins terapêuticos, profiláticos, metafiláticos e como promotores de crescimento. Desde a década de 50, os antimicrobianos promotores de crescimento tornaram-se parte integrante dos sistemas de produção animal, com grande quantidade sendo utilizada como aditivos de ração (AARESTRUP, 2000). Entretanto, devido à rápida emergência de bactérias zoonóticas resistentes aos agentes antimicrobianos de importância terapêutica, medidas têm sido tomadas para promover o uso prudente de antimicrobianos em animais de produção. Pesquisadores europeus comprovaram a associação entre o uso de avoparcina, como promotor de crescimento, e o aparecimento

de resistência à vancomicina em isolados de *Enterococcus* resistentes a glicopeptídeos (GRE) (KRUSE et al., 1999). Como consequência, o uso daquele promotor de crescimento foi abolido, no final da década de 90, em toda a União Europeia. Mais ainda, atendendo ao chamado “princípio da precaução”, a União Europeia banuiu, em 2006, o uso de todos os promotores de crescimento. Essa medida levou a uma drástica redução no uso de antimicrobianos naqueles países.

Quanto ao uso de antimicrobianos em animais de produção no Brasil, foram proibidos o cloranfenicol e os nitrofuranos (BRASIL, 2003), olaquinox (BRASIL, 2004) e carbadox (BRASIL, 2005). Recentemente, foi proibido o uso de eritromicina e espiramicina como aditivos de ração para suínos e aves, permanecendo liberado o uso terapêutico (BRASIL, 2012). A Instrução Normativa 26/2009 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina que as penicilinas, tetraciclínas e sulfonamidas sistêmicas sejam evitadas como aditivos alimentares e/ou promotores de crescimento, restringindo seu uso à terapêutica. Em relação a outros princípios ativos, não existe proibição de uso, apenas o monitoramento de resíduos em tecidos (BRASIL, 2010), o que remete a uma estratégia de observação de carência de uso da droga, levando ao desaparecimento de resíduos, mas não impedindo a seleção de estirpes bacterianas resistentes.

As questões relacionadas ao uso de agentes antimicrobianos em animais de produção estão sendo levantadas e debatidas há muitos anos. Diversas organizações internacionais, governamentais e profissionais têm discutido o assunto. A *Food and Drug Administration* (FDA) publicou um guia abordando o uso prudente de antimicrobianos de importância médica em animais. No documento encontram-se os resultados e recomendações de algumas das importantes publicações que abordaram a questão nos últimos 40 anos. A FDA ressalta que é importante considerar a forma como os agentes antimicrobianos estão sendo usados e afirma que a comunidade científica em geral concorda que o uso de antimicrobianos em animais de produção é a chave para a emergência de bactérias resistentes (FDA, 2012).

Os animais de produção podem atuar como reservatórios de micro-organismos resistentes, os quais podem ser transmitidos para humanos através do consumo de alimentos de origem animal. A correlação entre a prevalência de resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* obtida de casos de infecção sanguínea em humanos e *E. coli* proveniente de aves, suínos e bovinos foi analisada em 11 países, durante o período de 2005 a 2008. A resistência observada entre os isolados

provenientes de animais de produção, especialmente de aves e suínos, foi altamente correlacionada com os isolados resistentes de humanos (VIEIRA et al., 2011).

O uso massivo de agentes antimicrobianos gera uma pressão seletiva para o surgimento de bactérias resistentes. As bactérias podem ser naturalmente resistentes a um determinado agente antimicrobiano ou classe específica pela sua constituição estrutural ou ainda adquirir a resistência. A resistência adquirida é propriedade específica de uma cepa e pode ocorrer através da aquisição de genes de resistência ou alterações mutacionais em genes cromossômicos (KADLEC et al., 2012). Os genes de resistência em *Salmonella* estão frequentemente localizados em elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons, cassetes gênicos inseridos em integrons e ilhas genômicas. Consequentemente, os genes de resistência podem ser facilmente transferidos entre isolados de *Salmonella* e outras bactérias, bem como entre membros do mesmo ou diferente sorovar de *Salmonella* (SCHWARZ et al., 2006). Adicionalmente, os genes de resistência podem estar co-localizados e/ou fisicamente ligados a outros genes de resistência dentro de um elemento móvel, o que promove a disseminação e persistência de isolados multi-resistentes em um ambiente com alta pressão de seleção.

A apresentação desta tese de Doutorado foi dividida em 4 capítulos. O **capítulo 1** corresponde a revisão de literatura sobre o gênero *Salmonella*, seu potencial patogênico para humanos, sua importância na cadeia produtiva de suínos e a resistência a agentes antimicrobianos, elucidando os principais mecanismos de resistência envolvidos. Os capítulos 2, 3 e 4 foram redigidos na forma de artigos científicos, relatando os principais resultados obtidos com o presente estudo. O **capítulo 2** aborda as frequências de resistência aos agentes antimicrobianos comumente usados em suinocultura em uma coleção de isolados de *Salmonella* proveniente de ração, ambiente, carcaças e conteúdo intestinal de suínos. Os isolados que apresentaram perfis de multi-resistência foram investigados para a presença dos principais genes de resistência encontrados em *Salmonella*. No **capítulo 3**, isolados multi-resistentes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar (*S.*) Derby foram investigados quanto a sua relação genética e a presença de integrons de classes 1 e 2. No **capítulo 4**, isolados multi-resistentes de *S. Typhimurium* foram analisados quanto a sua relação genética, presença de integrons de classes 1 e 2 e caracterização de plasmídeos abrigando genes de resistência e/ou virulência.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi determinar as bases fenotípicas e genotípicas da resistência a agentes antimicrobianos entre isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* obtidos em diferentes etapas da cadeia produtiva de suínos no Sul do Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar fenotipicamente a frequência de resistência a agentes antimicrobianos em isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* obtidos em diferentes etapas da cadeia produtiva de suínos.
- b) Avaliar a presença dos principais genes de resistência associados aos fenótipos de resistência encontrados nos isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.
- c) Avaliar a presença de isolados multi-resistentes e classificá-los de acordo com o perfil apresentado na macro-restrição do DNA total (PFGE).
- d) Verificar a presença de integrons de classes 1 e 2 nos isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.
- e) Determinar se os integrons identificados nesses isolados estão localizados em plasmídeos ou no cromossomo bacteriano.
- f) Avaliar a capacidade de transferência de plasmídeos que abrigam integrons através da conjugação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Características do Gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, compreende bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, oxidase negativos e não produtores de esporos. A maioria é móvel por meio de flagelos peritríquios, com exceção dos sorovares Gallinarum e Pullorum (GRIFFITH et al., 2006). São quimiorganotróficos, com metabolismo respiratório e fermentativo. A partir da fermentação da D-glicose e outros carboidratos são capazes de produzir ácido e, frequentemente, gás. Utilizam o citrato como única fonte de carbono, não hidrolisam ureia, são indol negativos e podem descarboxilar ornitina e lisina (LE MINOR, 1984).

A nomenclatura do gênero *Salmonella* foi sendo modificada ao longo do tempo. Em meados de 2000, uma revisão sobre a nomenclatura de *Salmonella* foi publicada e adotada pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). De acordo com o CDC, o gênero *Salmonella* possui duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (BRENNER et al., 2000). Shelobolina e colaboradores (2004) propuseram o nome *Salmonella subterranea* para uma cepa isolada de sedimento de uma região aquífera dos Estados Unidos. A análise da sequência da porção 16S do DNA ribossomal revelou que a cepa apresentava 96,4 % de similaridade com *Salmonella bongori* e 96,3 % com *Enterobacter cloacae*. O nome *Salmonella subterranea* foi validado e publicado em 18 de março de 2005 (EUZÉBY, 2005). No entanto, a Organização Mundial da Saúde em colaboração com o Centro de Referência e Pesquisa em *Salmonella* do Instituto Pasteur, na França, relataram subsequentemente que *S. subterranea* não pertence ao gênero *Salmonella* (GRIMONT & WEILL, 2007; GUIBOURDENCHE et al., 2010). *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies (subsp.), identificadas por nomes e algarismos romanos: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Enquanto que *Salmonella bongori* apresenta uma subespécie *bongori* (V) (GRIMONT & WEILL, 2007).

Além da classificação em espécie e subespécie, adotada para a maioria dos micro-organismos, o esquema de Kauffman-White classifica os membros do gênero *Salmonella* em sorotipos ou sorovares. O esquema de Kauffman-White é baseado na diferenciação de antígenos somáticos (O), flagelares de fase 1 e fase 2 (H1 e H2) e capsulares (VI). No esquema Kauffman-White, os antígenos O são representados por

algarismos arábicos, os antígenos H1 por letras minúsculas e os antígenos H2 também por algarismos arábicos, dando origem a uma fórmula antigênica. Para a maioria dos isolados da espécie *enterica* subsp. *enterica*, a fórmula antigênica é expressa por um nome que foi atribuído ao sorovar. Por exemplo, o sorovar Typhimurium corresponde à fórmula antigênica 1, 4, [5], 12: i: 1, 2. Nas fórmulas antigênicas, o fator O sublinhado é determinado por fagoconversão (e.g. 6,14,18). Ou seja, os antígenos estão presentes apenas se a cultura é lisogenizada pelo fago conversor correspondente. Além disso, letras ou números entre parênteses representam antígenos que podem estar presentes ou ausentes, sem relação com fagoconversão (LE MINOR, 1984). Por razões práticas, é internacionalmente aceito que haja a omissão do nome da espécie e subespécie do gênero *Salmonella*, permanecendo apenas a denominação do sorovar. Por exemplo, em vez de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium, pode-se escrever apenas *Salmonella* (*S.*) Typhimurium. Ao todo, mais de 2.600 sorovares de *Salmonella* foram identificados com a caracterização de 70 novos sorovares reconhecidos entre os anos de 2003 e 2007, dos quais 44 foram classificados como pertencendo a *S. enterica* subsp. *enterica* (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Salmonella é capaz de infectar uma ampla variedade de hospedeiros: insetos, répteis, pássaros, mamíferos, incluindo os seres humanos. Além disso, pode estar presente e sobreviver em diversos ambientes (BOPP et al., 1999). De acordo com a adaptação a diferentes hospedeiros e a virulência, os sorovares de *Salmonella* podem ser classificados em quatro grupos (BARROW et al., 2010): (i) sorovares patogênicos para humanos causando febre tifoide, como *S. Typhi* e *S. Paratyphi*; (ii) sorovares patogênicos adaptados ao hospedeiro, como é o caso de *S. Gallinarum* para aves, *S. Choleraesuis* para suínos, *S. Abortusovis* para ovinos e *S. Dublin* para bovinos; (iii) sorovares não adaptados a um hospedeiro específico porém altamente virulentos, que podem causar doença clínica em humanos e animais, como por exemplo *S. Typhimurium* ou *S. Enteritidis*; (iv) sorovares não adaptados a um hospedeiro específico e com moderada a baixa virulência que podem, eventualmente, causar infecção em humanos e animais, como por exemplo *S. Derby* e *S. Agona*.

3.2 *Salmonella* em Humanos: Potencial Patogênico e Epidemiologia

Sorovares de *Salmonella* não adaptados a um hospedeiro específico são os mais envolvidos em Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em humanos. Os mais comumente isolados pertencem aos sorovares *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. Os alimentos de origem animal, como carne de aves, carne bovina e ovos, são considerados os principais veiculadores desses sorovares de *Salmonella*. No entanto, a carne suína pode estar envolvida em surtos (GOSSNER et al., 2012; KUHN et al., 2012; CDC, 2014). No Brasil, 4,9 % dos surtos de DTA registrados apresentam produtos de origem suína como alimento envolvido (BRASIL, 2011).

As infecções por *Salmonella* em hospedeiros iniciam, geralmente, pela ingestão de água ou alimento contaminado; seguida pela passagem da bactéria do estômago para o intestino delgado. A colonização da porção distal do intestino delgado é a etapa inicial na patogenia de *Salmonella*. Após a colonização, a bactéria invade as células do tecido epitelial. A passagem da bactéria através da parede intestinal ocorre por transcitose, fenômeno caracterizado pela invasão de enterócitos ou células M na porção apical, migração para a porção basolateral e exocitose para o interior do espaço intersticial da lâmina própria (MÜLLER et al., 2012). Ao alcançar a lâmina própria, *Salmonella* é fagocitada por diferentes células (macrófagos, células dendríticas e polimorfonucleares), dissemina-se rapidamente através dos linfonodos eferentes e mesentéricos, atingindo baço e fígado pela via hematogena (SALCEDO et al., 2001).

Para a invasão de células epiteliais, *Salmonella* produz moléculas sinalizadoras, chamadas efetoras, que desencadeiam alterações no citoesqueleto da célula hospedeira, induzindo a formação de projeções que englobam a bactéria e a internalizam em fagossomos. Esse mecanismo é conhecido como “Trigger”. Em contraste, no mecanismo conhecido como “Zipper”, a bactéria invasora se liga a membrana celular do hospedeiro e ocorrem mínimas alterações no citoesqueleto por contato específico de proteínas bacterianas (invasinas) com receptores na superfície da célula hospedeira (VELGE et al., 2012). Estudos apontam que *Salmonella* é capaz de invadir células eucarióticas através de ambos os mecanismos (ROSSELIN et al., 2010).

A maioria dos genes de virulência de *Salmonella* está agrupada em regiões no cromossomo bacteriano, denominadas Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (*Salmonella* Pathogenicity Islands-SPI). A SPI-1 é uma ilha de 40 kb encontrada em *S. bongori* e *S. enterica* e contém o *cluster inv/spa*. Compreende, entre outros, todos os

genes necessários para a biossíntese do sistema de secreção tipo III (T3SS), proteínas efetoras e suas chaperonas e algumas proteínas regulatórias (VEGEL et al., 2012). O sistema de secreção tipo III é capaz de injetar proteínas efetoras no citoplasma da célula hospedeira. Pelo menos 15 proteínas efetoras podem ser transferidas para a célula hospedeira pelo T3SS-1 para que ocorra a invasão, entre elas destacam-se SopE, SopE2, SopB, SipA e SipC (AGBOR & McCORMICK, 2011). A SPI-2 inclui genes que codificam para T3SS-1, porém está mais relacionada com a multiplicação intracelular de *Salmonella* em células epiteliais e a sobrevivência nos macrófagos (FIGUEIRA & HOLDEN, 2012).

Proteínas de membrana externa, denominadas Rck e PagN, também são descritas como moléculas capazes de induzir a invasão celular de *Salmonella* (ROSSELIN et al., 2010). A Rck é uma proteína de 19 kDa codificada pelo gene *rck*, o qual está localizado em grandes plasmídeos de virulência. O gene *rck* contribui para a expressão de genes de virulência como o *spvRABCD* (*Salmonella plasmid virulence*) e *pef* (*plasmid-encoded fimbriae*). A proteína Rck é capaz de promover a adesão e internalização da bactéria através do mecanismo “Zipper” (WIEDEMANN et al., 2012). Adicionalmente, a proteína PagN, altamente conservada no gênero *Salmonella*, e que apresenta similaridade com as adesinas/invasinas Hek e Tia encontradas em *E. coli*, pode facilitar a interação entre *Salmonella* e a célula eucariótica em condições específicas, onde não existe a expressão de SPI1 (LAMBERT & SMITH, 2008).

No artigo de Santos e colaboradores (2009), as etapas envolvidas no processo inflamatório após a infecção por *Salmonella* e a adaptação da bactéria ao intestino inflamado foram abordadas. A célula hospedeira infectada com *S. Typhimurium* é uma importante fonte de citocinas, como IL-18 e IL-23, as quais ajudam a amplificar as respostas do tecido através de sinalização parácrina. A presença da IL-18 pode estimular as células T a rapidamente secretar interferon (IFN)- γ durante a infecção bacteriana. Da mesma forma, IL-23 estimula a secreção de IL-17 e IL-22. O recrutamento de neutrófilos, que é estimulado pela liberação de IL-17, ajuda a prevenir a disseminação de bactérias extracelulares presentes no lúmen intestinal. Dessa forma, as bactérias da microbiota intestinal sofrem uma drástica redução, enquanto *S. Typhimurium*, localizada dentro dos fagossomos nos macrófagos, não é fagocitada por neutrófilos.

A estratégia utilizada por *S. Typhimurium* para sobreviver no intestino inflamado é a capacidade de se ajustar à disponibilidade limitada de nutrientes e a utilização de carboidratos do muco como fonte de energia. Além disso, *S. Typhimurium*

possui genes de virulência que conferem resistência aos mecanismos de defesa antimicrobiana. O *cluster* de genes denominado *ironBCDEN* é responsável por promover a resistência à lipocalina-2, uma substância antimicrobiana secretada no lúmen do intestino durante a inflamação (RAFFATELLU et al., 2009).

O termo salmonelose está associado a diferentes síndromes clínicas de severidade variável, incluindo gastroenterites, bacteremias e infecções endovasculares e focais. O tempo de incubação é geralmente de 6 a 12 horas. Os sintomas iniciais da gastroenterite são náuseas, vômitos e diarreia sanguinolenta. Outros sintomas podem incluir febre, calafrios, dor abdominal, mialgias e dores de cabeça (SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2011). Geralmente as infecções são auto-limitantes, havendo a cura em 5 a 7 dias, e o tratamento envolve a reposição oral ou intravenosa de fluidos. A terapia com agentes antimicrobianos faz-se necessária em casos de infecções invasivas ou em pacientes com risco de desenvolver a doença severa ou complicações, como crianças, idosos acima de 65 anos de idade e pessoas imunocomprometidas (<http://www.cdc.gov/salmonella/general/diagnosis.html>).

O sistema de vigilância em DTA dos Estados Unidos, o FoodNet (*Foodborne Diseases Active Surveillance Network*), relatou um total de 19.531 infecções, com 4.563 hospitalizações e 68 mortes associadas com DTA em 2012. Quanto à etiologia, *Salmonella* foi o agente com maior taxa de incidência, 16,2 casos para cada 100 mil habitantes, totalizando 7.800 casos de doença em 2012. Entre os sorovares de *Salmonella* isolados, os três mais comumente encontrados foram *S. Enteritidis* (1.238; 18 %), seguido de *S. Typhimurium* (914; 13 %) e *S. Newport* (901; 13 %) (CDC, 2013a).

De acordo com o último relatório publicado pelo Sistema de Vigilância em Doenças Entéricas do CDC (*Laboratory-based Enteric Disease Surveillance–LEDs*), sete sorovares persistiram entre os dez mais isolados nos anos de 2001, 2006 e 2011. São eles: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* (incluindo *S. Typhimurium* variante Copenhagen, atualmente denominada *S. Typhimurium* variant O5-), *S. Newport*, *S. Javiana*, *S. Montevideo*, *S. Heidelberg* e *S. Muenchen* (CDC, 2013b). Alguns desses sorovares estiveram entre os mais isolados de fontes não clínicas e não humanas e também apareceram entre os 20 sorovares mais isolados de fontes humanas, entre eles: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Anatum* e *S. Infantis*. Este fato pode indicar a transmissão desses sorovares de *Salmonella* de animais para humanos, através do consumo de alimentos de origem animal.

Em 2011, um total de 95.548 casos confirmados de salmonelose humana foi relatado na União Europeia (UE). Isso representou um decréscimo de 5,4 % comparado com o ano de 2010. A taxa de notificação e casos confirmados na UE foi de 20,7 casos em 100.000 habitantes. Como em anos anteriores, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram os sorovares mais frequentemente encontrados em 2011 (44,4 % e 24,9 %, respectivamente). A variante monofásica de *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:- foi o terceiro sorovar mais comumente encontrado em humanos em 2011, seguido do sorovar *S. Infantis*, o qual teve um aumento significativo nos últimos quatro anos (EFSA & ECDC, 2013).

3.3 Contaminação por *Salmonella* na Cadeia Produtiva de Suínos

A infecção por *Salmonella* em suínos é tema de pesquisas e vigilância epidemiológica devido à manifestação clínica nesta espécie e ao frequente envolvimento dos produtos cárneos de origem suína em casos de salmonelose humana. O sorovar *Choleraesuis* adaptado ao hospedeiro suíno é a causa mais comum de salmonelose nesta espécie, causando septicemia aguda ou enterocolite aguda ou crônica, frequentemente fatal (GRIFFITH et al., 2006). A segunda forma de apresentação clínica de salmonelose em suínos é causada por sorovares não adaptados, como *S. Typhimurium*, tendo como apresentação típica quadros de diarreia. Entretanto, a maioria dos sorovares não adaptados de *Salmonella* causa infecção assintomática nos suínos, que chegam ao abate como portadores excretadores, constituindo risco para contaminação de carcaças (FEDORKA-CRAY et al., 2000; NOLLET et al., 2005 ; BOYEN et al., 2008).

De acordo com o relatório publicado pelo CDC, *S. Typhimurium* variante O5- foi o sorovar mais frequentemente isolado de casos de salmonelose clínica em suínos, seguido dos sorovares *S. Derby* e *S. Agona*. Entre os isolados de *Salmonella* de origem não clínica, os sorovares mais frequentemente observados foram *S. Derby* (n=339), *S. Typhimurium* variante O5- (n=124), *S. Infantis* (n=96), *S. Agona* (n=89) e *S. Anatum* (n=88) (CDC, 2013c). No Brasil, estudos de prevalência em suínos ao abate demonstraram que 77,8 % a 80,6 % dos suínos apresentavam anticorpos anti-*Salmonella* (SCHWARZ et al., 2009; SILVA et al., 2012), enquanto que o isolamento em linfonodos mesentéricos apresentou frequências entre 17,6 % e 71,6 % (BESSA et al., 2004; SCHWARZ et al., 2009). Entre amostras de carcaças suínas e conteúdo cecal, as prevalências variaram de 14 % a 24 % e 26 % a 49 %, respectivamente (KICH et al.,

2011; SILVA et al., 2012). Os sorovares mais frequentemente encontrados no Sul do Brasil foram *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Agona* e *S. Panama*.

A contaminação por *Salmonella* na cadeia produtiva de suínos pode ocorrer desde a granja até o momento do abate dos animais. Estudo longitudinal realizado em 12 granjas integradas e em uma agroindústria do Sul do Brasil demonstrou a presença de *Salmonella* em 26 % das amostras colhidas do piso das baias de terminação, em 29 % dos lotes de ração fornecidos aos animais, em 44 % das fezes colhidas de animais em idade de creche, e 90 % das amostras colhidas nas baias de espera pré-abate do matadouro-frigorífico. Entre os suínos abatidos, 46 % foram portadores de *Salmonella* nos linfonodos mesentéricos e 24 % das carcaças resfriadas foram positivas (KICH et al., 2011). Esse estudo demonstrou a correlação entre os isolados obtidos de baias de espera pré-abate e isolados de superfície de carcaças antes e após o resfriamento.

A fase de terminação dos suínos é caracterizada por maior deficiência quanto à adoção dos fatores de biossegurança, propiciando a disseminação de *Salmonella* (SCHWARZ et al., 2009). No Sul do Brasil, os principais fatores de risco associados à prevalência de *Salmonella* em granjas de terminação foram: o uso de ração peletizada, destino inadequado de dejetos, não utilização de comedouros do tipo comedouro/bebedouro e o transporte com freteiro misturando animais de várias granjas. Em granjas de ciclo completo, os fatores de risco identificados foram: ingredientes de ração desprotegidos de outros animais, ração seca, ausência de cerca, não uso da pintura com cal após lavagem e desinfecção e a entrada de pessoas, além do técnico, na granja (KICH et al., 2005). Geralmente, a transmissão de *Salmonella* ocorre pela via feco-oral, sendo eliminada em grande número nas fezes de suínos infectados. Entretanto, roedores, insetos, humanos, ração e água contaminados também desempenham um importante papel na transmissão e disseminação desse patógeno. Dessa forma, a análise cuidadosa e a correção desses fatores de risco na granja tornam-se necessários para que adequadas medidas de controle sejam implantadas para minimizar a introdução e disseminação de *Salmonella* na produção de suínos.

A ração animal é considerada um importante veículo para a introdução de diversos patógenos, como *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella*, em sistemas de produção animal. A *European Food Safety Authority* (EFSA) identificou *Salmonella* como o maior perigo para a contaminação microbiana de ração animal (EFSA, 2008a). Berends e colaboradores (1996) estimaram que 15 a 30 % de todas as infecções na fase de terminação podiam ser atribuídas à ração contaminada. No Sul do

Brasil, Kich e colaboradores (2011) encontraram 29 % das amostras de ração positivas para *Salmonella* em rebanhos suínos em fase de terminação. As sementes oleaginosas e os ingredientes proteicos de origem animal têm sido apontados como de maior risco de introduzir *Salmonella* nas fábricas de ração (EFSA, 2008a). Wierup & Häggblom (2010) relataram a contaminação frequente por *Salmonella* em proteínas vegetais utilizadas em fábricas de ração de suínos, particularmente em amostras de farelo de soja (14,6 %) e colza (10 %).

Duas fontes de *Salmonella* têm sido identificadas dentro do matadouro frigorífico: (1) o ambiente previamente contaminado por *Salmonella* e (2) a entrada de suínos infectados por *Salmonella* na granja, durante o transporte ou nas baias de espera pré-abate (ARGUELLO et al., 2013a). As cepas presentes no ambiente podem se tornar parte da microbiota residente e constituir uma fonte de contaminação para as carcaças. No entanto, a principal fonte de contaminação das carcaças parece ser o suíno portador de *Salmonella*. Esse fato foi demonstrado através estudos de tipificação molecular, que revelaram a presença de diferentes clones de *Salmonella* entre coletas no mesmo matadouro-frigorífico, indicando que diferentes cepas entram continuamente na linha de abate (LETELLIER et al., 2009; PIRAS et al., 2011; ARGUELLO et al., 2013b).

Os suínos podem ser portadores de *Salmonella* em linfonodos, o que por sua vez pode ser fonte de contaminação de carcaças durante o processo de abate (LETELLIER et al., 2009). Na União Europeia, 10,3 % dos suínos ao abate foram portadores de *Salmonella* nos linfonodos e 8,3 % das carcaças apresentaram contaminação por *Salmonella* (EFSA, 2008b). No entanto, os resultados obtidos por De Busser e colaboradores (2011) mostraram que a maioria dos genótipos de *Salmonella* observados em isolados de carcaças suínas foi diferente dos genótipos encontrados em isolados de linfonodos, indicando que a contaminação de linfonodos pode não ser a fonte primária de contaminação das carcaças. Silva e colaboradores (2012) relatam que os mesmos pulsotipos de *Salmonella* encontrados em carcaças no pré-resfriamento foram também observados em baias de espera, conteúdo intestinal e carcaças após a depilação, sugerindo que a fonte primária de contaminação foi o suíno portador de *Salmonella* no intestino.

Ao longo da linha de abate, diversos pontos críticos de controle para redução da contaminação por *Salmonella* podem ser identificados (FIGURA 1). A etapa de escaldagem é considerada um ponto crítico devido à possibilidade de contaminação da água com sujidades, fezes, alimentos e micro-organismos. O monitoramento da

temperatura acima de 62 °C é considerado eficiente para eliminar *Salmonella*, desde que o volume de matéria orgânica não proteja o micro-organismo do aquecimento (DE BUSSER et al., 2013). A etapa de depilação é também um importante fator de risco para a contaminação das carcaças (EFSA, 2010). Porém, a etapa seguinte (chamuscamento) garante a redução significativa da carga bacteriana presente nas carcaças (EFSA, 2010). É considerada a única etapa durante o processo de abate em que *Salmonella* pode ser eliminada (PEARCE et al., 2004). No estudo de Silva e colaboradores (2012), o chamuscamento foi a etapa mais importante para a redução de *Salmonella*, porém a eficiência diferiu significativamente entre abatedouros. Abatedouros com chamuscamento em túnel apresentaram redução de 80 % nas carcaças positivas, enquanto o uso de chamuscador manual resultou em apenas 47,5 % de redução.

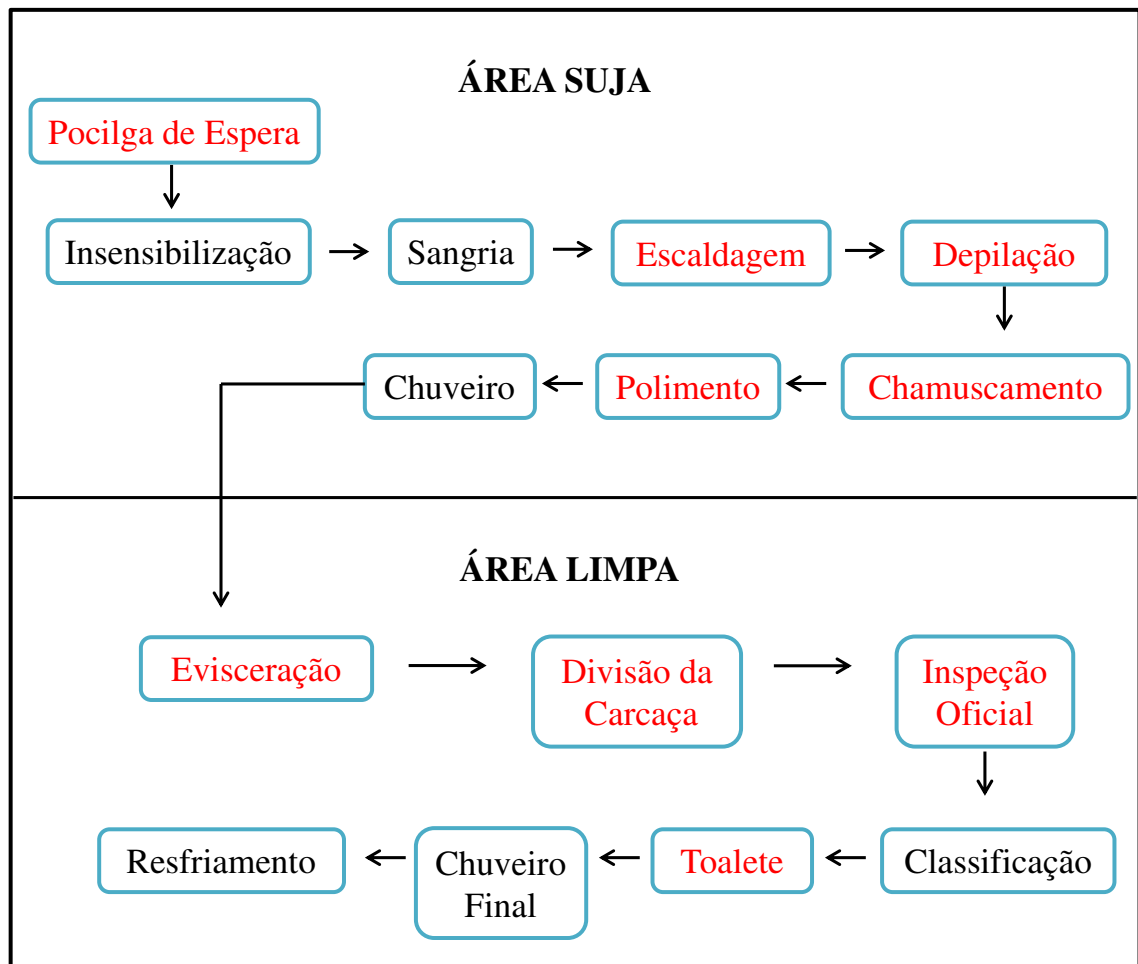


FIGURA 1 – Etapas do abate de suínos com os pontos críticos para a contaminação de *Salmonella* mostrados em vermelho.

A evisceração é considerada um ponto crítico de controle para *Salmonella* (BORCH et al., 1996). O principal risco de contaminação das carcaças é o extravasamento de conteúdo intestinal devido à ruptura das paredes intestinais. Berends e colaboradores (1997) estimaram que 55 a 90 % da contaminação das carcaças ocorrem na etapa de evisceração. Algumas formas de redução do risco de disseminação de *Salmonella* nesse ponto, como a oclusão do reto com bolsa plástica e a automatização do processo, têm sido sugeridas (ARGUELLO et al., 2013a). A superfície de uma carcaça contaminada pode abrigar e disseminar *Salmonella* para outros pontos da linha de processamento, o que constitui uma fonte de contaminação para as carcaças livres de *Salmonella*. A contaminação cruzada das carcaças pode ocorrer principalmente através dos equipamentos e mãos de operadores (BERENDS et al., 1997). Portanto, atividades de abate adequadas não podem evitar a introdução de *Salmonella* proveniente de suínos infectados na linha de abate, mas podem prevenir ou reduzir parte da contaminação durante o processo de abate.

3.4 Resistência de *Salmonella* aos Agentes Antimicrobianos

O tratamento das infecções por *Salmonella*, tanto em animais quanto em humanos, tem sido dificultado devido à emergência de cepas resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos. As fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, e as cefalosporinas de terceira geração, como o ceftriaxona, são comumente usados para tratar infecções severas causadas por *Salmonella*. Em membros da família *Enterobacteriaceae*, a resistência ao ácido nalidíxico está relacionada à diminuição da suscetibilidade à ciprofloxacina e, possivelmente, a falhas no tratamento (TAMANG et al., 2011a). De acordo com o relatório anual do programa nacional de monitoramento da resistência nos EUA, 7,2 % dos isolados de *S. Enteritidis*, um dos principais sorovares envolvidos em DTA, foram resistentes ao ácido nalidíxico. A resistência ao ceftiofur, um agente antimicrobiano usado em animais de produção, está relacionada à resistência a ceftriaxona (MIC ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$) em *Enterobacteriaceae*. A resistência a ceftriaxona foi observada mais comumente em *S. Heidelberg* (8,6 %), *S. Typhimurium* (6,8 %) e *S. Newport* (3,9 %) (NARMS, 2013). Como as fluoroquinolonas e as cefalosporinas são os antimicrobianos de escolha para o tratamento das salmoneloses, a emergência de resistência a essas duas classes são de grande importância em saúde pública.

Nos últimos anos, um aumento na prevalência de cepas de *Salmonella* multi-resistentes tem sido um problema global. Os sorovares de *Salmonella* que frequentemente apresentam perfis de multi-resistência são *S. Typhimurium*, *S. 4,[5],12:i:-* e *S. Heidelberg* (NARMS, 2013). O sorovar *Typhimurium* pertencente ao fagotipo DT104 foi identificado na década de noventa como um clone multi-resistente associado ao uso de agentes antimicrobianos em animais (THRELFALL, 2000). Esse fagotipo exibe resistência a cinco agentes antimicrobianos: ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (fenótipo ACSSuT). Os genes responsáveis pelo fenótipo de resistência são *bla_{PSE}*, *floR*, *aadA2*, *sull* e *tet(G)*, respectivamente. A multi-resistência está associada com a presença da ilha de multi-resistência cromossômica denominada *Salmonella Genomic Island 1* (SGI1) (MULVEY et al., 2006). Segundo o relatório anual do NARMS, a prevalência do perfil de resistência ACSSuT entre isolados de *S. Typhimurium* é de 19,6 % nos EUA (NARMS, 2013).

Outra preocupação em saúde pública é a emergência de *S. enterica* sorovar 4,[5],12:i:- mostrando resistência a quatro agentes antimicrobianos: ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (ASSuT). *S. 4,[5],12:i:-* é considerada a variante monofásica de *S. Typhimurium* (4,[5],12:i:-1,2) devido a grande similaridade antigênica e genotípica (ECHEITA et al., 2001; ZAMPERINI et al., 2007). A variante monofásica já esteve envolvida em diversos surtos, com relatos de infecções severas e mortes em humanos (MOSSONG et al., 2007). Nos EUA, a emergência do perfil ASSuT entre isolados da variante monofásica 4,[5],12:i:- teve um aumento considerável nos últimos anos, passando de 1 % em 2006 para 18,3 % em 2011 (NARMS, 2013). A variante monofásica de *S. Typhimurium* é considerada pandêmica na Europa e os suínos são reconhecidos como principal reservatório (HOPKINS et al., 2010). Na Dinamarca, por exemplo, a proporção de isolados provenientes de carne suína apresentando o perfil ASSuT foi significativamente maior em 2012 (56 %) que em 2007 (17 %) (DANMAP, 2012).

O uso de agentes antimicrobianos em animais de produção desempenha um importante papel no desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos em bactérias zoonóticas, como *Salmonella*. Os surtos de salmonelose humana por cepas multi-resistentes têm sido causados pelo consumo de alimentos contaminados ou por contato direto com animais infectados. Isolados de *S. Typhimurium* DT104 obtidos durante um surto na Dinamarca foram resistentes a seis classes de agentes antimicrobianos. Esses isolados foram associados ao consumo de *carpaccio* (fatias finas de carne bovina crua)

servido em um restaurante (ETHELBERG et al., 2007). Em 2008, um surto de *S. Typhimurium* DT104 relacionado ao consumo de carne curada afetou 16 pessoas em Londres. Os isolados apresentaram o perfil característico de penta-resistência (MINDLIN et al., 2013). Um surto envolvendo a variante monofásica 4,[5],12:i:- resistente à ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina foi associado ao consumo de linguiça suína em novembro e dezembro de 2011 na França (GOSSNER et al., 2012). Dessa forma, cepas de *Salmonella* apresentando perfis de multi-resistência representam um risco para a saúde pública.

Para o monitoramento e controle da disseminação de cepas de *Salmonella* multi-resistentes é fundamental entender os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da resistência e como ocorre a transmissão entre essas cepas. O desenvolvimento de resistência aos agentes antimicrobianos é atribuído a diversos mecanismos (VAN HOEK et al., 2011) como:

- I. mudanças na permeabilidade da parede celular bacteriana, as quais restringem o acesso do agente antimicrobiano ao alvo;
- II. efluxo ativo do agente antimicrobiano do interior da célula bacteriana;
- III. modificação enzimática do agente antimicrobiano;
- IV. degradação do agente antimicrobiano;
- V. aquisição de uma via metabólica alternativa àquela inibida pelo antimicrobiano;
- VI. modificação no alvo do agente antimicrobiano;
- VII. superprodução da enzima alvo.

Uma vez que a resistência é considerada um processo de evolução bacteriana, outros mecanismos de resistência ainda desconhecidos podem estar envolvidos na resistência em *Salmonella*.

3.4.1 Resistência aos β -lactâmicos

Os agentes da classe dos β -lactâmicos são amplamente usados no tratamento de uma variedade de infecções causadas por micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, tanto em medicina humana quanto em medicina veterinária. Existem inúmeras classes de β -lactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (FIGURA 2) (WORTHINGTON & MELANDER, 2013). Na União Europeia, as penicilinas, aminopenicilinas e primeira a quarta geração das

cefalosporinas são subgrupos autorizados para o uso em animais, sendo que as penicilinas são frequentemente usadas em combinação com inibidores de β -lactamases como o ácido clavulânico (EFSA, 2011). No Brasil, não há restrições para o uso terapêutico de β -lactâmicos em animais, apenas o monitoramento de resíduos em tecidos de suínos, aves, bovinos e equinos (BRASIL, 2010). No entanto, a legislação brasileira proíbe a sua utilização como aditivo zootécnico melhorador de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009).

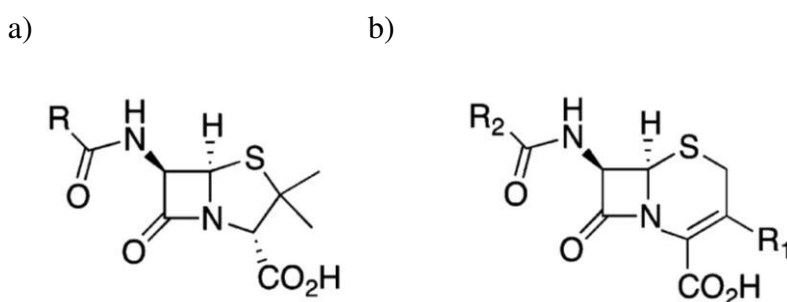


FIGURA 2 – Estrutura química da a) penicilina e da b) cefalosporina.

Os β -lactâmicos atuam inibindo a síntese de parede celular bacteriana através da ligação às chamadas proteínas ligadoras de penicilina (*penicillin-binding proteins* – PBPs), as quais são responsáveis pela ligação cruzada do peptidoglicano da parede celular. Quatro mecanismos de resistência aos agentes β -lactâmicos têm sido descritos: 1) alteração das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs); 2) alteração da permeabilidade da membrana externa bacteriana; 3) efluxo ativo do antimicrobiano pela célula, e 4) produção de enzimas β -lactamases (LLARRULL et al., 2010).

A produção de enzimas β -lactamases é um dos mais importantes mecanismos de resistência aos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas (POOLE, 2004). Algumas β -lactamases são associadas com certas espécies bacterianas enquanto outras são disseminadas entre diferentes espécies e gêneros bacterianos. Algumas possuem espectro de atividade restrito contra um número limitado de agentes antimicrobianos, enquanto as β -lactamases de amplo-espectro ou espectro estendido são capazes de degradar uma ampla gama de antimicrobianos (ARLET et al., 2006). Existem diversos sistemas de classificação para as enzimas β -lactamases, sendo dois deles amplamente utilizados: a classificação de Bush, Jacoby e Medeiros (BJM) baseada em características funcionais e estruturais das enzimas (BUSH et al., 1995); e a classificação mais antiga, de Ambler, baseada na estrutura molecular das enzimas β -lactamases, de acordo com a sequência de aminoácidos (AMBLER, 1980).

Entre as enzimas β -lactamases, as chamadas β -lactamases de espectro estendido (*extended-spectrum beta-lactamases*, ESBL) são capazes de promover resistência a importantes subclasses de agentes β -lactâmicos como às penicilinas (ampicilina, amoxicilina), cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona) e monobactâmicos (aztreonam), através da hidrólise do anel β -lactâmico. No entanto, não são capazes de hidrolisar cefamicinas e carbapenêmicos e são inibidas por inibidores de β -lactamases como o ácido clavulânico (Tabela 1) (EFSA, 2011). As ESBLs pertencem ao grupo 2be de acordo com a classificação funcional de Bush, Jacoby e Medeiros e à classe A de acordo com a classificação molecular de Ambler (AMBLER, 1980; BUSH et al., 1995; BUSH & JACOBY, 2010). As ESBLs mais frequentemente encontradas pertencem às famílias TEM, SHV e CTX-M e os genes estão comumente localizados em plasmídeos. Uma vez que os agentes β -lactâmicos desempenham um importante papel no controle de infecções em animais e humanos, isolados produtores de ESBLs representam um risco à saúde pública e têm sido associados com perdas econômicas na produção de animais (CANTÓN et al., 2012).

As primeiras ESBLs encontradas foram derivadas de genes que codificam β -lactamases de amplo espectro como TEM-1 e SHV-1, os quais foram descobertos por volta de 1960 (PATERSON & BONOMO, 2005). Devido a pontos de mutação em TEM e SHV, as β -lactamases expandiram de apenas penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro para β -lactamases de espectro estendido (BRADFORD, 2001). Entre as β -lactamases do tipo TEM, aquelas codificadas pelos genes *bla*_{TEM-1} e *bla*_{TEM-135} representam as penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro e pertencem à classe 2b. Outros genes, como *bla*_{TEM-3}, *bla*_{TEM-4}, *bla*_{TEM-20}, *bla*_{TEM-25}, *bla*_{TEM-27}, *bla*_{TEM-52}, *bla*_{TEM-63}, *bla*_{TEM-131}, *bla*_{TEM-144}, *bla*_{TEM-149} e *bla*_{TEM-188} pertencem à classe 2be e codificam β -lactamases de espectro estendido (Tabela 2). Entre as β -lactamases do tipo SHV encontradas em *Salmonella* destacam-se os genes *bla*_{SHV-2}, *bla*_{SHV-2a}, *bla*_{SHV-5}, *bla*_{SHV-9} e *bla*_{SHV-12} (Tabela 2).

ESBLs do tipo TEM e SHV foram as variantes predominantes durante as décadas de 80 e 90, encontradas principalmente em *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* causadora de infecções nosocomiais e outros gêneros da família *Enterobacteriaceae* (PATERSON & BONOMO, 2005; DAMJANOVA et al., 2007). Desde 2000, enzimas do tipo CTX-M tornaram-se as ESBLs mais prevalentes (Tabela 3 e Tabela 4) (CANTÓN et al., 2012; ZHAO & HU, 2013). Em contraste com ESBLs do tipo TEM e SHV, as enzimas CTX-M apresentam maior atividade hidrolítica contra cefotaxima do

que contra cefotazidima. A família de β -lactamases do tipo CTX-M inclui pelo menos seis grupos: CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9, CTX-M25 e KLUC, os quais diferem um do outro em pelo menos 10 % dos resíduos de aminoácidos (D'ANDREA et al., 2013). Atualmente, mais de 150 variantes do grupo CTX-M já foram descritas (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). Os genes *bla*_{CTX-M} encontrados em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* são geralmente localizados em grandes plasmídeos conjugativos (ZHAO & HU, 2013), embora em algumas cepas tenham sido encontrados no DNA cromossômico (MAHROUKI et al., 2012).

As β -lactamases do tipo AmpC são cefalosporinases codificadas por genes cromossômicos ou, mais recentemente, por genes plasmidiais em muitas bactérias Gram-negativas. Essas enzimas determinam resistência às penicilinas e cefalosporinas, podendo hidrolisar cefamicinas (cefotaxima), oximinocefalosporinas (ceftriaxona) e monobactâmicos (aztreonam), com exceção das cefalosporinas de quarta geração e carbapenêmicos (LIEBANA et al., 2013). Em contraste com outras ESBLs, β -lactamases do tipo AmpC não são inibidas pelo ácido clavulânico (Tabela 1). A resistência às cefalosporinas ocorre devido a mutações no gene *bla*_{AmpC}, resultando em super-expressão da enzima. As bactérias que não possuem o gene cromossômico *bla*_{AmpC}, podem adquiri-lo através de plasmídeos conjugativos (JACOBY, 2009). Diferentes famílias de β -lactamases do tipo AmpC têm sido descritas: CMY, ACC, ACT, DHA, FOX, MIR e MOX (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). Dentre as AmpCs adquiridas, a CMY-2 é a mais frequentemente relatada (Tabela 5) (LIEBANA et al., 2013). Muitas dessas enzimas já foram encontradas em isolados da família *Enterobacteriaceae* provenientes de animais de produção e alimentos (BEN SALLEM et al., 2012; HIKI et al., 2013).

TABELA 1 – Principais características das ESBLs e das β -lactamases AmpC.

β -lactamase	Perfil de hidrólise ^a				Inibição pelo ácido clavulânico
	CAZ/CTX	FOX	FEP	IMP	
ESBL	+	-	+	-	Sim
AmpC	+	+	-	-	Não

^a CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; FOX: cefoxitina; FEP: cefepima; IMP: imipenem.

TABELA 2 – β -lactamases de espectro estendido TEM e SHV em sorovares de *Salmonella*.

β -lactamase	Sorovar	País	Ano	Origem	Referência	
TEM-3	Kedougou	França	1990	Humano	Archambaud et al., 1991	
	Typhimurium	Marrocos	1994	Humano	AitMhand et al., 2002	
TEM-4	Mbandaka	Tunísia	1988	Humano	Makanera et al.; 2003	
TEM-20	Paratyphi B Java	Holanda	2002	Ave	Hasman et al., 2005	
TEM-25	Mbandaka	França	1990	Humano	Poupart et al., 1991	
TEM-27	Othmarschen	Espanha	1994	Humano	Morosini et al., 1996	
TEM-52	Enteritidis	Korea	1995-1997	Humano	Lee et al., 2003	
	Enteritidis	Holanda	2001	Humano	Hasman et al., 2005	
	Santpaul	Korea	1995-1997	Humano	Lee et al., 2003	
	Agona	Korea	1995-1997	Humano	Lee et al., 2003	
	Stanley	Korea	1995-1997	Humano	Lee et al., 2003	
	Blockey	Holanda	2001	Ave	Hasman et al., 2005	
	Thompson	Holanda	2001	Humano	Hasman et al., 2005	
	Blockey	Holanda	2001	Humano	Hasman et al., 2005	
	London	Holanda	2001	Humano	Hasman et al., 2005	
	Paratyphi B	Holanda	2001	Ave	Hasman et al., 2005	
	Blockey	Holanda	2002	Ave	Hasman et al., 2005	
	Virchow	Holanda	2002	Ave	Hasman et al., 2005	
	Typhimurium	Holanda	2001-2002	Ave	Hasman et al., 2005	
	Typhimurium	Hungria	1998	Humano	Vahaboglu et al., 2001	
	TEM-63	Isangi	Holanda	2002	Humano	Hasman et al., 2005
	TEM-131	Typhimurium	África do Sul	2002-2003	Humano	Kruger et al., 2004
Isangi		África do Sul	2002-2003	Humano	Kruger et al., 2004	
TEM-144	Derby	Uruguai	2006	Ave	Vignoli et al., 2006	
TEM-149	Infantis	Iran	2010	Humano	Ranjbar et al., 2010	
TEM-188	Brunei	Argélia	2012	Humano	Kermas et al., 2012	
SHV-2	Wien	Tunísia	1988	Humano	Hammami et al., 1991	
	Virchow	Holanda	2005	Ave	Hasman et al., 2005	
	Typhimurium	França	1990	Humano	Garbarg-Chenon et al., 1990	
SHV-2a	Mbandaka	Tunísia	1988	Humano	Makanera et al.; 2003	
	Enteritidis	Taiwan	2001	Humano	Su et al., 2005	
	Typhimurium	Polônia	1999-2000	Humano	Szych et al., 2001	
SHV-5	Typhimurium	Canadá	2000	Humano	Mulvey et al., 2003	
	Senftenberg	Índia	1998	Humano	Revathi et al., 1998	
	Brandenburg	Grécia	2000	Humano	Politi et al., 2005	
	Typhimurium	Itália	2000	Humano	Villa et al., 2000	
	Typhimurium	Romênia	2000-2001	Humano	Lukova et al., 2000	
Typhimurium	Áustria	1999	Humano	Miriagou et al., 2002		
SHV-9	Typhimurium	Austrália	2000	Humano	Hanson et al., 2002	
SHV-12	Enteritidis	Itália	1990-1998	Humano	Villa et al., 2002	
	35:c:1,2	Senegal	2000	Humano	Cardinale et al., 2001	
	Babelsberg	França	2002-2003	Humano	Weill et al., 2004a	
	Enteritidis	França	2002-2003	Humano	Weill et al., 2004a	
	Concord	Holanda	2001	Humano	Hasman et al., 2005	
	Livingstone	Itália	2005-2006	Ave	Chiarretto et al., 2008	
	Braenderup	Itália	2005-2006	Ave	Chiarretto et al., 2008	
Enteritidis	Itália	2005-2006	Ave	Chiarretto et al., 2008		

TABELA 3 – β -lactamases de espectro estendido CTX-M em sorovares de *Salmonella* de origem animal.

β -lactamase	Sorovar	País	Ano	Origem	Referência
CTX-M-1	Typhimurium	Alemanha	2003	Equino	Rodríguez et al., 2009
	Anatum	EUA	2011	Equino	Wittum et al., 2012
	Anatum	Alemanha	2005	Bovino	Rodríguez et al., 2009
	Infantis	Alemanha	2003	Bovino	Rodríguez et al., 2009
	Typhimurium	França	2010	Bovino	Madec et al., 2011
	4,5,12:i:-	Alemanha	2009	Bovino	Rodríguez et al., 2012
	O:d:enz15	EUA	2011	Suíno	Wittum et al., 2012
	4,5,12:i:-	Alemanha	2007/2009	Suíno	Rodríguez et al., 2012
	4,12:i:-	Alemanha	2009	Suíno	Rodríguez et al., 2012
	1,4,12:i:-	Alemanha	2010	Suíno	Rodríguez et al., 2012
	Llandoff	França	2006	Ave	CloECKaert et al., 2010
	Paratyphi	Holanda	2006	Ave	Dierikx et al., 2010
	Agona	Holanda	2006	Ave	Dierikx et al., 2010
	Infantis	Holanda	2006	Ave	Dierikx et al., 2010
	Bredeney	EUA	2010	Ave	Wittum et al., 2012
	Ouakam	EUA	2011	Ave	Wittum et al., 2012
	4,5,12:i:-	Alemanha	2009	Ovino	Rodríguez et al., 2012
	Typhimurium	Alemanha	2006	Felino	Rodríguez et al., 2009
	Typhimurium	Alemanha	2006	Ave	Rodríguez et al., 2009
	Typhimurium	Alemanha	2007	Carne suína	Rodríguez et al., 2009
	Typhimurium	Alemanha	2006	Carne de frango	Rodríguez et al., 2009
	Anatum	Alemanha	2006	Carne moída	Rodríguez et al., 2009
	London	Alemanha	2005	Carne moída	Rodríguez et al., 2009
CTX-M-2	Virchow	Bélgica	2001/2004	Carne de frango	Smet et al., 2009
	Virchow	Holanda	2002	Carne de frango	Hasman et al., 2005
	Paratyphi	Holanda	2006	Ave	Dierikx et al., 2010
	Typhimurium	Brasil	2004	Ave	Fernandes et al., 2009
	4,5,12:i:-	Alemanha	2010	Ave	Rodríguez et al., 2012
CTX-M-9	Virchow	França	2002	Ave	Weill et al., 2004b
CTX-M-14	Infantis	Japão	2010	Carne de frango	Kameyama et al., 2012
CTX-M-15	Typhimurium	Bélgica	2007	Carne de frango	Smet et al., 2009
	Enteritidis	Coréia	2009	Carne de frango	Tamang et al., 2011b
	Enteritidis	Coréia	2009	Ave	Tamang et al., 2011b
	Enteritidis	Coréia	2009	Ave	Tamang et al., 2011b
	Essen	Coréia	2009	Ave	Tamang et al., 2011b
	Typhimurium	Alemanha	2005	Equino	Rodríguez et al., 2009
CTX-M-32	Virchow	Grécia	2001	Ave	Politi et al., 2005
CTX-M-53	Westhampton	França	2004	Molusco	Doublet et al., 2009
	Senftenberg	França	2004	Molusco	Doublet et al., 2009

TABELA 4 – β -lactamases de espectro estendido CTX-M em sorovares de *Salmonella* de humanos.

β -lactamase	Sorovar	País	Ano	Origem	Referência
CTX-M-1	Typhimurium	Alemanha	2007	Humano	Rodríguez et al., 2009
	Litchfield	Espanha	2005	Humano	González-Sanz et al., 2009
	Newport	França	2003	Humano	CloECKaert et al., 2010
	Typhimurium	França	2005-2008	Humano	CloECKaert et al., 2010
	London	França	2007	Humano	CloECKaert et al., 2010
	Enteritidis	Espanha	2006	Humano	Pardos de la Gándara et al., 2011
CTX-M-2	Typhimurium	Brasil	2003-2004	Humano	Fernandes et al., 2009
	Infantis	Argentina	1997-1998	Humano	Di Conza et al., 2002
CTX-M-3	Gambia	França	2005	Humano	Moissenet et al., 2011
	Typhimurium	Holanda	2002	Humano	Hasman et al., 2005
CTX-M4	Typhimurium	Rússia	1996	Humano	Gazouli et al., 1998
CTX-M-5	Typhimurium	EUA	2007	Humano	Sjölund-Karlsson et al., 2011
CTX-M-6	Typhimurium	Grécia	1998	Humano	Gazouli et al., 1998
CTX-M-7	Typhimurium	Grécia	1998	Humano	Gazouli et al., 1998
CTX-M-9	Virchow	Espanha	2000-2004	Humano	Riaño et al., 2009
	Virchow	Espanha	2001	Humano	González-Sanz et al., 2009
	Senftenberg	Espanha	2003	Humano	González-Sanz et al., 2009
	Virchow	Espanha	2002-2006	Humano	Herrera-León et al., 2010
	Virchow	Espanha	2002-2004	Humano	Pardos de la Gándara et al., 2011
	Grumpensis	Espanha	2001-2009	Humano	Pérez-Moreno et al., 2013
	Virchow	Reino Unido	1997-2003	Humano	Batchelor et al., 2005a
	Virchow	Espanha	2001-2009	Humano	Pérez-Moreno et al., 2013
	Bovismorbificans	Portugal	2011	Humano	Antunes et al., 2013
	CTX-M-10	Virchow	Espanha	2000-2004	Humano
Virchow		Espanha	2001	Humano	González-Sanz et al., 2009
CTX-M-14	(IV) 44:z4,z23:-	Espanha	2004	Humano	González-Sanz et al., 2009
	Enteritidis	Espanha	2005	Humano	González-Sanz et al., 2009
	Typhimurium	Espanha	2003-2004	Humano	González-Sanz et al., 2009
	Choleraesuis	Tailândia	2003-2008	Humano	Sirichote et al., 2010
	Typhimurium	China	2007-2009	Humano	Yu et al., 2011
	Enteritidis	Coréia	2009	Humano	Tamang et al., 2011b
	Enteritidis	Uruguai	2011	Humano	Bado et al., 2012
	Panama	Taiwan	2007	Humano	Li et al., 2005
	Enteritidis	Alemanha	2003	Humano	Romero et al., 2004
	Enteritidis	Japão	2003	Humano	Izumiya et al., 2005
CTX-M-15	Concord	França	2004-2006	Humano	Fabre et al., 2009
	Enteritidis	Espanha	2002	Humano	González-Sanz et al., 2009
	Infantis	Iran	2007-2008	Humano	Ranjbar et al., 2010
	Concord	Holanda	2007	Humano	Veldman et al., 2010
	Concord	EUA	2006	Humano	Sjölund-Karlsson et al., 2010
	Infantis	Argélia	2008-2009	Humano	Naas et al., 2011
	Typhimurium	China	2007-2009	Humano	Yu et al., 2011
	Enteritidis	Coréia	2009	Humano	Tamang et al., 2011b
	Enteritidis	Coréia	2009	Humano	Kim et al., 2011
	Concord	EUA	2007	Humano	Sjölund-Karlsson et al., 2011
	Kapemba	Espanha	2001-2009	Humano	Pérez-Moreno et al., 2013
	Heidelberg	Argélia	2008	Humano	Kermas et al., 2012
	Anatum	Reino Unido	2001	Humano	Batchelor et al., 2005a

Continuação da **Tabela 4.**

	Typhimurium	Reino Unido	2002	Humano	Batchelor et al., 2005a
	Typhimurium	Reino Unido	2003	Humano	Batchelor et al., 2005a
	Enteritidis	Reino Unido	2003	Humano	Batchelor et al., 2005a
CTX-M-17/18	Stanley	Reino Unido	2002	Humano	Batchelor et al., 2005a
	Enteritidis	Reino Unido	2001	Humano	Batchelor et al., 2005a
CTX-M-27	Livingstone	Tunísia	2002	Humano	Bouallegue-Godet et al., 2005
CTX-M-28	Isangi	Holanda	2001-2002	Humano	Hasman et al., 2005
CTX-M-32	Enteritidis	Espanha	2005	Humano	González-Sanz et al., 2009
CTX-M-55	Typhimurium	China	2007-2009	Humano	Yu et al., 2011
CTX-M-55/57	I 4,5,12:i:-	EUA	2007	Humano	Sjölund-Karlsson et al., 2011

TABELA 5 – β -lactamases do tipo AmpC em sorovares de *Salmonella* de diversas origens.

AmpC	Sorovar	País	Ano	Origem	Referência
CMY-2	Senftenberg	Argélia	1994	Humano	Koeck et al., 1997
	Typhimurium	EUA	1998-1999	Bovino	Winokur et al., 2000
	Heidelberg	EUA	1998-1999	Suíno	Winokur et al., 2000
	Give	EUA	1998-1999	Suíno	Winokur et al., 2000
	Heidelberg	EUA	1998-1999	Bovino	Winokur et al., 2000
	Newport	EUA	1996-1999	Humano	Doublet et al., 2004
	Typhimurium	EUA	1996-1998	Humano	Doublet et al., 2004
	Thompson	EUA	1996-1998	Humano	Carattoli et al., 2002
	Choleraesuis	Taiwan	2002	Humano	Su et al., 2005
	Worthington	Reino Unido	2003	Humano	Batchelor et al., 2005b
	Anatum	Reino Unido	2003	Humano	Batchelor et al., 2005b
	Heidelberg	Dinamarca	2003	Humano	Aarestrup et al., 2004
	Wagenia	Taiwan	2000	Humano	Li et al., 2005
	Derby	Taiwan	2001	Humano	Li et al., 2005
	Duesseldorf	Taiwan	2000	Humano	Li et al., 2005
	Bredeney	Canada	1999	Ave	Allen & Poppe, 2002
	Ohio	Canada	1996	Ave	Allen & Poppe, 2002
	Agona	EUA	2000	Humano	Giles et al., 2004
	Reading	EUA	2000	Humano	Giles et al., 2004
CMY-4	Senftenberg	Reino Unido	2001	Humano	Batchelor et al., 2005b
	Wien	Tunísia	2001	Humano	Armand-Lefèvre et al., 2003
CMY-7	Typhimurium	Austrália	2000	Humano	Hanson et al., 2002
DHA-1	Enteritidis	Arábia Saudita	1992	Humano	Barnaud et al., 1998
ACC-1	Mbandaka	Tunísia	1999	Humano	Makanera et al.; 2003
	Bareilly	Holanda	2001	Humano	Hasman et al., 2005
	Bareilly	Holanda	2001	Ave	Hasman et al., 2005
	Braenderup	Holanda	2001	Ave	Hasman et al., 2005

3.4.2 Resistência às Tetraciclina

Desde a descoberta da clortetraciclina produzida por *Streptomyces aureofaciens* em 1948, diversas tetraciclina foram identificadas ocorrendo naturalmente principalmente em espécies de *Streptomyces* (oxitetraciclina e tetraciclina) ou como produtos semi-sintéticos (doxiciclina e minociclina) (FIGURA 3) (CHOPRA et al., 1992; CHOPRA & ROBERTS, 2001). As tetraciclina tornaram-se populares devido ao mínimo efeito adverso e ao amplo espectro de ação. Exibem atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, também contra clamídias, micoplasmas, riquetsias e protozoários. Possuem efeito bacteriostático prevenindo a ligação do tRNA à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, resultando na inibição da síntese proteica (THAKER et al., 2010). Embora as tetraciclina tenham um importante papel em medicina humana e veterinária, a emergência de resistência tem limitado sua eficácia. No Brasil, o uso da tetraciclina é vedado como aditivo zootécnico melhorador de desempenho ou como conservante de alimentos para animais (BRASIL, 2009).

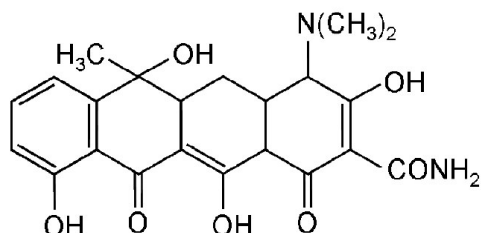


FIGURA 3 – Estrutura química da tetraciclina.

Os mecanismos de resistência à tetraciclina incluem: o efluxo ativo de tetraciclina do interior da célula, a produção de proteínas de proteção ribossômica (RPPs) e a degradação enzimática (THAKER et al., 2010). Inicialmente, os genes de resistência à tetraciclina receberam a denominação *tet* seguida por letras do alfabeto romano, como *tet(A)* ou *tet(B)*. Entretanto, a quantidade de genes *tet* empregou todas as letras do alfabeto e para acomodar novos genes, uma nomenclatura que emprega números foi introduzida. Um gene *tet* é identificado como novo quando apresentar < 79 % de identidade na sequência de aminoácidos com todos os genes previamente descritos (CHOPRA & ROBERTS, 2001).

Mais de 40 genes *tet*, conferindo resistência às tetraciclina, e três genes *ort*, conferindo resistência às oxitetraciclina, denominados *ort(A)*, *ort(B)* e *ort(C)*, foram

descritos até o presente (<http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb4.pdf>; último acesso em 24/01/2014). Entre esses determinantes, 26 genes *tet*, dois genes *ort* e um gene *tcr* codificam bombas de efluxo, enquanto 11 genes *tet* e um gene *ort* codificam RPPs. O mecanismo de inativação enzimática é atribuído a três genes *tet* (<http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf>). Os genes que codificam bombas de efluxo e RPPs são encontrados em bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, aeróbicas e anaeróbicas. O mecanismo de inativação enzimática foi observado apenas em micro-organismos Gram-negativos (VAN HOEK et al., 2011).

Em *Salmonella*, o sistema de efluxo ativo é o mecanismo de resistência mais comumente observado. Um estudo recente com *Salmonella* obtida de animais de produção nos Estados Unidos demonstrou que os genes de resistência às tetraciclinas identificados foram *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(G)* e *tet(R)* (FRYE & JACKSON, 2013). Entre diversos sorovares multi-resistentes de *Salmonella* obtidos de animais, alimentos e humanos nos Estados Unidos e Canadá, os genes de resistência associados à tetraciclina encontrados foram *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)* e *tet(D)*, com *tet(A)* sendo detectado em 80% dos isolados (GLENN et al., 2013). Outro estudo, conduzido em Portugal, descreveu a presença de multi-resistência entre sorovares de *Salmonella* obtidos de suínos ao abate e revelou que o gene *tet(B)* foi o mais frequentemente encontrado em isolados de *S. Typhimurium* e sorovar 4,[5],12:i:- (GOMES-NEVES et al., 2013).

Muitos genes de resistência às tetraciclinas estão localizados em elementos genéticos móveis. Em bactérias Gram-negativas, os genes *tet* estão frequentemente localizados em grandes plasmídeos conjugativos, o que pode explicar a grande disseminação desses genes entre bactérias (HENTSCHKE et al., 2010; VILACOBIA et al., 2013). Transposons, como o *Tn10* carregando o gene *tet(B)* e o *Tn1721* carregando o gene *tet(A)*, também têm sido descritos em membros da família *Enterobacteriaceae*, incluindo *Salmonella* (PASQUALI et al., 2005). O gene *tet(G)* tem sido detectado como componente da Ilha Genômica de *Salmonella* (SGI-1) associada ao *cluster* de multi-resistência que foi primeiramente descrito em *S. Typhimurium* DT104 (MULVEY et al., 2006). A SGI-1 e variantes foram também relatadas em outros sorovares de *Salmonella* como *S. Agona*, *S. Albany*, *S. Paratyphi B* e *S. Newport* (MICHAEL et al., 2006).

A regulação da expressão dos genes *tet* é frequentemente associada a uma proteína repressora da família TetR. Na ausência de tetraciclina, a proteína repressora liga-se diretamente ao gene *tet*, bloqueando a transcrição tanto da proteína de efluxo

quanto da proteína repressora. Quando tetraciclina está presente, o complexo tetraciclina-Mg²⁺ entra na célula e se liga à proteína TetR, permitindo que ocorra a expressão gene *tet* associado (CHOPRA & ROBERTS, 2001; RAMOS et al., 2005; THAKER et al.,2010).

3.4.3 Resistência aos Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos que se ligam à fração 30S dos ribossomos impedindo a leitura correta do RNA mensageiro e a síntese proteica correspondente (VAKULENKO & MOBASHERY, 2003). Possuem um amplo espectro de ação e apresentam sinergismo com outros agentes antimicrobianos. Em meados de 1940, foi descoberto o primeiro aminoglicosídeo, a estreptomicina, obtida de *Streptomyces griseus* e usada com sucesso no tratamento da tuberculose (FIGURA 4). Após a descoberta inicial da estreptomicina e seu sucesso na prática clínica, diversos aminoglicosídeos foram caracterizados, como a neomicina (1949), canamicina (1957), gentamicina (1963) e tobramicina (1967) (BECKER & COOPER, 2013).

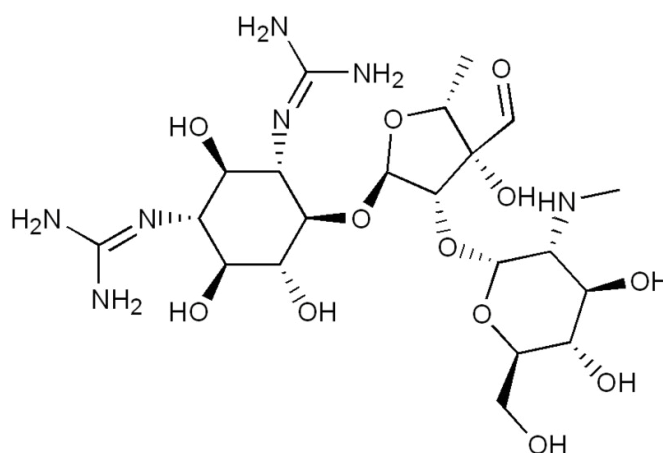


FIGURA 4 – Estrutura química da estreptomicina.

A resistência aos aminoglicosídeos é disseminada entre micro-organismos e pode ser causada por i) efluxo ativo, ii) diminuição da permeabilidade da célula, iii) alteração nos ribossomos e iv) inativação da droga por enzimas (VAN HOEK et al., 2011). A modificação enzimática é o mecanismo mais comum de resistência aos aminoglicosídeos. Dependendo do tipo de modificação, as enzimas são classificadas em aminoglicosídeo acetiltransferases (AAC), aminoglicosídeo adeniltransferases (AAD) (também conhecidas como aminoglicosídeo nucleotidiltransferases [ANT]) e aminoglicosídeo fosfotransferases (APH) (BECKER & COOPER, 2013).

Diferentes sistemas de nomenclatura para as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) podem ser usados. O primeiro refere-se à ação enzimática e consiste em três letras (AAC, ANT, APH), seguidas de um número entre parênteses que identifica o lugar da modificação e, logo após, um numeral romano para designar a subclasse ou subtipo, por exemplo, AAC(3)-IIa. O outro sistema de nomenclatura refere-se ao gene codificante, utilizando três letras minúsculas em itálico para cada tipo de atividade (*aac*, *aad*, *aph*), uma letra maiúscula para identificar o local da modificação e um número para o subtipo do gene. A designação *aph(3'')-Ib*, por exemplo, refere-se ao tipo de modificação (*aph* para aminoglicosídeo fosfotransferase), a posição onde a modificação é introduzida (3'') e também lista o subtipo do gene (*Ib*). A designação *strA*, usada para o mesmo gene, é uma nomenclatura alternativa que se baseia apenas no fenótipo de resistência correspondente (*str* para resistência à estreptomicina) e no subtipo do gene (A) (MICHAEL et al., 2006; SCHWARZ et al., 2006).

Existem quatro classes e inúmeras subclasses das enzimas AACs: AAC(1), que não possui subclasses; AAC(3)-I a X; AAC(2')-I e AAC(6')-I a IV (BECKER & COOPER, 2013). Dentre essas quatro diferentes classes de N-acetiltransferases, apenas aquelas que induzem acetilação na posição 3' [AAC(3)] e 6' [AAC(6')] têm sido detectadas em isolados de *Salmonella* (MICHAEL et al., 2006). O genes de resistência à gentamicina *aac(3)-IIa*, *aac(3)-III* e *aac(3)-IV* são exemplos de genes pertencentes à família AAC(3) detectados em *Salmonella* (LIM et al., 2013; BEUTLICH et al., 2013). A enzima com maior relevância clínica dentro da classe AAC(6') é codificada pelo gene *aac(6')-Ib*. Ele está presente em 70 % dos isolados Gram-negativos carreadores de *aac(6')-I*, causando resistência a amicacina, sisomicina, tobramicina e netilmicina (BECKER & COOPER, 2013). Em *Salmonella*, o gene *aac(6')-Ib* foi identificado em cassete gênico inserido em integron de classe 1 (LAI et al., 2013).

As enzimas aminoglicosídeo fosfotransferases (APH), codificadas pelos genes *aph*, são responsáveis pela fosforilação de grupamentos hidroxila em aminoglicosídeos, resultando em uma mudança dramática na capacidade de ligação aos ribossomos. Sete classes e algumas subclasses dessas enzimas, APH(2'')-I a IV, APH(3')-I a VII, APH(3'')-I, APH(4)-I, APH(6)-I, APH(7'')-I e APH(9)-I têm sido identificadas (VAKULENKO & MOBASHERY, 2003; BECKER & COOPER, 2013). Apenas aquelas cuja fosforilação ocorre na posição 3', 3'' e 6 têm sido identificadas no gênero *Salmonella*. O gene *aph(3')-IIa*, responsável pelo fenótipo de resistência à canamicina e neomicina, foi identificado recentemente entre isolados de *Salmonella* na Áustria, assim

como o gene *aph(3')-IIIa*, o qual confere resistência adicional à amicacina (WÖGERBAUER et al., 2013). Os genes *aph(3'')-Ib* (também conhecido como *strA*) e *aph(6)-Id* (também conhecido como *strB*) são responsáveis pela resistência apenas à estreptomicina. O *aph(3'')-Ib* foi o gene mais encontrado entre isolados de origem clínica pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, com prevalência de 65,4 % (MIRÓ et al., 2013). Frequentemente, esses genes são encontrados fisicamente ligados um ao outro e precedidos ou seguidos do gene *sul2*, responsável por promover resistência às sulfonamidas (YAU et al., 2010; ANANTHAM & HALL, 2012).

As enzimas aminoglicosídeo adeniltransferases (AAD) (também conhecidas como aminoglicosídeo nucleotíditransferases [ANT]) apresentam-se divididas em cinco classes: ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6) e ANT(9). Não existem subclasses com exceção do ANT(4'), que inclui as subclasses I e II. Embora sejam a menor família de AMEs, apresentam grande importância clínica, porque conferem resistência à tobramicina, amicacina e gentamicina (BECKER & COOPER, 2013). Em *Salmonella*, aqueles genes cujos produtos atuam nas posições 3' [*aadA*, *ant(3'')*] e 2'' [*aadB*, *ant(2'')*] são identificados frequentemente. No grupo *aadA*, que confere resistência à estreptomicina e espectinomicina, pelo menos 12 subtipos foram relatados entre isolados de *Salmonella* e estão disponíveis no banco de dados: *aadA1*, *aadA2*, *aadA4*, *aadA5*, *aadA6*, *aadA7*, *aadA12*, *aadA21*, *aadA22*, *aadA23*, *aadA24* e *aadA26* (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Muitos desses genes são encontrados em cassetes gênicos localizados em integrons. Em *Salmonella* sorovar 4,[5],12:i:2-, os genes *aadA1* e *aadA2* foram encontrados como cassetes gênicos localizados em integrons de classe 1, os quais, por sua vez, estavam localizados em plasmídeos do tipo IncA/C (GARCÍA et al., 2011). Pérez-Moreno e colaboradores (2013) relataram a presença dos genes *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadA7* e *aadA13* em cassetes gênicos de integrons de classe 1 em diferentes sorovares de *Salmonella*.

3.4.4 Resistência aos Fenicóis

Em 1947, o cloranfenicol foi purificado a partir de *Streptomyces venezuelae* por David Gottlieb. O cloranfenicol é molécula com estrutura simples e, por esse motivo, um pequeno número de derivados pode ser sintetizado a partir da molécula original, sem haver efeitos adversos na atividade antimicrobiana. Para a síntese de azidanfenicol, dois átomos de cloro (-Cl₂) são substituídos por um grupo azida. O tianfenicol difere do

cloranfenicol pela presença de um grupo sulfometilo (-SO₂CH₃) no lugar de um grupamento *p*-nitro (-NO₂). O florfenicol é um análogo do tianfenicol e apresenta um átomo de flúor (-F) no lugar do grupo hidroxila (-OH) (SCHWARZ et al., 2004; VAN HOEK et al., 2011).

O cloranfenicol é um agente antimicrobiano muito eficaz no tratamento de uma gama considerável de enfermidades. Entretanto, é uma droga extremamente tóxica, podendo causar anemia aplástica devido à depressão profunda da atividade da medula óssea levando à pancitopenia (diminuição de todas as células do sangue) em indivíduos hipersensíveis. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento proibiu o uso deste antimicrobiano em animais de produção (BRASIL, 2003), seguindo o banimento que já havia ocorrido na maioria dos países. Enquanto o cloranfenicol não é licenciado para o uso em animais de produção, o florfenicol é indicado para tratamento de infecções do trato respiratório e digestório de suínos e bovinos.

Os agentes antimicrobianos do grupo dos fenicóis ligam-se reversivelmente à subunidade 50S do ribossomo bacteriano e inibem a síntese proteica. Cloranfenicol e florfenicol possuem um amplo espectro de ação e atuam bacteriostaticamente contra micro-organismos Gram-negativos, Gram-positivos, bactérias aeróbicas e anaeróbicas, além de clamídias, riquetsias e micoplasmas (SHAW, 1983; YAO & MOELLERING, 1999). O mecanismo de resistência mais comum em bactérias Gram-negativas é a inativação enzimática através de cloranfenicol acetiltransferases (CAT), as quais inativam o cloranfenicol, porém não o florfenicol. As CATs podem ser divididas em dois grandes grupos: tipo A e tipo B (SCHWARZ et al., 2004; WRIGHT, 2005). Em *Salmonella*, o gene *catA1* é o mais frequentemente encontrado, tendo sido detectado em plasmídeos de *S. Infantis* (DIONISI et al., 2011), *S. Typhimurium* (BEUTLICH et al., 2013) e *S. Typhi* (PARKHILL et al., 2001). Entre os genes que codificam as CATs do tipo B, *catB3* foi detectado recentemente em cassetes gênicos localizados em integrons em *S. Typhimurium* e *S. Indiana* (LI et al., 2013; LAI et al., 2013).

Além da inativação enzimática, existem outros sistemas de resistência ao cloranfenicol, como a inativação por fosfotransferases, mutações no alvo da droga, alterações na permeabilidade e sistemas de efluxo ativo. Dentre eles, o mecanismo de efluxo ativo através dos genes *cmlA* e *floR* é o mais conhecido (VAN HOEK et al., 2011). O gene *cmlA* causa resistência ao cloranfenicol, mas não ao florfenicol. Entre isolados de *Salmonella*, o gene exportador *cmlA* foi identificado em cassete gênico localizado em integrons de classe 1 em *S. Indiana* (MENG et al., 2011) e *S. Stanley*

(KRAULAND et al., 2010). Uma variante do gene, denominada *cmlA9*, foi identificada como parte de uma ilha de multi-resistência SGI-2 em *S. Emek* (LEVINGS et al., 2008).

O gene *floR*, também denominado como *flo*, *flo_{St}*, *pp-flo* ou *cmlA-like*, é um exportador de cloranfenicol e florfenicol. Apesar da variação na nomenclatura, esses genes apresentam estreita relação e apresentam 96-100% de identidade em suas seqüências de nucleotídeos e 88-100% de identidade na seqüência de aminoácidos (SCHWARZ et al., 2004). O gene *floR* foi identificado como parte da ilha de multi-resistência SGI-1, localizada no cromossomo de *S. Typhimurium* DT104 (BRIGGS & FRATAMICO, 1999). Adicionalmente, o gene *floR* tem sido identificado em plasmídeos de multi-resistência IncA/C de *S. Typhimurium* (WIESNER et al., 2011). O gene *floR* também foi identificado em plasmídeo de *S. Typhimurium* associado ao gene que codifica β -lactamases CMY-2 (TAMAMURA et al., 2013).

3.4.5 Resistência à Sulfonamidas e Trimetoprima

Desde 1968, a combinação de sulfonamidas e trimetoprima tem sido bastante usada no tratamento de infecções bacterianas devido, principalmente, ao seu baixo custo (FIGURA 5) (ROBERTS, 1998). Esses componentes são agentes antimicrobianos bacteriostáticos que atuam competitivamente inibindo enzimas envolvidas na síntese do ácido fólico. As sulfonamidas são análogas do ácido p-aminobenzóico, inibindo a enzima diidropteroato sintetase (DHPS), enquanto a trimetoprima atua inibindo a enzima diidrofolato redutase (DHFR) (ALCAINE et al., 2007). A combinação desses agentes é comumente utilizada para o tratamento de infecções do trato urinário ou respiratório de animais, mas também é utilizada em medicina humana. A utilização das sulfonamidas como aditivos ou como conservantes de alimentos para animais é proibida no Brasil (BRASIL, 2009).

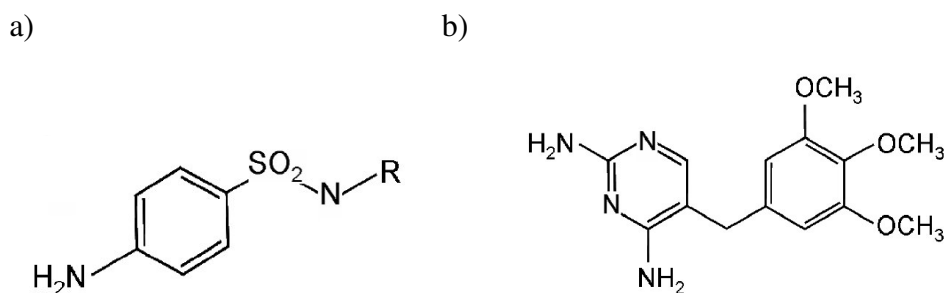


FIGURA 5 – a) Estrutura química da sulfonamida e b) trimetoprima.

A resistência às sulfonamidas em isolados de *Salmonella* tem sido atribuída à presença do gene *sul*, o qual codifica uma variante resistente da enzima alvo diidropteroato sintetase (DHPS). Três principais genes *sul* têm sido identificados: *sul1*, *sul2* e *sul3* (VAN HOEK et al., 2011). O gene *sul1* foi relatado em diversos sorovares de *Salmonella* e, frequentemente, é relatado como parte da região conservada de integrons de classe 1 (PÉREZ-MORENO et al., 2013). O gene *sul2* pode aparecer fisicamente ligado ao *cluster* de resistência à estreptomicina *strA-strB*, comumente encontrado em plasmídeos mas não relacionado com integrons (YAU et al., 2010). Diferentes sorovares de *Salmonella*, como Typhimurium e 4,[5],12:i:-, revelaram a presença do gene *sul2* (BEUTLICH et al., 2013; MULVEY et al., 2013). A ligação entre o gene *sul3* e o integron de classe 1 foi evidenciada em *S. Choleraesuis* e *S. Typhimurium* (CHIU et al., 2005; ANTUNES et al., 2007). Essa pode ser uma das razões para a rápida disseminação de genes *sul3* nos últimos anos.

A resistência à trimetoprima é atribuída à expressão da variante resistente da enzima DHFR. De acordo com a estrutura, essas enzimas são subdivididas em duas famílias, que são codificadas pelos genes *dfrA* e *dfrB* (VAN HOEK et al., 2011). Membros do grupo *dfrA* apresentam pelo menos 474 nucleotídeos (157 aminoácidos) e são encontrados frequentemente inseridos em cassetes gênicos. O cassete gênico contendo *dfrA1* é comumente relatado e já foi encontrado, por exemplo, em *S. Braenderburg* (MARTÍNEZ et al., 2007), *S. Bredeney* (MICHAEL et al., 2008), *S. Newport* (KHAN et al., 2009) e *S. Paratyphi B* (DU et al., 2012). Os membros do segundo grupo *dfrB* possuem 237 nucleotídeos (78 aminoácidos) e são identificados com menor frequência que os membros do grupo *dfrA* (VAN HOEK et al., 2011). A primeira descrição do gene *dfrB* em *Salmonella* ocorreu em 2006, quando um cassete gênico contendo *dfrB6* foi encontrado em integron de classe 1 de *S. Infantis* (LEVINGS et al., 2006).

3.4.6 Resistência às Quinolonas e Fluoroquinolonas

As quinolonas representam uma classe de agentes antimicrobianos sintéticos eficazes no tratamento de diversas infecções, principalmente as de origem bacteriana. A primeira quinolona, o ácido nalidíxico, foi introduzido na clínica médica em 1962 (FIGURA 6) (ALCAINE et al., 2007; VAN HOEK et al., 2011). Este agente antimicrobiano foi utilizado no tratamento de infecções do trato urinário causadas por

enterobactérias. No Brasil, é vedado o uso das quinolonas como aditivos ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009), porém são moléculas muito utilizadas na terapêutica de diversas infecções que acometem suínos (BARCELLOS et al., 2012).

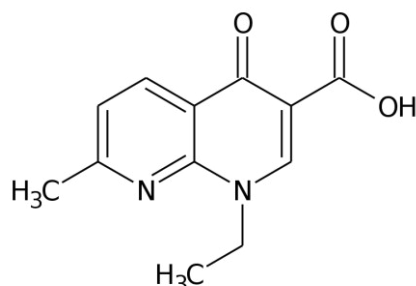


FIGURA 6 – Estrutura química do ácido nalidíxico.

A segunda geração das quinolonas surgiu quando ficou comprovado que a adição de átomo de flúor na posição R6 da molécula de quinolona, criando uma fluoroquinolona, aumentava sua atividade biológica. Durante os anos 80, várias fluoroquinolonas foram desenvolvidas, como ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina. Esses compostos apresentavam maior atividade contra bactérias Gram-negativas, eram ativas contra algumas espécies Gram-positivas e atingiram uma atividade antibacteriana mil vezes superior ao ácido nalidíxico (WOLFSON & HOOPER, 1989; HOOPER, 2000; KING et al., 2000). Posteriormente, novas alterações resultaram no desenvolvimento da terceira geração de fluoroquinolonas, como levofloxacina e esparfloxacina, alcançando potente atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (HOOPER, 2000; KING et al., 2000).

As quinolonas inibem a ação das enzimas DNA girase e topoisomerase IV, essenciais para a replicação do DNA na célula bacteriana. A DNA girase é composta por duas subunidades GyrA e GyrB. A topoisomerase IV apresenta uma estrutura similar, também composta por duas subunidades denominadas ParC e ParE (HOOPER, 2000). A resistência de *Salmonella* às quinolonas está relacionada a dois mecanismos. O primeiro mecanismo é mediado por mutações cromossômicas em genes que codificam proteínas alvo, como as enzimas DNA girase e topoisomerase IV. O segundo mecanismo envolve alterações na expressão do sistema de efluxo AcrAB-TolC, principalmente devido a mutações nos genes reguladores, resultando na super-expressão do sistema de efluxo (ALCAINE et al., 2007; FÀBREGA et al., 2009).

O ponto de mutação mais importante em *Salmonella* é no gene *gyrA*, o qual codifica a subunidade A da enzima DNA girase. As mutações em *gyrA* ocorrem em uma região entre os aminoácidos 67 e 106, chamada região determinante de resistência às quinolonas (*quinolone resistance-determining region-QRDR*). Substituições no aminoácido Ser-83 (por Phe, Tyr ou Ala) ou no aminoácido Asp-87 (por Gly, Asn ou Tyr) são frequentemente observadas em cepas resistentes ao ácido nalidíxico (BALLESTÉ-DELPPIERRE et al., 2013; VELHNER et al., 2013). Mutações duplas nos resíduos 83 e 87 já foram identificadas em isolados clínicos de *S. Typhimurium* DT204 com elevada resistência às fluoroquinolonas (HEISIG et al., 1995). Nos últimos anos, duas mutações em *gyrA* foram identificadas dentro da região QRDR em um isolado de *S. Typhi*. A primeira substituição foi comum, induzindo a troca de serina por fenilalanina no códon 83. No entanto, a segunda mutação foi inédita, com substituição de uma citosina por timina no nucleotídeo 248, resultando na troca do ácido aspártico por valina no códon 87 (KOIRALA et al., 2012).

Uma mutação espontânea dupla é considerada um evento genético raro, ocorrendo na frequência de 10^{-14} a 10^{-16} para fluoroquinolonas. Por esse motivo, um fenômeno mutacional não fornece explicação satisfatória para a frequência com a qual a resistência tem surgido. Em 1998, foi descoberto o primeiro plasmídeo mediando resistência às quinolonas (*Plasmid-mediated quinolone resistances-PMQR*), devido à presença do gene *qnrA* (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 1998). A proteína Qnr protege o complexo DNA girase, alvo das quinolonas e fluoroquinolonas, promovendo a resistência às quinolonas e suscetibilidade reduzida as fluoroquinolonas. Mais genes *qnr*, como *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS* foram descritos posteriormente (VAN HOEK et al., 2011).

Em *Salmonella*, o gene *qnrA3* foi detectado em *S. Enteritidis* isolada de humanos em Hong Kong (CHEUNG et al., 2005; CHU et al., 2006). Dentre a família de proteínas QnrB, o gene *qnrB19* foi identificado em um isolado de *S. Typhimurium*, obtido em 2004, de um caso de gastroenterite humana na Itália (DIONISI et al., 2009). Além disso, o gene *qnrB19* foi detectado em isolado de *S. Typhimurium* de humanos na Holanda (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2009; HAMMERL et al., 2010; VELDMAN et al., 2011), em isolados de *Salmonella* de répteis na Alemanha (DIERIKX et al., 2010, GUERRA et al., 2010), bem como em isolados de *Salmonella* de humanos na Coreia (JEONG et al., 2011). Existem relatos ainda do gene *qnrD1* em isolados de *S. Kentucky* e *S. Bovismorbificans* na China (CAVACO et al., 2009). O gene *qnrS1* foi também

encontrado entre isolados de *Salmonella* no Reino Unido e Holanda (HOPKINS et al., 2007; GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2009).

Além dos genes *qnr*, um segundo gene de resistência às quinolonas localizado em plasmídeos, o gene *aac(6')-Ib-cr*, foi identificado. Esse gene codifica a enzima aminoglicosídeo acetiltransferase, a qual confere resistência à canamicina e suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina e norfloxacina (ROBICSEK et al., 2006). O gene *aac(6')-Ib-cr* foi observado em *S. Enteritidis* concomitantemente com os genes *qnrA* e *qnrB* (AL-GALLAS et al., 2013). Uma nova variante do gene *aac(6')-Ib-cr*, designada *aac(6')-Ib-cr4*, foi encontrada em plasmídeo de *S. Typhimurium* (DE TORO et al., 2013). Adicionalmente, o gene plasmidial *qepA* foi responsável por promover resistência às quinolonas. O gene *qepA* possui duas variantes *qepA1* e *qepA2* (CATTOIR et al., 2008), as quais codificam uma bomba de efluxo capaz de expulsar fluoroquinolonas hidrofílicas, como a ciprofloxacina e a enrofloxacin (PÉRICHON et al., 2007; YAMANE et al., 2007). Um gene com 100 % de identidade com o *qepA* foi encontrado em *S. Typhimurium*, embora não tenha sido associado com o fenótipo de reduzida suscetibilidade às quinolonas (LUNN et al., 2010).

3.5 Transferência Horizontal de Genes de Resistência

A transferência horizontal de genes corresponde à transferência de material genético entre bactérias da mesma geração. Os genes de resistência adquiridos estão frequentemente localizados em elementos genéticos móveis, os quais possuem a capacidade de translocação de uma parte do genoma para outra ou entre genomas (VAN HOEK et al., 2011). Os elementos genéticos móveis podem se disseminar horizontalmente entre bactérias de mesma espécie, mas também entre diferentes espécies ou diferentes gêneros bacterianos (THOMAS et al., 2005). Muitos genes de resistência presentes em cepas de *Salmonella* estão também presentes em outros gêneros bacterianos. Um exemplo é o gene de resistência *aadA* que confere resistência combinada à estreptomicina e espectinomicina e pode ser encontrado tanto em bactérias Gram-negativas quanto em Gram-positivas (KEHRENBERG et al., 2005).

A disseminação de genes de resistência entre membros de diferentes espécies e gêneros bacterianos em condições naturais requer a transmissão horizontal por conjugação, transdução ou, menos frequentemente, por transformação (FIGURA 7). A transformação natural tem sido descrita para bactérias como *Haemophilus*,

Campylobacter ou *Pseudomonas*, entre outras (THOMAS et al., 2005). Os bacteriófagos também desempenham um papel importante na disseminação de DNA entre bactérias, atuando como veículo de genes de resistência. Em condições naturais, a conjugação é o mecanismo mais comum para transferência de plasmídeos e transposons. A conjugação é um processo no qual o contato entre as células é estabelecido e um poro é formado na parede bacteriana, para que ocorra a passagem de DNA da célula doadora para a receptora (VAN HOEK et al., 2011). A transferência horizontal de elementos genéticos móveis contribui para a aquisição, manutenção e disseminação de genes de resistência a agentes antimicrobianos (DOMINGUES et al., 2012). Alguns elementos incluindo plasmídeos, transposons, integrons e cassetes gênicos, além de ilhas genômicas podem estar presentes em cepas resistentes aos agentes antimicrobianos.

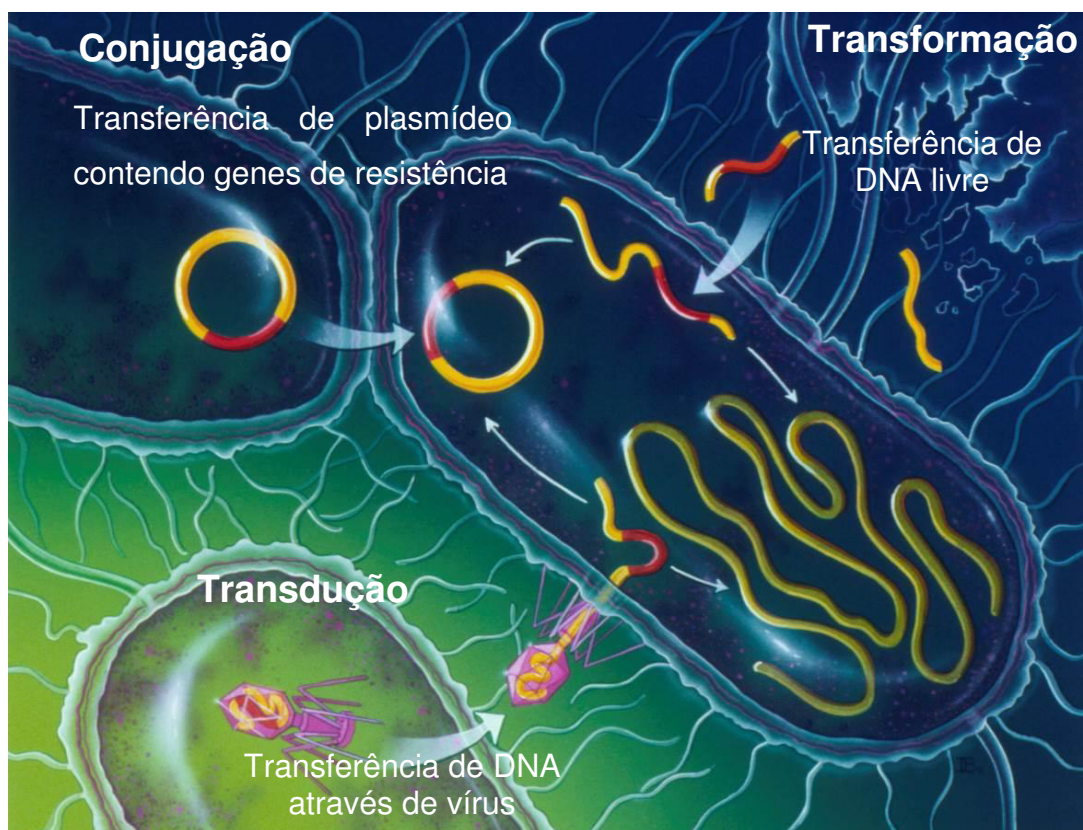


FIGURA 7 – Transferência horizontal de genes de resistência por conjugação, transformação e transdução (Copyright © Science Photo Library).

3.5.1 Plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas de DNA circular dupla fita que podem se replicar independentemente do DNA cromossômico da célula hospedeira. Os plasmídeos podem

estar presentes em quase todas as espécies bacterianas variando em tamanho e número de cópias por célula (WATERS, 1999). Eles podem abrigar genes essenciais para a iniciação e controle da replicação e genes acessórios que podem ser úteis para a célula hospedeira, como genes de resistência ou virulência (SCHWARZ et al., 2006). Os plasmídeos que possuem genes para a conjugação são chamados de conjugativos e apresentam uma origem de transferência (*oriT*). Os genes necessários para a conjugação plasmidial estão agrupados no operon *tra* de tamanho >15 kb (SMILLIE et. al., 2010). Sendo assim, plasmídeos conjugativos devem ser maiores que 20 kb. Os plasmídeos pequenos podem ser mobilizados juntamente com grandes plasmídeos durante o processo de conjugação (VAN HOEK et al., 2011).

Alguns tipos de plasmídeos não podem coexistir na célula bacteriana e esse fato deu origem à divisão em grupos de incompatibilidade (NOVICK, 1987; COUTURIER et al., 1988). Plasmídeos com o mesmo sistema de controle da replicação são chamados de “incompatíveis”, enquanto que plasmídeos com diferente sistema de controle da replicação são conhecidos como “compatíveis”. Dessa forma, dois plasmídeos pertencentes ao mesmo grupo Inc não podem se propagar na mesma linhagem celular (COUTURIER et al., 1988). A identificação do grupo Inc tem sido frequentemente utilizada para a classificação de plasmídeos. Em 2005, Carattoli e colaboradores desenvolveram um método para a identificação dos principais grupos de plasmídeos que circulam entre *Enterobacteriaceae*, denominado PCR baseado na tipagem do replicon (PBRT). Nesse método, 18 pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para a realização de cinco ensaios de multiplex PCR e três ensaios de simplex PCR, reconhecendo os grupos FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-I γ , L/M, N P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F e FIIA.

Os grupos de plasmídeos não ocorrem com a mesma frequência entre membros da família *Enterobacteriaceae*, com alguns sendo mais prevalentes e difusos que outros. Em 2008, García-Fernández e colaboradores desenvolveram um esquema de tipagem de sequências de plasmídeos (*plasmid multi-locus sequence typing* - pMLST) com o objetivo de identificar linhagens clonais relacionadas, semelhante ao MLST conduzido para genomas bacterianos. Esse método está disponível para a famílias de plasmídeos mais prevalentes em *Enterobacteriaceae*, como IncI1, IncF, IncHI2 e IncN (<http://pubmlst.org/plasmid/>) (CARATTOLI, 2013).

3.5.2 Transposons

Os elementos genéticos móveis mais simples são as sequências de inserção (IS). As ISs são pequenos segmentos de DNA (< 2,5 kb), os quais codificam apenas funções necessárias à transposição dentro e entre genomas e os genes das proteínas (transposases) que a promovem (SIGUIER et al., 2006; SCHWARZ et al., 2006). Quando uma IS possui genes acessórios, não envolvidos em sua translocação, recebe o nome de transposons. Um transposon simples contém apenas um gene acessório (normalmente gene de resistência) além do gene da transposase (ROBERTS et al., 2008). Os transposons são elementos de DNA dupla fita de tamanho variável (2 – 20 kb), que ao contrário dos plasmídeos, não possuem sistema de replicação autônoma. Esses elementos necessitam estar integrados no DNA cromossômico ou em plasmídeos para que ocorra a sua replicação (WOZNIAK et al., 2010).

Baseado em sua estrutura, os transposons podem ser diferenciados em transposons compostos ou complexos. A estrutura básica do transposons compostos pode ser esquematizada por: a) uma região central com genes não relacionados à transposição (geralmente genes de resistência a antimicrobianos) e b) dois módulos que delimitam essa região central e que são sequências de inserção, as quais codificam as atividades de transposição. Exemplos de transposons compostos são o *Tn5* (REZNIKOFF, 2002) conferindo resistência aos aminoglicosídeos e o *Tn7* (CRAIG, 2002), que confere resistência à trimetoprima e aminoglicosídeos. Os transposons complexos geralmente possuem repetições invertidas curtas nas extremidades que variam de 15 a 40 pb e uma região de repetição interna, a qual separa a parte responsável pelas funções de transposição da parte responsável pelas funções de resistência. O *Tn1721* que abriga o gene de resistência à tetraciclina *tet(A)* é um exemplo de transposon complexo (HENTSCHKE et al., 2010).

A movimentação de transposons desempenha um importante papel na aquisição de genes de resistência aos antimicrobianos em *Salmonella*. Transposons abrigando genes de resistência à tetraciclina já foram descritos em diversas bactérias, incluindo membros da família *Enterobacteriaceae*. O gene de resistência à tetraciclina *tet(A)*, que codifica uma proteína de efluxo, é associado com o transposon *Tn1721* em diversos sorovares de *Salmonella* (GARCÍA et al., 2011). O gene *bla_{TEM-1}*, que confere resistência à ampicilina, tem sido detectado no transposon *Tn3* localizado em plasmídeos conjugativos e não conjugativos, ou no DNA cromossômico de *Salmonella*

(PASQUALI et al., 2005; MARTÍNEZ et al., 2010). Além desses transposons, o Tn10 abrigando o gene *tet(B)*, o qual confere resistência à tetraciclina, já foi descrito em *Salmonella* (CAIN & HALL, 2012a). O gene *catA1*, responsável pela resistência ao cloranfenicol, foi também descrito como parte de um Tn9 em plasmídeos de multi-resistência de *Salmonella* (MARTÍNEZ et al., 2007). O estudo de Cain & Hall (2012b) demonstrou a presença de um plasmídeo, abrigando 10 genes de resistência a antimicrobianos, em um transposon derivado do Tn2670 em *S. Typhimurium*.

3.5.3 Ilhas Genômicas

A ilha genômica 1 de *Salmonella* (SGI1) apresenta um tamanho de 43 kb e contém uma região de multi-resistência conferindo resistência à ampicilina, cloranfenicol/florfenicol, estreptomicina/espectinomicina, sulfonamida e tetraciclina, codificada pelos genes *bla_{PSE-1}*, *floR*, *aadA2*, *sul1* e *tet(G)*. Os genes de resistência estão localizados dentro de integrons, denominados In104, os quais pertencem à família In4 (MULVEY et al., 2006). A SGI1 é transferida horizontalmente e foi identificada como elemento integrativo mobilizável (DOUBLET et al., 2005). A ilha foi primeiramente identificada em uma cepa multi-resistente de *S. Typhimurium* fagotipo DT104 (BOYD et al., 2001). Subsequentemente, a SGI1 também foi identificada em outros sorovares de *Salmonella* e em *Proteus mirabilis* (AHMED et al., 2007; DOUBLET et al., 2004a, DOUBLET et al., 2004b).

Desde a descoberta da SGI-1, inúmeras variantes têm sido descritas entre os sorovares de *Salmonella*. A maioria delas demonstra um ganho, perda ou troca de genes de resistência. Beutlich e colaboradores (2011) identificaram sete diferentes variantes de SGI1 associadas com multi-resistência. Os autores relataram a presença de SGI1-A e SGI1-C no sorovar Derby, SGI1-F em Albany, SGI1-L em Newport, SGI1-K em Kentucky e SGI1-M em Typhimurium. Também foi encontrada uma nova variante semelhante à SGI1-C com resistência adicional à gentamicina, codificada pelo gene *aadB*. Um estudo retrospectivo com cepas de *S. Kentucky* isoladas de pacientes humanos entre 1969 e 1999 revelou a presença de uma nova variante, denominada SGI1-J6, contendo os genes *aadA2*, *floR2*, *tet(R)*, *tet(G)* e *sul1* localizados em um complexo integron. Além disso, uma nova sequência de inserção denominada ISSen5 foi identificada inserida na ORF S023 de SGI1 (LE HELLO et al., 2012). Esses estudos

demonstram que uma grande diversidade fenotípica e genotípica pode ser observada entre isolados positivos para SGI1.

3.5.4 Integrons

O termo integron descreve uma grande família de elementos genéticos capazes de capturar pequenos elementos, denominados cassetes gênicos (FIGURA 8) (HALL, 2012). O principal componente de um integron funcional é o gene *intl*, responsável pela produção da enzima integrase. Essa enzima catalisa a excisão e integração de cassetes gênicos. A integração do cassete ocorre em um lugar específico imediatamente adjacente ao gene *intl*, denominado sítio de recombinação primário (*attI*). Os integrons apresentam uma região promotora, a qual é responsável pela expressão dos cassetes gênicos. A expressão desses genes ocorre através do promotor P_c , que está incorporado no gene *intl* ou no sítio de recombinação *attI* (CAMBRAY et al., 2010). Os integrons consistem em dois segmentos conservados (CS), 5'-CS e 3'-CS, os quais flanqueiam a região variável que contém um ou mais cassetes gênicos. A parte 5'-CS contém o gene da integrase, o sítio de recombinação e o promotor. A parte 3'-CS abriga o gene *qacEΔ1*, gene semi-funcional derivado do gene *qacE* que confere resistência aos compostos quaternários de amônia, o gene de resistência a sulfonamidas *sulI* e uma fase de leitura aberta de função desconhecida denominada ORF5 (SCHWARZ et al., 2006).

Os cassetes gênicos estão entre os mais simples elementos genéticos móveis, porém não são móveis por si só, requerem a ação da Intl. O cassete gênico geralmente consiste em um único gene ou uma fase de leitura aberta (*open reading frame*) e um sítio de recombinação *attC*, o qual permite que ele seja reconhecido pela Intl e, portanto, essencial para a mobilidade do cassete (HALL, 2012). O sítio de recombinação foi originalmente chamado de elemento de 59 bases (*59-base element*), no entanto, pode variar de tamanho de 57 pb até 140 pb. Devido à natureza da recombinação sítio-específica que promove a integração de um cassete na forma circular livre, uma pequena parte do *attC* é encontrado no começo do cassete linearizado e outra parte no final (RECCHIA & HALL, 1995).

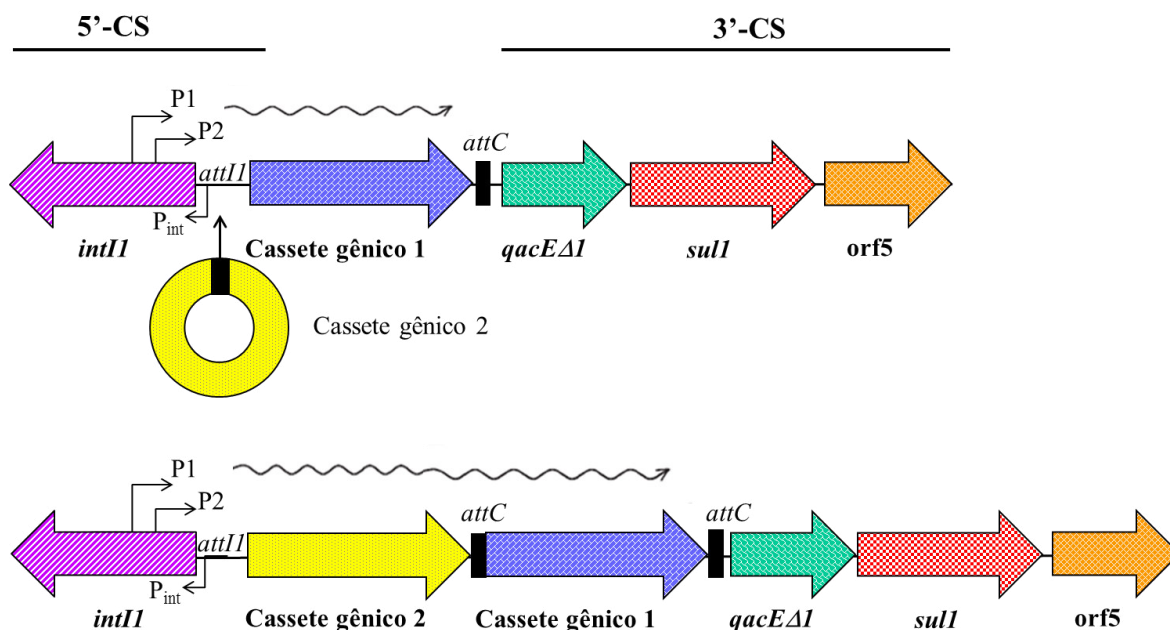


FIGURA 8 – Representação esquemática de um integron classe 1 e um modelo para a aquisição de cassetes gênicos.

Diferentes classes de integrons foram definidas de acordo com a homologia das sequências de integrases, sendo que as classes 1, 2 e 3 estão frequentemente envolvidas na disseminação de fenótipos de multi-resistência e têm maior ocorrência quando comparadas a outras classes (CAMBRAY et al., 2010). Membros da mesma classe possuem a mesma integrase, porém podem conter diferentes cassetes gênicos. As integrases de diferentes classes são distinguidas através de diferenças em suas sequências de aminoácidos. A *IntI1* apresenta 46 % de identidade com a *IntI2*, enquanto que *IntI1* apresenta 60 % de identidade com a *IntI3* (HALL, 2012). Desde 2009, foi desenvolvido um banco de dados exclusivo para sequências de integrons, integrases e cassetes gênicos, denominada INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt>) (MOURA et al., 2009). Realizando uma busca com a palavra “Salmonella” no campo “Organism”, foram encontrados 275 registros de integrons e cassetes gênicos (último acesso em 15/02/2014).

Os integrons de classe 1 são os mais disseminados e clinicamente importantes, sendo detectados em 22% a 59 % dos isolados de bactérias Gram-negativas. Geralmente, estão associados com transposons funcionais e não funcionais derivados de *Tn402*, os quais podem estar alojados em grandes transposons como o *Tn21* (CAMBRAY et al., 2010). Integrons de classe 1 são os mais frequentes também entre isolados do gênero *Salmonella*. Um conjunto diversificado de integrons de classe 1,

revelando oito diferentes tipos de cassetes gênicos, foi observado em estudo recente (HSU et al., 2013). Nesse estudo, o gene *intI1* esteve presente em 83,6 % de uma coleção de 499 isolados de *Salmonella* obtidos de humanos e animais, pertencendo a diferentes sorovares. Entre as cepas positivas para o gene *intI1*, 86,3 % apresentaram o integron de classe 1 abrigando cassetes gênicos, os quais revelaram tamanhos variando entre 1 e 2 kb, e 13,7 % apresentaram o integron de classe 1 vazio, sem a presença de cassetes gênicos.

3.6 Teste de Suscetibilidade

A suscetibilidade *in vitro* de bactérias aos agentes antimicrobianos ainda é determinada de forma mais frequente por testes fenotípicos, embora métodos genotípicos venham ganhando cada vez mais espaço na rotina laboratorial. Diversos métodos fenotípicos podem ser empregados para predizer a suscetibilidade de bactérias aos agentes antimicrobianos: teste de disco-difusão, E-test, diluição em ágar, micro-diluição ou macro-diluição em caldo, alguns desses são qualitativos e outros quantitativos. Os testes devem ser realizados de acordo com procedimentos aceitos internacionalmente, como aqueles publicados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), pela *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2013), pela *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (WOOTTON, 2013), pelo *Comité de L'Antibiogramme de La Société Française de Microbiologie* (CASFM, 2012), entre outros.

3.6.1 Testes Fenotípicos de Suscetibilidade

Em princípio, três testes são baseados na determinação fenotípica de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos: o teste de disco-difusão, o Etest e os testes de diluição. O objetivo de todos esses é classificar os micro-organismos nas categorias “suscetível”, “intermediário” ou “resistente” ao agente antimicrobiano testado. O resultado do teste de suscetibilidade poderá fornecer um prognóstico em relação à eficácia do agente antimicrobiano.

Os testes de disco-difusão devem seguir metodologias padronizadas e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionadas às concentrações inibitórias mínimas (*Minimal Inhibitory Concentration* - MIC) de cepas reconhecidamente suscetíveis e

resistentes aos diversos agentes antimicrobianos. Para a realização do teste de disco-difusão, uma suspensão bacteriana definida (inóculo) é semeada na superfície seca da placa de ágar Mueller-Hinton. Um conjunto pré-determinado de discos, impregnados com agentes antimicrobianos em concentrações conhecidas, é colocado na superfície da placa de ágar semeada. Após 16-18 horas de incubação a temperatura de 35 °C, os diâmetros dos halos de inibição são mensurados e o micro-organismo classificado após consulta a tabelas de referência, como “suscetível”, “intermediário” ou “resistente”. Esse método fornece apenas resultados qualitativos.

O E-test é um método de difusão em ágar que permite a determinação da concentração inibitória mínima. Os procedimentos de preparação do inóculo e semeadura são similares ao anteriormente referido. Uma fita plástica, disponível comercialmente, impregnada com concentrações crescentes do agente antimicrobiano é adicionada à placa semeada. A determinação do valor de MIC é feita considerando-se o ponto de intersecção da fita e a zona de inibição do crescimento do micro-organismo, que assume a forma elíptica. Vários estudos demonstram que a MIC determinada pelo E-test apresenta concordância com os resultados obtidos em testes de diluição, embora a interpretação dos resultados possa ser dificultada em algumas situações.

Os métodos de diluição em caldo (microdiluição e macrodiluição) ou em ágar são considerados padrão para avaliar quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. O teste pode ser realizado em caldo ou ágar, os quais são preparados com concentrações crescentes dos agentes antimicrobianos. A seguir, os tubos ou as placas são inoculados com uma suspensão padrão do micro-organismo a ser testado. Após a incubação a 35 °C por 16-20 horas, examinam-se os tubos ou placas para verificar a presença de crescimento. O valor de MIC é registrado como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do micro-organismo. Os métodos de diluição garantem resultados quantitativos expressos em microgramas por mililitros, bem como categoriza os micro-organismos em suscetíveis ou resistentes.

Alguns aspectos são importantes para alcançar o sucesso na realização do teste de suscetibilidade. Entre esses aspectos estão: (i) a escolha correta do agente antimicrobiano a ser testado; (ii) o cumprimento dos requisitos descritos nas normas para a execução do teste, e (iii) a interpretação correta dos resultados. Com relação à interpretação, dois tipos de critérios estão disponíveis: pontos de corte clínicos e valores de corte epidemiológicos (BYWATER et al., 2006). Os pontos de corte clínicos devem

ser aplicados para estudos com ênfase terapêutica, nos quais o objetivo é determinar qual agente antimicrobiano é mais adequado para o tratamento. Valores de corte epidemiológicos devem ser usados para descrever a distribuição dos valores de MIC de uma população de bactérias. Os pontos de corte clínicos ou valores de corte epidemiológicos podem ser muito similares ou idênticos para a mesma bactéria ou droga, entretanto, os valores epidemiológicos não são, necessariamente, submetidos a testes de eficácia clínica, farmacocinética e farmacodinâmica (BYWATER et al., 2006; WATTS & LINDEMAN, 2006; SCHWARZ et. al., 2010).

3.6.2 Testes Genotípicos de Suscetibilidade

Os métodos genotípicos têm por objetivo a detecção de genes de resistência específicos. Devido à sensibilidade, especificidade e rapidez dos resultados, a PCR é o método de escolha para a detecção de genes de resistência. Geralmente, a PCR fornece resultados em menos de 24 horas, incluindo o tratamento da amostra para extração e purificação do DNA alvo, a amplificação, a separação dos produtos em gel de agarose e a visualização (AARTS et al., 2001). Os métodos fenotípicos para testes de suscetibilidade, como o disco-difusão, exigem o isolamento do micro-organismo a partir da amostra, o que pode demorar de 24 a 72 horas. No caso de micro-organismos fastidiosos ou de crescimento lento esse período pode ser consideravelmente mais longo. A detecção direta de genes de resistência em amostras clínicas, através da PCR, é possível antes que ocorra o isolamento e identificação da bactéria, permitindo uma terapia antimicrobiana precoce.

Outro método utilizado para a detecção de genes de resistência é a PCR em tempo real (*Real-time PCR*). A técnica monitora o número de cópias do genoma bacteriano durante o crescimento do micro-organismo na presença do agente antimicrobiano a ser testado (ROLAIN et al., 2004). Recentemente, Martín-Peña e colaboradores (2013) demonstraram a detecção de resistência a imipenem, ciprofloxacina, colistina e amicacina em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* usando um ensaio de PCR em tempo real. Uma das principais vantagens deste método, comparado ao ensaio de PCR convencional, é a avaliação indireta da expressão dos genes de resistência.

A técnica de micro-arranjos é um método alternativo para a detecção de uma ampla variedade de genes de resistência. Nesse método, sondas específicas para

milhares de genes são depositadas em um suporte sólido, geralmente placas de vidro. O DNA é marcado e hibridizado no arranjo e a estrutura é detectada por uma molécula fluorescente (CALL et al., 2003). Os micro-arranjos são ideais para bactérias que apresentam diversos mecanismos de resistência ou variantes de um único mecanismo, como é o caso das enzimas β -lactamases. Grimm e colaboradores (2004) desenvolveram e validaram um micro-arranjo para a identificação de ESBL em bactérias Gram-negativas através da genotipagem simultânea dos genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*. O arranjo foi capaz de detectar mutações responsáveis por 156 substituições de aminoácidos em um período de 5 horas.

CAPÍTULO 2

Antimicrobial resistance patterns in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from feed, pigs and carcasses in Brazil

1 **Antimicrobial resistance patterns in *Salmonella enterica* subsp.**
2 ***enterica* isolated from feed, pigs and carcasses in Brazil**

3

4

5 Graciela Volz Lopes¹, Caroline Pissetti¹, Débora da Cruz Payão
6 Pellegrini^{1,2}, Luis Eduardo da Silva¹, Marisa Cardoso^{1*}

7

8

9

10 ¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio
11 Grande do Sul (UFGRS), Porto Alegre, Brazil;

12 ² Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA),
13 Campus Uruguiana, Brazil.

14

15 Key words: antimicrobial susceptibility testing; swine; feed mills; resistance genes.

16

17

18 (Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Journal of Food Protection*).

19

20

21 * Author for correspondence. Tel: +55-51-3308-6123; Fax: +55-51-3308-7305; E-mail:
22 mcardoso@ufrgs.br.

23

ABSTRACT

24

25 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* plays a role as food-borne pathogens worldwide.
26 The consumption of contaminated pork has been associated with human salmonellosis
27 and the increases on antimicrobial resistance are a concern among *Salmonella* strains
28 from pigs and pork products. A total of 225 *Salmonella* isolates from feed mills, lairage
29 environment, intestinal content of pigs and carcasses were investigated for their
30 antimicrobial susceptibility. The minimum inhibitory concentration (MIC) for
31 ciprofloxacin was screened by agar dilution and antimicrobial resistance genes were
32 investigated by PCR assays. Among tested isolates, 171 (76%) showed resistance to at
33 least one antimicrobial agent and 91 (40.4%) were multi-resistant. Resistance occurred
34 most frequently to tetracycline (54.5%), sulphonamides (39.6%) and streptomycin
35 (33.7%). Thirty-two (94.1%) nalidixic acid-resistant isolates exhibited decreased
36 susceptibility to ciprofloxacin. The resistance genes found were: *bla*_{TEM} (ampicillin),
37 *tet*(A) (tetracycline), *tet*(B) (tetracycline/minocycline), *sul1*, *sul2* and *sul3*
38 (sulphonamides), *catA1* (chloramphenicol), *floR* (florfenicol/chloramphenicol), *strA* and
39 *strB* (streptomycin), *aph*(3')-Ia (kanamycin), *aac*(3)-IIa and *aac*(3)-IVa
40 (apramycin/gentamicin), *aadA* variant (streptomycin/spectinomycin), and *dfpA1*
41 (trimethoprim). *Salmonella* strains from pig feces and carcasses displayed higher
42 frequency of resistance to most antimicrobials tested than strains from feed mills.
43 Common resistance genes profiles were found in isolates from lairage, intestinal content
44 of pigs and carcasses, demonstrating that resistance genes selected on farm are present
45 in pork.
46

47 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* figures among the leading causes of food-
48 borne diseases in humans worldwide. Pigs have been recognised as a source of
49 *Salmonella* (2, 5, 10) and the consumption of contaminated pork has been associated
50 with a significant number of human cases of salmonellosis in the European Union (25).
51 *Salmonella* infection in swine herds of Southern Brazil has been demonstrated by
52 isolation and serology surveys (43) and a high prevalence of *Salmonella* isolation has
53 been found in pigs at slaughter (8), pork (12) and pork products (54). Besides carcasses
54 and pork, *Salmonella* was also reported in feedingstuffs and feed mills (25, 67); and
55 contaminated feed is considered a significant source of *Salmonella* transmission to pigs
56 (27).

57 Antimicrobial resistance has been considered one of the main concerns to human
58 and animal health. The increases on antimicrobial resistance among *Salmonella* strains,
59 particularly those that are resistant to multiple antimicrobial agents, have been observed
60 in pigs and pork products (20, 24, 55). In Southern Brazil, resistance to antimicrobial
61 agents among porcine *Salmonella* strains has been also reported and characterized (8,
62 42, 49, 50, 52, 54). Although, multi-resistant strains have been isolated from pigs at
63 slaughter (7, 51), the resistance pattern of strains originated from feed and carcasses has
64 been less investigated in this region.

65 Thus, this study aimed to assess the antimicrobial resistance rates in *Salmonella*
66 *enterica* subsp. *enterica* isolated from different steps of the swine production system
67 (feed, environment, intestinal content of pigs and carcasses) and to determine the
68 antimicrobial resistance phenotypes and genotypes.

69

70

MATERIALS AND METHODS

71 **Origin of strains.** During the period of 2008 to 2011, a total of 1,771 samples
72 were collected from different steps of the pig production chain in Brazil for monitoring
73 and surveillance studies (58, 59, 65). Samples were taken from the lairage environment,
74 intestinal content of pigs and carcasses at five slaughterhouses. In the same period,
75 samples were taken from different steps of the feed manufacturing process at four feed
76 mills (feed ingredients, feed and dust deposited on the floor and on the inner surface of
77 storage bins, bucket elevators, mills, mixers, scales, pelleting chamber and cooler).

78 All samples were submitted to a *Salmonella* isolation protocol consisted of non-
79 selective pre-enrichment, selective enrichment in Tetrathionate and Rappaport-
80 Vassiliadis broths, and plating onto selective solid medium Xylose Lysine Tergitol 4
81 agar (XLT4; Merck, Darmstadt, Germany) and Brilliant-green Phenol-Red Lactose
82 Sucrose agar (BPLS; Merck). Typical colonies were submitted to biochemical and
83 serological confirmation. *Salmonella* isolates were serotyped at the National Reference
84 Centre, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, according to the
85 Kauffmann-White scheme.

86 A total of 225 *Salmonella* isolates from the aforementioned studies were selected
87 for resistance testing: fifty-four (n=54) *Salmonella* strains isolated from feed mills,
88 thirty (n=30) from lairage environment, twenty-five (n=25) from intestinal content of
89 pigs and one hundred sixteen (n=116) from carcasses. All strains were kept frozen until
90 testing.

91

92 **Antimicrobial susceptibility testing.** *Salmonella* strains were tested for
93 antimicrobial susceptibility against 12 different antimicrobial agents, including the
94 antimicrobials critically important for human medicine. The agar disc diffusion method
95 was performed and evaluated according to the specifications of the Clinical and

96 Laboratory Standards Institute (CLSI), documents VET01-S2 (16) and M100-S23 (17).
97 The following discs (Oxoid; Basingstoke, UK) were used: ampicillin (AMP, 10 µg),
98 cefotaxime (CTX, 30 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg), chloramphenicol (CHL, 30 µg),
99 ciprofloxacin (CIP, 5 µg), gentamicin (GEN, 10 µg), kanamycin (KAN, 30 µg),
100 nalidixic acid (NAL, 30 µg), streptomycin (STR, 10 µg), sulphonamides (SUL, 300 µg),
101 tetracycline (TET, 30 µg) and trimethoprim (TMP, 5 µg). *Escherichia coli* ATCC[®]
102 25922 was used as reference strain for quality control purposes. Antimicrobial multi-
103 resistance was defined as resistance to three or more classes of antimicrobial agents
104 (64). In multi-resistant strains displaying resistance to nalidixic acid, the minimum
105 inhibitory concentration (MIC) for ciprofloxacin was screened by agar dilution
106 following the recommendations of the CLSI document M07-A9 (15).

107

108 **Antimicrobial resistance genes profiling.** *Salmonella* strains that displayed
109 multi-resistance profile on the disc diffusion testing were investigated for the presence
110 of several resistance genes previously reported in this genus. Genomic DNA for the
111 PCR assays was prepared by thermal lysis procedure (single colonies resuspended in
112 200 µL of double-distilled water were heated for 5 min at 95°C and centrifuged for 10
113 min at 1500xg) or using the NucleoSpin[®] Tissue Kits (Macherey-Nagel; Düren,
114 Germany). Genes coding resistance to β-lactams (*bla*_{TEM} and *bla*_{PSE-1}), aminoglycosides
115 [*strA*, *strB*, *aadA*, *aadB*, *aac(3)-IIa*, *aac(3)-IVa*, *aph(3')-Ia*], tetracyclines [*tet(A-B)* and
116 *tet(G)*], sulphonamides (*sul1*, *sul2*, and *sul3*), phenicols (*floR* and *catA1*), and
117 trimethoprim (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA14-dfrA17* and *dfrB1*, *dfrB2*, *dfrB3*) were
118 investigated by PCR assays, using the primers listed in Table 1.

119

120 **Statistical analysis.** The antimicrobial resistance frequencies of *Salmonella*
121 isolates from different origins were compared by chi-square test (χ^2) using the Stata
122 Data Analysis and Statistical Software, version 12.0. A *P* value of < 0.05 was
123 considered significant. For the purpose of this study, isolates with intermediate
124 susceptibility were categorized as susceptible for statistical analysis (22).

125

126

RESULTS

127 The antimicrobial resistance rates among *Salmonella* isolates from swine
128 production system are presented in Table 2. Of the 225 *Salmonella* isolates included in
129 this study, 171 (76%) showed resistance to at least one antimicrobial agent. Resistance
130 occurred most frequently to tetracycline (54.5%), sulphonamides (39.6%), streptomycin
131 (33.7%) and nalidixic acid (33.3%). All isolates were susceptible to cefotaxime or
132 ceftazidime, and a low frequency ($< 1\%$) of resistance to ciprofloxacin was observed.
133 *Salmonella* strains isolated from feed mill were significantly less resistant to ampicillin,
134 chloramphenicol, gentamycin, tetracycline, streptomycin, sulphonamides, trimethoprim
135 and kanamycin ($P < 0.05$).

136 Resistance to three or more classes of antimicrobial agents (40.4%; 91/225) was
137 seen in varying combinations (Table 3). Among the feed mill isolates, twenty-three
138 (42.6%) were resistant to one or two antimicrobial agents and only one (1.9%) isolate
139 showed multi-resistance. On the other hand, among the 30 isolates from the lairage, 22
140 (73.3%) were resistant to at least one antimicrobial and 12 (40%) were multi-resistant.
141 A similar resistance rate was observed for intestinal content and carcass strains.
142 Resistance to at least one antimicrobial was found in 18 (72%) isolates from intestinal
143 content and a high frequency (64%; 16/25) of multi-resistance was observed. Among

144 carcass isolates, resistant to at least one antimicrobial agent was observed in 89.7%
145 (104/116) and multi-resistance in 53.4% (62/116).

146 The ciprofloxacin MIC was determined for 34 multi-resistant isolates that
147 showed resistance to nalidixic acid. Thirty-two (94.1%) isolates exhibited decreased
148 ciprofloxacin susceptibility (MIC 0.125-2 µg/ml). Among these isolates, 10 (31.2%)
149 exhibited a quite high MIC (1-2 µg/ml) and 18 (56.2%) presented MIC values of 0.5
150 µg/ml. According to the current CLSI criteria, only one multi-resistant isolate was
151 resistant to ciprofloxacin, showing a MIC value of 4 µg/ml.

152 Tested strains belonged to 28 different *Salmonella* serovars; among them *S.*
153 Typhimurium (76/225; 33.8%) and *S.* Derby (49/225; 21.8%) were the most prevalent.
154 Multi-resistance was observed in strains belonging to only ten of the serovars identified
155 (Agona, Derby, Enteritidis, Infantis, Ohio, Panama, Senftenberg, Typhimurium, O:4,5
156 and O:6,7). Among the two most common serovars, 46 (60.5%) *S.* Typhimurium and 27
157 (55.1%) *S.* Derby strains showed multi-resistance. *S.* Typhimurium strains presented a
158 higher diversity in multi-resistance profiles, with 20 different antimicrobial resistance
159 patterns detected in this serovar. The pattern AMP-NAL-STR-SUL-TET-TMP was the
160 most frequent and was found in 11 *S.* Typhimurium strains, all of them isolated from
161 carcasses (Table 3). The multi-resistance profile STR-SUL-TET was identified in 27 *S.*
162 Derby isolates originated from intestinal content and carcasses.

163 A variety of antimicrobial resistance gene profiles were detected among the 91
164 multi-resistant strains submitted to PCR analysis. The following resistance genes
165 (codified resistance phenotype in brackets) were detected: *bla*_{TEM} (ampicillin); *tet*(A)
166 (tetracycline); *tet*(B) (tetracycline/minocycline); *sul1*, *sul2* and *sul3* (sulphonamides);
167 *catA1* (chloramphenicol); *floR* (florfenicol/chloramphenicol); *strA* and *strB*
168 (streptomycin); *aph*(3')-Ia (kanamycin); *aac*(3)-IIa and *aac*(3)-IVa

169 (apramycin/gentamicin); and *aadA variant* (streptomycin/spectinomycin) (Table 3). The
170 genes *tet(A)*, *bla*_{TEM}, *sulI* and *aadA* were the most prevalent. The genes *aadB*, *bla*_{PSE-1},
171 *tet(G)* and all trimethoprim resistance genes tested, except *dfrA1*, were not found among
172 tested *Salmonella* isolates.

173

174

DISCUSSION

175 In the current study, 76% of the isolates were resistant to at least one
176 antimicrobial agent, and multi-resistance was observed in 40.4% of the isolates. The
177 occurrence of resistant *Salmonella* strains in pigs and pork represents a relevant issue
178 with regard to food safety and consumer protection. Porcine *Salmonella* isolates with a
179 high rate of antimicrobial resistance were reported in many countries (6, 22, 31, 34, 41);
180 however, resistance patterns almost certainly differ across geographical boundaries and
181 swine production systems. For this reason, national studies are essential for providing
182 information on epidemiological status of the region. In Brazil, antimicrobial resistance
183 surveillance targeted to the swine production chain has not been conducted yet.
184 However, the nationwide *Salmonella* surveillance for antimicrobial resistance
185 conducted in chicken (60) demonstrated that all 250 *Salmonella* strains, isolated from
186 2,710 samples collected at retail level, presented resistance to at least one antimicrobial
187 tested, and 69.3% were multi-resistant. Even considering that antimicrobials tested and
188 methodologies adopted were different from our study, the results demonstrate in both
189 cases that antimicrobial resistance in *Salmonella* should be a concern in Brazil.

190 The association of antimicrobial resistance with specific *Salmonella* serovars has
191 been suggested (45, 56). In this study, 46 (60.5%) *S. Typhimurium* isolates were multi-
192 resistant and displayed a variety of resistance profiles, being the pattern AMP-NAL-
193 STR-SUL-TET-TMP commonly found. During the last decades, multi-resistant clones

194 of *S. Typhimurium* have emerged (11). One of these *S. Typhimurium* clones, typically
195 resistant to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin/spectinomycin, sulphonamides
196 and tetracycline (ACSSuT), is widely distributed and was recovered from clinical
197 samples, food-producing animals and food in many countries. Those clones have been
198 also associated to a higher virulence, and therefore have been intensively surveyed (1, 4,
199 30, 35). In our study, this resistance phenotype, alone or combined with others
200 antimicrobial agents, was found in 15 (19.7%) *S. Typhimurium* isolates. The frequency
201 was quite higher than previously reported in the same region (7, 42).

202 The second most common serovar was *S. Derby*, in line with studies conducted
203 in European Union, which revealed that *S. Derby* is among the top 10 serovars isolated
204 from slaughter pigs (25) and the most frequently isolated from breeding pigs (26).
205 Clinical, food and animal *S. Derby* isolates showed a wide range of antimicrobial
206 resistance profiles, often encompassing streptomycin, tetracycline, or sulphonamides
207 (18, 41). In the present study, multi-resistance patterns were found in 27 (55.1%) *S.*
208 *Derby* isolates. The multi-resistance profile STR-SUL-TET was by far the most
209 frequent, being identified in 27 isolates. The same multi-resistance pattern was also
210 previously reported as predominant among *S. Derby* from pigs in the same region (51),
211 demonstrating its persistence over the years.

212 Overall, the highest frequency of resistance was observed against tetracycline
213 (54.5%), sulphonamides (39.6%) and streptomycin (33.7%). In previous studies
214 conducted in Brazil, *Salmonella* strains isolated from pig and pork displayed resistance
215 against tetracycline, sulphonamides and streptomycin in frequencies ranging from 23%
216 to 90% (8, 42, 54). These antimicrobials have been used for treatment of respiratory and
217 enteric diseases in swine over the years, justifying the selective pressure observed in the
218 *Salmonella* population. The predominant tetracycline-resistant gene *tet(A)* was found in

219 61 (67%) multi-resistant isolates from lairage, intestinal content of pigs and carcasses,
220 followed by *tet(B)* gene identified in 30 (33%) isolates. None of tetracycline-resistant
221 strains harbored the *tet(G)* gene. Other studies have also reported predominance of
222 *tet(A)* and *tet(B)* genes in tetracycline-resistant *Salmonella* isolates (23, 31). Both
223 resistance genes are mostly located on transposon, and this may contribute to their
224 spread among bacterial populations.

225 On the other hand, resistance to streptomycin has been frequently reported to be
226 encoded by *aadA* gene located on class 1 integrons (31). In our study, the streptomycin-
227 resistance gene *aadA* variant and *strA-strB* gene cluster were detected by PCR assays.
228 The *aadA* variant gene encodes aminoglycoside adenylyltransferases, whereas the *strA*-
229 *strB* genes encode aminoglycoside phosphotransferases, which confer resistance to
230 streptomycin. It has been reported that the *strA-strB* gene cluster in many cases is
231 physically linked with *sul2* resistance gene on small plasmids from *S. Typhimurium*
232 (70). The *sul2-strA-strB* gene cluster appears to be quite disseminated, being found also
233 in large resistance plasmids and chromosomally integrated elements (19).

234 Regarding sulphonamides resistance, *sul2* and *sul1* genes were detected in multi-
235 resistant isolates from lairage, intestinal content of pigs and carcasses; however *sul3*
236 gene was detected in only eleven *S. Typhimurium* isolates from carcasses, which
237 displayed a same resistance genotype pattern [*bla*_{TEM}, *aadA* variant, *sul3*, *tet(A)*]. All
238 isolates presenting this resistance profile were recovered from a same slaughter day, and
239 may represent a *S. Typhimurium* clone that has been spread on farm or during the
240 holding period. The location of gene *sul3* in class 1 integrons has been demonstrated in
241 *S. Typhimurium*, and its rapid spread in the last decade has also been reported (3, 13).

242 Other antimicrobial agents frequently used in swine production, such as nalidixic
243 acid, kanamycin, gentamicin and trimethoprim, showed a variable frequency (ranging

244 from 0 to 43.3%) of resistance. It has been demonstrated that resistance to nalidixic acid
245 is coupled with decreased susceptibility to fluoroquinolones (MIC \geq 0.125 μ g/ml) in
246 salmonellae (46, 66). Although in our study only two strains displayed resistance to
247 ciprofloxacin, 33.3% were resistant against nalidixic acid and most of the tested isolates
248 (94.1%) showed decreased ciprofloxacin susceptibility (MIC 0.12-2 μ g/ml). Since
249 ciprofloxacin is the recommended antimicrobial for treatment of life-threatening
250 *Salmonella* infection in human, the decrease of susceptibility against fluoroquinolones
251 may represent an additional hazard of the circulating strains in Brazil.

252 Among gentamicin-resistant isolates investigated for their resistance genotype,
253 the *aac(3)-IIa* gene was the most prevalent, while the *aph(3')-Ia* gene was detected in
254 all except one kanamycin-resistant isolate investigated. In this case, other resistance
255 genes not investigated may be responsible for the resistance phenotype. On the other
256 hand, even the investigation of frequent trimethoprim resistance genes (*dfrA1*, *dfrA5*,
257 *dfrA7*, *dfrA14-dfrA17* and *dfrB1*, *dfrB2*, *dfrB3*) was not sufficient to elucidate the
258 resistance genotype of the *Salmonella* strains tested in this study. Except for one isolate
259 that showed the *dfrA1* gene, no other genes were detected, suggesting that rare or novel
260 *dfr* variants may be present in these isolates.

261 Even many years after chloramphenicol ban in Brazil, resistance was still found
262 in 14.2% of the isolates. In a similar way, resistance to this antimicrobial was observed
263 in 26.3% of isolates from pigs in Belgium, in spite of the chloramphenicol ban occurred
264 three decades ago (68). This fact suggests a genetic linkage between resistance against
265 chloramphenicol and other antimicrobial agents (44). The high prevalence of the *floR*
266 gene, encoding efflux proteins that export florfenicol and chloramphenicol, may
267 partially explain the persistence of chloramphenicol-resistant strains. Florfenicol is
268 widely used for prophylactic and therapeutic purposes in Brazilian pig farms, and may

269 exert a selective pressure on *Salmonella*. However, a high frequency of the *catA1* gene
270 was also observed, and in several resistant isolates this was the only gene detected
271 encoding chloramphenicol resistance. In these cases, the *catA1* gene may be co-located
272 on mobile elements that are selected by other widely used antimicrobial agents such as
273 ampicillin and streptomycin.

274 In this study, resistance to ampicillin in *Salmonella* was mediated by *bla*_{TEM} β -
275 lactamase gene, in accordance with other reports (23, 39). The *bla*_{TEM} gene is usually
276 part of transposon Tn3 in *Salmonella* isolates (48, 57). Recently, the *bla*_{TEM-1} gene was
277 identified located on IncFII-virulence plasmid from porcine *S. Typhimurium* (9). On the
278 other hand, the *bla*_{PSE-1} gene is usually located on class 1 integron designated InC,
279 which is part of the chromosomally *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) (53).

280 Resistance to third-generation cephalosporins (ceftazidime and cefotaxime) was
281 not found. Extended spectrum cephalosporins are an important category of
282 antimicrobial agents that is frequently used for treatment of complicated *Salmonella*
283 infections in humans. The emergence of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in
284 *Enterobacteriaceae* is an increasing problem worldwide, compromising the use of these
285 drugs for the treatment of *Salmonella* infection. However, the frequency of *Salmonella*
286 resistant strains is still quite low. The National *Salmonella* Reference Laboratory (NRL-
287 Salm) from Germany analyzed during 2003-2010 a total of 31,839 *Salmonella* isolates
288 and only 160 (0.5%) isolates showed MIC values ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ for cefotaxime and/or
289 ceftazidime or ceftiofur, suggesting the presence of ESBL or AmpC enzymes (61). In
290 United States, among 2,034 clinical *Salmonella* isolates submitted to the National
291 Veterinary Services Laboratories (NVSL) of the U.S. Department of Agriculture
292 (USDA), only 12 (0.6%) isolates were ESBL producers (69). Since we analyze a quite

293 lower number of isolates, we cannot exclude the presence of ESBL-producing
294 *Salmonella* in Brazil.

295 The risk of antimicrobial resistance in feed manufacturing process is related to
296 introduction of resistant strains in pig farms and potential dissemination of mobile
297 genetic elements, which may be transmitted to other more pathogenic endemic strains
298 (14, 25, 36). In Canada, 11.8% of resistant strains and 53.6% of multi-resistant strains
299 belonging to different *Salmonella* serovars were isolated from feed (37). Among *S.*
300 Heidelberg from feed, 72% of the isolates displayed resistance to at least one of the
301 antimicrobial agents tested (47). In Brazil, multi-resistant *S.* Senftenberg was found in
302 feed samples collected on farm (42). However, in our study, *Salmonella* isolates from
303 feed mills were significantly less resistant to most of the tested antimicrobial agents and
304 multi-resistance was observed in only one isolate. Therefore, feed doesn't seem to play
305 an important role in the introduction of resistance genes on farm, whereas the selective
306 pressure of antimicrobial use might be a better explanation for the high resistance rates
307 observed in isolates recovered from pigs and lairage.

308 A high frequency (53.5%, 62/116) of multi-resistance in different *Salmonella*
309 serovars from pig carcasses was observed, and fifteen resistance patterns were found
310 among the multi-resistant isolates. These results were in good agreement with the
311 results of previous studies on antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from pig
312 carcasses (30, 31). *Salmonella* strains that contaminate carcasses are mainly originated
313 from lairage and intestinal content (21, 42, 65), therefore resistant strains selected on
314 farm are expected to be found on the carcass surface. These resistant isolates in turn
315 may contaminate pork products and pose a potential risk for consumers. In Brazil, most
316 of the tested antimicrobial agents are not used as feed additives; however, they are still
317 adopted for prophylactic and therapeutic purposes. As this study demonstrated, the

318 antimicrobial use on farm may have been selecting resistant bacterial strains in the
319 intestinal microbiota, including pathogenic bacteria such as *Salmonella*. Strains isolated
320 from lairage, intestinal content of pigs and carcasses displayed common genotypic
321 profiles, demonstrating that resistance genes selected on farm are present in pork. The
322 hazard of transmission of resistant strains through the food chain or their disposal in the
323 environment through animal manure highlights the need of a more judicious use of
324 antimicrobial agents in pig farms.

325 In conclusion, *Salmonella* strains isolated from pig feces and carcasses displayed
326 a high frequency of resistance to most antimicrobial agents tested, while strains
327 originated from feed mills presented a quite lower frequency of resistance. This result
328 indicates that the selective pressure is being exerted on farm. The high rate of
329 antimicrobial resistance and the common resistance genes profiles found in *Salmonella*
330 strains from pig feces and carcasses indicate that pigs may pose a potential risk in
331 serving as reservoirs of multi-resistant *Salmonella*.

332

333

ACKNOWLEDGEMENTS

334 The authors thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel
335 (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)
336 for financial support. G. V. Lopes is a Ph.D. student at the Postgraduate Program in
337 Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary (PPGCV/UFRGS), and received a
338 scholarship from CAPES.

339

340

REFERENCES

- 341 1. Agustin, A. I., J. J. Carraminana, C. Rota, and A. Herrera. 2005.
342 Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. from pigs at slaughter in Spain
343 in 1993 and 2001. *Lett. Appl. Microbiol.* 41:39-44.
- 344 2. Alban, L., F. M. Baptista, V. Mogelmoose, L. L. Lorensen, H. Christensen, S.
345 Aabo, and J. Dahl. 2012. *Salmonella* surveillance and control for finisher
346 pigs and pork in Denmark - A case study. *Food Res. Int.* 45:656-665.
- 347 3. Antunes, P., J. Machado, and L. Peixe. 2007. Dissemination of *sul3*-
348 containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved
349 sequence region among *Salmonella* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*
350 51:1545-1548.
- 351 4. Antunes, P., T. M. Coque, and L. Peixe. 2010. Emergence of an IncIy
352 plasmid encoding CMY-2 β -lactamase associated with the international
353 ST19 OXA-30-producing β -lactamase *Salmonella* Typhimurium multidrug
354 resistant clone. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:2097-2100.
- 355 5. Arguello, H., A. Carvajal, J. Á. Collazos, C. Garcia-Feliz, and P. Rubio.
356 2012. Prevalence and serovars of *Salmonella enterica* on pig carcasses,
357 slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. *Food*
358 *Res. Int.* 45:905-912.
- 359 6. Arguello, H., G. Sorensen, A. Carvajal, D. L. Baggesen, and P. Rubio. 2013.
360 Prevalence, serotypes and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* in
361 Danish pig production. *Res. Vet. Sci.* 95:334-342.
- 362 7. Bessa, M. C., G. B. Michael, N. Canu, C. Canal, M. Cardoso, W. Rabsch,
363 and S. Rubino. 2007. Phenotypic and genetic characterization of *Salmonella*
364 *enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio
365 Grande do Sul, Brazil. *Res. Vet. Sci.* 83:302-310.

- 366 8. Bessa, M. C., M. Costa, and M. Cardoso. 2004. Prevalência de *Salmonella*
367 sp. em suínos abatidos em frigoríficos sob inspeção federal no Rio Grande
368 do Sul. *Pesquisa Vet. Brasil.* 24:80-84. [Article in Portuguese]
- 369 9. Beutlich, J., R. M. Rodicio, C. M. Mendoza, P. García, M. Kirchner, I.
370 Luzzi, D. Mevius, J. Threlfall, R. Helmuth, and B. Guerra. 2013. *Salmonella*
371 *enterica* serovar Typhimurium virulence-resistance plasmids derived from
372 the pSLT carrying nonconventional class 1 integrons with *dfrA12* gene in
373 their variable region and *sul3* in the 3' conserved segment. *Microb. Drug*
374 *Resist.* 19:437-445.
- 375 10. Bolton, D. J., C. Ivory, and D. McDowell. 2013. A study of *Salmonella* in
376 pigs from birth to carcass: serotypes, genotypes, antibiotic resistance and
377 virulence profiles. *Int. J. Food Microbiol.* 160:298-303.
- 378 11. Butaye, P., G. B. Michael, S. Schwarz, T. J. Barrett, A. Brisabois, and D. G.
379 White. 2006. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella*
380 serotypes. *Microbes Infect.* 8:1891-1897.
- 381 12. Castagna, S. M. F., P. Schwarz, C. W. Canal, and M. Cardoso. 2004.
382 Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação
383 de embutidos frescal. *Acta Sci. Vet.* 32:141-147. [Article in Portuguese]
- 384 13. Chiu, C. H., P. Tang, C. Chu, S. Hu, Q. Bao, J. Yu, Y. Y. Chou, H. S. Wang,
385 and Y. S. Lee. 2005. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar
386 Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic*
387 *Acids Res.* 33:1690-1698.
- 388 14. Chu, C., and C. H. Chiu. 2006. Evolution of the virulence plasmids of non-
389 typhoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance.
390 *Microbes Infect.* 8:1931-1936.

- 391 15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Methods for
392 dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically:
393 Approved Standard – Ninth Edition. CLSI Document M07-A9. CLSI,
394 Wayne, Pennsylvania, USA.
- 395 16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013a. Performance
396 standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria
397 isolated from animals; second informational supplement. CLSI document
398 VET01-S2. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.
- 399 17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013b. Performance
400 standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-third Informational
401 Supplement. CLSI Document M100-S23. CLSI, Wayne, Pennsylvania,
402 USA.
- 403 18. Clothier, K. A., J. M. Kinyon, and T. S. Frana. 2010. Comparison of
404 *Salmonella* serovar isolation and antimicrobial resistance patterns from
405 porcine samples between 2003 and 2008. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22:578-582.
- 406 19. Daly, M., L. Villa, C. Pezella, S. Fanning, and A. Carattoli. 2005
407 Comparison of multidrug resistance gene regions between two
408 geographically unrelated *Salmonella* serotypes. *J. Antimicrob. Chemother.*
409 55:558-561.
- 410 20. DANMAP. 2012. Use of antimicrobial agents and occurrence of
411 antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in
412 Denmark. ISSN: 1600-2032. Available at: [http://www.danmap.org/
413 Downloads/Reports.aspx](http://www.danmap.org/Downloads/Reports.aspx). Accessed 15 December 2013.
- 414 21. De Busser, E. V., D. Maes, K. Houf, J. Dewulf, H. Imberechts, S. Bertrand,
415 and L. De Zutter. 2011. Detection and characterization of *Salmonella* in

- 416 lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *Int. J. Food*
417 *Microbiol.* 145:279-286.
- 418 22. De Jong, A., V. Thomas, S. Simjee, K. Godinho, B. Schiessl, U. Klein, P.
419 Butty, M. Vallé, H. Marion, and T. R. Shryock. 2012. Pan-european
420 monitoring of susceptibility to human-use antimicrobial agents in enteric
421 bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J. Antimicrob.*
422 *Chemother.* 67:638-651.
- 423 23. Diarra, M. S., P. Delaquis, H. Rempel, S. Bach, C. Harlton, M. Aslam, J.
424 Pritchard, and E. Topp. 2014. Antibiotic resistance and diversity of
425 *Salmonella enterica* serovars associated with broiler chickens. *J. Food Prot.*
426 77:40-49.
- 427 24. European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease
428 Prevention and Control (ECDC). 2013b. The European Union summary
429 report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from
430 humans, animals and Food in 2011. *EFSA J.* 11:3196 [359 pp.].
- 431 25. European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease
432 Prevention and Control (ECDC). 2013a. The European Union summary
433 report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne
434 outbreaks in 2011. *EFSA J.* 11:3129 [250 pp.].
- 435 26. European Food Safety Authority (EFSA). 2009. Analysis of the baseline
436 survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the
437 EU, 2008, Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA J.* 7:1377 [93
438 pp.].

- 439 27. Fedorka-Cray, P. J., A. Hogg, J. T. Gray, K. Lorenzen, J. Velasquez, and P.
440 Von Behren. 1997. Feed and feed trucks as sources of *Salmonella*
441 contamination in swine. *Swine Health Prod.* 5:189-193.
- 442 28. Frech, G., and S. Schwarz. 2000. Molecular analysis of tetracycline
443 resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium,
444 Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and
445 application of specific gene probes. *J. Appl. Microbiol.* 89:633-641.
- 446 29. Frech, G., C. Kehrenberg, and S. Schwarz. 2003. Resistance phenotypes and
447 genotypes of multiresistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar
448 Typhimurium var. Copenhagen isolates from animal sources. *J. Antimicrob.*
449 *Chemother.* 51:180-182.
- 450 30. Gebreyes, W. A., S. Thakur, and W. E. Morgan Morrow. 2006. Comparison
451 of prevalence, antimicrobial resistance, and occurrence of multidrug-
452 resistant *Salmonella* in antimicrobial-free and conventional pig production.
453 *J. Food Prot.* 69:743-748.
- 454 31. Gomes-Neves, E., P. Antunes, V. Manageiro, F. Gärtner, M. Caniça, J. M.
455 C. Costa, and L. Peixe. 2014. Clinically relevant multidrug resistant
456 *Salmonella enterica* in swine and meat handlers at the abattoir. *Vet.*
457 *Microbiol.* 168:229-233.
- 458 32. Grape, M., L. Sundström, and G. Kronvall. 2003. Sulphonamide resistance
459 gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J.*
460 *Antimicrob. Chemother.* 52:1022-1024.
- 461 33. Grimm, V., S. Ezaki, M. Susa, C. Knabbe, R. D. Schmid, and T. T.
462 Bachmann. 2004. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM
463 beta-lactamases that confer resistance. *J. Clin. Microbiol.* 42:3766-3774.

- 464 34. Haley, C. A., D. A. Dargatz, E. J. Bush, M. M. Erdman, and P. J. Fedorka-
465 Cray. 2012. *Salmonella* prevalence and antimicrobial susceptibility from the
466 National Animal Health Monitoring System Swine 2000 and 2006 studies. *J.*
467 *Food Prot.* 5:428-436.
- 468 35. Herrero, A., M. C. Mendoza, E. J. Threlfall, and M. R. Rodicio. 2009.
469 Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with pUO-StVR2-
470 like virulence-resistance hybrid plasmids in the United Kingdom. *Eur. J.*
471 *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28:1087-1093.
- 472 36. Hofacre, C. L., D. G. White, J. J. Maurer, C. Morales, C. Lobsinger, and C.
473 Hudson. 2001. Characterization of antibiotic-resistant bacteria in rendered
474 animal products. *Avian Dis.* 45:953-961.
- 475 37. Johnson, J. M., A. Rajic, and L. M. McMullen. 2005. Antimicrobial
476 resistance of selected *Salmonella* isolates from food animals and food in
477 Alberta. *Can. Vet. J.* 46:141-146.
- 478 38. Kadlec, K., C. Kehrenberg, and S. Schwarz. 2007. Efflux-mediated
479 resistance to florfenicol and/or chloramphenicol in *Bordetella*
480 *bronchiseptica*: identification of a novel chloramphenicol exporter. *J.*
481 *Antimicrob. Chemother.* 59:191-196.
- 482 39. Keelara, S., H. M. Scott, W. M. Morrow, C. S. Hartley, D. L. Griffin, W. A.
483 Gebreyes, and S. Thakur. 2014. Comparative phenotypic and genotypic
484 characterization of temporally related nontyphoidal *Salmonella* isolated from
485 human clinical cases, pigs, and the environment in North Carolina.
486 *Foodborne Pathog. Dis.* 11:156-164.
- 487 40. Kehrenberg, C., and S. Schwarz. 2001. Occurrence and linkage of genes
488 coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in

- 489 bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. *FEMS Microbiol. Lett.*
490 18:283-290.
- 491 41. Kerouanton, A., V. Rose, F. Weill, S. A. Granier, and M. Denis. 2013.
492 Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella*
493 *enterica* serotype Derby isolated from pigs, pork, and humans in France.
494 *Foodborne Pathog. Dis.* 10:977-984.
- 495 42. Kich, J. D., A. Coldebella, N. Morés, M. G. Nogueira, M. Cardoso, P. M.
496 Fratamico, J. E. Call, P. Fedorka-Cray, and J. B. Luchansky. 2011.
497 Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella*
498 recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa
499 Catarina, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 151:307-313.
- 500 43. Kich, J. D., P. Schwarz, L. E. Silva, A. Coldebella, I. A. Piffer, R. Vizzotto,
501 and M. R. I. Cardoso. 2007. Development and application of an enzyme-
502 linked immunosorbent assay to detect antibodies against prevalent
503 *Salmonella* serovars in swine in southern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.*
504 19:510-517.
- 505 44. Kikuvi, G. M., S. Schwarz, J. N. Ombui, E. S. Mitema, and C. Kehrenberg.
506 2007. Streptomycin and chloramphenicol resistance genes in *Escherichia*
507 *coli* isolates from cattle, pigs, and chicken in Kenya. *Microb. Drug Resist.*
508 13:62-68.
- 509 45. Larkin, C., C. Poppe, B. McNab, B. McEwen, A. Mahdi, and J. Odumeru.
510 2004. Antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from hog, beef, and
511 chicken carcass samples from provincially inspected abattoirs in Ontario. *J.*
512 *Food Prot.* 67:448-455.

- 513 46. Lee, H. Y., L. H. Su, M. H. Tsai, S. W. Kim, H. H. Chang, S. I. Jung, K. H.
514 Park, J. Perera, C. Carlos, B. H. Tan, G. Kumarasinghe, T. So, A.
515 Chongthaleong, P. R. Hsueh, J. W. Liu, J. H. Song, and C. H. Chiu. 2009.
516 High rate of reduced susceptibility to ciprofloxacin and ceftriaxone among
517 nontyphoid *Salmonella* clinical isolates in Asia. *Antimicrob. Agents*
518 *Chemother.* 53:2696-2699.
- 519 47. Lynne, A. M., P. Kaldhone, D. David, D. G. White, and S. L. Foley. 2009.
520 Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar
521 Heidelberg isolated from food animals. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:207-215.
- 522 48. Martínez, N., I. Rodríguez, R. Rodicio, M. C. Mendoza, and M. R. Rodicio.
523 2010. Molecular basis and evolution of multiple drug resistance in the
524 foodborne pathogen *Salmonella enterica* serovar Ohio. *Foodborne Pathog.*
525 *Dis.* 7:189-198.
- 526 49. Michael, G. B., M. Cardoso, and S. Schwarz. 2005a. Class1 integron-
527 associated gene cassettes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar
528 Agona isolated from pig carcasses in Brazilian. *J. Antimicrob. Chemother.*
529 55:776-779.
- 530 50. Michael, G. B., M. Cardoso, and S. Schwarz. 2005b. Identification of an
531 *aadA2* gene cassette in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Derby. *J.*
532 *Vet. Med. B* 52:456-459.
- 533 51. Michael, G. B., M. Cardoso, and S. Schwarz. 2006. Phenotypic and
534 genotypic differentiation of porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica*
535 serovar Derby isolates. *Vet. Microbiol.* 118:312-318.
- 536 52. Michael, G. B., M. Cardoso, and S. Schwarz. 2008. Molecular analysis of
537 multiresistant porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Bredeney

- 538 isolates from Southern Brazil: identification of resistance genes, integrons
539 and a group II intron. *Int. J. Antimicrob. Agents* 32:120-129.
- 540 53. Mulvey, M. R., D. A. Boyd, A. B. Olson, B. Doublet, and A. Cloeckert.
541 2006. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect.* 8:1915-
542 1922.
- 543 54. Mürmann, L., M. C. Santos, S. M. Longaray, J. M. C. Both, and M. Cardoso.
544 2008. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated
545 from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do
546 Sul, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 39:529-534.
- 547 55. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). 2011.
548 Retail Meat Annual Report, 2011. Food and Drug Administration/Center for
549 Veterinary Medicine (FDA/CVM) and Centers for Disease Control and
550 Prevention (CDC). Available at: [http://www.fda.gov/downloads/Animal
551 Veterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialRes
552 istanceMonitoringSystem/UCM334834.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Animal%20Veterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM334834.pdf). Accessed 21 February 2014.
- 553 56. Parveen, S., M. Taabodi, J. G. Schwarz, T. P. Oscar, J. Harter-Dennis, and
554 D. G. White. 2007. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella*
555 recovered from processed poultry. *J. Food Prot.* 70:2466-2472.
- 556 57. Pasquali, F., C. Kehrenberg, G. Manfreda, and S. Schwarz. 2005. Physical
557 linkage of Tn3 and part of Tn1721 in a tetracycline and ampicillin resistance
558 plasmid from *Salmonella* Typhimurium. *J. Antimicrob. Chemother.* 55:562-
559 565.
- 560 58. Pellegrini, D. C. P., D. S. Paim, G. J. M. M. Lima, J. D. Kich, A. Coldebella,
561 and M. Cardoso. 2011. Identification of *Salmonella* clonal groups and
562 enterobacteria quantification in different risk areas of manufacturing in four

- 563 Brazilian feed mills. In: Safepork 2011, Maastricht, The Netherlands.
564 Proceedings Book of Safepork 2011, pp.279-282.
- 565 59. Pissetti, C., G. O. Werlang, L. L. Biesus, J. D. Kich, and M. Cardoso. 2012.
566 *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* detection on pre-chill pig
567 carcasses. *Acta Sci. Vet.* 40:1071. [Article in Portuguese]
- 568 60. Programa de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em
569 Frango (PREBAF). 2008. Relatório do Monitoramento da prevalência e do
570 perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em *Enterococos* e *Salmonelas*
571 isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. pp.
572 186. Available at: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/relatorios/relatorio](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/relatorios/relatorio_prebaf.pdf)
573 [prebaf.pdf](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/relatorios/relatorio_prebaf.pdf). Accessed 26 December 2013. [Article in Portuguese]
- 574 61. Rodríguez, I., S. Jahn, A. Schroeter, B. Malorny, R. Helmuth, and B. Guerra.
575 2012. Extended-spectrum β -lactamases in German isolates belonging to the
576 emerging monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar
577 Typhimurium 4,[5],12:i:- European clone. *J. Antimicrob. Chemother.*
578 67:505-508.
- 579 62. Sandvang, D., and F. M. Aarestrup. 2000. Characterization of
580 aminoglycoside resistance genes and class 1 integrons in porcine and bovine
581 gentamicin-resistant *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist.* 6:19-27.
- 582 63. Sandvang, D., M. Diggle, and D. J. Platt. 2002. Translocation of integron-
583 associated resistance in a natural system acquisition of resistance
584 determinants by IncP and IncW plasmids from *Salmonella enterica*
585 Typhimurium DT104. *Microb. Drug Resist.* 8:151-160.
- 586 64. Schwarz, S., P. Silley, S. Simjee, N. Woodford, E. Van Duijkeren, A.
587 Johson, and W. Gaastra. 2010. Editorial: Assessing the antimicrobial

- 588 susceptibility of bacteria obtained from animals. *J. Antimicrob. Chemother.*
589 65:601-604.
- 590 65. Silva, L. E., V. Dias, A. Ferronato, P. Guerra, L. Berno, N. Triches, J. D.
591 Kich, L. G. Corbellini, and M. Cardoso. 2012. Longitudinal dissemination of
592 *Salmonella enterica* clonal groups through the slaughter process of
593 *Salmonella*-positive pig batches. *J. Food Prot.* 75:1580-1588.
- 594 66. Tamang, M. D., H. M. Nam, A. Kim, H. S. Lee, T. S. Kim, M. J. Kim, G. C.
595 Jang, S. C. Jung, and S. K. Lim. 2011. Prevalence and mechanisms of
596 quinolone resistance among selected nontyphoid *Salmonella* isolated from
597 food animals and humans in Korea. *Foodborne Pathog. Dis.* 8:1199-1206.
- 598 67. Torres, G. J., F. J. Piquer, L. Algarra, C. De Frutos, and O. J. Sobrinho.
599 2011. The prevalence of *Salmonella enterica* in Spanish feed mills and
600 potential feed-related risk factors for contamination. *Prev. Vet. Med.* 98:81-
601 87.
- 602 68. Van Boxtael, S., K. Dierick, X. Van Huffel, M. Uyttendaele, D. Berkvens,
603 L. Herman, S. Bertrand, C. Wildemaewe, B. Catry, P. Butaye, H.
604 Imberehtes. 2012. Comparison of antimicrobial resistance patterns and
605 phage types of *Salmonella* Typhimurium isolated from pigs, pork and
606 humans in Belgium between 2001 and 2006. *Food Res. Int.* 45:913-918.
- 607 69. Wittum, T. E., D. F. Mollenkopf, and M. M. Erdman. 2012. Detection of
608 *Salmonella enterica* isolates producing CTX-M cephalosporinase in U.S.
609 livestock populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:7487-7491.
- 610 70. Yau, S., X. Liu, S. P. Djordjevic, and R. M. Hall. 2010. RSF1010-like
611 plasmids in Australian *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and origin

612 of their *sul2-strA-strB* antibiotic resistance gene cluster. *Microb. Drug*
613 *Resist.* 16:249-252.
614

615 **TABLE 1.** PCR primers used in this study.

Antimicrobial agent class	Gene	Amplicon size (bp)	Sequence (5' – 3')	Reference
Aminoglycosides	<i>aac(3)-IIa</i>	369	fw: TGAAACGCTGACGGAGCCTC rv: GTCGAACAGGTAGCACTGAG	64
	<i>aac(3)-IVa</i>	627	fw: GTGTGCTGCTGGTCCACAGC rv: AGTTGACCCAGGGCTGTCGC	64
	<i>aph(3')-Ia</i>	669	fw: AACGTCTTGCTCGAGGCCGCG rv: GGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGC	64
	<i>ant(2'')-Ia</i>	328	fw: GGGCGCGTCATGGAGGAGTT rv: TATCGCGACCTGAAAGCGGC	64
	<i>ant(3'')-Ia</i>	526	fw: GTGGATGGCGGCCTGAAGCC rv: ATTGCCCAGTCGGCAGCG	64
	<i>strA</i>	645	fw: TGA CTGGTTGCCTGTCAGAGG rv: CCAGTTGTCTTCGGCGTTAGCA	42
	<i>strB</i>	510	fw: ATCGTCAAGGGATTGAAACC rv: GGATCGTAGAACATATTGGC	46
β-lactams	<i>bla_{TEM}</i>	851	fw: ATGAGTATTCAACATTTCCG rv: TTAATCAGTGAGGCACCTAT	34
	<i>bla_{PSE-1}</i>	419	fw: CGCTTCCCCTTAACAAGTAC rv: CTGGTTCATTTTCAGATAGCG	65
Phenicol	<i>catA1</i>	551	fw: GGCATTTTCAGTCAGTTG rv: CATTAAGCATTCTGCCG	46
	<i>floR</i>	1,291	fw: AGGGTTGATTTCGTATGACCA	40

			rv: CGTTAGACGACTGGCGACT	
Trimethoprim	<i>dfrA1/dfrA15/dfrA16</i>	414	fw: GATATTCCATGGAGTGCCA	29
			rv: ACCCTTTTGCCAGATTTG	
	<i>dfrA5/dfrA14</i>	379	fw: GATTGGTTGCGCTCCA	29
			rv: CTCAAAAACAACCTTCGAAGG	
	<i>dfrA7/dfrA17</i>	345	fw: CAGAAAATGGCGTAATCG	29
			rv: TCACCTTCAACCTCAACG	
	<i>dfrB1/dfrB2/dfrB3</i>	205	fw: CAAAGTAGCGATGAAGCCA	29
			rv: CAGGATAAATTTGCACTGAGC	
Sulphonamides	<i>sul1</i>	839	fw: ATGGTGACGGTGTTCGGCATTCTGA	33
			rv: CTAGGCATGATCTAACCCCTCGGTCT	
	<i>sul2</i>	703	fw: ACAGTTTCTCCGATGGAGGCC	42
			rv: CTCGTGTGTGCGGATGAAGTC	
	<i>sul3</i>	803	fw: GAGCAAGATTTTTGGAATCG	33
			rv: CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	
Tetracyclines	<i>tet(A)</i>	953	fw: GTAATTCTGAGCACTGT	28
			rv: CCTGGACAACATTGCTT	
	<i>tet(B)</i>	1,169	fw: ACGTTACTCGATGCCAT	28
			rv: AGCACTTGTCTCCTGTT	
	<i>tet(G)</i>	1,141	fw: CTGCTGATCGTGGGTCT	28
			rv: TTGCGAATGGTCTGCGT	

616 fw: primer forward; rv: primer reverse.

617 **TABLE 2.** Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolates recovered from feed mills and healthy slaughter pigs.

Antimicrobial	Percentage of <i>Salmonella</i> resistant strains				Total (n=225)	P value
	Feed mill (n=54)	Lairage (n=30)	Intestinal Content (n=25)	Carcass (n=116)		
Ampicillin	11.1	36.7	36.0	35.3	29.8	0.008
Chloramphenicol	1.8	10.0	28.0	18.1	14.2	0.006
Gentamicin	1.8	16.7	24.0	10.3	10.7	0.017
Nalidixic acid	16.7	43.3	12.0	43.1	33.3	<0.001
Tetracycline	3.7	53.3	64.0	75.8	54.5	<0.001
Streptomycin	1.8	26.7	60.0	44.8	33.7	<0.001
Sulphonamide	22.2	26.7	60.0	46.5	39.6	0.001
Trimethoprim	0	3.3	4.0	13.7	8.0	0.01
Kanamycin	0	20.0	12.0	20.7	14.7	0.004
Cefotaxime	0	0	0	0	0	-
Ceftazidime	0	0	0	0	0	-
Ciprofloxacin	0	3.3	0	0.8	0.9	0.433

618

619 **TABLE 3.** The antimicrobial resistance phenotype and genotype patterns of multi-resistant *Salmonella* serovars isolated from different
 620 steps of the swine production chain in Southern Brazil.

Origin	Serovar (n)	Resistance Phenotype^a	Resistance Genotype
Feed mill (n=1)	Typhimurium (1)	AMP-CHL-STR-SUL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>aadA</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>
Lairage (n=12)	Agona (1)	STR-SUL-TET	<i>aadA</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(A)</i>
	Derby (2)	STR-SUL-TET	<i>aadA</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(A)</i>
	Typhimurium (1)	AMP-GEN-KAN-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>tet(A)</i>
	Typhimurium (1)	AMP-NAL-STR-TET-TMP	<i>bla</i> _{TEM} , <i>aadA</i> , <i>tet(B)</i>
	Typhimurium (4)	AMP-GEN-KAN-NAL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>tet(A)</i>
	O:6,7 (1)	AMP-CHL-NAL-STR-SUL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>
	O:6,7:-:I, w (1)	AMP-CHL-NAL-STR-SUL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>
	Panama (1)	AMP-CHL-KAN-NAL-STR-SUL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>
Intestinal Content (n=16)	Derby (7)	STR-SUL-TET	<i>aadA</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(A)</i>
	Agona (1)	CHL-STR-SUL-TET	<i>floR</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>
	Typhimurium (1)	AMP-GEN-KAN-NAL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>tet(A)</i>
	Typhimurium (1)	AMP-GEN-KAN-NAL-STR-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i>
	Senftenberg (1)	AMP-CHL-STR-SUL-TET-TMP	<i>bla</i> _{TEM} , <i>floR</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>
	Typhimurium (1)	AMP-CHL-KAN-STR-SUL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>aadA</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(B)</i>
	Typhimurium (4)	AMP-CHL-GEN-STR-SUL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>acc(3)-IVa</i> , <i>aadA</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(B)</i>
Carcass (n=62)	Typhimurium (1)	NAL-STR-TET	<i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i>
	Enteritidis (1);	STR-SUL-TET	<i>strA-strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>
	Derby (18)	STR-SUL-TET	<i>aadA</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(A)</i>

Infantis (1)	AMP-CHL-TET-TMP	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>tet(A)</i>
Typhimurium (4)	AMP-GEN-KAN-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>tet(A)</i>
Typhimurium (1)	AMP-NAL-TET-TMP	<i>bla</i> _{TEM} , <i>tet(A)</i>
Typhimurium (1)	CHL-STR-SUL-TET	<i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>aadA</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(B)</i>
Infantis (1)	AMP-CHL-SUL-TET-TMP	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(A)</i>
Typhimurium (5)	AMP-GEN-KAN-NAL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>tet(A)</i>
Typhimurium (11)	AMP-NAL-STR-SUL-TET-TMP	<i>bla</i> _{TEM} , <i>aadA</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i>
Typhimurium (1)	AMP-CHL-GEN-STR-SUL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>acc(3)-IVa</i> , <i>aadA</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(B)</i>
O:4,5 (1)	AMP-CHL-KAN-STR-SUL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>aadA</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(B)</i>
Panama (4)	AMP-CHL-KAN-STR-SUL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>
Typhimurium (6)	AMP-CHL-KAN-STR-SUL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aadA</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(B)</i>
Ohio (1)	AMP-CHL-NAL-STR-SUL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>
Infantis (1)	AMP-CHL-KAN-NAL-STR-SUL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(B)</i>
Panama (2)	AMP-CHL-KAN-NAL-STR-SUL-TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>
		<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(B)</i>
Typhimurium (1)	AMP-CHL-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TMP	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>
Typhimurium (1)	AMP-CHL-CIP-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TMP	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>dfrA1</i>

621 ^aAMP: ampicillin, CIP: ciprofloxacin, CHL: chloramphenicol, GEN: gentamicin, KAN: kanamycin, NAL: nalidixic acid, STR: streptomycin, SUL: sulphonamides,

622 TET: tetracycline, TMP: trimethoprim.

CAPÍTULO 3

Identification and characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Derby isolates carrying a new *aadA26* gene cassette in a class 1 integron obtained at pig slaughterhouses

1 **Identification and characterization of *Salmonella enterica* subsp.**
2 ***enterica* serovar Derby isolates carrying a new *aadA26* gene cassette in**
3 **a class 1 integron obtained at pig slaughterhouses**

4

5

6 Graciela Volz Lopes^{1,2}, Geovana Brenner Michael², Marisa Cardoso¹ &
7 Stefan Schwarz²

8

9

10 ¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio
11 Grande do Sul (UFGRS), Porto Alegre, Brazil; and ² Institute of Farm Animal Genetics,
12 Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Neustadt-Mariensee, Germany

13

14 **Key words:** pig slaughterhouse, pork, macrorestriction analysis, antimicrobial
15 resistance, transposon.

16

17 **Running Title:** Antimicrobial resistance of porcine *Salmonella* Derby

18

19 (Artigo submetido para publicação no periódico *FEMS Microbiology Letters*).

20

21 Correspondence: Geovana Brenner Michael, PhD, Institute of Farm Animal Genetics,
22 Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Höltystr. 10, 31535 Neustadt-Mariensee, Germany.

23 Tel: +49 (0) 5034 871254;

24 fax: +49 (0) 5034 871143;

25 e-mail: geovana.michaelbrenner@fli.bund.de

26 **Abstract**

27 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (*S.*) serovar Derby is one of the most prevalent
28 serovar in pigs. Twenty-seven multi-resistant *S.* Derby isolates, obtained at two pig
29 slaughterhouses in Southern Brazil, were investigated for their molecular relationships,
30 genotypic resistance and presence of class 1 and 2 integrons. All isolates shared the
31 same XbaI-macrorestriction pattern and showed a common resistance genotype with
32 resistance to streptomycin/spectinomycin (*aadA* variant), sulphonamides (*sulI*) and
33 tetracycline [*tet(A)*]. They carried chromosome-located class 1 integrons with a new
34 *aadA* gene variant, designated *aadA26*, as part of a gene cassette. The sequence of the
35 flanking regions of this integron and the amplification of the *merA* gene may indicate
36 the location of the class 1 integron into a Tn21-related transposon. The close
37 relationships among these isolates and isolates from an earlier study suggest the
38 persistence of a resistant clone of *S.* Derby in the pig production chain in Southern
39 Brazil.

40 **Introduction**

41 *Salmonella* is a common causative agent of foodborne diseases in humans and has been
42 associated with food-producing animals worldwide. In the U.S.A., *Salmonella enterica*
43 subsp. *enterica* serovar (*S.*) Derby is among the top five serovars most frequently
44 isolated from clinical and non-clinical samples of non-human sources (CDC, 2013). In
45 Europe, *S.* Derby is one of the most prevalent serovars in slaughter pigs and it also
46 ranks among the ten most frequently isolated serovars in humans (EFSA & ECDC,
47 2013). It has also been found in samples from swine finishing herds, slaughterhouses
48 and pork sausage in Southern Brazil (Mürmann *et al.*, 2009; Kich *et al.*, 2011). There is
49 an increasing concern about the infection of food-producing animals and the
50 contamination of food products with *Salmonella* isolates carrying acquired
51 antimicrobial resistance genes.

52 Integrations and their gene cassettes play a relevant role in the dissemination of
53 antimicrobial resistance among bacteria and have also been identified in *S.* Derby
54 (Michael *et al.*, 2006; Peirano *et al.*, 2006; van Essen-Zandbergen *et al.*, 2007; Beutlich
55 *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2013). Integrations are genetic elements able to
56 integrate/excise/rearrange (by site-specific recombination) and express gene cassettes.
57 Class 1 integrations, the most common class found in *Enterobacteriaceae*, show typically
58 three regions, the 5' conserved segment (5'-CS) and 3' conserved segment (3'-CS)
59 flanking a central variable region, which may harbour gene cassettes. The 5'-CS
60 includes the integrase gene (*intI1*), the attachment site (*attI1*) and the promoter (P_c). The
61 3'-CS consists of the *qacEAI*, which encodes a semi-functional derivative of the
62 quaternary ammonium compounds resistance gene *qacE*, and the sulphonamide
63 resistance gene *sulI*. Integrations may be found inserted into transposons and conjugative

64 plasmids, which allow their horizontal dissemination (Cambray *et al.*, 2010; Domingues
65 *et al.*, 2012; Stokes *et al.*, 2012).

66 The aim of the present study was the investigation of multi-resistant *S. Derby*
67 isolates from lairage environment, carcasses and intestinal content of pigs for (a) their
68 molecular relationships, (b) their pheno- and genotypic resistance, (c) the presence of
69 class 1 and 2 integrons and their gene cassettes and (d) the location of the integrons.

70

71 **Materials and methods**

72 **Bacterial isolates and susceptibility testing**

73 Porcine *S. Derby* isolates were obtained from cross-sectional studies conducted at three
74 pig slaughterhouses in Southern Brazil (Silva *et al.*, 2012). The slaughterhouses were
75 located approximately 120 - 600 km away from each other and were supplied by
76 finishing farms in a vertically integrated production system. During a 10-month period
77 (10/2007 - 08/2008), a total of 232 samples was collected from lairage environment,
78 carcasses and intestinal content of pigs at the slaughterhouses A, B and C. The samples
79 from lairage were taken from the floor using the overshoe method. The swab samples
80 from a 300 cm² area of the carcasses were taken after the dehairing process. A piece of
81 the caecum from each marked carcass was taken during the evisceration. To avoid
82 duplicates, only one *Salmonella* isolate per sample was selected. The isolates were
83 identified as *Salmonella enterica* by routine laboratory procedures (Michael *et al.*,
84 2003). Serological tests were performed at the National Reference Centre, Instituto
85 Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, by slide agglutination. *S. Derby* was identified in
86 30 (12.9 %) samples and these isolates were analysed for their antimicrobial resistance.
87 Twenty-seven isolates from slaughterhouses B (n=16) and C (n=11) showed multi-

88 resistance patterns (resistance to, at least, three different classes of antimicrobial agents)
89 and were further investigated in this study.

90 Antimicrobial resistance profiles of the *S. Derby* isolates were determined by agar
91 disc diffusion. The following discs (Oxoid, Basingstoke, UK) were used: ampicillin (10
92 µg), cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5
93 µg), sulphonamides (300 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (10 µg), nalidixic acid
94 (30 µg), streptomycin (10 µg), tetracycline (30 µg), and trimethoprim (5 µg). *In vitro*
95 susceptibility testing was performed and evaluated according to the specifications of the
96 Clinical and Laboratory Standards Institute, documents VET01-S2 and M100-S23
97 (CLSI, 2013a, b). *Escherichia coli* ATCC[®] 25922 was used for quality control
98 purposes.

99

100 **Macrorestriction analysis (PFGE)**

101 To prepare the genomic DNA, the concentration of the cell suspension was set to an
102 optical density of 0.3 at 578 nm (Schwarz & Liebisch, 1994). The remaining steps of
103 the protocol followed the standard conditions of PulseNet (Ribot *et al.*, 2006). Genomic
104 DNA of *S. Derby* isolates and *S. Braenderup* H9812 (size marker) were digested with
105 XbaI (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). The DNA fragments were separated by
106 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in a CHEF DR III system (BioRad, Munich,
107 Germany). Macrorestriction patterns were analysed as previously described (Michael *et*
108 *al.*, 2005).

109

110 **DNA preparation and PCR assays**

111 Genomic DNA for the PCR assays or for the restriction analysis, respectively, was
112 prepared by thermal lysis procedure (single colonies resuspended in 200 µL of double-

113 distilled water were heated for 5 minutes at 95 °C and centrifuged for 10 minutes at
114 1500 g) or by phenol-chloroform extraction (Schwarz & Liebisch, 1994). Plasmid DNA
115 was prepared by modified alkaline lysis methods (Birnboim & Doly, 1979; Kado & Liu,
116 1981). For estimating the sizes of plasmids, the plasmids of *Escherichia coli* V517
117 (Macrina *et al.*, 1978) were used as size standards.

118 Based on their antimicrobial susceptibility patterns, genes for resistance to
119 sulphonamides (*sul1*, *sul2*, and *sul3*), tetracyclines [*tet(A)* and *tet(B)*], streptomycin
120 (*strA*) and streptomycin/spectinomycin (*aadA*) were investigated by previously
121 described PCR assays (Frech *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2004; Grape *et al.*, 2003;
122 Kadlec *et al.*, 2005). Furthermore, PCR assays were performed for the detection of class
123 1 integrase gene (*intI1*) and the variable part of class 1 integrons (5'-CS / 3'-CS)
124 (Sandvang *et al.*, 2002; Kadlec *et al.*, 2005). Class 2 integrons were also investigated for
125 the presence of the class 2 integrase gene (*intI2*) by PCR (Kadlec & Schwarz, 2008).

126

127 **Analysis of the variable part of class 1 integrons, cloning and sequencing**

128 The amplicons specific for the variable part of class 1 integrons were analysed by
129 restriction fragment polymorphism (RFLP) using the restriction endonuclease EcoRI. A
130 representative amplicon was chosen for cloning into the vector pCR[®]2.1-TOPO[®]
131 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands). The recombinant vector was transformed by
132 heat shock into CaCl₂-treated competent *E. coli* TOP 10 cells (Dagert & Ehrlich, 1979)
133 with subsequent selection on Luria-Bertani (LB) agar plate supplemented with
134 ampicillin (100 µg mL⁻¹). Transformants were investigated by plasmid profiling,
135 plasmid restriction analysis, PCR assay (primer set 5'-CS / 3'-CS), for the expression of
136 streptomycin/spectinomycin resistance. Sequencing was conducted with the M13
137 universal and reverse primers (MWG, Ebersberg, Germany). Sequence analyses and

138 comparisons were carried out with the ORF Finder program
139 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) and the BLAST® programs blastn and
140 blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The nucleotide sequence of the complete
141 variable part of the class 1 integron and its flanking regions has been deposited in the
142 EMBL database under accession number **HG314953.2**.

143

144 **Hybridization experiments**

145 The location of the class 1 integrons was investigated by Southern blot hybridization.
146 For this, plasmid and EcoRI-digested genomic DNA, of eight *S. Derby* isolates
147 (representatives of different plasmid profiles or isolation sources), were transferred from
148 agarose gels to a nylon membrane by the capillary blot procedure. The sequenced
149 amplicon of the variable part of the class 1 integron was enzymatically labelled by the
150 Dig-High Prime DNA Labelling and Detection System (Roche, Mannheim, Germany)
151 and used as probe. Hybridization and signal detection were carried out according to the
152 manufacturer's recommendations.

153

154 **Identification of flanking regions of the *aadA26* gene cassette**

155 For the characterization of the flanking regions of the *aadA26* gene cassette, inverse
156 PCR assays were performed. Genomic DNA of the *S. Derby* isolate 26 was digested
157 with EcoRI and self-ligated by T4 DNA ligase during overnight incubation at 14 °C.
158 Aliquots of the ligation reaction were used as template in the inverse PCR assays with
159 outwards primer sets (left-hand terminus: *aadA* fw + class 1 integrase rv; right-hand
160 terminus: *aadA* rv + *sul1* fw, Table 1, Fig. 1). For this, a 50 µL reaction mixture
161 containing 100 ng of genomic DNA, 0.02 U µL⁻¹ of Phusion High-Fidelity DNA
162 Polymerase (Thermo Scientific, Germany) in 5 X Phusion HF buffer, 120 µM of dNTPs

163 and 0.4 μM of each primer were used. The PCR conditions consisted of an initial
164 denaturation for 2 minutes at 99 $^{\circ}\text{C}$, followed by 35 cycles of denaturation for 30
165 seconds at 98 $^{\circ}\text{C}$, annealing for 30 seconds at 55 $^{\circ}\text{C}$ and extension for 4 minutes at 72
166 $^{\circ}\text{C}$, followed by a final extension step of 5 minutes at 72 $^{\circ}\text{C}$. The amplified fragments
167 showing the expected sizes (according to the size of the labelled fragments seen in the
168 Southern blot hybridization) were purified by gel extraction and cloned into pCR[®]2.1-
169 TOPO[®] vector. The recombinant vectors were transformed into the recipient strain *E.*
170 *coli* TOP10. Transformants were selected on LB agar plates supplemented with
171 ampicillin (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Transformed plasmids were investigated by restriction
172 analysis and sequenced by primer walking starting with M13 universal and reverse
173 primers.

174 To complete the sequence between the *aadA26* gene cassette and the gene *sull*
175 (right-hand flanking region of *aadA26* gene cassette), a PCR assay was conducted using
176 the primer set *aadA* fw + *sull* rv (Fig. 1 and 2). To confirm the linkage between the
177 gene cassette *aadA26* and the gene *intI1* (left-hand flanking region of *aadA26* gene
178 cassette), a PCR was conducted with the primer set class 1 integrase fw + *aadA* rv (Fig.
179 1 and 3). Both amplicons were sequenced by primer walking starting with the primers
180 used in the respective PCR assays.

181 To investigate the location of the class 1 integron in a Tn21-related transposon,
182 PCR assays were performed for the investigation of transposition genes and the
183 presence of the mercury resistance (*mer*) operon. Primer sets were used for the
184 amplification of the individual genes *tnpA* (TnpA21-F + TnpA21-R), *tnpM* (TnpM-F +
185 TnpM-R) (Kiiru *et al.*, 2013) and *merA* (*merA*-F2 + *merA*-R2) or for the linkage
186 between the Tn21 genes *tnpA-tnpR* (*tnpA*-R100-R + *tnpR*-R100-F) (Rodríguez *et al.*,
187 2006). The linkage of Tn21 and the *aadA26* gene cassette of *S. Derby 26* was

188 investigated by PCR using the combination of the following primers: TnpA21-F + class
189 1 integrase rv, tnpA-R100-R + class 1 integrase rv, TnpM-F + class1 rv and sull fw +
190 merA-F2.

191

192 **Results and discussion**

193 In this study, multi-resistant *S. Derby* isolates from pigs obtained during survey studies
194 in Southern Brazil were characterized. Although the 27 multi-resistant *S. Derby* isolates
195 have been obtained in different slaughterhouses, B (n=16) and C (n=11), and from
196 different sources (lairage, carcasses and intestinal content), the isolates showed the same
197 resistance pattern (streptomycin/spectinomycin-sulphonamides-tetracycline) and shared
198 the same XbaI-macrorestriction pattern (Fig. 2a). All isolates from slaughterhouse B
199 showed also the same plasmid profile (PP1) (Fig. 2b). The isolates from slaughterhouse
200 B were obtained from all different sources during a single sampling day. In this way, a
201 cross contamination in the slaughterhouse B cannot be excluded. Interestingly, these
202 isolates showed the same XbaI-macrorestriction pattern as seen among isolates from
203 slaughterhouse C, which is located approximately 500 km away from slaughterhouse B.
204 The isolates from slaughterhouse C were found in samples from carcasses and intestinal
205 content collected during two sampling days (27-days interval) and among them, four
206 plasmid profiles were identified (PP2-5) (Fig. 2b). Noteworthy, 27 multi-resistant
207 isolates carried virtually the same class 1 integron. These findings may suggest the
208 spread of a resistant clone of *S. Derby* in the pig production chain in the Southern
209 Brazil. An explanation for this clonal dissemination, within this particular geographic
210 area in Brazil, could be the pig production system. It is a vertically integrated system, in
211 which the slaughterhouses are supplied by specific finishing farms that purchase the
212 piglets from only few common pig-producing farms.

213 PCR analysis revealed that all isolates carried an *aadA* variant coding for an
214 aminoglycoside adenytransferase which confers combined resistance to
215 streptomycin/spectinomycin, the gene *sulI* coding for a sulphonamide-insensitive
216 dihydropteroate synthase, the tetracycline exporter gene *tet(A)* and the class 1 integrase
217 gene *intI1*. With the PCR for the variable part of class 1 integrons, amplicons of
218 approximately 1 kb were detected in all isolates. These amplicons showed also the same
219 EcoRI-RFLP profile (fragments of 560 and 449 bp). Class 2 integrons were not
220 detected. Sequence analysis of a representative amplicon for the variable part of the
221 class 1 integron revealed the presence of a single gene cassette carrying a reading frame
222 for a new variant of the AadA aminoglycoside adenytransferase (259 amino acids),
223 designated AadA26 (Fig. 3). This *aadA26* gene cassette proved to be functionally active
224 and showed an amino acid substitution in the coding region, Ile→Val at the position
225 209, that is unique in the database entries (blastp; last accessed 26. January 2014). Gene
226 cassettes carrying variants of the *aadA* gene have been commonly found inserted into
227 class 1 integrons (Gebreyes *et al.*, 2004). The *aadA1* gene cassette was the most
228 frequently observed among *Salmonella* isolates from different sources, including animal
229 feed and food-producing animals in Brazil (Peirano *et al.*, 2006).

230 This study aimed not only the identification of integrons but the characterization
231 of the genetic context in which they are inserted. Since the hybridization experiments
232 did not yield signals when using plasmid DNA as targets, but produced signals when
233 using digested genomic DNA, the class 1 integrons are supposed to be located in the
234 chromosomal DNA of the *S. Derby* isolates. To identify the genetic environment of
235 downstream of the *aadA26* gene cassette, the amplicon of the corresponding inverse
236 PCR assay was sequenced. In this region, the *qacEΔ1* and *sulI* genes, the *orf5* and the
237 partial sequence of an ORF, *istB*, of the insertion sequence IS1326 (Liebert *et al.*, 1999)

238 were identified (Fig. 3). The inverse PCR and cloning experiments performed for the
239 left-hand flanking region of the *aadA26* gene cassette did not yield clones with the
240 correct insert. However, the sequence analysis of the amplicon of the linkage PCR
241 (class1 fw + aadA rv) confirmed the presence of the *intI1* gene upstream the *aadA26*
242 gene cassette.

243 The assembling of these sequences, which comprised the variable part of the class
244 1 integron and its flanking regions, resulted in a 3,988-bp fragment (Fig. 3) which
245 showed 99 % identity with the sequence of the plasmid pIP1202 of *Yersinia pestis*
246 biovar Orientalis strain IP275 (accession number **CP000603.1**) and 98 % identity with
247 sequences of plasmids found in an uncultured bacterium (accession number
248 **JQ004408.1**), in *S. Typhimurium* (accession numbers **AB576781.2**, **AB723628.1**,
249 **AB605179.1**, **JF274992.1** and **JF274991.1**), *E. coli* (accession numbers **HQ201416.1**
250 and **DQ364638.1**) and *Shigella flexneri* (accession number **AP000342.1**) isolates.
251 Identity of 98 % was also found with the sequence of the chromosomal DNA of the
252 enteroaggregative *E. coli* strain 042 (accession number **FN554766.1**).

253 Further sequence analysis showed that in all these sequences the region of the
254 3,988-bp fragment was inserted into transposons, such as the Tn21 found on the plasmid
255 R100 of *S. flexneri* 2b (or plasmid RN1 from *E. coli*) (Liebert *et al.*, 1999) or in the
256 chromosomal DNA of *E. coli* 042 (Chaudhuri *et al.*, 2010). In contrast, the isolates were
257 from diverse geographic origins, such as plasmid pIP1202 from *Y. pestis* IP275, which
258 was isolated from a bubonic plague patient in Madagascar (Welch *et al.*, 2007), the
259 plasmid from an uncultured bacterium detected in soil fertilized with pig manure in
260 Germany (Heuer *et al.*, 2012), or the sequence of the chromosomal DNA of *E. coli* 042
261 isolated from a child with diarrhea in Peru (Chaudhuri *et al.*, 2010). This underlines the
262 importance of transposons and plasmids in the dissemination of antimicrobial

263 resistance. However, the PCR assays performed for the detection of the transposition
264 region and the *mer* operon and their linkage to the class 1 integron detected in *S. Derby*
265 26 were all negative, except for the *merA* gene.

266 When the present results were compared with those of a previous study (sampling
267 period 1999-2000) conducted in Southern Brazil (Michael *et al.*, 2006), it became
268 obvious that the multi-resistance pattern (streptomycin/spectinomycin-sulphonamides-
269 tetracycline) was also the most common pattern found among the isolates of the
270 previous study. Almost all isolates that shared the same resistance phenotype showed
271 also the same resistance genotype. However, in the previous study, an *aadA2* was found
272 and in the present study, the new variant *aadA26* was identified. Moreover, the isolates
273 from the present study shared the same XbaI-macrorestriction pattern with one isolate or
274 differed by only three fragments from another 23 isolates of the previous study (Fig.
275 2a). Although there is an 8-years interval between the two survey studies and different
276 slaughterhouses were sampled, the class 1 integrons and their gene cassettes and the
277 presence of the *tet(A)* resistance gene proved to be highly conserved and stable. Such a
278 situation may be explained by the genetic linkage of the resistance determinants to
279 truncated transposons of the Tn3 family (e.g. Tn21-related and Tn1721 transposons)
280 with a compromised transfer module which maintains them permanently anchored
281 within the chromosomal DNA.

282 The long term presence of virtually the same class 1 integron among related *S.*
283 *Derby* isolates from pigs at slaughter, points towards a dissemination of the integron by
284 a clonal expansion of the isolates in apparently healthy pigs. Noteworthy, such
285 asymptomatic carriers may promote the dissemination of *S. Derby* not only to other
286 animals, but also to humans when the isolates enter the food chain.

287

288 **Acknowledgements**

289 G. V. Lopes is supported by a scholarship of the Coordination for the Improvement of
290 Higher Education Personnel (CAPES). During her time in Germany, she was supported
291 by a scholarship from the Science without Border Program of the National Council for
292 Scientific and Technological Development (CNPq-Brazil). The authors thank Roswitha
293 Becker and Regina Ronge for excellent technical assistance.

294

295 **References**

- 296 Beutlich J, Jahn S, Malorny B *et al.* (2011) Antimicrobial resistance and virulence
297 determinants in European *Salmonella* genomic island 1-positive *Salmonella*
298 *enterica* isolates from different origins. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5655-5664.
- 299 Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening
300 recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* **7**: 1513-1523.
- 301 Cambray G, Guerout AM & Mazel D (2010) Integrons. *Annu Rev Genet* **44**: 141-166.
- 302 Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Guerin E, Da Re S, González-Zorn B,
303 Ploy MC, Barbé J, Mazel D & Erill I (2011) Prevalence of SOS-mediated control
304 of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile
305 integrons. *Mob DNA* **2**: 6. doi: 10.1186/1759-8753-2-6.
- 306 Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013) National *Salmonella*
307 Surveillance Annual Report, 2011. Atlanta, Georgia: US Department of Health and
308 Human Services, CDC, p. 1-18, 2013. Available at: [http://www.cdc.gov](http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/salmonella-annual-report-2011-508c.pdf)
309 [/ncezid/dfwed/PDFs/salmonella-annual-report-2011-508c.pdf](http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/salmonella-annual-report-2011-508c.pdf). Accessed on 02
310 mar. 2014.

- 311 Chaudhuri RR, Sebahia M, Hobman JL *et al.* (2010) Complete genome sequence and
312 comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia*
313 *coli* strain 042. *PLoS One* **5**: e8801. doi: 10.1371/journal.pone.0008801.
- 314 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013a) Performance standards for
315 antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from
316 animals; second informational supplement. CLSI document VET01-S2. CLSI,
317 Wayne, Pennsylvania, USA.
- 318 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013b) Performance standards for
319 antimicrobial susceptibility: twenty third informational supplement. CLSI
320 document M100-S23. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.
- 321 Dagert M & Ehrlich SD (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the
322 competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-8.
- 323 Domingues S, Silva GJ & Nielsen KM (2012) Integrons: Vehicles and pathways for
324 horizontal dissemination in bacteria. *Mob Genet Elements* **2**: 211-223.
- 325 European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and
326 Control (ECDC) (2013) The European Union summary report on trends and
327 sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J*
328 **11**: 3129 [250 pp.].
- 329 Gebreyes WA, Thakur S, Davies PR, Funk JA & Altier C (2004) Trends in
330 antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes
331 from pigs, 1997-2000. *J. Antimicrob. Chemother* **53**: 997-1003.
- 332 Frech G, Kehrenberg C & Schwarz S (2003) Resistance phenotypes and genotypes of
333 multiresistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium var.
334 Copenhagen isolates from animal source. *J Antimicrob Chemother* **51**: 180-182.

- 335 Grape M, Sundström L & Kronvall G (2003) Sulphonamide resistance gene *sul3* found
336 in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J Antimicrob Chemother* **52**:
337 1022-1024.
- 338 Heuer H, Binh CT, Jechalke S, Kopmann C, Zimmerling U, Krögerrecklenfort E,
339 Ledger T, González B, Top E & Smalla K (2012) IncP-1 ϵ plasmids are important
340 vectors of antibiotic resistance genes in agricultural systems: diversification driven
341 by class 1 integron gene cassettes. *Front Microbiol* **3**: 2. doi:
342 10.3389/fmicb.2012.00002.
- 343 Kadlec K & Schwarz S (2008) Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons
344 and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses,
345 cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. *J Antimicrob*
346 *Chemother* **62**: 469-473.
- 347 Kadlec K, Kehrenberg C & Schwarz S (2005) Molecular basis of resistance to
348 trimethoprim, chloramphenicol and sulphonamides in *Bordetella bronchiseptica*. *J*
349 *Antimicrob Chemother* **56**: 485-490.
- 350 Kado CI & Liu ST (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and
351 small plasmids. *J Bacteriol* **145**: 1365-73.
- 352 Kich JD, Coldebella A, Morés N, Nogueira MG, Cardoso M, Fratamico PM, Call JE,
353 Fedorka-Cray P & Luchansky JB (2011) Prevalence, distribution, and molecular
354 characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a
355 slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. *Int J Food Microbiol* **151**: 307-313.
- 356 Kiiru J, Butaye P, Goddeeris BM, Kariuki S (2013) Analysis for prevalence and
357 physical linkages amongst integrons, ISEcp1, ISCR1, Tn21 and Tn27 encountered
358 in *Escherichia coli* strains from hospitalized and non-hospitalized patients in
359 Kenya during a 19-year period (1992-2001). *BMC Microbiol* **n**: 13: 109.

- 360 Liebert CA, Hall RM & Summers AO (1999) Transposon Tn21, flagship of the floating
361 genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 507-522.
- 362 Machado E, Coque TM, Canton R, Souza JC & Peixe L (2013) Commensal
363 *Enterobacteriaceae* as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons,
364 and *sul* genes in Portugal. *Front Microbiol* **4**: 1-7.
- 365 Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR, Ayers DJ & McCowan SM (1978) A multiple
366 plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference
367 plasmid molecules. *Plasmid* **1**: 417-420.
- 368 Michael GB, Simonetti R, Costa M & Cardoso MRI (2003) Comparison of different
369 selective enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. from faeces of finishing swine.
370 *Braz J Microbiol* **34**: 138-142.
- 371 Michael GB, Cardoso M & Schwarz S (2005) Class 1 integron-associated gene cassettes
372 in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from pig carcasses
373 in Brazil. *J Antimicrob Chemother* **55**: 776-779.
- 374 Michael GB, Cardoso M, Rabsch W & Schwarz S (2006) Phenotypic and genotypic
375 differentiation of porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Derby
376 isolates. *Vet Microbiol* **118**: 312-318.
- 377 Mürmann L, Santos MC & Cardoso M (2009) Prevalence, genetic characterization and
378 antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto
379 Alegre, Brazil. *Food Control* **20**: 191-195.
- 380 Peirano G, Agersø Y, Aarestrup FM, dos Reis EM & dos Prazeres Rodrigues D (2006)
381 Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella*
382 *enterica* from Brazil. *J Antimicrob Chemother* **58**: 305-359.
- 383 Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B & Barrett TJ
384 (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the

- 385 subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet.
386 *Foodborne Pathog Dis* **3**: 59-67.
- 387 Rodríguez I, Rosario Rodicio M, Carmen Mendoza M & Cruz Martín M (2006) Large
388 conjugative plasmids from clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Virchow
389 contain a class 2 integron in addition to class 1 integrons and several non-integron-
390 associated drug resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1603-
391 1607.
- 392 Sandvang D, Diggle M & Platt DJ (2002) Translocation of integron-associated
393 resistance in a natural system: acquisition of resistance determinants by IncP and
394 IncW plasmids from *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *Microb Drug*
395 *Resist* **8**: 151-160.
- 396 Schwarz S & Liebisch B (1994) Use of ribotyping, IS200 typing and plasmid analysis
397 for the identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium
398 vaccine strain Zoosaloral H and its differentiation from wild type strains of the
399 same serovar. *Zentralb Bakteriol* **281**: 442-450.
- 400 Schwarz S, Kehrenberg C, Salmon SA & Watts JL (2004) In vitro activities of
401 spectinomycin and comparator agents against *Pasteurella multocida* and
402 *Mannheimia haemolytica* from respiratory tract infections of cattle. *J Antimicrob*
403 *Chemother* **53**: 379-382.
- 404 Silva LE, Dias V, Ferronato A, Guerra P, Berno L, Triches N, Kich JD, Corbellini LG
405 & Cardoso M (2012) Longitudinal dissemination of *Salmonella enterica* clonal
406 groups through the slaughter process of *Salmonella*-positive pig batches. *J Food*
407 *Prot* **75**:1580-1588.

- 408 Stokes HW, Martinez E, Roy Chowdhury P & Djordjevic S (2012) Class 1 integron-
409 associated spread of resistance regions in *Pseudomonas aeruginosa*: plasmid or
410 chromosomal platforms? *J Antimicrob Chemother* **67**: 1799-1800.
- 411 van Essen-Zandbergen A, Smith H, Veldman K & Melvius D (2007) Occurrence and
412 characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and
413 *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* **59**: 746-750.
- 414 Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF *et al.* (2007) Multiple antimicrobial resistance in
415 plague: an emerging public health risk. *PLoS One* **2**: e309.
- 416

417 **Table 1.** Primers used for screening for genetic elements and for detection of physical linkages between class 1 integron and Tn21
 418 transposon

PCR	Primer	DNA sequence (5'-3')	GenBank	Reference
5'-CS (left-hand)	aadA fw	GTGGATGGCGGCCTGAAGCC	X68227.1	Schwarz <i>et al.</i> , 2004
	class 1 integrase rv	CAAGGTTCTGGACCAGTTGCG	U67194.4	Sandvang <i>et al.</i> , 2002
3'-CS (right-hand)	aadA rv	ATTGCCCAGTCGGCAGCG	X68227.1	Schwarz <i>et al.</i> , 2004
	sul1 fw	ATGGTGACGGTGTTCGGCATTCTGA	U04277.1	Grape <i>et al.</i> , 2003
<i>tnpA</i>	tnpA-R100-F	GATCGGCGCGGGGAAGTTCAGGC	NC_002134.1	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006
	tnpA-R100-R	AGCCGGTTGCAGAGGCCGTAGC		
	TnpA21-F	TGCGCTCCGGCGACATCTGG	NC_002134.1	Kiiru <i>et al.</i> , 2013
	TnpA21-R	TCAGCCCGGCATGCACGCG		
<i>tnpR</i>	tnpR-R100-F	GAGCGTCAGCGCGAGGGTATTG	AF_071413	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006
<i>tnpM</i>	TnpM-F	TCAACCTGACGGCGGCGA	AF_071413	Kiiru <i>et al.</i> , 2013
	TnpM-R	CCTCGGCTACCACCTCC		
<i>merA</i>	merA-F2	AAGGCGCACGTGTCACGCTGATC	AF_071413	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006
	merA-R2	CCGCTGCCTTCTTCAACCACCAG		

419

420

421 **Fig. 1.** Schematic representation of the inverse PCR assay. (a) In the upper part, the
422 predicted flanking regions of the sequenced *aadA26* gene cassette are shown. They were
423 predicted by linkage PCR assays with the primer sets class 1 fw + *aadA* rv (left-hand
424 flanking region) and *aadA* fw + *sul1* rv (right-hand flanking region). The size of the
425 EcoRI restriction fragments (ca. 3 and 4.5 kb) were determined by the signals obtained
426 in the Southern blot hybridization experiment. Based on this information (b) the
427 genomic DNA of *S. Derby* 26 was digested with EcoRI, (c) the fragments were self-
428 ligated and amplified by PCR.

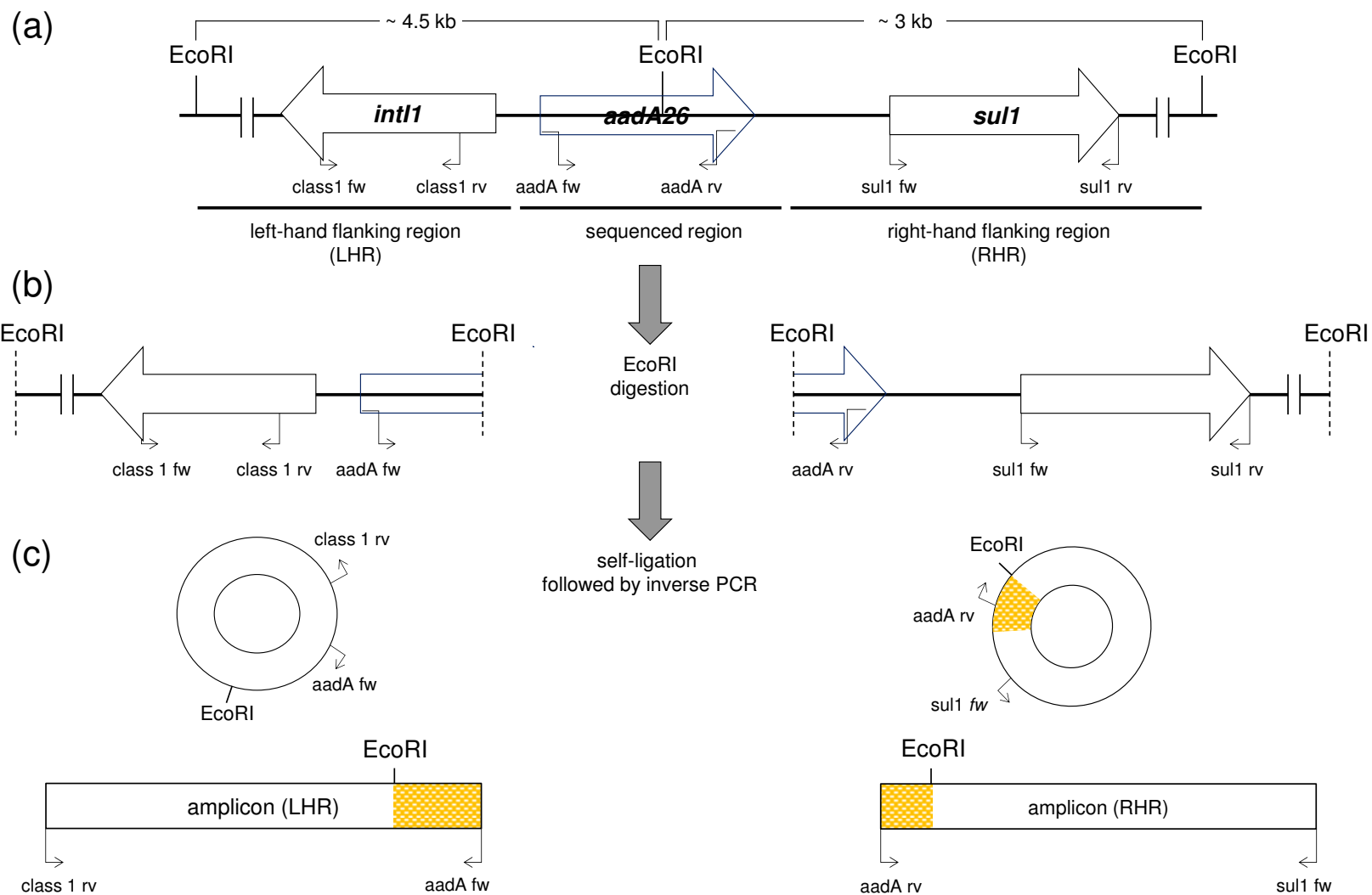
429

430 **Fig. 2.** Molecular characterization of *S. Derby* isolates. (a) XbaI-macrorestriction
431 pattern seen with the *S. Derby* isolates detected in the present study is shown in lane 1,
432 whereas in lanes 2 and 3 the patterns of *S. Derby* isolates detected in a previous study
433 conducted in Southern Brazil (Michael *et al.*, 2006) are shown. Lane M contains XbaI-
434 digested DNA of *S. Braenderup* H9812, which was used as size standard. (b) Lanes 1 to
435 5 correspond to the plasmid profiles, PP1 to PP5, of *S. Derby* isolates. Lane M contains
436 plasmids of the *E. coli* V517 (size standard).

437

438 **Fig. 3.** Schematic presentation of the *aadA26* gene cassette, its flanking regions, and the
439 alignment of the complete fragment with sequences of the Database. (a) Detailed
440 presentation of the *aadA26* gene cassette of *S. Derby* 26, in which the *aadA26* reading
441 frame is shown as a stippled arrow (the arrowheads indicate the direction of
442 transcription), the translational start (GTG) and stop (TGA) codons are underlined, the
443 59-base element (59-be or *attC* site) is presented as a stem-loop structure and the
444 integrase 1 binding domains 1L, 2L, 2R, and 1R are indicated by arrows. (b)
445 Presentation of the left-hand flanking region of the *aadA26* gene cassette with the

446 partial sequence of *intI1* gene (in the 5'-CS), the right-hand flanking region showing the
447 genes *qacEΔ1* and *sull1*, the *orf5* (in the 3'-CS) and the partial sequence of ORF *istB*
448 from IS1326. The EcoRI restriction site and the position and orientation of primers are
449 also shown. A vertical bar next to the ORF *istB* represents a terminal inverted repeat of
450 IS1326. (c) Alignment in which the horizontal bars (I, II and III) represent the
451 sequences with the best matches found by the BLASTN when the 3,988-bp fragment of
452 *S. Derby 26* was used as query: (I) *Y. pestis* IP275 (accession number **CP000603.1**), (II)
453 *S. Typhimurium* (accession numbers **AB576781.2**, **AB723628.1**, **AB605179.1**,
454 **JF274992.1** and **JF274991.1**), *E. coli* (accession numbers **HQ201416.1**, **FN554766.1**
455 and **DQ364638.1**) and *Shigella flexneri* (accession number **AP000342.1**) and (III) of an
456 uncultured bacterium (accession number **JQ004408.1**). The light gray regions indicate
457 100 % identity and each vertical line represents a single nucleotide substitution. The
458 vertical arrow indicates the insertion of three G residues (GGG-disruption of the LexA
459 binding site) (Cambray *et al.*, 2011) which was absent in *S. Derby 26* and the uncultured
460 bacterium. The symbols } or < indicate the location on the positive or negative strand,
461 respectively. While the *aadA2* gene was present in plasmid pIP1202 of *Y. pestis* IP275,
462 an *aadA1* gene was identified in the remaining sequences. A distance scale in kb is
463 given below the alignment.



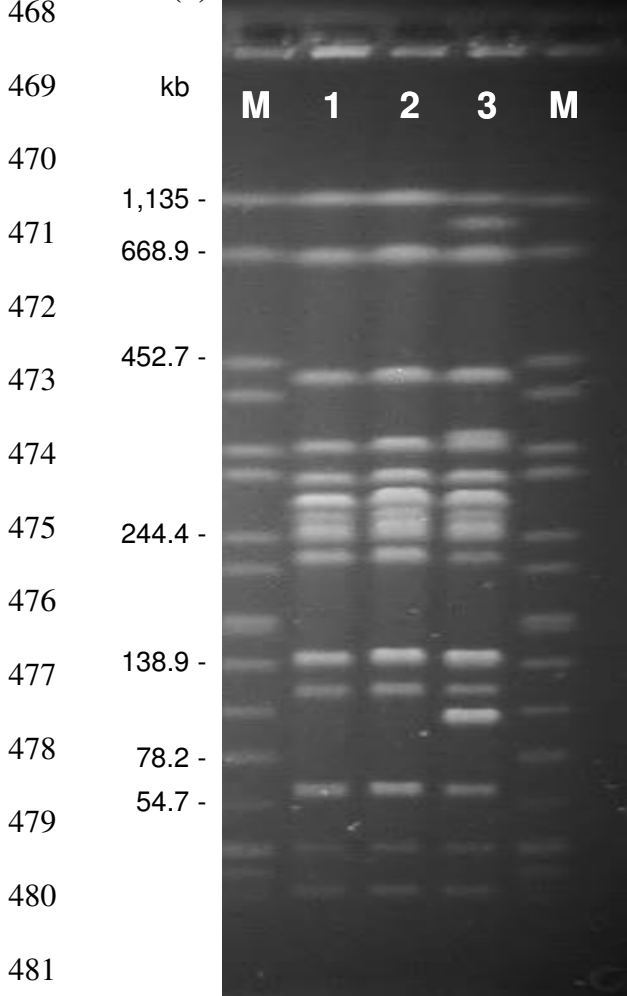
464

465 **Fig. 1**

466

467

468 (a)



(b)

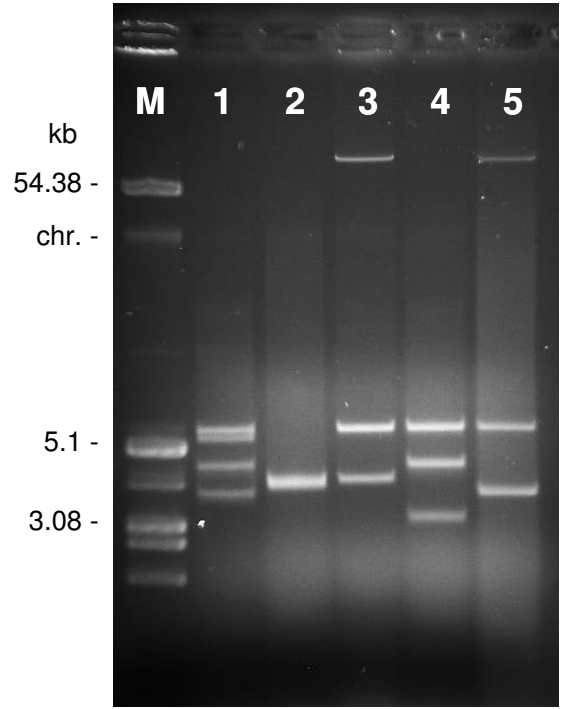


Fig. 2

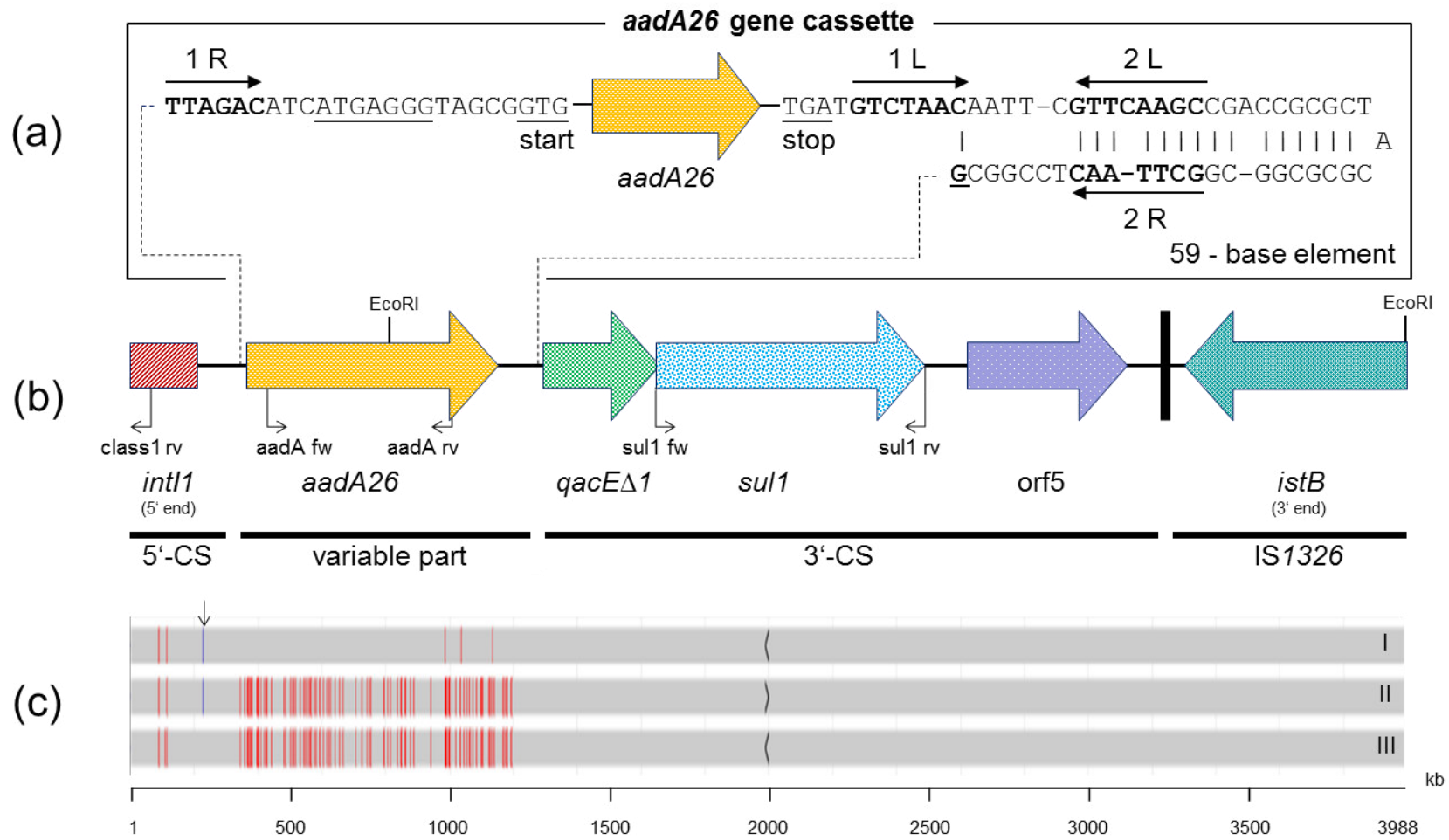


Fig. 3

CAPÍTULO 4

Antimicrobial resistance and class 1 integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs at slaughter in Southern Brazil

1 **Antimicrobial resistance and class 1 integron-associated gene cassettes**
2 **in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs at**
3 **slaughter in Southern Brazil**

4
5
6 Graciela Volz Lopes^{1,2}, Geovana Brenner Michael², Marisa Cardoso¹ &
7 Stefan Schwarz^{2*}

8
9
10 ¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio
11 Grande do Sul (UFGRS), Porto Alegre, Brazil; and ²Institute of Farm Animal Genetics,
12 Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Neustadt-Mariensee, Germany.

13
14
15 **Key words:** conjugation, resistance plasmids, hybrid virulence-resistance plasmids,
16 food-producing animals

17
18
19 (Artigo a ser submetido para publicação no periódico *FEMS Microbiology Letters*)

20
21
22 * Author for correspondence: Prof. Dr. Stefan Schwarz, Institute of Farm Animal
23 Genetics, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Hoeltystr. 10, 31535 Neustadt-Mariensee,
24 Germany. Tel: +49 (0) 5034 871241; fax: +49 (0) 5034 871 143; e-mail:
25 stefan.schwarz@fli.bund.de

26 **Abstract**

27 Forty-five multi-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar (S.) Typhimurium
28 isolates obtained at five slaughterhouses in Southern Brazil were characterized. Their
29 relatedness was determined by XbaI-macrorestriction analysis. Resistance genes,
30 integrons and plasmid-mediated quinolone resistance genes (PMQR) were identified by
31 PCR. Amplicons for the variable part of class 1 integrons and from the quinolone
32 resistance-determining regions (QRDR) were sequenced. Plasmids were characterized
33 by alkaline lysis, conjugation and replicon typing. Eighteen XbaI-macrorestriction
34 patterns and 19 plasmid profiles (ca. 2.7-150 kb) were seen. Resistance to ampicillin
35 (*bla*_{TEM}), chloramphenicol (*catA1* and *floR*), streptomycin (*strA-strB*),
36 streptomycin/spectinomycin (*aadA* variant), sulphonamides (*sul1*, *sul2* and *sul3*) and
37 tetracyclines [*tet*(A) and *tet*(B)] were commonly found. A *dfrA8* trimethoprim resistance
38 gene was identified on a 100-kb plasmid. Only single substitutions were found in the
39 QRDR of GyrA and no PMQR were found. A total of 25 isolates was carrying class 1
40 integrons with *aadA23* gene cassette or an unusual integron carrying *dfrA12*-orfF-
41 *aadA27* gene cassettes. Both integrons were found on large conjugative plasmids.
42 *Salmonella* plasmid-located virulence genes *spvR*, *spvA*, *spvB*, *rck* and *pefA* were found
43 on a multi-resistance IncFIB plasmid. Plasmids harbouring class 1 integrons or hybrid
44 resistance/virulence plasmids play an important role in the maintenance and spreading
45 of antimicrobial resistance among bacteria.

46

47 **Introduction**

48 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar (*S.*) Typhimurium, which affects both
49 humans and animals, is one of the most commonly reported serovars worldwide (CDC,
50 2013; EFSA & ECDC, 2013). In different countries as well as in Southern Brazil, *S.*
51 Typhimurium has been also the most prevalent serovar isolated from swine finishing
52 herds and slaughter facilities (Kich *et al.*, 2011; Gomes-Neves *et al.*, 2012; Arguello *et*
53 *al.*, 2013; Mueller-Doblies *et al.*, 2013). A matter of concern are the carrier pigs that
54 may excrete *S.* Typhimurium under stressful conditions, e.g. during the transport to
55 slaughterhouses or during the stay in the lairage. They represent a potential source of
56 pork contamination (de Busser *et al.*, 2011) and thereby may play an important role in
57 the dissemination of antimicrobial resistant isolates throughout the food chain.

58 The presence of genetic elements such as integrons, transposons and plasmids has
59 been frequently associated with multi-resistance phenotypes among *Salmonella* isolates.
60 In addition, in several *Salmonella* serovars hybrid plasmids carrying antimicrobial
61 resistance determinants and virulence genes have been described (Guerra *et al.*, 2002;
62 Herrero *et al.*, 2008). In this study, porcine *S.* Typhimurium isolates from
63 slaughterhouses were analysed (i) for the phenotypic and genotypic antimicrobial
64 resistance properties, (ii) for the presence of integrons and plasmid virulence genes, (iii)
65 for the location of integrons and (iv) for transferability of plasmids carrying integrons or
66 virulence genes.

67

68 **Materials and Methods**

69 **Bacterial strains and antimicrobial susceptibility testing**

70 For this study, *S. Typhimurium* isolates obtained from a cross-sectional study conducted
71 at five pig slaughterhouses (A, B, C, D and E) in Southern Brazil were selected (Silva *et*
72 *al.*, 2012; Pissetti *et al.*, 2012). During the period from 2007 to 2011, a total of 502
73 samples from lairage environment, carcasses and intestinal content of pigs were
74 collected. The samples from lairage were taken from the floor using the overshoe
75 method. For carcass, swab samples from a 300 cm² area were collected. A piece of the
76 caecum from each carcass was taken at the time of evisceration. To avoid duplicates,
77 only one *Salmonella* isolate per sample was selected. *Salmonella* was found in 27.3 %
78 (137/502) of the samples. A total of 75 isolates from lairage (n=9), carcass (n=54) and
79 intestinal content (n=12) was identified as *S. Typhimurium*.

80 The antimicrobial susceptibility testing of isolates, transformants and
81 transconjugants was performed by agar disc diffusion according to the
82 recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute, documents
83 VET01-S2 and M100-S23 (CLSI, 2013a, b). The antimicrobial agents tested were:
84 ampicillin (AMP, 10 µg), cefotaxime (CTX, 30 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg),
85 chloramphenicol (CHL, 30 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), gentamicin (GEN, 10 µg),
86 kanamycin (KAN, 10 µg), nalidixic acid (NAL, 30 µg), streptomycin (STR, 10 µg),
87 compound sulphonamides (SUL, 300 µg), tetracycline (TET, 30 µg) and trimethoprim
88 (TMP, 5 µg). Multi-resistant isolates (resistance to at least three different classes of
89 antimicrobial agents) were further characterized. The minimum inhibitory concentration
90 (MIC) for ciprofloxacin was screened by agar dilution followed the recommendations of
91 the document M07-A9 (CLSI, 2012). Five representative isolates from different
92 ciprofloxacin MICs (0.25, 0.5, 1 and 4 µg mL⁻¹) were additionally tested for their
93 nalidixic acid, enrofloxacin and ciprofloxacin MIC by broth microdilution (CLSI,

94 2008). The reference strain *Escherichia coli* ATCC[®] 25922 was used for quality control
95 purposes.

96

97 **Molecular typing**

98 Plasmid profiling was performed by modified alkaline lysis methods (Kado & Liu,
99 1981; Birnboim & Doly, 1979). The *E. coli* V517 (Macrina *et al.*, 1978), *S.*
100 Typhimurium LT2 (McClelland *et al.*, 2001) and *Klebsiella pneumoniae* R55
101 (CloECKaert *et al.*, 2001) reference plasmids were used as size standards.

102 The relatedness of multi-resistant *S. Typhimurium* isolates (n= 45) was
103 investigated by macrorestriction analysis with XbaI endonuclease (Thermo Scientific,
104 Vilnius, Lithuania). For this the standard PulseNet conditions (Ribot *et al.*, 2006) were
105 followed. Except to concentration of the cell suspensions, that was set to an optical
106 density of 0.3 at 578 nm (Schwarz & Liebisch, 1994). The DNA fragments were
107 separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using the CHEF DR III system
108 (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). Whole cell DNA of *S. Braenderup* H9812
109 digested with XbaI served as size marker. Macrorestriction patterns were analysed using
110 the GelCompar software package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) and the
111 similarities between the patterns were determined on the basis of the Dice correlation
112 coefficient, with a maximal position tolerance of 1 %. Patterns were clustered the
113 unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA).

114

115 **Detection of resistance determinants and integrons**

116 Detection of antimicrobial resistance genes was performed by PCR assays described
117 elsewhere (Frech & Schwarz, 2000; Kadlec *et al.*, 2005). These included the
118 investigation of resistance genes to ampicillin (*bla*_{TEM} and *bla*_{PSE-1}), aminoglycosides

119 [*strA*, *strB*, *ant(3'')-Ia*, *ant(2'')-Ia*, *aac(3)-IIa*, *aac(3)-IVa*, *aph(3')-Ia*], phenicols
120 (*catA1* and *floR*), sulphonamides (*sul1*, *sul2* and *sul3*), tetracyclines [*tet(A-E)* and
121 *tet(G)*] and trimethoprim (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA14-A17* and *dfrB1*, *dfrB2*, *dfrB3*).

122 The five representative isolates of the different ciprofloxacin MICs were
123 investigated for mutations in the quinolone resistance-determining region (QRDR) of
124 the target genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes by PCR assays and sequence analysis
125 (Kehrenberg *et al.*, 2006). These isolates were also investigated for the presence of
126 plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*,
127 *qepA*, *oqxAB* and *acc(6')-Ib-cr* genes) by PCR assays (Wang *et al.*, 2003; Kehrenberg *et*
128 *al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; Cavaco *et al.*, 2009; Cattoir *et al.*, 2008).

129 Class 1 integrons were investigated by PCR assays for the detection of the class 1
130 integrase gene *intI1*, sulphonamide resistance gene *sul1*, quaternary ammonium
131 compounds resistance gene *qacEΔ1* and their linkage and for the variable region
132 [between 5'-conserved segment (CS) and 3'-CS] (Sandvang *et al.*, 1997; Sandvang *et*
133 *al.*, 2002, Kadlec *et al.*, 2005; Michael *et al.*, 2005). Class 2 integrons were also
134 investigated for the presence of the class 2 integrase gene (*intI2*) by PCR (Kadlec &
135 Schwarz, 2008). Since trimethoprim resistance genes have been found on gene cassettes
136 inserted in unusual integrons; trimethoprim resistant isolates, which showed negative
137 PCR results for *intI1* or *sul1* and *qacEΔ1* genes (genes commonly found in the 5'-CS or
138 3'-CS of class 1 integrons), were nevertheless investigated for the variable part of the
139 integrons by PCR. Amplicons specific for the variable part of the integrons were
140 analysed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using the restriction
141 endonucleases BclI and HindIII.

142

143 **Nucleotide Sequencing**

144 At least one representative amplicon of the different variable part of the integrons was
145 cloned and sequenced. Cloning experiments were performed with the pCR[®]2.1-TOPO[®]
146 vector (Invitrogen, Groningen, The Netherlands). The recombinant vectors were
147 transformed by heat shock into CaCl₂-treated competent *E. coli* TOP10 or JM109 cells
148 (Dagert & Ehrlich, 1979). Transformant were selected on Luria-Bertani (LB) agar plates
149 supplemented with ampicillin (100 µg mL⁻¹) or trimethoprim (30 µg mL⁻¹).
150 Transformed plasmids were investigated by plasmid restriction analysis and for the
151 expression of the respective resistance determinant inserted into the integron. The
152 sequencing was conducted by primer walking; the primers M13 universal and reverse
153 primers (MWG, Ebersberg, Germany) started the analysis. Sequence comparisons were
154 carried out using the BLAST[®] programs blastn and blastp
155 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi>) and with the ORF Finder program
156 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). The nucleotide sequences of the
157 amplicons have been deposited in the EMBL database under accession numbers
158 **HG314954** and **HG314952.1**.

159 The genomic environment of the unusual plasmid-borne class 1 integron of *S.*
160 Typhimurium isolate 89 was characterized by primer walking using a transformed
161 plasmid as target DNA. The class 1 integron was considered unusual because of the
162 negative PCR results for the detection of the *intl1*, *sul1* and *qacEΔ1* genes. For this
163 plasmid DNA was transferred into *E. coli* recipient strain HB101 by
164 electrotransformation. Electrotransformants were selected on LB agar plates containing
165 trimethoprim (30 µg mL⁻¹). Transformed plasmid was isolated by anion-exchange
166 chromatography on NucleoBond Xtra midi columns (Macherey-Nagel, Düren,
167 Germany) and submitted to primer walking sequencing starting on both termini of the
168 sequence of the respective variable part of class 1 integron which was sequenced before.

169 *In vitro* susceptibility testing of the electrotransformants was performed by disc
170 diffusion.

171 In order to identify a trimethoprim resistance gene in the *S. Typhimurium* isolate
172 77, which showed negative PCR results for the detection of class 1 and 2 integrons and
173 for all trimethoprim genes tested, its plasmids were extracted by anion-exchange
174 chromatography on NucleoBond Xtra midi columns and electrotransformed into *E. coli*
175 HB101. Electrotransformants were selected on Luria-Bertani (LB) agar supplemented
176 with 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of trimethoprim. A transformed plasmid was digested with PstI
177 endonuclease and the fragments were cloned into pBluescript II SK(+) vector
178 (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands). Recombinant plasmids were subsequently
179 transformed into *E. coli* TOP10. Electrotransformants were analysed by susceptibility
180 testing, restriction analysis and sequencing. Sequencing was performed by primer
181 walking starting by the M13 universal and reverse primers. The nucleotide sequence of
182 the PstI-fragment carrying the trimethoprim resistance gene has been deposited in the
183 GenBank database under accession number [KJ174469](#).

184

185 **Hybridization experiments**

186 To determine the location of class 1 integrons, 12 *S. Typhimurium* isolates
187 (representatives of different plasmid profiles or isolation sources) were selected for
188 Southern Blot hybridization. It was performed using plasmid and EcoRI-digested
189 genomic DNA, which were transferred from agarose gels to a nylon membrane by the
190 capillary blot procedure. The sequenced amplicon of the variable part of the class 1
191 integron was enzymatically labelled by Dig-High Prime DNA Labelling and Detection
192 System (Roche, Mannheim, Germany) and used as probe. Hybridization and signal
193 detection were carried out according to the manufacturer's recommendations.

194

195 Detection of plasmid-borne virulence genes

196 The isolates were investigated for the presence of the *Salmonella* plasmid virulence
197 (*spv*) genes by PCR assays. All of them were first screened for the virulence regulator
198 *spvR* gene (Rubino *et al.*, 1998). Positive isolates were further investigated for the
199 remaining genes of the *spv* operon (*spvA*, *spvB*, *spvC* and *spvD*) and for the virulence
200 plasmid genes *rck* (resistance to complement killing) and *pefA* (plasmid-encoded
201 fimbriae) (Beutlich *et al.*, 2011; Guerra *et al.*, 2002; Herrero *et al.*, 2006). *S.*
202 Typhimurium LT2 was used as a positive control.

203

204 Plasmid transfer experiments

205 Conjugation experiments were conducted to confirm the horizontal transferability of the
206 plasmids harbouring integrons and virulence genes. Five integron-positive strains and
207 one isolate harbouring *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) genes were included as donor
208 cells. Plasmids were transferred by electrotransformation, as described before
209 (Kehrenberg & Schwarz, 2001), into *E. coli* HB101 with subsequent selection on Luria-
210 Bertani (LB) agar plates containing either tetracycline (10 µg mL⁻¹), chloramphenicol
211 (10 µg mL⁻¹), ampicillin (100 µg mL⁻¹) or trimethoprim (30 µg mL⁻¹).
212 Electrotransformants were screened for their plasmid content and resistance phenotype
213 by agar disc diffusion.

214 Conjugation was performed using the electrotransformants or *S.* Typhimurium
215 isolates as donor and the sodium azide-resistant *E. coli* J53 as recipient strain. Liquid
216 cultures of donor and recipient strains were prepared separately in LB broth and grown
217 overnight at 37 °C. Recipient and donor cells were mixed in a ratio of 1:5 and
218 centrifuged for 15 minutes at 1500 g. Supernatants were discarded and the cells were

219 spotted on the surface of a LB agar plates. Mating plates were incubated for 4 hours at
220 37 °C or at room temperature, when the plasmids were not conjugative at 37 °C. Cells
221 were collected in 1 mL of a 0.85 % NaCl and serial dilutions were prepared. Aliquots of
222 100 µL were spread on LB agar supplemented with sodium azide (200 µg mL⁻¹) and
223 onto the LB agar with sodium azide plus any of the aforementioned selective
224 antimicrobial agents. Putative transconjugants were grown at 37 °C for, at least, 48
225 hours. The frequencies of the plasmid conjugation were calculated by dividing the
226 number of transconjugants by the number of recipient cells. The phenotypic resistance
227 patterns of the transformants or transconjugants were determined by a susceptibility
228 testing by agar disc diffusion. Moreover, they were checked for the presence of the class
229 1 integrons and co-located resistance. The recipient strains *E. coli* HB101 and J53
230 served as negative controls in these PCR assays.

231

232 **Plasmid replicon typing**

233 The incompatibility (Inc) groups of plasmids from electrotransformants or
234 transconjugants were determined by PCR-based replicon typing. Detection of IncA/C,
235 IncB/O, IncF (FIA, FIB, FIC, FIIA subgroups), IncHI1, IncHI2, IncI1-Ic, IncK, IncL/M,
236 IncU, IncT and IncY replicons was performed by PCR, using primers and conditions
237 previously described (Carattoli *et al.*, 2005).

238

239 **Results and Discussion**

240 **Antimicrobial resistance phenotypes and molecular typing**

241 Forty-five *S. Typhimurium* isolates proved to be multi-resistant and were selected for
242 molecular characterization. Susceptibility testing revealed the presence of eleven
243 different multi-resistance patterns (Table 1). Among the most common resistance

244 properties, tetracycline resistance was found in all multi-resistant isolates and ampicillin
245 resistance was found in 95.5 % (43/45) of the isolates. In contrast, resistance to
246 cefotaxime or ceftazidime was not detected. Low frequency of resistance to third-
247 generation cephalosporin in *Salmonella* has been reported by monitoring studies in
248 England and Wales, Germany and United States (Miller *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*,
249 2012; Wittum *et al.*, 2012).

250 One to six plasmids, ranging approximately from 2 to > 150 kb, were detected
251 with the multi-resistant isolates. A total of 19 plasmid profiles (PP1-PP19) could be
252 seen (Table 1). Thirty-nine isolates, distribute among 16 plasmid profiles, harboured
253 plasmids larger than 90 kb. Eleven isolates shared the most common plasmid profile
254 (PP17) and most common resistance pattern AMP-NAL-SUL-TET-TMP, but one of
255 them showed a different XbaI-PFGE patterns. XbaI-macrorestriction of the 45 multi-
256 resistant isolates generated 18 XbaI-PFGE patterns, eleven of them were unique (Table
257 1, Fig. 1). In contrast, some XbaI-PFGE patterns (e.g. STX5, STX9 and STX15) were
258 shared by isolates from the same slaughterhouse or even from different slaughterhouses
259 (STX2). The most common pattern, STX15, was seen in 10 isolates from
260 slaughterhouse E. The detection of the same *S. Typhimurium* clone from 10 different
261 animal carcasses within the same slaughterhouse may suggest a cross-contamination
262 during the slaughter process.

263

264 **Antimicrobial resistance genotypes and characterization of class 1 integrons**

265 PCR analysis for resistance genes revealed the presence of the ampicillin resistance
266 gene *bla*_{TEM}, the tetracyclines efflux genes *tet*(A) and *tet*(B), the sulphonamide-
267 insensitive dihydropteroate synthase genes *sul1*, *sul2* and *sul3*, the chloramphenicol
268 acetyltransferase *catA1* gene, the florfenicol/chloramphenicol efflux *floR* gene and the

269 aminoglycoside phosphotransferase genes *strA*, *strB* and *aph(3')-Ia* and the
270 aminoglycoside acetyltransferase genes *aac(3)-IIa* and *aac(3)-IVa* (Table 1). Specific
271 PCR assay confirmed the physical linkage of *strA-strB* genes or *sul2-strA-strB* genes.

272 Five representative isolates resistant to nalidixic acid showed decreased
273 ciprofloxacin susceptibility (MIC 0.125 - 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The sequences of the QRDR
274 revealed single bp mutations in the region of *gyrA* gene (Table 2). A single isolate
275 showed amino acid substitutions at position 87 of the GyrA protein (according to *E. coli*
276 numbering): Asp87→Asn (GAC→AAC). At position 83, one isolate showed the amino
277 acid substitution Ser83→Phe (TCC→TTC), and the remaining showed Ser83→Tyr
278 (TCC→TAC). The substitution Ser83→Phe in the GyrA protein is one of the most
279 common (Hwang *et al.*, 2010). The QRDR of the *gyrB*, *parC* and *parE* genes showed
280 the non-mutated wild type sequences. The PMQR genes were not detected among *S.*
281 *Typhimurium* isolates. It is interesting to note that with an isolate showing resistance to
282 ciprofloxacin (MIC 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a single amino acid substitution Ser83→Tyr
283 (TCC→TAC) in GyrA protein was seen. Although additional substitutions in ParC or
284 ParE proteins are usually required to achieve ciprofloxacin resistance.

285 Twenty-five isolates were positive for the variable part of class 1 integron.
286 Amplicons of ~ 1 or 2 kb were seen with 13 or 12 isolates, respectively. Based on the
287 sequence of representatives of each size of amplicons, restriction analyses were
288 performed with BclII or HindIII. The shorter amplicons (~ 1 kb) shared the same pattern
289 with two fragments of 706 and 303 bp when digested with BclII. The larger amplicons (~
290 2 kb) showed the same fragment pattern with HindIII digestion, consisting of three
291 fragments of 1179, 517 and 217 bp. Isolates carrying the shorter amplicon were also
292 positive for *intI1*, *sul1* and *qacE Δ 1* genes. In contrast, isolates harboring the larger
293 amplicon were negative for the aforementioned genes. Class 2 integrons were not found.

294 Sequence analysis of the shorter amplicon of *S. Typhimurium* 70 (representative
295 isolate) revealed a variable part of 1009 bp carrying a single gene cassette. The gene
296 cassette carried a variant of the aminoglycoside resistance gene *aadA23*, which encodes
297 a 259-amino-acid aminoglycoside adenytransferase AadA23 that confers combined
298 resistance to streptomycin and spectinomycin. The 59-base element of the gene cassette
299 was identified containing the binding sites 1L, 2L, 1R and 2R for the *intI1*-encoded
300 integrase. The structure of the *aadA23* gene cassette including the dyad symmetry of the
301 59-base element is presented schematically in Figure 2a. The amino acid sequence
302 showed 100 % identity to AadA23 protein of *S. Typhimurium* (accession number
303 **CAX52766.2**) and *S. Agona* (accession number **CAH10847.1**), which were isolated
304 from swine holding pen and carcass, respectively, in the same geographic area in
305 Southern Brazil (Michael *et al.*, 2005).

306 Sequence analysis of the larger amplicon (*S. Typhimurium* 89) showed a variable
307 part of 1913 bp carrying the *dfrA12*-orfF-*aadA27* gene cassette array. The first gene
308 cassette harboured a trimethoprim resistance gene that encodes a DfrA12 enzyme of a
309 165 amino acids. The third cassette showed a reading frame coding for a new variant of
310 the AadA aminoglycoside adenytransferase, designated AadA27. The two amino acids
311 difference in comparison with the AadA1 protein from the class 1 integron is due to the
312 double amino acid substitutions in the coding region: Gln→Arg (at position 8) and
313 Asp→Gly (at position 240). The first substitution is not unique, but the second is unique
314 in the database. The gene cassette in the middle is an open reading frame with unknown
315 function (Fig. 2b). The *dfrA12*-orfF-*aadA27* revealed 99 % identity with a gene cassette
316 from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Lansing (accession number
317 **EF550586.1**). The *dfrA12*-orfF-*aadA27* can be distinguished from *dfrA12*-orfF-*aadA2*
318 by two amino acid substitutions within the *aadA* gene cassette, constituting the new

319 variant for aminoglycoside adenylyltransferase gene. The *dfrA12-orfF-aadA2* gene
320 cassette was previously identified on plasmid from *S. Typhimurium* DT104 and *S.*
321 Rissen in Portuguese pig production (Antunes *et al.*, 2011). It was also found in *S.*
322 Choleraesuis, *S. Enteritidis* and *S. Newport* isolated from animal hosts (Hsu *et al.*,
323 2013).

324

325 **Location and transferability of class 1 integrons**

326 Hybridization experiments showed the presence of class 1 integrons on large plasmids
327 (95-150 kb). Transformation and conjugation experiments were performed with five
328 isolates that harboured class 1 integron and showed different plasmid profiles. All five
329 plasmids were transferred by electrotransformation, but only two of them proved to be
330 conjugative (Table 3). The presence of the class 1 integron and its gene cassettes and
331 co-located resistance genes was confirmed by PCR using plasmid DNA from
332 electrotransformants and transconjugants. All resistance gene cassettes and resistance
333 genes, tested with clones, electrotransformants or transconjugants, were functionally
334 active. Moreover, almost all resistance properties found in the isolates were identified
335 on the transferred plasmids (Table 1 and 3).

336 Replicon typing, conducted with electrotransformants or transconjugants, revealed
337 the presence of IncHI1, IncF, and IncFIB (Table 3). The plasmids carrying the *aadA23*
338 gene cassette showed the IncHI1 and one isolate was positive for additional Inc groups,
339 IncF, and IncFIB. The plasmids carrying the *dfrA12-orfF-aadA27* gene cassette showed
340 the group IncF. Plasmids belonging to these Inc groups are commonly found in
341 *Enterobacteriaceae* and have been described as self-transmissible plasmid (Carattoli,
342 2009). In this work different conditions and incubation temperature of the mating
343 mixture were tested, but only two plasmids proved to be conjugative. Nevertheless, it is

344 a matter of concern the fact that in two representative isolates class 1 integrons
345 harbouring the *aadA23* or *dfrA12-orfF-aadA27* gene cassettes and additional
346 antimicrobial resistance genes were found on large conjugative plasmids (100 or 150
347 kb). This observation underlines the risk of dissemination and co-transfer of these
348 resistance properties. Furthermore, the related *dfrA12-orfF-aadA2* gene cassette array of
349 class 1 integrons which was first identified into a transposon Tn21-like element on the
350 plasmid of a clinical *E. coli* isolate (Heikkila *et al.*, 1993) has been already found in the
351 chromosomal DNA of Gram-positive bacteria (Xu *et al.*, 2011).

352

353 **Characterization of cassette-independent trimethoprim resistance gene**

354 In trimethoprim resistant isolate 77, which showed negative PCR results for the
355 detection of class 1 and 2 integrons and for all tested trimethoprim resistance genes, was
356 found a 100-kb plasmid mediating resistance to ampicillin, chloramphenicol,
357 streptomycin, sulphonamides, gentamicin and trimethoprim. PCR analysis identified the
358 corresponding resistance genes *bla*_{TEM}, *floR*, *strA-strB*, and *sul2*. Whereas the
359 gentamicin resistance gene could not be detected, the trimethoprim resistance gene was
360 identified in a 2,005-bp PstI-fragment of the 100-kb plasmid of the isolate (Table 3).
361 Sequence analysis of this PstI-fragment showed the presence of a trimethoprim
362 resistance gene (*dfrA8*) and an unknown open reading frame (orf1) being flanked by
363 direct repeats of the insertion sequence IS26. The *dfrA8* gene encodes a 169-amino acid
364 dihydrofolate reductase enzyme (DfrA8). The 14-bp perfect terminal inverted repeats
365 (TTTGCAACAGTGCC), characteristic of IS26, were also identified. The 100 kb
366 plasmid showed the incompatibility group IncI1 and was called plasmid pST77.

367 The comparison of the nucleotide sequence of the PstI-fragment or the *dfrA8* gene
368 with the available sequences showed the highest score of 99 % or 100 % identity,

369 respectively, with the sequences of plasmid pMLO226 of *E. coli* (accession number
370 U10186.1) and plasmid pBH700 of *Shigella sonnei* (accession number U09273.1). The
371 gene *dfrA8* has been identified in *E. coli* isolates recovered from diseased swine, as well
372 as in human clinical isolates (Seputiené *et al.*, 2010). Additionally, among 75
373 trimethoprim resistant *E. coli* isolates, the *dfrA8* was found in 55 integron-independent
374 isolates (Pallecchi *et al.*, 2007). The *dfrA8* gene does not appear to be a recombination
375 substrate for the integrons but has been assembled, by the independent insertion of two
376 IS26 elements on either side, into a compound transposon Tn5091 (Sundström *et al.*,
377 1995).

378

379 **Characterization of the flanking region of the unusual class 1 integron**

380 The unusual class 1 integron from *S. Typhimuirum* isolate 89 proved to be located on a
381 conjugative ~100 kb plasmid which mediates resistance to ampicillin, streptomycin,
382 sulphonamides, tetracycline and trimethoprim. PCR analysis identified the
383 corresponding resistance genes as *bla*_{TEM}, *aadA* variant, *sul3* and *tet(A)*. The sequencing
384 of the flanking regions of the *dfrA12*-orfF-*aadA27* gene cassette array resulted on a
385 4,109-bp fragment.

386 Sequence analysis from the left-hand flanking region of the variable part of the
387 class 1 integron (gene cassette array) showed, upstream the *dfrA12* gene cassette, the
388 *intl1* gene truncated by the insertion sequence IS26. The sequencing performed for the
389 right-hand flanking region of the class 1 integron, downstream the *aadA27* gene
390 cassette, revealed the insertion of a truncated *ISEcp-1*-like in the 3'-CS, 92 nucleotides
391 downstream the *aadA27* gene cassette and the presence of a coding sequence whose
392 protein may be involved in oxidation-reduction process, an Pyridoxamine 5'-phosphate
393 oxidase-like.

394 Sequences comparisons revealed 99 % identity with the sequence of the plasmid
395 pK1HV (position 23,040 – 25,794) of *Klebsiella pneumoniae* strain K1HV (accession
396 number HF545434.1). It was the best match and showed a 100 % of query cover.
397 However, in this part of the sequence of plasmid pK1HV a complete *intI1* gene and a
398 truncated transposase of Tn21 transposon are seen before the IS26. In the gene cassette
399 array only the substitutions in the *aadA27* gene cassette were seen. Both sequences
400 showed the insertion of a truncated *ISEcp-1*-like. But in plasmid pK1HV a transposase
401 was inserted between the truncated *ISEcp-1*-like and the last coding sequence identified
402 in the 4,109-bp fragment of *S. Typhimurium*. Such analysis show insertion sequence-
403 mediated deletions in the conserved segments of the class 1 integron. Since deletion,
404 duplication, and rearrangement of the gene cassettes occur only in the presence of the
405 integron-encoded integrase (Collis & Hall, 1992; Fluit & Schmitz, 1999), defective
406 integrases cannot excise, insert or rearrange gene cassettes.

407 The absence of the usual class 1 integron-associated 3'-CS due to the insertion
408 of IS26 was previously reported on a plasmid isolated from bovine-derived *E. coli* strain
409 (Dawes *et al.*, 2010). Previous studies described the dissemination of *sul3* gene
410 associated with plasmid-borne class 1 integrons containing an unusual 3'-CS site. Sáenz
411 *et al.* (2010) reported the presence of *qacH*, IS440, *sul3*, *orf1*, *mef(B)* and IS26
412 downstream the *dfrA12*-*orfF*-*aadA2* gene cassette array of class 1 integrons.

413

414 **Characterisation of a hybrid virulence-resistance plasmid**

415 The *spvR* gene was found in a single multi-resistant isolate, no. 77, which was
416 also positive for the *Salmonella* plasmid-located virulence genes *spvA*, *spvB*, *rck* and
417 *pefA* (Table 3). PCR assays, with transformed plasmid, revealed that virulence genes
418 and additional resistance genes [*sul2*, *tet(B)*] were located on a ~ 90 kb plasmid. This

419 plasmid belonged to the IncFIB. Plasmids of IncF family have been associated to the
420 presence of antimicrobial resistance genes and virulence genes. Such co-evolution of
421 virulence and antimicrobial resistance genes may contribute to the fitness of the
422 bacteria and represents an important tool for the spreading of the plasmid among diverse
423 hosts and environments (Carattoli, 2009, Rodríguez et al., 2011; Tamamura *et al.*,
424 2013). In addition to the hybrid virulence-resistance plasmid, the *S. Typhimurium* 77
425 harbors a multi-resistance plasmid, the 100-kb plasmid with the resistance genes *bla*_{TEM},
426 *floR*, *strA-strB*, *dfrA8* and a second copy of *sul2* (Table 3). Nevertheless, this isolate
427 showed a reduced susceptibility to fluoroquinolones and was found on a carcass which
428 may represent a potential risk to human health when such isolates enter in the food
429 chain.

430

431 **Acknowledgements**

432 G. V. Lopes is supported by a scholarship of the Coordination for the Improvement of
433 Higher Education Personnel (CAPES). During her time in Germany, she was supported
434 by a scholarship from the Science without Border Program of the National Council for
435 Scientific and Technological Development (CNPq-Brazil). The authors thank Roswitha
436 Becker and Regina Ronge for excellent technical assistance.

437

438 **References**

439 Antunes P, Mourão J, Pestana N & Peixe L (2011) Leakage of emerging clinically
440 relevant multidrug-resistant *Salmonella* clones from pig farms. *J Antimicrob*
441 *Chemother* **66**: 2028-2032.

- 442 Arguello H, Sørensen G, Carvajal A, Baggesen DL, Rubio P & Pedersen K (2013)
443 Prevalence, serotypes and resistance patterns of *Salmonella* in Danish pig
444 production. *Res Vet Sci* **95**: 334-342.
- 445 Beutlich J, Jahn S, Malorny B, Hauser E, Hühn S, Schroeter A, Rodicio MR, Appel B,
446 Threlfall J, Mevius D, Helmuth R, Guerra B & Med-Vet-Net WP21 Project Group
447 (2011) Antimicrobial resistance and virulence determinants in European
448 *Salmonella* genomic island 1-positive *Salmonella enterica* isolates from different
449 origins. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5655-5664.
- 450 Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening
451 recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* **7**: 1513-1523.
- 452 Carattoli A (2009) Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob*
453 *Agents Chemother* **53**: 2227–2238.
- 454 Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL & Threlfall EJ (2005)
455 Identification of plasmids by PCR based replicon typing. *J Microbiol Methods* **63**:
456 219-228.
- 457 Cattoir V, Poirel L & Nordmann P (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance Pump
458 QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother*
459 **52**: 3801-3804.
- 460 Cavaco LM, Hasman H, Xia S & Aarestrup M (2009) *qnrD*, a Novel Gene Conferring
461 Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and
462 Bovismorbificans Strains of Human Origin. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:
463 603-608.
- 464 Centers for Disease Control and Prevention - CDC (2013) Surveillance for foodborne
465 disease outbreaks- United States, 1998-2008. *MMWR* **62** (Suppl 2): 1-34.

- 466 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008) Performance standards for
467 antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from
468 animals: Approved Standard – Third Edition. CLSI document M31-A3. CLSI,
469 Wayne, Pennsylvania, USA.
- 470 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012) Methods for dilution
471 antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved
472 Standard – Sixth Edition. CLSI document M7-A9. CLSI, Wayne, Pennsylvania,
473 USA.
- 474 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013b) Performance standards for
475 antimicrobial susceptibility testing: Twenty-third Informational Supplement. CLSI
476 document M100-S23. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.
- 477 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013a) Performance standards for
478 antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from
479 animals; second informational supplement. CLSI document VET01-S2. CLSI,
480 Wayne, Pennsylvania, USA.
- 481 Cloeckaert A, Baucheron S & Chaslus-Dancla E (2001) Nonenzymatic chloramphenicol
482 resistance mediated by IncC plasmid R55 is encoded by a *floR* gene variant.
483 *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2381–2382.
- 484 Collis CM & Hall RM (1992) Site-specific deletion and rearrangement of integron
485 insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol* **174**: 1574-1585.
- 486 Dagert M & Ehrlich SD (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the
487 competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-8.
- 488 Dawes FE, Kuzevski A, Bettelheim KA, Hornitzky MA, Djordjevic SP & Walker MJ
489 (2010) Distribution of class 1 integrons with IS26-mediated deletions in their 3'-

- 490 conserved segments in *Escherichia coli* of human and animal origin. *Plos One* **5**:
491 e12754.
- 492 De Busser EV, Maes D, Houf K, Dewulf J, Imberechts H, Bertrand S & De Zutter L
493 (2011) Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses
494 and intestines in five slaughterhouses. *Int J Food Microbiol* **145**: 279-286.
- 495 European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and
496 Control (ECDC) 2013. The European Union Summary Report on Trends and
497 Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J*
498 **11**: 3129p.
- 499 Fluit AC & Schmitz FJ (1999) Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and
500 epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**: 761-770.
- 501 Frech G & Schwarz S (2000) Molecular analysis of tetracycline resistance in
502 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin,
503 Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene
504 probes. *J Appl Microbiol* **89**: 633-41.
- 505 Gomes-Neves E, Antunes P, Tavares A, Themudo P, Cardoso MF, Gärtner F, Costa JM
506 & Peixe L (2012) *Salmonella* cross-contamination in swine abattoirs in Portugal:
507 Carcasses, meat and meat handlers. *Int J Food Microbiol* **157**: 82-87.
- 508 Guerra B, Soto S, Helmuth R & Mendoza MC (2002) Characterization of a self-
509 transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical
510 isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and
511 drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2977–2981.
- 512 Heikkila E, Skurnik M, Sundström L & Huovinen P (1993) A novel dihydrofolate
513 reductase cassette inserted in an integron borne on a Tn21-like element.
514 *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 1297–1304.

- 515 Herrero A, Rodicio MR, Echeita MA & Mendoza MC (2008) *Salmonella enterica*
516 serotype Typhimurium carrying hybrid virulence-resistance plasmids (pUO-
517 StVR): a new multidrug-resistant group endemic in Spain. *Int J Med Microbiol*
518 **298**: 253-261.
- 519 Herrero A, Rodicio MR, González-Hevia MA & Mendoza MC (2006) Molecular
520 epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype
521 Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2. *J*
522 *Antimicrob Chemother* **57**:39-45.
- 523 Hsu YM, Tang CY, Lin H, Chen YH, Chen YL, Su YH, Chen DS, Lin JH & Chang CC
524 (2013) Comparative study of class 1 integron, ampicillin, chloramphenicol,
525 streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline (ACSSuT) and fluoroquinolone
526 resistance in various *Salmonella* serovars from humans and animals. *Comp*
527 *Immunol Microbiol Infect Dis* **36**: 9-16.
- 528 Hwang IS, Song JY, Kim WJ, Jeong HW, Kim MS & Cheong HJ (2010) Prevalence
529 and mechanisms of low level quinolone resistance among non-typhoidal
530 *Salmonella* isolates from human and poultry/livestock in Korea: usefulness of
531 nalidixic acid resistance test. *Infect Chemother* **42**:230-236.
- 532 Kadlec K & Schwarz S (2008) Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons
533 and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses,
534 cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. *J Antimicrob*
535 *Chemother* **62**: 469-473.
- 536 Kadlec K, Kehrenberg C & Schwarz S (2005) Molecular basis of resistance to
537 trimethoprim, chloramphenicol and sulphonamides in *Bordetella bronchiseptica*. *J*
538 *Antimicrob Chemother* **56**: 485-90.

- 539 Kado CI & Liu ST (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and
540 small plasmids. *J Bacteriol* **145**: 1365-1373.
- 541 Kehrenberg C & Schwarz S (2001) Molecular analysis of tetracycline resistance in
542 *Pasteurella aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2885–2890.
- 543 Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A, Michael GB & Schwarz S (2006)
544 Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella*
545 *enterica* serovar Infantis. *J Antimicrob Chemother* **58**: 18-22.
- 546 Kich JD, Coldebella A, Morés N, Nogueira MG, Cardoso M, Fratamico PM, Call JE,
547 Fedorka-Cray P & Luchansky JB (2011) Prevalence, distribution, and molecular
548 characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a
549 slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. *Int J Food Microbiol* **151**: 307-313.
- 550 Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR, Ayers DJ & McCowan SM (1978) A multiple
551 plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference
552 plasmid molecules. *Plasmid* **1**: 417-420.
- 553 McClelland M, Sanderson KE & Spieth J *et al.* (2001) Complete genome sequence of
554 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **213**: 852-856.
- 555 Michael GB, Cardoso M & Schwarz S (2005) Class-1 integron associated gene cassettes
556 in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from pig carcasses
557 in Brazil. *J Antimicrob Chemother* **55**: 776-779.
- 558 Miller AJ, Twomey DF, Davies RH, Teale CJ, Williamson SM, Reichel R, Featherstone
559 CA, Cook AJC, Snow LC & Armstrong JD (2011) *Salmonella* Serovars and
560 Antimicrobial Resistance Patterns on a Sample of High Seroprevalence Pig Farms
561 in England and Wales (2003–2008). *Zoonoses Public Health* **58**: 549-559.

- 562 Mueller-Doblies D, Speed K & Davies RH (2013) A retrospective analysis of
563 *Salmonella* serovars isolated from pigs in Great Britain between 1994 and 2010.
564 *Prev Vet Med* **110**: 447-455.
- 565 Pallecchi L, Lucchetti C, Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Gamboa H, Carattoli A,
566 Paradisi F & Rossolini GM (2007) Population structure and resistance genes in
567 antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic
568 exposure. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 1179-1184.
- 569 Pissetti C, Werlang GO, Biesus LL, Kich JD & Cardoso M (2012) Detecção de
570 *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes* em carcaças suínas na etapa de pré-
571 resfriamento *Acta Scienti Vet* **40**: 1071. [Article in Portuguese]
- 572 Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B & Barrett TJ
573 (2006) Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the
574 Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet.
575 *Foodborne Pathog Dis* **3**: 59-67.
- 576 Rodríguez I, Guerra B, Mendoza MC & Rodicio MR (2011) pUO-SeVR1 is an
577 emergent virulence–resistance complex plasmid of *Salmonella enterica* serovar
578 Enteritidis. *J Antimicrob Chemother* **66**: 218-220.
- 579 Rodríguez I, Jahn S, Schroeter A, Malorny B, Helmuth R & Guerra B (2012) Extended-
580 spectrum β -lactamases in German isolates belonging to the emerging monophasic
581 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 4,[5],12:i:- European
582 clone. *J Antimicrob Chemother* **67**: 505-508.
- 583 Rubino S, Muresu E, Solinas M, Santona M, Paglietti B, Azara A, Schiaffino A,
584 Santona A, Maida A & Cappuccinelli P (1998) IS200 fingerprint of *Salmonella*
585 *enterica* serovar Typhimurium human strains isolated in Sardinia. *Epidemiol*
586 *Infect* **120**: 215-222.

- 587 Sáenz Y, Vinué L, Ruiz E, Somalo S, Martínez S, Rojo-Bezares B, Zarazaga M &
588 Torres C (2010) Class 1 integrons lacking *qacEDelta1* and *sul1* genes in
589 *Escherichia coli* isolates of food, animal and humans origins. *Vet Microbiol*
590 **144**:493-497.
- 591 Sandvang D, Aarestrup FM & Jensen LB (1997) Characterisation of integrons and
592 antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica*
593 Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett* **157**: 177–181.
- 594 Sandvang D, Diggle M & Platt DJ (2002) Translocation of integron-associated
595 resistance in a natural system: acquisition of resistance determinants by IncP and
596 IncW plasmids from *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *Microb Drug*
597 *Resist* **8**: 151–60.
- 598 Schwarz S & Liebisch B (1994) Use of ribotyping, IS200 typing and plasmid analysis
599 for the identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium
600 vaccine strain Zoosaloral H and its differentiation from wild type strains of the
601 same serovar. *Zentralbl Bakteriol.* **281**: 442–50.
- 602 Seputienė VS, Povilonis J, Ruzauskas M, Pavilonis A & Suziedeliene E (2010)
603 Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human
604 and animal origin in Lithuania. *J Med Microbiol* **59**: 315-322.
- 605 Silva LE, Dias V, Ferronato A, Guerra P, Berno L, Triches N, Kich JD, Corbellini LG
606 & Cardoso M (2012) Longitudinal dissemination of *Salmonella enterica* clonal
607 groups through the slaughter process of *Salmonella*-positive pig batches. *J Food*
608 *Prot* **75**:1580-1588.
- 609 Sundström L, Jansson C, Bremer K, Heikkilä E & Olsson-Liljequist B (1995) A new
610 *dhfr VIII* trimethoprim-resistance gene, flanked by IS26, whose product is remote
611 from other dihydrofolate reductases in parsimony analysis. *Gene* **154**: 7-14.

- 612 Tamamura Y, Tanaka K, Akiba M, Kanno T, Hatama S, Ishihara R & Uchida I (2013)
613 Complete Nucleotide Sequence of Virulence-Resistance Plasmids Carried by
614 Emerging Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolated
615 from Cattle in Hokkaido, Japan. *Plos One* **8**: e77644.
- 616 Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, Hooper DC & Wang M (2009) New
617 Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, *qnrC*, Found in a Clinical Isolate
618 of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 1892-1897.
- 619 Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F & Hooper DC (2003) Plasmid-
620 Mediated Quinolone Resistance in Clinical Isolates of *Escherichia coli* from
621 Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2242-2248.
- 622 Wittum TE, Mollenkopf DF & Erdman MM (2012) Detection of *Salmonella enterica*
623 Isolates Producing CTX-M Cephalosporinase in U.S. Livestock Populations. *Appl*
624 *Environ Microbiol* **78**: 7487-7491.
- 625 Xu Z, Li L, Shi L & Shirtliff ME (2011) Class 1 integron in staphylococci. *Mol Biol*
626 *Rep* **38**: 5261–5279.
- 627

628 **Table 1.** Phenotypic and genotypic characteristics of porcine *S. Typhimurium* isolates.

Abattoir	No. of isolates (Isolate no.)	Origin ^a	PFGE XbaI	Plasmid profile ^b	Resistance phenotype ^c	Resistance genotype
A	1	Ca	STX1	PP1	NAL-SPT-STR-TET	<i>strA-strB, tet(A)</i>
	1(3)	Ca	STX2	PP2	AMP-GEN-KAN-NAL-TET	<i>bla_{TEM}, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, tet(A)</i>
	1	Ic	STX2	PP2	AMP-GEN-KAN-NAL-TET	<i>bla_{TEM}, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, tet(A)</i>
	1	La	STX2	PP2	AMP-GEN-KAN-NAL-TET	<i>bla_{TEM}, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, tet(A)</i>
B	1	Ca	STX2	PP2	AMP-GEN-KAN-NAL-TET	<i>bla_{TEM}, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, tet(A)</i>
	3	Ca	STX3	PP3	AMP-GEN-KAN-TET	<i>bla_{TEM}, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, tet(A)</i>
	1	La	STX4	PP4	AMP-GEN-KAN-TET	<i>bla_{TEM}, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, tet(A)</i>
	1	Ca	STX1	PP5	AMP-GEN-KAN-TET	<i>bla_{TEM}, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, tet(A)</i>
C	1	Ca	STX5	PP6	AMP-CHL-GEN-STR-SUL-TET/MIN	<i>bla_{TEM}, catA1, floR, aac(3)-IVa, sul1, tet(B), class 1 integron (aadA23)</i>
	3 (43)	Ic	STX5	PP6	AMP-CHL-GEN-STR-SUL-TET/MIN	<i>bla_{TEM}, catA1, floR, aac(3)-IVa, sul1, tet(B), class 1 integron (aadA23)</i>
	1	Ca	STX5	PP19	CHL-STR-SUL-TET/MIN	<i>catA1, floR, sul1, tet(B), class 1 integron (aadA23)</i>
	1 (53)	Ic	STX6	PP7	AMP-CHL-KAN-STR-SUL-TET/MIN	<i>bla_{TEM}, catA1, aph(3')-Ia, strA-strB, sul1, tet(B), class 1 integron (aadA23)</i>
	1	Ic	STX7	PP8	AMP-GEN-KAN-NAL-STR-TET	<i>bla_{TEM}, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, strA-strB, tet(A)</i>
	1	Ic	STX8	PP9	AMP-CHL-GEN-STR-SUL-TET/MIN	<i>bla_{TEM}, catA1, floR, aac(3)-IVa, sul1, tet(B), class 1 integron (aadA23)</i>
D	6 (70)	Ca	STX9	PP10	AMP-CHL-KAN-STR-SUL-TET/MIN	<i>bla_{TEM}, catA1, aph(3')-Ia, strA-strB, sul1, tet(B), class 1 integron (aadA23)</i>
	1 (76)	La	STX10	PP11	AMP-NAL-STR-TET/MIN-TMP	<i>bla_{TEM}, tet(B), class 1 integron (dfrA12-orfF-aadA27)</i>
	1 (77)	Ca	STX11	PP12	AMP-CHL-GEN-NAL-STR-SUL-TET/MIN-TMP	<i>bla_{TEM}, catA1, floR, strA-strB-sul2, tet(B), dfrA8</i>
	1	La	STX1	PP13	AMP-GEN-KAN-NAL-TET	<i>bla_{TEM}, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, tet(A)</i>
E	1	Ca	STX12	PP14	AMP-NAL-TET/MIN-TMP	<i>bla_{TEM}, tet(A)</i>
	1	La	STX13	PP15	AMP-GEN-KAN-NAL-TET	<i>bla_{TEM}, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, tet(A)</i>
	1 (83)	La	STX14	PP16	AMP-GEN-KAN-NAL-TET	<i>bla_{TEM}, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, tet(A)</i>
	10 (89)	Ca	STX15	PP17	AMP-NAL-STR-SUL-TET-TMP	<i>bla_{TEM}, sul3, tet(A), class 1 integron (dfrA12-orfF-aadA27)</i>
	1	Ca	STX16	PP17	AMP-NAL-STR-SUL-TET-TMP	<i>bla_{TEM}, sul3, tet(A), class 1 integron (dfrA12-orfF-aadA27)</i>
	1 (91)	Ca	STX17	PP18	AMP-CHL-CIP-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TMP	<i>bla_{TEM}, catA1, floR, aac(3)-IIa, strA-strB, sul1, tet(A), dfrA1</i>
3	Ca	STX18	PP15	AMP-GEN-KAN-NAL-TET	<i>bla_{TEM}, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, tet(A)</i>	

629 ^a Origin of isolates: Ca, carcass; Ic, intestinal content; La, lairage.
630 ^b Plasmid profile (plasmid sizes in kb): PP1 (95, 45), PP2 (60), PP3 (95), PP4 (95, 5, 4, 3.5), PP5 (95, 8.5, 5, 4), PP6 (>150, 100, 3.5, 2), PP7 (>150, 3.5, 2.8, 2), PP8
631 (95, 30), PP9 (95, 5.5), PP10 (>150, 95, 3.5, 2), PP11 (95, 50, 40), PP12 (100, 90, 6), PP13 (80, 8.5, 5.4, 4.2, 3), PP14 (7, 4.5, 3.5), PP15 (>150), PP16 (95, 80), PP17
632 (95, 8, 4.5), PP18 (>150, 85, 8.5, 5.8, 4.5, 2), PP19 (>150, 95, 3.5, 2).
633 ^c AMP: ampicillin, CIP: ciprofloxacin, CHL: chloramphenicol, GEN: gentamicin, KAN: kanamycin, MIN: minocycline, NAL: nalidixic acid, STR: streptomycin, SUL:
634 sulphonamides, TET: tetracycline, TMP: trimethoprim.
635
636

637 **Table 2.** Analysis of quinolone resistance among *S. Typhimurium* isolated from pigs.

Isolate no.	Resistance phenotype ^a	Origin	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			GyrA substitution (<i>gyrA</i> mutation)	GyrB substitution	ParE substitution	ParC substitution
			NAL ^b	CIP ^b	ENR ^b				
89	AMP-NAL-STR- SUL-TET-TMP	Carcass	≥ 256	0.25	0.50	Asp87Asn (AAC)	wt ^c	wt	wt
77	AMP-CHL-GEN-NAL-STR-SUL-TET/MIN-TMP	Carcass	≥ 256	0.50	0.50	Ser83Phe (TTC)	wt	wt	wt
3	AMP-GEN-KAN-NAL-TET	Carcass	≥ 256	0.50	2	Ser83Tyr (TAC)	wt	wt	wt
83	AMP-GEN-KAN-NAL-TET	Lairage	≥ 256	1	1	Ser83Tyr (TAC)	wt	wt	wt
91	AMP-CIP-CHL-GEN-NAL-STR-SUL-TET-TMP	Carcass	≥ 256	4	16	Ser83Tyr (TAC)	wt	wt	wt

638 ^a AMP: ampicillin, CIP: ciprofloxacin, CHL: chloramphenicol, GEN: gentamicin, KAN: kanamycin, MIN: minocycline, NAL: nalidixic acid, STR: streptomycin,

639 SUL: sulphonamides, TET: tetracycline, TMP: trimethoprim

640 ^b NAL: nalidixic acid, CIP: ciprofloxacin, ENR: enrofloxacin

641 ^c wt, wild type

642

643 **Table 3.** Characteristics of plasmids harbouring class 1 integrons, cassette-independent trimethoprim resistance gene (*dfrA8*) and virulence
644 genes among *S. Typhimurium* isolates from Southern Brazil.

Isolate no.	Donor phenotype ^a	resistance	Transferred plasmid (kb)	Frequency of conjugation	Inc group	Class 1 integron (size)	Virulence genes	Co-located resistance genes
43	AMP-CHL-GEN-STR-SUL-TET/MIN		>150	7.26 x 10 ⁻⁶	IncHI1 IncFIB IncF	<i>aadA23</i> (1009 bp)	-	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>aac(3)-Iva</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(B)</i> , <i>aadA23</i> gene cassette
53	AMP-CHL-KAN-STR-SUL-TET/MIN		>150 ^b	- ^c	IncHI1	<i>aadA23</i>	-	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(B)</i> , <i>aadA23</i> gene cassette
70	AMP-CHL-KAN-STR-SUL-TET/MIN		>150 ^b	- ^c	IncHI1	<i>aadA23</i>	-	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(B)</i> , <i>aadA23</i> gene cassette
89	AMP-NAL-STR-SUL-TET-TMP		~100	3.80 x 10 ⁻⁸	IncF	<i>dfrA12</i> -orfF- <i>aadA27</i> (1913 bp)	-	<i>bla</i> _{TEM} , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i> -orfF- <i>aadA27</i> gene cassette array
76	AMP-NAL-TET/MIN-TMP		~95	- ^c	IncF	<i>dfrA12</i> -orfF- <i>aadA27</i>	-	<i>bla</i> _{TEM} , <i>tet(B)</i> , <i>dfrA12</i> -orfF- <i>aadA27</i> gene cassette array
77	AMP-CHL-GEN-NAL-STR-SUL-TET/MIN-TMP		~100	- ^c	IncI1	-	-	<i>bla</i> _{TEM} , <i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA8</i>
77	AMP-CHL-GEN-NAL-STR-SUL-TET/MIN-TMP		~90	- ^c	IncFIB	-	<i>spvRAB</i> , <i>rck</i> , <i>pfeA</i>	<i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>

645 ^a AMP: ampicillin, CIP: ciprofloxacin, CHL: chloramphenicol, GEN: gentamicin, KAN: kanamycin, MIN: minocycline, NAL: nalidixic acid, STR: streptomycin, SUL:
646 sulphonamides, TET: tetracycline, TMP: trimethoprim

647 ^b Plasmids >150 kb and with same size

648 ^c Transconjugants were not obtained under the tested conditions (see materials and methods section). Transformants were used for the plasmid characterization.

649

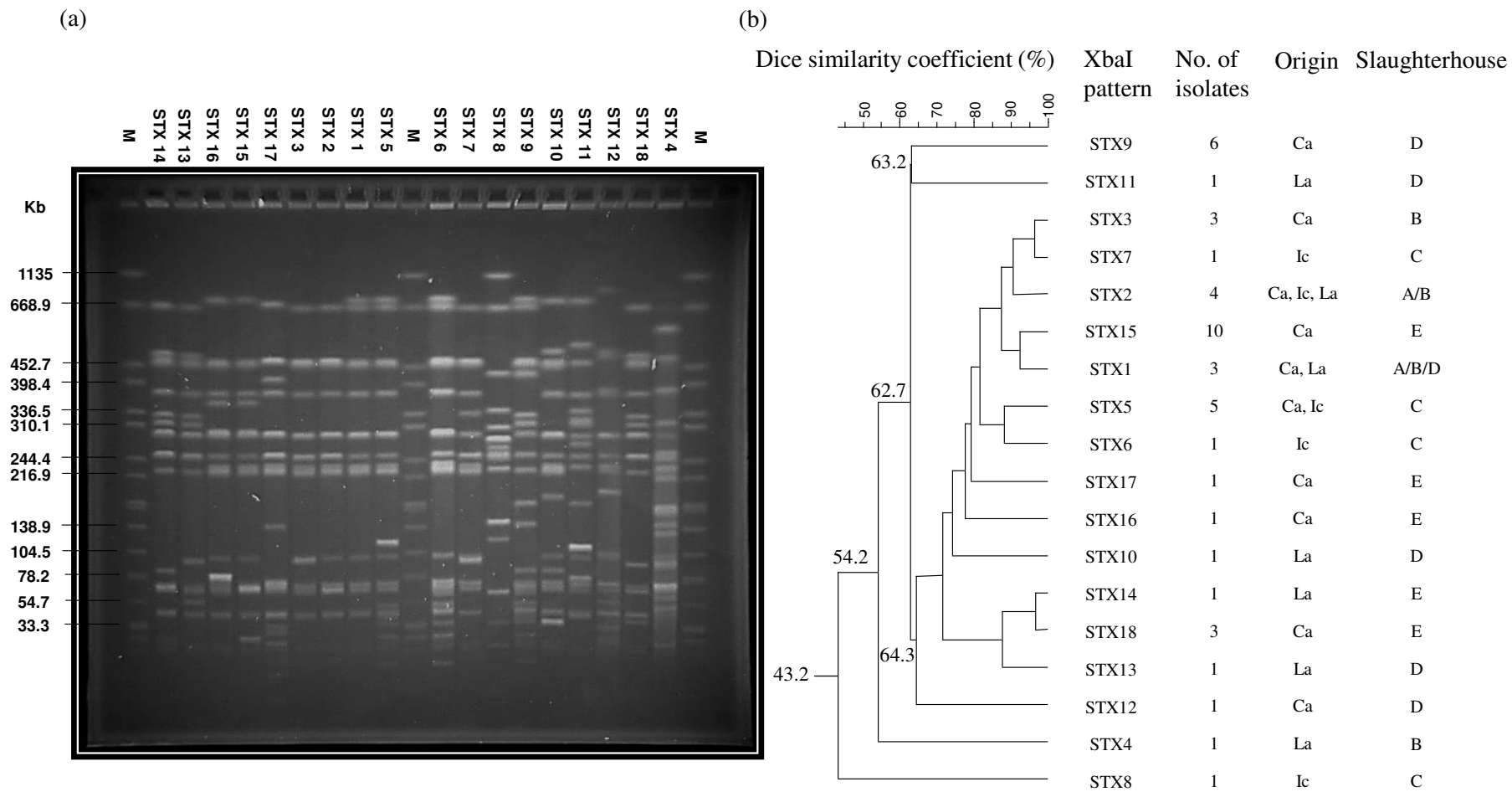
650 **Fig.1.** (a) Macrorestriction patterns of *S. Typhimurium* isolates obtained with the
651 restriction enzyme XbaI. Lane letters and numbers correspond to the different pulsed-
652 field gel electrophoresis patterns in Table 1. Lane M contains XbaI-digested DNA of
653 *Salmonella* Braenderup H9812. (b) Dendrogram of *S. Typhimurium* isolates based on
654 XbaI-macrorestriction (PFGE) patterns. The similarity analysis was performed using the
655 Dice coefficient and UPGMA method (tolerance 1%). The similarity of the isolates
656 obtained from carcasses (Ca), lairage environment (La) and intestinal content (Ic) are
657 given as percentages at the major junctions in the dendrogram. The XbaI patterns,
658 number of isolates, origin and slaughterhouses are shown.

659

660 **Fig. 2.** Schematic presentation of the structures of (a) the class 1 integron carrying the
661 *aadA23* gene cassette (accession no. HG314954) and (b) the class 1 integron carrying
662 the *dfrA12-orfF-aadA27* gene cassette array (accession no. **HG314952.1**) identified in
663 this study. The arrows indicate the gene cassettes and the 5' and 3' conserved segments
664 (5'-CS, 3'-CS) of the class 1 integrons are shown as boxes. The beginning and end of
665 the gene cassettes are shown in detail. The translational start (GTG, ATG) and stop
666 (TAA) codons are underlined. The 59-base element sites, shown in bold, are represented
667 as stem-loop structures, and the integrase 1 binding domains 1L, 2L, 2R and 1R are
668 indicated by arrows. Numbers indicating important positions of bases correspond to the
669 database entries. The dotted lines indicate the connection between the gene cassettes.

670

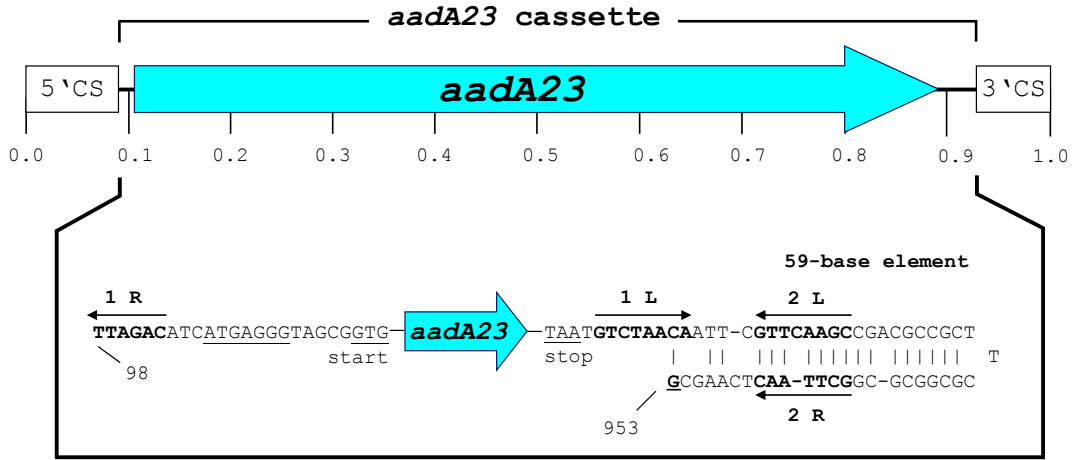
671



672

673 **Fig. 1**

(a)



(b)

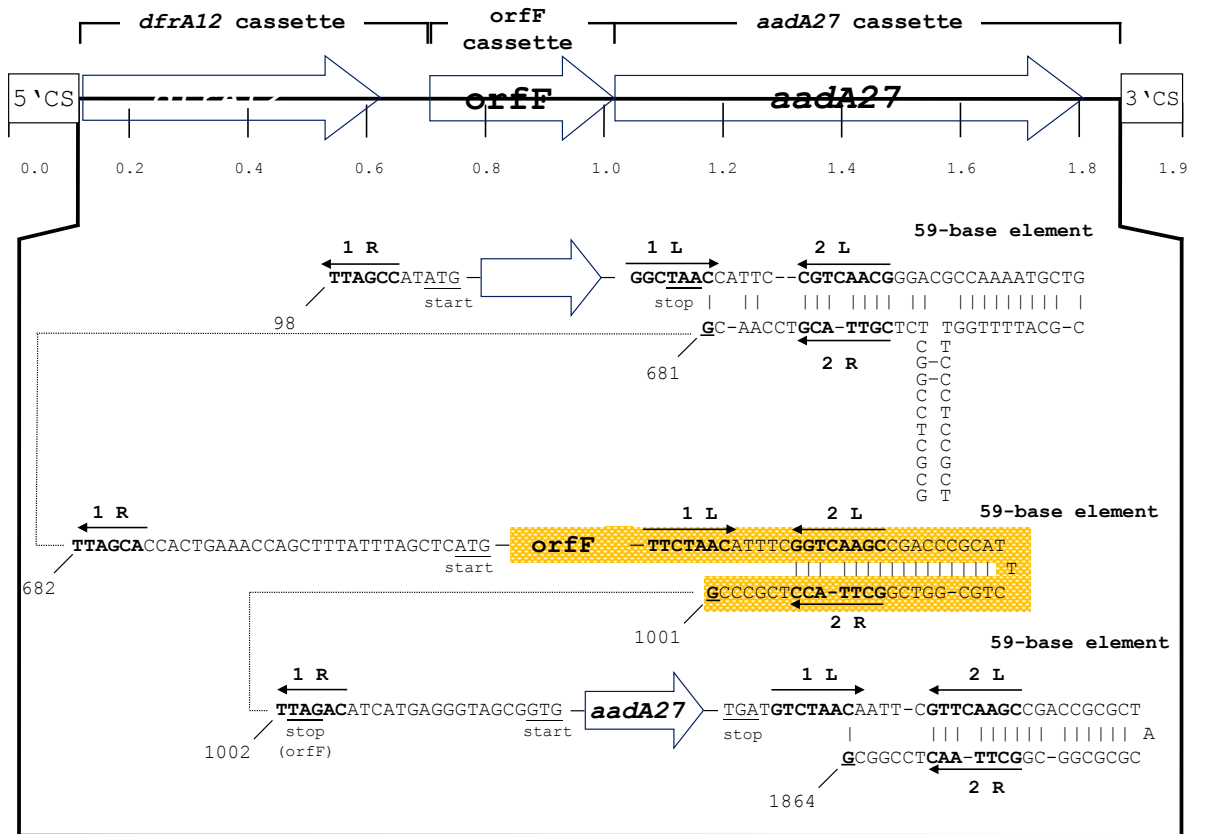


Fig. 2

CONCLUSÕES

Com relação aos objetivos da tese listados no Capítulo 1, as seguintes conclusões podem ser feitas:

- a) Isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (*S.*) de fezes suínas, obtidas de baias de espera ou conteúdo intestinal, e de carcaças apresentaram maiores frequências de resistência a maioria dos agentes antimicrobianos testados quando comparados com isolados de fábricas de ração, os quais foram consideravelmente menos resistentes.
- b) Uma variedade de genes de resistência foi detectada entre isolados multi-resistentes de *Salmonella*. Os isolados obtidos de baias de espera, carcaças e conteúdo intestinal revelaram perfis genotípicos comuns, demonstrando que os genes de resistência selecionados na granja podem chegar ao produto final.
- c) Isolados multi-resistentes de *S. Derby*, provenientes de abatedouros diferentes, foram indistinguíveis em seus perfis fenotípicos e genotípicos de resistência e perfis de macro-restrição (PFGE), sugerindo a disseminação de um clone resistente de *S. Derby* na região sul do Brasil. Os isolados multi-resistentes de *S. Typhimurium* apresentaram variabilidade em sua estrutura genômica e perfis fenotípicos e genotípicos de resistência, embora um mesmo perfil de macro-restrição tenha sido encontrado em isolados de baias de espera e de carcaças, sugerindo disseminação clonal dentro do abatedouro.
- d) A caracterização de integrons de classe 1 em isolados de *S. Derby* revelou a presença de cassetes gênicos com a nova variante do gene *aadA*, denominada *aadA26*, conferindo resistência a estreptomicina e espectinomicina. Isolados de *S. Typhimurium* apresentaram integrons de classe 1 com os cassetes gênicos *aadA23* ou *dfrA12-orfF-aadA27*, com as variantes do gene *aadA* codificando

resistência a estreptomicina e espectinomicina e o *dfrA12* conferindo resistência à trimetoprima.

- e) Os integrons de classe 1 foram identificados supostamente no cromossomo de *S. Derby*, uma vez que a hibridização não revelou sinal quando DNA plasmidial foi utilizado. A sequência das regiões que flanqueiam o cassete gênico e a amplificação do gene *merA* sugerem a localização em transposons da família Tn21. Em *S. Typhimurium* os integrons de classe 1 foram identificados em grandes plasmídeos (95-150 kb).
- f) Plasmídeos abrigando integrons de classe 1 com os cassetes gênicos *aadA23* e *dfrA12-orfF-aadA27* provaram ser conjugativos.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; HASMAN, H.; OLSEN, I.; SORENSEN, G. International spread of *bla*(CMY-2)-mediated cephalosporin resistance in a multiresistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolate stemming from the importation of a boar by Denmark from Canada. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 5, p. 1916-1917, may. 2004.
- AARESTUP, F. M. Chapter 2: The use of antimicrobial agents for growth promotion in a historical perspective. **APMIS**, Copenhagen, v. 108, S101, oct. 2000. Doi: 10.1111/j.1600-0463.2000.tb05381.x.
- AARTS, H. J.; BOUMEDINE, K. S.; NESME, X.; CLOECKAERT, A. Molecular tools for the characterization of antibiotic-resistant bacteria. **Veterinary Research**, Paris, v. 32, n. 3-4, p. 363-380, may-aug. 2001.
- AGBOR, T. A.; MCCORMICK, B. A. *Salmonella* effectors: important players modulating host cell function during infection. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 13, n. 12, p. 1858-1869, dec. 2011.
- AHMED, A. M.; HUSSEIN, A. I.; SHIMAMOTO, T. *Proteus mirabilis* clinical isolate harbouring a new variant of *Salmonella* genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 59, n. 2, p. 184-190, feb. 2007.
- AITMHAND, R.; SOUKRI, A.; MOUSTAOU, N.; AMAROUCHE, H.; SIROT, D.; BENBACHIR, M. Plasmid-mediated TEM-3 extended-spectrum β -lactamase production in *Salmonella typhimurium* in Casablanca. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, n. 49, n. 1, p. 169-172, jan. 2002.
- ALCAINE, S. D.; WARNICK, L. D.; WIEDMANN, M. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 70, n. 3, p. 780-790, mar. 2007.
- AL-GALLAS, N.; ABBASSI, M. S.; GHARBI, B.; MANAI, M.; BEN FAYALA, M. N.; BICHIHI, R.; AL-GALLAS, A.; BEN AISSA, R. Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and *rmtB* gene in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and Typhimurium isolated from food-animal products in Tunisia. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 10, n. 9, p. 813-819, sep. 2013.
- ALLEN, K. J.; POPPE, C. Occurrence and characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins mediated by beta-lactamase CMY-2 in *Salmonella* isolated from food-producing animals in Canada. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 66, n. 3, p. 137-144, jul. 2002.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, London, v. 289, n. 1036, p. 321-331, may. 1980.

ANANTHAM, S.; HALL, R. M. pCERC1, a Small, Globally Disseminated Plasmid Carrying the *dfrA14* Cassette in the *strA* Gene of the *sul2-strA-strB* Gene Cluster. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 18, n. 4, p. 364-371, aug. 2012.

ANTUNES, P.; MACHADO, J.; PEIXE, L. Dissemination of *sul3*-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 4, p. 1545-1548, apr. 2007.

ANTUNES, P.; MOURÃO, J.; ALVES, T.; CAMPOS, J.; NOVAIS, C.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. *Salmonella enterica* serotype Bovismorbificans, a new host for CTX-M-9 **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 91-93, jan. 2013.

ARCHAMBAUD, M.; GERBAUD, G.; LABAU, E.; MARTY, N.; COURVALIN, P. Possible in-vivo transfer of β -lactamase TEM-3 from *Klebsiella pneumonia* to *Salmonella* kedougou. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 27, n. 4, p. 427-436, apr. 1991.

ARGUELLO, H.; ÁLVAREZ-ORDOÑEZ, A.; CARVAJAL, A.; RUBIO, P.; PRIETO, M. Role of Slaughtering in *Salmonella* Spreading and Control in Pork Production. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 76, n. 5, p. 899-911, may. 2013a.

ARGUELLO, H.; CARVAJAL, A.; NAHARRO, G.; ARCOS, M.; RODICIO, M. R.; MARTIN, M. C.; RUBIO, P. Sero- and genotyping of *Salmonella* in slaughter pigs, from farm to cutting plant, with a focus on the slaughter process. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 161, n. 1, p. 44-52, jan. 2013b.

ARLET, G.; BARRETT, T. J.; BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; MULVEY, M. R.; WHITE, D. G. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, n. 7, p. 1945-1954, jun. 2006.

ARMAND-LEFÈVRE, L.; LEFLON-GUIBOUT, V.; BREDIN, J.; BARGUELLIL, F.; AMOR, A.; PAGÈS, J. M.; NICOLAS-CHANOINE, M. H. Imipenem resistance in *Salmonella enterica* serovar Wien related to porin loss and CMY-4 β -lactamase production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 3, p. 1165-1168, mar. 2003.

Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (ABIEPCS). Relatório Anual Abiepcs 2012. Disponível em: <http://www.abiepcs.org.br/uploads/relatorios/relatoriosassociados/ABIEPCS_relatorio_2012_pt.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2014.

BADO, I.; GARCÍA-FULGUEIRAS, V.; CORDEIRO, N. F.; BETANCOR, L.; CAIATA, L.; SEIJA, V.; ROBINO, L.; ALGORTA, G.; CHABALGOITY, J. A.; AYALA, J. A.; GUTKIND, G. O.; VIGNOLI, R. First human isolate of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis harboring *bla*_{CTX-M-14} in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 4, p. 2132-2134, apr. 2012.

- BALLESTÉ-DELPYERRE, C.; SOLÉ, M.; DOMÈNECH, O.; BORRELL, J.; VILA, J.; FÀBREGA, A. Molecular study of quinolone resistance mechanisms and clonal relationship of *Salmonella enterica* clinical isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 121-125, feb. 2013.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; SOBESTIANSKY, J.; LINHARES, D.; SOBESTIANSKY, T. B. Uso de antimicrobianos em suinocultura. In: SOBESTIANSKY, J; BARCELLOS, D. **Doenças dos Suínos**. 2. ed. Goiânia: Editora Cànone, 2012, p. 837-884.
- BARNAUD, G.; ARLET, G.; VERDET, C.; GAILLOT, O.; LAGRANGE, P. H.; PHILIPPON, A. *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible b-lactamase (DHA-1) with an *ampR* gene from *Morganella morganii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 42, n. 9, p. 2352-2358, sep. 1998.
- BARROW, P. A.; JONES, M. A.; THOMSON, N. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infection in animal**. 4. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2010, p. 231-265.
- BATCHELOR, M.; HOPKINS, K. L.; THRELFALL, E. J.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; STALLWOOD, A. D.; DAVIES, R. H.; LIEBANA, E. Characterization of AmpC mediated resistance in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans during the period 1992 to 2003 in England and Wales. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington; v. 43, n. 5, p. 2261-2265, may. 2005b.
- BATCHELOR, M.; HOPKINS, K.; THRELFALL, E. J.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; STALLWOOD, A. D.; DAVIES, R. H.; LIEBANA, E. *bla*_{CTX-M} genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 4, p. 1319-1322, apr. 2005a.
- BECKER, B.; COOPER, M. A. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 8, n. 1, p. 105-115, jan. 2013.
- BEN SALLEM, R.; BEN SLAMA, K.; SÁENZ, Y.; ROJO-BEZARES, B.; ESTEPA, V.; JOUINI, A.; GHARSA, H.; KLIBI, N.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and CMY-2-producing *Escherichia coli* Isolates from healthy food-producing animals in Tunisia. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 9, n. 12, p. 1137-1142, dec. 2012.
- BERENDS, B. R.; URLINGS, H. A.; SNIJDERS, J. M.; VAN KNAPEN, F. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 1-2, p. 37-53, jun. 1996.
- BERENDS, B. R.; VAN KNAPEN, F.; SNIJDERS, J. M.; MOSSEL, D. A. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 36, n. 2-3, p. 199-206, may. 1997.

BESSA, M. C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp em Suínos Abatidos em Frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 80-84, abr-jun. 2004.

BEUTLICH, J.; JAHN, S.; MALORNY, B.; HAUSER, E.; HÜHN, S.; SCHROETER, A.; RODICIO, M. R.; APPEL, B.; THRELFALL, J.; MEVIUS, D.; HELMUTH, R.; GUERRA, B.; MED-VET-NET WP21 PROJECT GROUP. Antimicrobial resistance and virulence determinants in European *Salmonella* genomic island 1-positive *Salmonella enterica* isolates from different origins. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 16, p. 5655-5664, aug. 2011.

BEUTLICH, J.; ROSARIO RODICIO, M.; CARMEN MENDOZA, M.; GARCÍA, P.; KIRCHNER, M.; LUZZI, I.; MEVIUS, D.; THRELFALL, J.; HELMUTH, R.; GUERRA, B.; MED-VET-NET WP21 PROJETO GROUP. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Virulence-Resistance Plasmids Derived from the pSLT Carrying Nonconventional Class 1 Integrons with *dfrA12* Gene in Their Variable Region and *sul3* in the 3' Conserved Segment. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 19, n. 6, p. 437-445, dec. 2013.

BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 1-2, p. 9-25, jun. 1996.

BOUALLEGUE-GODET, O.; BEN SALEM, Y.; FABRE, L.; DEMARTIN, M.; GRIMONT, P. A.; MZOUGH, R.; WEILL, F. X. Nosocomial outbreak caused by *Salmonella enterica* serotype Livingstone producing CTX-M-27 extended-spectrum β -lactamase in a neonatal unit in Sousse, Tunisia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 3, p. 1037-1044, mar. 2005.

BOYEN, F.; HAESBROUCK, F.; MAES, D.; VAN IMMERSEEL, F.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 130, n. 1-2, p. 1-19, jul. 2008.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamase in the 21st century: characterization, and detection of this importance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 4, p. 933-951, oct. 2001.

BRASIL. Instrução Normativa nº 08, de 29 de abril de 2010. Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes PNCRC/2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 maio 2010. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

BRASIL. Instrução Normativa nº 09, de 27 de junho de 2003. Proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso de princípios ativos cloranfenicol nitrofuranos e os produtos que contenham esses princípios ativos, para uso veterinário e susceptível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 jun. 2003. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

BRASIL. Instrução Normativa nº 11, de 24 de novembro de 2004. Proibir a fabricação, a importação, a comercialização e o uso da substância química olaquinox, como aditivo promotor de crescimento em animais produtores de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 nov. 2004. Disponível em: <<http://www.agricultura.br/sislegis>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

BRASIL. Instrução Normativa nº 14, de 17 de maio de 2012. Proibir em todo território nacional a importação, fabricação e o uso das substâncias antimicrobianas espiramicina e eritromicina com finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 maio 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.br/sislegis>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

BRASIL. Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 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**, Brasília, DF, 10 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

BRASIL. Instrução Normativa nº 35, de 14 de novembro de 2005. Proibir a fabricação, a importação, a comercialização e o uso de produtos destinados à alimentação animal contendo a substância química denominada carbadox. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 nov. 2005. Disponível em: <<http://www.agricultura.br/sislegis>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Dados epidemiológicos dos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2011. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos>>. Acesso em: 22 nov. 2013.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, jul. 2000.

BRIGGS, C. E.; FRATAMICO, P. M. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 43, n. 4, p. 846-849, apr. 1999.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 3, p. 969-976, mar. 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, jun. 1995.

BYWATER, R.; SILLEY, P.; SIMJEE, S. Antimicrobial breakpoints – definitions and conflicting requirements. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 118, n. 1-2, p. 158-159, nov. 2006.

CAIN, A. K.; HALL, R. M. Evolution of a multiple antibiotic resistance region in IncHI1 plasmids: reshaping resistance regions in situ. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 67, n. 12, p. 2848-2853, dec. 2012b.

CAIN, A. K.; HALL, R. M. Evolution of IncHI2 plasmids via acquisition of transposons carrying antibiotic resistance determinants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 67, n. 5, p. 1121-1127, may. 2012a.

CALL, D. R.; BAKKO, M. K.; KRUG, M. J.; ROBERTS, M. C. Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 10, p. 3290-3295, oct. 2003.

CAMBRAY, G.; GUEROUT, A. M.; MAZEL, D. Integrons. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 44, p. 141-166, 2010.

CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M enzymes: origin and diffusion. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, n. 110, apr. 2012.

CARATTOLI, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. **Veterinary Research**, Paris, v. 32, n. 3-4, p. 243-259, may-aug. 2001.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 303, n. 6-7, p. 298-304, aug. 2013.

CARATTOLI, A.; BERTINI, A.; VILLA, L.; FALBO, V.; HOPKINS, K. L.; THRELFALL, E. J. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 63, n. 3, p. 219-228, dec. 2005.

CARATTOLI, A.; TOSINI, F.; GILES, W. P.; RUPP, M. E.; HINRICHS, S. H.; ÂNGULO, F. J.; BARRETT, T. J.; FEY, P. D. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, n. 5, p. 1269-1272, may. 2002.

CARDINALE, E.; COLBACHINI, P.; PERRIER-GROS-CLAUDE, J. D.; GASSAMA, A.; AIDARA-KANE, A. Dual emergence in food and humans of a novel multiresistant serotype of *Salmonella* in Senegal: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 35:c:1,2. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 6, p. 2373-2374, jun. 2001.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 10, p. 3801-3804, oct. 2008.

CAVACO, L. M.; HASMAN, H.; XIA, S.; AARESTRUP, F. M. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 2, p. 603-608, feb. 2009.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food – Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996-2012. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 62, n. 15, p. 283-287, 2013a.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **National Salmonella Surveillance Annual Report, 2011**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, p. 1-18, 2013b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/salmonella-annual-report-2011-508c.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2013.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **National Salmonella Surveillance Annual Report – Appendices, 2011**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, p. 1-62, 2013c. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/salmonella-annual-report-appendices-2011-508c.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2013.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of salmonellosis associated with consumption of pulled pork at a church festival - hamilton county, Ohio, 2010. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 62, n. 51, p. 1045-1047, 2014.

CHEUNG, T. K.; CHU, Y. W.; CHU, M. Y.; MA, C. H.; YUNG, R. W.; KAM, K. M. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 56, n. 3, p. 586-589, sep. 2005.

CHIARETTO, G.; ZAVAGNIN, P.; BETTINI, F.; MANCIN, M.; MINORELLO, C.; SACCARDIN, C.; RICCI, A. Extended spectrum beta-lactamase SHV-12-producing *Salmonella* from poultry. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 128, n. 3-4, p. 406-413, apr. 2008.

CHIU, C. H.; TANG, P.; CHU, C.; HU, S.; BAO, Q.; YU, J.; CHOU, Y. Y.; WANG, H. S.; LEE, Y. S. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, n. 5, p. 1690-1698, mar. 2005.

CHOPRA, I.; HAWKEY, P. M.; HINTON, M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 29, n. 3, p. 245-277, mar. 1992.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 65, n. 2, p. 232-260, jun. 2001.

CHU, Y. W.; CHEUNG, T. K.; NG, T. K.; TSANG, D.; TO, W. K.; KAM, K. M.; LO, J. Y. Quinolone resistance determinant *qnrA3* in clinical isolates of *Salmonella* in 2000-2005 in Hong Kong. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 58, n. 4, p. 904-905, oct. 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement**. CLSI document M100-S23. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2013.

CLOECKAERT, A.; PRAUD, K.; LEFEVRE, M.; DOUBLET, B.; PARDOS, M.; GRANIER, S. A.; BRISABOIS, A.; WEILL, F. IncI1 plasmid carrying extended-spectrum- β -lactamase gene *bla*CTX-M-1 in *Salmonella enterica* isolates from poultry and humans in France, 2003 to 2008. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 10, p. 4484-4486, oct. 2010.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). **Recommandations 2012** (Edition de Janvier 2012). Disponível em: <http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/CASFM_2012.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2014.

COUTURIER, M.; BEX, F.; BERGQUIST, P. L.; MAAS, W. K. Identification and classification of bacterial plasmids. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 52, n. 3, p. 375-395, sep. 1988.

CRAIG, N. Tn7. In: Craig N, Craigie R, Gellert M, Labowitz A, eds. **Mobile DNA II**. 2. ed. Washington: ASM Press, 2002, p. 423-456.

D'ANDREA, M. M.; ARENA, F.; PALLECCHI, L.; ROSSOLINI, G. M. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 303, n. 6-7, p. 305-317, aug. 2013.

DAMJANOVA, I.; TOTH, A.; PASZTI, J.; JAKAB, M.; MILCH, H.; BAUERNFEIND, A.; FUZI, M. Epidemiology of SHV-type beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. from outbreaks in five geographically distant Hungarian neonatal intensive care units: widespread dissemination of epidemic R-plasmids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 29, n. 6, p. 665-671, jun. 2007.

DANMAP 2012. **Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark**. September, 2013. ISSN 1600-2032. Disponível em: <<http://www.danmap.org>>. Acesso em: 15 fev. 2014.

DE BUSSEER, E. V.; DE ZUTTER, L.; DEWULF, J.; HOUF, K.; MAES, D. *Salmonella* control in live pigs and at slaughter. **The Veterinary Journal**, London, v. 196, n. 1, p. 20-27, apr. 2013.

DE BUSSEER, E. V.; MAES, D.; HOUF, K.; DEWULF, J.; IMBERECHTS, H.; BERTRAND, S.; DE ZUTTER, L. Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 279-286, jan. 2011.

DE TORO, M.; RODRÍGUEZ, I.; ROJO-BEZARES, B.; HELMUTH, R.; TORRES, C.; GUERRA, B.; SÁENZ, Y. pMdT1, a small ColE1-like plasmid mobilizing a new variant of the *aac(6')-Ib-cr* gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 68, n. 6, p. 1277-1280, jun. 2013.

DI CONZA, J.; AYALA, J. A.; POWER, P.; MOLLERACH, M.; GUTKIND, G. Novel Class 1 Integron (InS21) Carrying blaCTX-M-2 in *Salmonella enterica* Serovar Infantis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, n. 7, p. 2257-2261, jul. 2002.

DIERIKX, C.; VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A.; VELDMAN, K.; SMITH, H.; MEVIUS, D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 3-4, p. 273-278, oct. 2010.

DIONISI, A. M.; LUCARELLI, C.; BENEDETTI, I.; OWCZAREK, S.; LUZZI, I. Molecular characterisation of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Infantis from humans, animals and the environment in Italy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 38, n. 5, p. 384-389, nov. 2011.

DIONISI, A. M.; LUCARELLI, C.; OWCZAREK, S.; LUZZI, I.; VILLA, L. Characterization of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrB19* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 9, p. 4019-4021, sep. 2009.

DOMINGUES, S.; DA SILVA, G. J.; NIELSEN, K. M. Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. **Mobile Genetic Elements**, Austin, v. 2, n. 5., p. 211-223, sep. 2012.

DOUBLET, B.; BOYD, D.; MULVEY, M. R.; CLOECKAERT, A. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 1911-1924, mar. 2005.

DOUBLET, B.; BUTAYE, P.; IMBERECHTS, H.; BOYD, D.; MULVEY, M.R.; CHASLUS-DANCLA, E.; CLOECKAERT, A. *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance gene clusters in *Salmonella enterica* serovar Agona isolated in Belgium in 1992 to 2002. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 7, p. 2510- 2517, jul. 2004a.

DOUBLET, B.; CARATTOLI, A.; WHICHARD, J. M.; WHITE, D. G.; BAUCHERON, S.; CHASLUS-DANCLA, E.; CLOECKAERT, A. Plasmid-mediated florfenicol and ceftriaxone resistance encoded by the *floR* and blaCMY- genes in *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Newport isolated in the United States. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 233, n. 2, p. 301-305, apr. 2004.

DOUBLET, B.; GRANIER, S. A.; ROBIN, F.; BONNET, R.; FABRE, L.; BRISABOIS, A.; CLOECKAERT, A.; WEILL, F. X. Novel plasmid-encoded ceftazidime-hydrolyzing CTX-M-53 extended-spectrum b-lactamase from *Salmonella enterica* serotypes Westhampton and Senftenberg. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 5, p. 1944-1951, may. 2009.

DOUBLET, B.; WEILL, F. X.; FABRE, L.; CHASLUS-DANCLA, E.; CLOECKAERT, A. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster containing a novel 30-N-aminoglycoside acetyltransferase gene cassette, *aac(3)-*

Id., in *Salmonella enterica* serovar Newport. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 10, p. 3806-3812, oct. 2004b.

DU, X. D.; LI, D. X.; HU, G. Z.; WANG, Y.; SHANG, Y. H.; WU, C. M.; LIU, H. B.; LI, X. S. Tn1548-associated *armA* is co-located with *qnrB2*, *aac(6')-Ib-cr* and *bla_{CTX-M-3}* on an IncFII plasmid in a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B strain isolated from chickens in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 67, n. 1, p. 246-248, jan. 2012.

ECHETA, M. A.; HERRERA, S.; USERA, M. A. Atypical *fljB*-negative *Salmonella enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 8, p. 2981-2983, aug. 2001.

ETHELBERG, S.; SORENSEN, G.; KRISTENSEN, B.; CHRISTENSEN, K.; KRUSELL, L.; HEMPEL-JORGENSEN, A.; PERGE, A.; NIELSEN, E. M. Outbreak with multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 linked to carpaccio, Denmark, 2005. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 135, n. 6, p. 900-907, aug. 2007.

European Food Safety Authority (EFSA). Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. **The EFSA Journal 2008**, Parma, v. 720, p. 1-84, 2008a. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/720.pdf>>. Acesso em: 06 jan. 2014.

European Food Safety Authority (EFSA). Quantitative Microbiological Risk Assessment on *Salmonella* in slaughter and Breeder pigs: Final Report. **EFSA Journal 2010**, Parma, p. 1-437, 2010. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1547.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

European Food Safety Authority (EFSA). Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, Part A. **The EFSA Journal 2008**, Parma, v. 135, p. 1-111, 2008b. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/135r.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2014.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. **The EFSA Journal 2011**, Parma, v. 9, n. 8, p. 1-2322, 2011. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2322.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne outbreaks in 2011. **The EFSA Journal 2013**, Parma, v. 11, n. 4, 3129p., 2013. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3129.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2014.

EUZÉBY, J. Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, Pt2, p. 547-549, mar. 2005.

FABRE, L.; DELAUNE, A.; ESPIE, E.; NYGARD, K.; PARDOS, M.; POLOMACK, L.; GUESNIER, F.; GALIMAND, M.; LASSEN, J.; WEILL, F. X. Chromosomal integration of the extended-spectrum b-lactamase gene *bla*CTX-M-15 in *Salmonella enterica* serotype Concord isolates from internationally adopted children.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, v. 53, n. 5, p. 1808-1816, may. 2009.

FÀBREGA, A.; MADRUGA, S.; GIRALT, E.; VILA, J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. **Microbial Biotechnology**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 40-61, jan. 2009.

FEDORKA-CRAY, P. J.; GRAY, J. T.; WRAY, C. *Salmonella* infections in pigs. In: WRAY, C. & WRAY, A. **Salmonella in Domestic Animals**. Wallingford: CABI Publishing, 2000, p. 191-207.

FERNANDES, S. A.; PATERSON, D. L.; GHILARDI-RODRIGUES, A. C.; ADAMS-HADUCH, J. M.; TAVECHIO, A. T.; DOI, Y. CTX-M-2-producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont; v. 15, n. 4, p. 317-321, dec. 2009.

FIGUEIRA, R.; HOLDEN, D. W. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. **Microbiology**, Reading, v. 158, Pt5, p. 1147-1161, may. 2012.

Food and Drug Administration (FDA). **Guidance for Industry. The Judicious Use of Medically Important Antimicrobials Drugs in Food-Producing Animals**. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine. Apr 13, 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/animalveterinary/guidancecompliancenenforcement/guidanceforindustry/ucm216936.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

FRYE, J. G.; JACKSON, C. R. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, n. 135, may. 2013.

GARBARG-CHENON, A.; GODARD, V.; LABIA, R.; NICOLAS, J. C. Nucleotide sequence of SHV-2 b-lactamase gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 34, n. 7, p. 1444-1446, jul. 1990.

GARCÍA, P.; GUERRA, B.; BANCES, M.; CARMEN MENDOZA, M.; ROSARIO RODICIO, M. IncA/C plasmids mediate antimicrobial resistance linked to virulence genes in the Spanish clone of the emerging *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:2-. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 66, n. 3, p. 543-549, mar. 2011.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; CHIARETTO, G.; BERTINI, A.; VILLA, L.; FORTINI, D.; RICCI, A.; CARATTOLI, A. Multilocus sequence typing of IncII plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 61, n. 6, p. 1229-1233, jun. 2008.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; FORTINI, D.; VELDMAN, K.; MEVIUS, D.; CARATTOLI, A. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 63, n. 2, p. 274-281, feb. 2009.

GAZOULI, M.; TZELEPI, E.; MARKOGIANNAKIS, A.; LEGAKIS, N. J.; TZOUVELEKIS, L. S. Two novel plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing β -lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from *Salmonella typhimurium*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 165, n. 2, p. 289-293, aug. 1998.

GILES, W. P.; BENSON, A. K.; OLSON, M. E.; HUTKINS, R. W.; WHICHARD, J. M.; WINOKUR, P. L.; FEY, P. D. DNA sequence analysis of regions surrounding *bla*_{CMY-2} from multiple *Salmonella* plasmid backbones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 8, p. 2845-2852, aug. 2004.

GLENN, L. M.; LINDSEY, R. L.; FOLSTER, J. P.; PECIC, G.; BOERLIN, P.; GILMOUR, M. W.; HARBOTTLE, H.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P. F.; FEDORKA-CRAY, P. J.; FRYE, J. G. Antimicrobial Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Isolated from Animals, Retail Meats, and Humans in the United States and Canada. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 19, n. 3, p. 175-184, jun. 2013.

GOMES-NEVES, E.; ANTUNES, P.; MANAGEIRO, V.; GÄRTNER, F.; CANIÇA, M.; DA COSTA, J. M.; PEIXE, L. Clinically relevant multidrug resistant *Salmonella enterica* in swine and meat handlers at the abattoir. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 168, n. 1, p. 229-233, jan. 2013.

GONZÁLEZ-SANZ, R.; HERRERA-LEON, S.; FUENTE, M.; ARROYO, M.; ECHEITA, A. M. Emergence of extended-spectrum β -lactamases and AmpC-type β -lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 64, n. 6, p. 1181-1186, dec. 2009.

GOSSNER, C. M.; VAN CAUTEREN, D.; LE HELLO, S.; WEILL, F. X.; TERRIEN, E.; TESSIER, S.; JANIN, C.; BRISABOIS, A.; DUSCH, V.; VAILLANT, V.; JOURDAN DA SILVA, N. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011. **Euro Surveillance**, Stockholm, v. 17, n. 5, pii. 20071, feb. 2012.

GRIFFITH, R. W.; SCHWARTZ, K. J.; MEYERHOLZ, D. K. *Salmonella*. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. **Diseases of Swine**. 9. ed. Ames: Iowa State University Press, 2006, p. 739-754.

GRIMM, V.; EZAKI, S.; SUSU, M.; KNABBE, C.; SCHMID, R. D.; BACHMANN, T. T. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM β -lactamases that confer resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 8, p. 3766-3774, aug. 2004.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9 Ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. **Institute Pasteur**, Paris, 2007. Disponível em: <<https://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>>. Acesso em: 23 jan. 2014.

GUERRA, B.; HELMUTH, R.; THOMAS, K.; BEUTLICH, J.; JAHN, S.; SCHROETER, A. Plasmid mediated quinolone resistance determinants in *Salmonella* spp. isolates from reptiles in Germany. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 65, n. 9, p. 2043-2045, sep. 2010.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P.; WEILL, F. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, n. 1, p. 26-29, jan-feb. 2010.

HALL, R. M. Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1267, p. 71-78, sep. 2012.

HAMMAMI, A.; ARLET, G.; BEN REDJEB, S.; GRIMONT, F.; BEN HASSEN, A.; REKIK, A.; PHILIPPON, A. Nosocomial outbreak of acute gastroenteritis in a neonatal intensive care unit in Tunisia caused by multiply drug resistant *Salmonella* Wien producing SHV-2 beta-lactamase. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 10, n. 8, p. 641-646, aug. 1991.

HAMMERL, J. A.; BEUTLICH, J.; HERTWIG, S.; MEVIUS, D.; THRELFALL, E. J.; HELMUTH, R.; GUERRA, B. pSGI15, a small ColE-like *qnrB19* plasmid of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain carrying *Salmonella* genomic island 1 (SGI1). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 65, n. 1, p. 173-175, jan. 2010.

HANSON, N. D.; MOLAND, E. S.; HOSSAIN, A.; NEVILLE, S. A.; GOSBELL, I. B.; THOMSON, K. S. Unusual *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30 beta-lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 49, n. 6, p. 1011-1014, jun. 2002.

HASMAN, H.; MEVIUS, D.; VELDMAN, K.; OLESEN, I.; AARESTRUP, F. M. β -Lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 56, n. 1, p. 115-121, jul. 2005.

HEISIG, P.; KRATZ, B.; HALLE, E.; GRASER, Y.; ALTWEGG, M.; RABSCH, W.; FABER, J. P. Identification of DNA gyrase A mutations in ciprofloxacin resistant isolates of *Salmonella* typhimurium from men and cattle in Germany. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 1, n. 3, p. 211-218, 1995.

HENTSCHKE, M.; CHRISTNER, M.; SOBOTTKA, I.; AEPFELBACHER, M.; ROHDE, H. Combined *ramR* mutation and presence of a Tn1721-associated *tet(A)* variant in a clinical isolate of *Salmonella enterica* serovar Hadar resistant to tigecycline.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, v. 54, n. 3, p. 1319-1322, mar. 2010.

HERRERA-LEÓN, S.; GONZÁLEZ-SANZ, R.; RODRÍGUEZ, I.; RODICIO, M. R.; ECHEITA, M. A. Spread of a multiresistant CTX-M-9-producing *Salmonella enterica* serotype Virchow phage type 19 in Spain. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 29, n. 7, p. 901-905, jul. 2010.

HIKI, M.; USUI, M.; KOJIMA, A.; OZAWA, M.; ISHII, Y.; ASAI, T. Diversity of plasmid replicons encoding the bla(CMY-2) gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 10, n. 3, p. 243-249, mar. 2013.

HOOVER, D. C. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 31, S24-S28, aug. 2000.

HOPKINS, K. L.; KIRCHNER, M.; GUERRA, B.; GRANIER, S. A.; LUCARELLI, C.; PORRERO, M. C.; JAKUBCZAK, A.; THRELFALL, E. J.; MEVIUS, D. J. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5], 12:i:- in Europe: a new pandemic strain? **Euro Surveillance**, Stockholm, v. 15, n. 22, p. 19580, jun. 2010.

HOPKINS, K. L.; WOOTTON, L.; DAY, M. R.; THRELFALL, E. J. Plasmid mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 59, n. 6, p. 1071-1075, jun. 2007.

HSU, Y. M.; TANG, C. Y.; LIN, H.; CHEN, Y. H.; CHEN, Y. L.; SU, Y. H.; CHEN, D. S.; LIN, J. H.; CHANG, C. C. Comparative study of class 1 integron, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline (ACSSuT) and fluoroquinolone resistance in various *Salmonella* serovars from humans and animals. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 9-16, jan. 2013.

IZUMIYA, H.; MORI, K.; HIGASHIDE, M.; TAMURA, K.; TAKAI, N.; HIROSE, K.; TERAJIMA, J.; WATANABE, H. Identification of CTX-M-14b-lactamase in a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolate from Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 6, p. 2568-2570, jun. 2005.

JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 22, n. 1, p. 161-182, jan. 2009.

JEONG, H. S.; BAE, I. K.; SHIN, J. H.; KIM, S. H.; CHANG, C. L.; JEONG, J.; KIM, S.; LEE, C. H.; RYOO, N. H.; LEE, J. N. Fecal colonization of *Enterobacteriaceae* carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Korea. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 17, n. 4, p. 507-517, dec. 2011.

KADLEC, K.; MICHAEL, G. B.; FESSLER, A. T.; SCHWARZ, S. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistances. In: MAX RUBNER CONFERENCE, 2012, Karlsruhe, Germany. **Anais...** Karlsruhe: Max Rubner Conference 2012 – Antibiotics in the Food Chain, 2012, p. 16.

KAMEYAMA, M.; CHUMA, T.; YOKOI, T.; YABATA, J.; TOMINAGA, K.; MIYASAKO, D.; IWATA, H.; OKAMOTO, K. Emergence of *Salmonella enterica* serovar Infantis harboring IncII plasmid with blaCTX-M-14 in a broiler farm in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science/The Japanese Society of Veterinary Science**, Tokyo, v. 74, n. 9, p. 1213-1216, sep. 2012.

KEHRENBERG, C.; CATRY, B.; HAESEBROUCK, F.; KRUIF, A.; SCHWARZ, S. Novel spectinomycin/streptomycin resistance gene, *aadA14*, from *Pasteurella multocida*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 7, p. 3046-3049, jul. 2005.

KERMAS, R.; TOUATI, A.; BRASME, L.; LE MAGREX-DEBAR, E.; MEHRANE, S.; WEILL, F. X.; DE CHAMPS, C. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serotype Brunei and Heidelberg at the Hussein Dey hospital in Algiers (Algeria). **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 9, n. 9, p. 803-808, sep. 2012.

KHAN, A. A.; PONCE, E.; NAWAZ, M. S.; CHENG, C. M.; KHAN, J. A.; WEST, C. S. Identification and characterization of Class 1 integron resistance gene cassettes among *Salmonella* strains isolates from imported seafood. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1192-1196, feb. 2009.

KICH, J. D.; COLDEBELLA, A.; MORES, N.; NOGUEIRA, M. G.; CARDOSO, M.; FRATAMICO, P. M.; CALL, J. E.; FEDORKA-CRAY, P.; LUCHANSKY, J. B. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 151, n. 3, p. 307-313, dec. 2011.

KICH, J. D.; MORAES, N.; PIFFER, I. A.; COLDEBELLA, A.; AMARAL, A.; RAMMINGER, L.; CARDOSO, M. Fatores associados à soroprevalência de *Salmonella* em rebanhos comerciais de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 398-405, mar-abr. 2005.

KIM, Y.; BAE, I. K.; JEONG, S. H.; LEE, C. H.; LEE, H. K.; AHN, J.; LEE, M. K.; LEE, S.; LEE, K. Occurrence of IncFII plasmids carrying the bla(CTX-M-15) gene in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis sequence type 11 in Korea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 71, n. 2, p. 171-173, oct. 2011.

KING, D. E.; MALONE, R.; LILLEY, S. H. New classification and update on the quinolone antibiotics. **American Family Physician**, Kansas City, v. 61, n. 9, p. 2741-2748, may. 2000.

KOECK, J. L.; ARLET, G.; PHILIPPON, A.; BASMACIOGULLARI, S.; THIEN, H. V.; BUISSON, Y.; CAVALLO, J. D. A plasmid-mediated CMY-2 b-lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella* senftenberg, **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 152, n. 2, p. 255-260, jul. 1997.

KOIRALA, K. D.; THANH, D. P.; THAPA, S. D.; ARJYAL, A.; KARKEY, A.; DONGOL, S.; SHRESTHA, U. M.; FARRAR, J. J.; BASNYAT, B.; BAKER, S.

Highly resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi with a novel *gyrA* mutation raises questions about the long-term efficacy of older fluoroquinolones for treating typhoid fever. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 5, p. 2761-2762, may. 2012.

KRAULAND, M.; HARRISON, L.; PATERSON, D.; MARSH, J. Novel integron gene cassette arrays identified in a global collection of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella enterica*. **Current Microbiology**, New York, v. 60, n. 3, p. 217-223, mar. 2010.

KRUGER, T.; SZABO, D.; KEDDY, K. H.; DEELEY, K.; MARSH, J. W.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A.; PATERSON, D. L. Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 11, p. 4263-4270, nov. 2004.

KRUSE, H.; JOHANSEN, B. K.; RORVIK, L. M.; SCHALLER, G. The use of avoparcin as a growth promoter and the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus* species in Norwegian poultry and swine production. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 5, n. 2, p. 135-139, Summer 1999.

KUHN, K. G.; SORENSEN, G.; TORPDAHL, M.; KJELDSSEN, M. K.; JENSEN, T.; GUBBELS, S.; BJERAGER, G. O.; WINGSTRAND, A.; PORSBO, L. J.; ETHELBERG, S. A long-lasting outbreak of *Salmonella* Typhimurium U323 associated with several pork products, Denmark, 2010. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 26, p. 1-9, apr. 2012.

LAI, J.; WANG, Y.; SHEN, J.; LI, R.; HAN, J.; FOLEY, S. L.; WU, C. Unique Class 1 Integron and Multiple Resistance Genes Co-located on IncHI2 Plasmid Is Associated with the Emerging Multidrug Resistance of *Salmonella* Indiana Isolated from Chicken in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 10, n. 7, p. 581-588, jul. 2013.

LAMBERT, M. A. & SMITH, S. G. The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. **BMC Microbiology**, London, v. 8, n. 142, sep. 2008. Doi: 10.1186/1471-2180-8-142.

LE HELLO, S.; WEILL, F. X.; GUIBERT, V.; PRAUD, K.; CLOECKAERT, A.; DOUBLET, B. Early strains of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky sequence type 198 from Southeast Asia harbor *Salmonella* genomic island 1-J variants with a novel insertion sequence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 10, p. 5096-5102, oct. 2012.

LE MINOR, L. Facultative Anaerobic Gram-Negative rods. In: HOLT J. G., N. R. KRIEG. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, p. 427-458.

LEE, K.; YONG, D.; YUM, J. H.; KIM, H. H.; CHONG, Y. Diversity of TEM-52 extended-spectrum β -lactamase-producing non-typhoidal *Salmonella* isolates in Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 52, n. 3, p. 493-496, sep. 2003.

LETELLIER, A.; BEAUCHAMP, G.; GUÉVREMONT, E.; D'ALLAIRE, S.; HURNIK, D.; QUESSY, S. Risk factors at slaughter associated with presence of *Salmonella* on hog carcasses in Canada. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 72, n. 11, p. 2326-2331, nov. 2009.

LEVINGS, R. S.; DJORDJEVIC, S. P.; HALL, R. M. SGI2, a Relative of *Salmonella* Genomic Island SGI1 with an Independent Origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 7, p. 2529-2537, jul. 2008.

LEVINGS, R. S.; LIGHTFOOT, D.; ELBOURNE, L. D.; DJORDJEVIC, S. P.; HALL, R. M. New integron-associated gene cassette encoding a trimethoprim-resistant DfrB-type dihydrofolate reductase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 50, n. 8, p. 2863-2865, aug. 2006.

LI, L.; LIAO, X.; YANG, Y.; SUN, J.; LI, L.; LIU, B.; YANG, S.; MA, J.; LI, X.; ZHANG, Q.; LIU, Y. Spread of oqxAB in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium predominantly by IncHI2 plasmids. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 68, n. 10, p. 2263-2268, oct. 2013.

LI, W. C.; HUANG, F. Y.; LIU, C. P.; WENG, L. C.; WANG, N. Y.; CHIU, N. C.; CHIANG, C. S. Ceftriaxone resistance of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in Northern Taiwan attributable to production of CTX-M-14 and CMY-2b-lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 7, p. 3237-3243, jul. 2005.

LIEBANA, E.; CARATTOLI, A.; COQUE, T. M.; HASMAN, H.; MAGIORAKOS, A. P.; MEVIUS, D.; PEIXE, L.; POIREL, L.; SCHUEPBACH-REGULA, G.; TORNEKE, K.; TORREN-EDO, J.; TORRES, C.; THRELFALL, J. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum β -lactamases or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. **Clinical Infections Diseases**, Chicago, v. 56, n. 7, p. 1030-1037, apr. 2013.

LIM, S. K.; NAM, H. M.; LEE, H. S.; KIM, A. R.; JANG, G. C.; JUNG, S. C.; KIM, T. S. Prevalence and Characterization of Apramycin-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolated from Healthy and Diseased Pigs in Korea during 1998 through 2009. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 76, n. 8, p. 1443-1446, aug. 2013.

LLARRULL, L. I.; TESTERO, S. A.; FISCHER, J. F.; MOBASHERY, S. The future of the beta-lactams. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 13, n. 5, p. 551-557, sep. 2010.

LUKOVA, V.; TZOUVELEKIS, L. S.; TASSIOS, P. T.; THIEL, W. Extended-spectrum β -lactamases in *Salmonella* strains isolated in Austria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 155-156, jul. 2000.

LUNN, A. D.; FÀBREGA, A.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J.; VILA, J. Prevalence of mechanisms decreasing quinolone-susceptibility among *Salmonella* spp. Clinical isolates. **International Microbiology**, Barcelona, v. 13, n. 1, p. 15-20, mar. 2010.

MADEC, J.; DOUBLET, B.; PONSIN, C.; CLOECKAERT, A.; HAENNI, M. Extended-spectrum b-lactamase *bla*_{CTX-M-1} gene carried on an Inc11 plasmid in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in cattle in France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 66, n. 4, p. 942-944, apr. 2011.

MAHROUKI, S.; BELHADJ, O.; CHIHI, H.; MOHAMED, B. M.; CELENZA, G.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M. Chromosomal *bla*_{CTX-M-15} associated with ISEcp1 in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* isolated at the Military Hospital of Tunis, Tunisia. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 61, Pt9, p. 1286-1289, sep. 2012.

MAKANERA, A.; ARLET, G.; GAUTIER, V.; MANAI, M. Molecular epidemiology and characterization of plasmid-encoded β -lactamases produced by Tunisian clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Mbandaka resistant to broad-spectrum cephalosporins. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 7; p. 2940-2945, jul. 2003.

MARTÍNEZ, N.; MENDOZA, M. C.; RODRÍGUEZ, I.; SOTO, S.; BANCES, M.; RODICIO, M. R. Detailed structure of integrons and transposons carried by large conjugative plasmids responsible for multidrug resistance in diverse genomic types of *Salmonella enterica* serovar Brandenburg. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 60, n. 6, p. 1227-1234, dec. 2007.

MARTÍNEZ, N.; RODRÍGUEZ, I.; RODICIO, R.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Molecular basis and evolution of multiple drug resistance in the foodborne pathogen *Salmonella enterica* serovar Ohio. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 7, n. 2, p. 189-198, feb. 2010.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Lancet**, London, v. 351, n. 9105, p. 797-799, mar. 1998.

MARTÍN-PEÑA, R.; DOMÍNGUEZ-HERRERA, J.; PACHÓN, J.; McCONNELL, M. J. Rapid detection of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* using quantitative real-time PCR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 68, n. 7, p. 1572-1575, jul. 2013.

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

MENG, H.; ZHANG, Z.; CHEN, M.; SU, Y.; LI, L.; MIYOSHI, S.; YAN, H.; SHI, L. Characterization and horizontal transfer of class 1 integrons in *Salmonella* strains isolated from food products of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 149, n. 3, p. 274-277, oct. 2011.

MICHAEL, G. B.; BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, A. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, n. 7, p. 1898-1914, jun. 2006.

MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of multiresistant porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Bredeney isolates from Southern Brazil: identification of resistance genes, integrons and a group II intron. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 120-129, aug. 2008.

MINDLIN, M. J.; LANG, N.; MAGUIRE, H.; WALSH, B.; VERLANDER, N. Q.; LANE, C.; TAYLOR, C.; BISHOP, L. A.; CROOK, P. D. Outbreak investigation and case-control study: penta-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 associated with biltong in London in 2008. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 141, n. 9, p. 1920-1927, sep. 2013.

MIRIAGOU, V.; FILIP, R.; COMAN, G.; TZOUVELEKIS, L. S. Expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains in Romania. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 11, p. 4334-4336, nov. 2002.

MIRÓ, E.; GRÜNBAUM, F.; GÓMEZ, L.; RIVERA, A.; MIRELIS, B.; COLL, P.; NAVARRO, F. Characterization of Aminoglycoside-Modifying Enzymes in *Enterobacteriaceae* Clinical Strains and Characterization of the Plasmids Implicated in Their Diffusion. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 19, n. 2, p. 94-99, apr. 2013.

MOISSENET, D.; WEILL, F. X.; ARLET, G.; HARROIS, D.; GIRARDET, J. P.; VU-THIEN, H. *Salmonella enterica* serotype Gambia with CTX-M-3 and *armA* resistance markers: nosocomial infections with a fatal outcome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 4, p. 1676-1678, apr. 2011.

MOROSINI, M. I.; BLAZQUEZ, J.; NEGRI, M. C.; CANTON, R.; LOZA, E.; BAQUERO, F. Characterization of a nosocomial outbreak involving an epidemic plasmid encoding for TEM-27 in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Othmarschen. **Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 174, n. 5, p. 1015-1020, nov.1996.

MOSSONG, J.; MARQUES, P.; RAGIMBEAU, C.; HUBERTY-KRAU, P.; LOSCH, S.; MEYER, G. Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Luxembourg, 2006. **Euro Surveillance**, Stockholm, v. 12, n. 6, E11-2, jun. 2010.

MOURA, A.; SOARES, M.; PEREIRA, C.; LEITÃO, N.; HENRIQUES, I.; CORREIA, A. Integrral: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1096-1098, apr. 2009.

MÜLLER, A. J., KAISER, P.; DITTMAR, K. E.; WEBER, T. C.; HAUETER, S.; ENDT, K.; SONGHET, P.; ZELLWEGER, C.; KREMER, M.; FEHLING, H. J.; HARDT, W. D. *Salmonella* gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 11, n. 1, p. 19-32, jan. 2012.

MULVEY, M. R.; BOYD, D. A.; OLSON, A. B.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, n. 7, p. 1915-1922, jun. 2006.

MULVEY, M. R.; FINLEY, R.; ALLEN, V.; ANG, L.; BEKAL, S.; EL BAILEY, S.; HALDANE, D.; HOANG, L.; HORSMAN, G.; LOUIE, M.; ROBBERTS, L.; WYLIE, J.; MCCRACKEN, M.; LANGNER, S.; AHMED, R.; TABOR, H.; GILMOUR, M. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- involving human cases in Canada: results from the Canadian Integrated Program on Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS), 2003-10. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 68, n. 9, p. 1982-1986, sep. 2013.

MULVEY, M. R.; SOULE, G.; BOYD, D.; DEMCZUK, W.; AHMED, R. Multi-provincial *Salmonella* Typhimurium Case Control Study Group. Characterization of the first extended-spectrum β -lactamase producing *Salmonella* isolate identified in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 1, p. 460-462, jan. 2003.

NAAS, T.; BENTCHOUALA, C.; CUZON, G.; YAOU, S.; LEZZAR, A.; SMATI, F.; NORDMANN, P. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 38, n. 2, p. 135-139, aug. 2011.

National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). **Human Isolates Final Report, 2011**. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, p. 1-71, 2013. Disponível em : < <http://www.cdc.gov/narms/pdf/2011-annual-report-narms-508c.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2014.

NOLLET, N.; HOUF, K.; DEWULF, J.; DE KRUIF, A.; DE ZUTTER, L.; MAES, D. *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. **Veterinary Research**, Paris, v. 36, n. 4, p. 645-656, aug. 2005.

NOVICK, R. P. Plasmid incompatibility. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 51, n. 4, p. 381-395, dec. 1987.

PARDOS DE LA GÁNDARA, M.; SERAL, C.; GARCÍA, J. C.; RUBIO CALVO, C.; WEILL, F. X. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Salmonella enterica* isolates in Saragossa, Spain (2001–2008). **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 17, n. 2, p. 207-213, jun. 2011.

PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; PICKARD, D.; WAIN, J.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K. L.; BENTLEY, S. D.; HOLDEN, M. T. G.; SEBAIHIA, M.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CONNERTON, P.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DAVIES, R. M.; DOWD, L.; WHITE, N.; FARRAR, J.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HAQUE, A.; HIEN, T. T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KROGH, A.; LARSEN, T. S.; LEATHER, S.; MOULE, S.; O'GAORA, P.; PARRY, C.; QUAIL, M.; RUTHERFORD, K.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. **Nature**, London, v. 413, n. 6858, p. 848-852, oct. 2001.

PASQUALI, F.; KEHRENBERG, C.; MANFREDA, G.; SCHWARZ, S. Physical linkage of Tn3 and part of Tn1721 in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid

from *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 55, n. 4, p. 562–565, apr. 2005.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, n. 4, p. 657-686, oct. 2005.

PEARCE, R. A.; BOLTON, D. J.; SHERIDAN, J. J.; MCDOWELL, D. A.; BLAIR, I. S.; HARRINGTON, D. Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 331-339, feb. 2004.

PÉREZ-MORENO, M. O.; PICÓ-PLANA, E.; DE TORO, M.; GRANDE-ARMAS, J.; QUILES-FORTUNY, V.; PONS, M. J.; GOMES, C.; SÁENZ, Y.; TORRES, C.; RUIZ, J. β -Lactamases, transferable quinolone resistance determinants, and class 1 integron-mediated antimicrobial resistance in human clinical *Salmonella enterica* isolates of non-Typhimurium serotypes. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 303, n. 1, p. 25-31, jan. 2013.

PÉRICHON, B.; COURVALIN, P.; GALIMAND, M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 7, p. 2464-2469, jul. 2007.

PIRAS, F.; BROWN, D. J.; MELONI, D.; MUREDDU, A.; MAZZETTE, R. Investigation of *Salmonella enterica* in Sardinian slaughter pigs: prevalence, serotype and genotype characterization. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 151, n. 2, p. 201-209, dec. 2011.

POLITI, L.; TASSIOS, P. T.; LAMBIRI, M.; KANSOUZIDOU, A.; PASIOTOU, M.; VATOPOULOS, A. C.; MELLOU, K.; LEGAKIS, N. J.; TZOUVELEKIS, L. S. Repeated occurrence of diverse extended-spectrum beta-lactamases in minor serotypes of food-borne *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 7, p. 3453-3456, jul. 2005.

POOLE, K. Resistance to beta-lactam antibiotics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 61, n. 17, p. 2200-2223, sep. 2004.

POUPART, M. C.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; SIROT, J. Identification of CTX-2, a novel cefotaximase from a *Salmonella* mbandaka isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 35, n. 7, p. 1498-1500, jul. 1991.

RAFFATELLU, M.; GEORGE, M. D.; AKIYAMA, Y.; HORNSBY, M. J.; NUCCIO, S. P.; PAIXAO, T. A.; BUTLER, B. P.; CHU, H.; SANTOS, R. L.; BERGER, T.; MAK, T. W.; TSOLIS, R. M.; BEVINS, C. L.; SOLNICK, J. V.; DANDEKAR, S.; BÄUMLER, A. J. Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 5, n. 5, p. 476-486, may. 2009.

RAMOS, J. L.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; MOLINA-HENARES, A. J.; TERÁN, W.; WATANABE, K.; ZHANG, X.; GALLEGOS, M. T.; BRENNAN, R.; TOBES, R. The

TetR Family of transcriptional repressor. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 69, n. 2, p. 326-356, jun. 2005.

RANJBAR, R.; GIAMMANCO, G. M.; ALEO, A.; PLANO, M. R.; NAGHONI, A.; OWLIA, P.; MAMMINA, C. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing nontyphoidal *Salmonella* strains isolated in Tehran, Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 7, n. 1, p. 91-95, jan. 2010.

RECCHIA, G. D.; HALL, R. M. Gene cassettes: a new class of mobile element. **Microbiology**, Washington, v. 141, Pt12, p. 3015-3027, dec. 1995.

REVATHI, G.; SHANNON, K. P.; STAPLETON, P. D.; JAIN, B. K.; FRENCH, G. L. An outbreak of extended-spectrum-lactamase-producing *Salmonella* senftenberg in a burns ward. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 40, n. 4, p. 295-302, dec. 1998.

REZNIKOFF, W. Tn5 Transposition. In: CRAIG, N.; CRAIGIE, R.; GELLERT, M.; LAMBOWITZ, A. eds. **Mobile DNA II**. Washington: ASM Press, 2002, p. 403-422.

RIAÑO, I.; GARCÍA-CAMPELLO, M.; SÁENZ, Y.; ALVAREZ, P.; VINUÉ, L.; LANTERO, M.; MORENO, M. A.; ZARAZAGA, M.; TORRES, C. Occurrence of extended-spectrum b-lactamase-producing *Salmonella enterica* in northern Spain with evidence of CTX-M-9 clonal spread among animals and humans. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 15, n. 3, p. 292-295, mar. 2009.

ROBERTS, M. C. Resistance to tetracyclines, macrolides, trimethoprim and sulfonamides. **Methods in Molecular Medicine**, Totowa, v. 15, p. 641-663, 1998.

ROBERTS, M. C. Update on macrolide-lincosamide streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 282, n. 2, p. 147-159, may. 2008.

ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G. A.; MACIELAG, M.; ABBANAT, D.; PARK, C. H.; BUSH, K.; HOOPER, D. C. Fluoroquinolone modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. **Nature Medicine**, New York, v. 12, n. 1, p. 83-88, jan. 2006.

RODRÍGUEZ, I.; BAROWNICK, W.; HELMUTH, R.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R.; SCHROETER, A.; GUERRA, B. Extended-spectrum b-lactamases and AmpC b-lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003–07. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 64, n. 2, p. 301-309, aug. 2009.

RODRÍGUEZ, I.; JAHN, S.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; HELMUTH, R.; GUERRA, B. Extended-spectrum b-lactamases in German isolates belonging to the emerging monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 4,[5],12:i:- European clone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 67, n. 2, p. 505-508, feb. 2012.

ROLAIN, J. M.; MALLET, M. N.; FOURNIER P. E., RAOULT, D. Real-time PCR for universal antibiotic susceptibility testing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 54, n. 2, p. 538-541, aug. 2004.

ROMERO, L.; LÓPEZ, L.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; GUERRA, B.; HERNÁNDEZ, J. R.; PASCUAL, A. Characterization of the first CTX-M-14-producing *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 53, n. 6, p. 1113-1114, jun. 2004.

ROSSELIN, M.; VIRLOGEUX-PAYANT, I.; ROY, C.; BOTTREAU, E.; SIZARET, P. Y.; MIJOUIN, L.; GERMON, P.; CARON, E.; VELGE, P.; WIEDEMANN, A. Rck of *Salmonella enterica*, subspecies *enterica* serovar Enteritidis, mediates Zipper-like internalization. **Cell Research**, Beijing, v. 20, n. 6, p. 647-664, jun. 2010.

SALCEDO, S. P.; NOURSADEGHI, M.; COHEN, J.; HOLDEN, D. W. Intracellular replication of *Salmonella* Typhimurium strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 3, n. 9, p. 587-597, sep. 2001.

SÁNCHEZ-VARGAS, F. M.; ABU-EL-HAIJA, M. A.; GÓMEZ-DUARTE, O. G. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. **Travel Medicine and Infectious Disease**, Amsterdam, v. 9, n. 6, p. 263-277, nov. 2011.

SANTOS, R. L.; RAFFATELLU, M.; BEVINS, C. L.; ADAMS, L. G.; TÜKEL, Ç.; TSOLIS, R. N.; BÄUMLER, A. J. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 17, n. 11, p. 498-506, nov. 2009.

SCHWARZ, P.; CALVEIRA, J.; BESSA, M.; BARCELLOS, D.; CARDOSO, M. *Salmonella enterica*: isolamento e soroprevalência em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 5, p. 1028-1034, oct. 2009.

SCHWARZ, S.; CLOECKAERT, A.; ROBERTS, M. C. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: F.M. AARESTRUP (Ed.): **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin**. Washington: ASM Press, 2006, p. 73-98.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 28, n. 5, p. 519-542, nov. 2004.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A.; GAASTRA, W. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 65, n. 4, p. 601-604, apr. 2010.

SHAW, W. V. Chloramphenicol acetyltransferase, enzymology and molecular biology. **CRC Critical Reviews in Biochemistry**, Cleveland, v. 14, n. 1, p. 1-46, 1983.

SHELOBOLINA, E. S.; SULLIVAN, S. A.; O'NEILL, K. R.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Isolation, characterization and U(VI)-reduction potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI) contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 70, n. 5, p. 2959-2965, may. 2004.

SIGUIER, P.; FILÉ, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences in prokaryotic genomes. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 9, n. 5, p. 526-531, oct. 2006.

SILVA, L. E.; DIAS, V.; FERRONATTO, A.; GUERRA, P.; BERNO, L.; TRICHES, N.; KICH, J. D.; CORBELLINI, L. G.; CARDOSO, M. Longitudinal dissemination of *Salmonella enterica* clonal groups through the slaughter process of *Salmonella*-positive pig batches. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 75, n. 9, p. 1580-1588, sep. 2012.

SIRICHOTE, P.; HASMAN, H.; PULSRIKARN, C.; SCHØNHEYDER, H. C.; SAMULIONIENE, J.; PORNRUANGMONG, S.; BANGTRAKULNONTH, A.; AARESTRUP, F. M.; HENDRIKSEN, R. S. Molecular characterization of extended-spectrum cephalosporinase-producing *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates from patients in Thailand and Denmark. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 3, p. 883-888, mar. 2010.

SJÖLUND-KARLSSON, M.; HOWIE, R.; KRUEGER, A.; RICKERT, R.; PECIC, G.; LUPOLI, K.; FOLSTER, J. P.; WHICHARD, J. M. CTX-M-producing non-typhi *Salmonella* spp. isolated from humans, United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 1, p. 97-99, jan. 2011.

SJÖLUND-KARLSSON, M.; RICKERT, R.; MATAR, C.; PECIC, G.; HOWIE, R. L.; JOYCE, K.; MEDALLA, F.; BARZILAY, E. J.; WHICHARD, J. M. *Salmonella* isolates with decreased susceptibility to extended-spectrum cephalosporins in the United States. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 7, n. 12, p. 1503-1509, dec. 2010.

SMET, A.; MARTEL, A.; PERSONS, D.; DEWULF, J.; HEYNDRIKX, M.; CLOECKAERT, A.; PRAUD, K.; CLAEYS, G.; CATRY, B.; HERMAN, L.; HAESEBROUCK, F.; BUTAYE, P. Comparative analysis of extended-spectrum-beta-lactamase-carrying plasmids from different members of *Enterobacteriaceae* isolated from poultry, pigs and humans: evidence for a shared beta-lactam resistance gene pool? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 63, n. 6, p. 1286-1300, jun. 2009.

SMILLIE, C.; GARCILLÁN-BARCIA, M. P.; FRANCA, M. V.; ROCHA, E. P.; DE LA CRUZ, F. Mobility of plasmids. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 74, n. 3, p. 434-52, sep. 2010.

SU, L. H.; WU, T. L.; CHIA, J. H.; CHU, C.; KUO, A. J.; CHIU, C. H. Increasing ceftriaxone resistance in *Salmonella* isolates from a university hospital in Taiwan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 55, n. 6, p. 846-852, jun. 2005.

SZYCH, J.; CIESLIK, A.; PACIOREK, K.; KALUZEWSKI, S. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains isolated in Poland from 1998 to 1999. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 37-42, jul. 2001.

TAMAMURA, Y.; TANAKA, K.; AKIBA, M.; KANNO, T.; HATAMA, S.; ISHIHARA, R.; UCHIDA, I. Complete nucleotide sequences of virulence-resistance plasmids carried by emerging multidrug-resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium isolated from cattle in Hokkaido, Japan. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 10, e77644, oct. 2013.

TAMANG, M. D.; NAM, H. M.; KIM, A.; LEE, H. S.; KIM, T. S.; KIM, M. J.; JANG, G. C.; JUNG, S. C.; LIM, S. K. Prevalence and mechanisms of quinolone resistance among selected nontyphoid *Salmonella* isolated from food animals and humans in Korea. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 8, n. 11, p. 1199-1206, nov. 2011a.

TAMANG, M. D.; NAM, H. M.; KIM, T. S.; JANG, G. C.; JUNG, S. C.; LIM, S. K. Emergence of extended-spectrum b-lactamase (CTX-M-15 and CTX-M-14)-producing nontyphoid *Salmonella* with reduced susceptibility to ciprofloxacin among food animals and humans in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 7, p. 2671-2675, jul. 2011b.

THAKER, M.; SPANOGIANNOPOULOS, P.; WRIGHT, G. D. The tetracycline resistome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, n. 3, p. 419-431, feb. 2010.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). **Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method**, Version 3.0, apri. 2013. Disponível em: <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Manual_v_3.0_EUCAST_Disk_Test.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2014.

THOMAS, C. M.; NIELSEN K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 9, p. 711-721, sep. 2005.

THRELFALL, E. J. Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT104 – a truly international multiresistant clone. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 46, n. 1, p. 7-10, jul. 2000.

VAHABOGLU, H.; FUZI, M.; CETIN, S.; GUNDES, S.; UJHELYI, E.; COSKUNKAN, F.; TANSEL, O. Characterization of extended spectrum-lactamase (TEM-52)-producing strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with diverse resistance phenotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 2, p. 791-793, feb. 2001.

VAKULENKO, S. B.; MOBASHERY, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 430-450, jul. 2003.

VAN HOEK, A. H.; MEVIUS, D.; GUERRA, B.; MULLANY, P.; ROBERTS, A. P.; AARTS, H. J. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 2, n. 203, sep. 2011.

VELDMAN, K.; CAVACO, L. M.; MEVIUS, D.; BATTISTI, A.; FRANCO, A.; BOTTELDOORN, N.; BRUNEAU, M.; PERRIN-GUYOMARD, A.; CERNY, T.; DE FRUTOS ESCOBAR, C.; GUERRA, B.; SCHROETER, A.; GUTIERREZ, M.; HOPKINS, K.; MYLLYNIEMI, A.-L.; SUNDE, M.; WASYL, D.; AARESTRUP, F. M. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 66, n. 6, p. 1278-1286, jun. 2011.

VELDMAN, K.; DIERIKX, C.; VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A.; VAN PELT, W.; MEVIUS, D. Characterization of multidrug-resistant, *qnrB2*-positive and extended-spectrum- β -lactamase producing *Salmonella* Concord and *Salmonella* Senftenberg isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 65, n. 5, p. 872-875, may. 2010.

VELGE, P.; WIEDEMANN, A.; ROSSELIN, M.; ABED, N.; BOUMART, Z.; CHAUSSÉ, A. M.; GRÉPINET, O.; NAMDARI, F.; ROCHE, S. M.; ROSSIGNOL, A.; VIRLOGEUX-PAYANT, I. Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. **Microbiology Open**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 243-58, sep. 2012.

VELHNER, M.; KOZODEROVIĆ, G.; GREGO, E.; GALÍC, N.; STOJANOV, I.; JELESÍC, Z.; KEHRENBURG, C. Clonal spread of *Salmonella enterica* Serovar Infantis in Serbia: Acquisition of Mutations in the Topoisomerase Genes *gyrA* and *parC* leads to increased resistance to fluoroquinolones. **Zoonoses and Public Health**, Berlin, Oct. 2013. Doi: 10.1111/zph.12081.

VIEIRA, A. R.; COLLIGNON, P.; AARESTRUP, F. M.; McEWEN, S. A.; HENDRIKSEN, R. S.; HALD, T.; WEGENER, H. C. Association between antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals and blood stream isolates from humans in Europe: an ecological study. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 8, n. 12, p. 1295-1301, dec. 2011.

VIGNOLI, R.; CORDEIRO, N. F.; GARCÍA, V.; MOTA, M. I.; BETANCOR, L.; POWER, P.; CHABALGOITY, J. A.; SCHELOTTO, F.; GUTKIND, G.; AYALA, J. A. New TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase and its genomic context in plasmids from *Salmonella enterica* serovar Derby isolates from Uruguay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 50, n. 2, p. 781-784, feb. 2006.

VILACOBIA, E.; ALMUZARA, M.; GULONE, L.; TRAGLIA, G. M.; FIGUEROA, S. A.; SLY, G.; FERNÁNDEZ, A.; CENTRÓN, D.; RAMÍREZ, M. S. Emergence and spread of plasmid-borne *tet(B)::ISCR2* in minocycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 57, n. 1, p. 651-654, jan. 2013.

VILLA, L.; MAMMINA, C.; MIRIAGOU, V.; TZOUVELEKIS, L. S.; TASSIOS, P. T.; NASTASI, A.; CARATTOLI, A. Multidrug and broadspectrum cephalosporin resistance among *Salmonella enterica* serotype Enteritidis clinical isolates in southern Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 7, p. 2662-2665, jul. 2002.

VILLA, L.; PEZZELLA, C.; TOSINI, F.; VISCA, P.; PETRUCCA, A.; CARATTOLI, A. Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an extended-spectrum β -lactamase gene and a class 1 integron. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 44, n. 10, p. 2911-2914, oct. 2000.

WATERS, V. L. Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, v. 4, p. 416-439, may. 1999.

WATTS, J.; LINDEMAN, C. Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria of Veterinary Origin. In: F.M. AARESTRUP (Ed.): **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin**. Washington: ASM Press, 2006, p. 29-36.

WEILL, F. X.; DEMARTIN, M.; TANDE, D.; ESPIE, E.; RAKOTOARIVONY, I.; GRIMONT, P. A. SHV-12-like extended-spectrum-beta-lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 6, p. 2432-2437, jun. 2004a.

WEILL, F. X.; LAILLER, R.; PRAUD, K.; KÉROUANTON, A.; FABRE, L.; BRISABOIS, A.; GRIMONT, P. A.; CLOECKAERT, A. Emergence of Extended-Spectrum Humans b-Lactamase (CTX-M-9)-Producing Multiresistant Strains of *Salmonella* Serotype Virchow in Poultry and enterica Humans in France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 12, p. 5767-5773, dec. 2004b.

WIEDEMANN, A.; ROSSELIN, M.; MIJOUIN, L.; BOTTREAU, E.; VELGE, P. Involvement of c-Src Tyrosine Kinase Upstream of Class I Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinases in *Salmonella* Enteritidis Rck Protein-mediated Invasion. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 287, n. 37, p. 31148-31154, sep. 2012.

WIERUP, M.; HÄGGBLÖM, P. An assessment of soybeans and other vegetable proteins as source of *Salmonella* contamination in pig production. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 52, n. 15, feb. 2010.

WIESNER, M.; CALVA, E.; FERNÁNDEZ-MORA, M.; CEVALLOS, M. A.; CAMPOS, F.; ZAIDI, M. B.; SILVA, C. *Salmonella* Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. **BMC Microbiology**, London, v. 11, n. 9, jan. 2011. Doi: 10.1186/1471-2180-11-9.

WINOKUR, P. L.; BRUEGGEMANN, A.; DESALVO, D. L.; HOFFMANN, L.; APLEY, M. D.; UHLENHOPP, E. K.; PFALLER, M. A.; DOERN, G. V. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a

plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 44, n. 10, p. 2777-2783, oct. 2000.

WITTUM, T. E.; MOLLENKOPF, D. F.; ERDMANB, M. M. Detection of *Salmonella enterica* isolates producing CTX-M Cephalosporinase in U.S. livestock populations. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 20, p. 7487-7491, oct. 2012.

WOEGERBAUER, M.; ZEINZINGER, J.; SPRINGER, B.; HUFNAGL, P.; INDRA, A.; KORSCHINECK, I.; HOFRICHTER, J.; KOPACKA, I.; FUCHS, R.; STEINWIDER, J.; FUCHS, K.; NIELSEN, K. M.; ALLERBERGER, F. Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes *aph(3')-IIIa* and *aph(3')-IIa* in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *Staphylococcus aureus* isolates in Austria. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 63, Pt2, p. 210-217, feb. 2014.

WOLFSON, J. S.; HOOPER, D. C. Fluoroquinolone antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 2, n. 4, p. 378-424, oct. 1989.

WOOTTON, M. **BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing** (Version 12 May 2013). Disponível em: <http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Version-12-Apr-2013_final.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2014.

WORTHINGTON, R. J.; MELANDER, C. Overcoming resistance to β -lactam antibiotics. **The Journal of Organic Chemistry**, Easton, v. 78, n. 9, p. 4207-4213, may. 2013.

WOZNIAK, R. A. F.; WALDOR, M. K. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, n. 8, p. 552-563, aug. 2010.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 57, n. 10, p. 1451-1470, jul. 2005.

YAMANE, K.; WACHINO, J. I.; SUZUKI, S.; KIMURA, K.; SHIBATA, N.; KATO, H.; SHIBAYAMA, K.; KONDA, T.; ARAKAWA, Y. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 9, p. 3354-3360, sep. 2007.

YAO, J. D. C.; MOELLERING Jr., R. C. Antimicrobial agents. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington: ASM Press, 1999, p. 1474-1505.

YAU, S.; LIU, X.; DJORDJEVIC, S. P.; HALL, R. M. RSF1010-like plasmids in Australian *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and origin of their *sul2-strA-strB* antibiotic resistance gene cluster. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 16, n. 4, p. 249-252, dec. 2010.

YU, F.; CHEN, Q.; YU, X.; LI, Q.; DING, B.; YANG, L.; CHEN, C.; QIN, Z.; PARSONS, C.; ZHANG, X.; HUANG, J.; LUO, Y.; WANG, L.; PAN, J. High prevalence of extended-spectrum beta lactamases among *Salmonella enterica* Typhimurium isolates from pediatric patients with diarrhea in China. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 3, e16801, mar. 2011.

ZAMPERINI, K.; SONI, V.; WALTMAN, D.; SANCHEZ, S.; THERIAULT, E. C.; BRAY, J.; MAURER, J. J. Molecular characterization reveals *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- from poultry is a variant Typhimurium serovar. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 51, n. 4, p. 958-964, dec. 2007.

ZHAO, W. H.; HU, Z. Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamase in Gram-negative bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 39, n. 1, p. 79-101, feb. 2013.