

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

CAMILA VERÍSSIMO DE SALES

MUDANÇAS NO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM *Salmonella enterica* APÓS EXPOSIÇÃO ÀS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS EM CARNE DE FRANGO

JOÃO PESSOA-PB

2018

CAMILA VERÍSSIMO DE SALES

**MUDANÇAS NO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM *Salmonella*
enterica APÓS EXPOSIÇÃO ÀS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS
SIMULADAS EM CARNE DE FRANGO**

JOÃO PESSOA-PB

2018

CAMILA VERÍSSIMO DE SALES

**MUDANÇAS NO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM *Salmonella enterica* APÓS EXPOSIÇÃO ÀS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS
SIMULADAS EM CARNE DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dr^a Marciane Magnani

JOÃO PESSOA
2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S163m Sales, Camila Veríssimo de.

Mudanças no fenótipo de resistência a antibióticos em *Salmonella enterica* após exposição às condições gastrointestinais simuladas em carne de frango / Camila Veríssimo de Sales. - João Pessoa, 2018.
64 f. : il.

Orientação: Marciane Magnani.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Enterobacteriaceae - Salmonelose. 2. Cepas epidêmicas. 3. Carne de frango. 4. Digestão in vitro.
5. Antibioticoterapia. I. Magnani, Marciane. II. Título.

UFPB/BC

CDU 579.842.1/.2(043)

CAMILA VERÍSSIMO DE SALES

**MUDANÇAS NO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM
Salmonella enterica APÓS EXPOSIÇÃO ÀS CONDIÇÕES
GASTROINTESTINAIS SIMULADAS EM CARNE DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

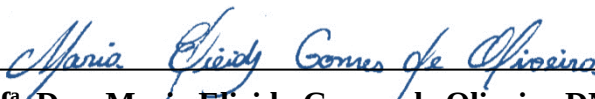
Dissertação aprovada em 25/04/2018

BANCA EXAMINADORA



Profª Dra. Marciane Magnani DEA/CT/UFPB

Presidente da Banca Examinadora



Profª. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira DN/UFPB

Examinador Interno



Prof. Dr. Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira DN/UFPB

Examinador Externo

JOÃO PESSOA-PB

2018

*A Deus autor da minha vida, socorro bem
presente na hora da angústia, minha fortaleza,
meu Senhor e salvador. Ao meu filho, Guilherme
e minha mãe, Luzia Veríssimo, meus maiores
presentes da parte de Deus, por todo o apoio,
companheirismo e amor.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em especial à Deus, por ser meu escudo, por sua presença constante em minha vida, por ter me carregado nos braços e me dado forças nas horas difíceis e por tantas bênçãos derramadas sobre mim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba (PPGCTA-UFPB), pela disponibilidade de sua estrutura física, todo corpo docente, coordenadores e secretária.

À minha mãe e meu filho, que são meu porto seguro, que me deram tanto apoio, amor, compreensão e que a minha chegada até aqui só foi possível depois de muita dedicação, esforços e renúncias dessas pessoas. A todos os familiares pelo apoio.

À minha orientadora, Prof^a Dr.^a Marciane Magnani, pelo empenho e orientação, toda dedicação, disponibilidade, pela confiança que sempre me concedeu, ajuda e conhecimentos transmitidos. Meu muito obrigada!!!

À minha amiga, Thayse por estar sempre comigo, por me apoiar em todos os momentos, por tudo que compartilhamos juntas, com você pude sentir de verdade que nossa família são todos aqueles que amamos, obrigada por tudo.

Aos amigos do laboratório, Whyara, Helena, Rayanne, Daniele, Adma, Geany, Rayssa e Laênia, a Seu Gilvandro e Seu Claudeonor pelo companheirismo, conversas e risos compartilhados.

Às amigas, Aline, Elainy, Winnie e Dayene por todo suporte durante as disciplinas do mestrado, e por me ensinarem a ser melhor a cada dia. Muito obrigada pelo companheirismo e amizade.

A banca examinadora, professora Dr.^a. Elieidy e ao Professor Dr. Carlos Eduardo pelo aceite e contribuição para a melhoria deste trabalho e, especialmente, por terem despertado em mim o amor pela pesquisa. Obrigada pelo carinho, ensinamentos, conselhos e incentivos. Ambos são exemplos de humildade, inteligência e dedicação, recebam minha total admiração.

Por fim, quero deixar meu agradecimento a todos, pois saibam só foi possível a conclusão deste trabalho porque teve a participação de cada um. Muito obrigada a todos por darem sua parcela de contribuição pra meu crescimento e amadurecimento pessoal e acadêmico.

RESUMO

O crescente aumento da resistência aos antibióticos em *Salmonella enterica* é considerado um problema de saúde pública, porém pouco é sabido sobre os efeitos da exposição às condições gastrointestinais no fenótipo de resistência de cepas epidêmicas deste patógeno. Este estudo avaliou os efeitos da exposição às condições gastrointestinais simuladas na suscetibilidade a onze antibióticos em quinze cepas epidêmicas de *S. enterica* de quinze sorovares distintos. A concentração inibitória mínima (CIM) de cada antibiótico foi determinada pelo método de microdiluição em caldo antes e após a exposição às condições gastrointestinais simuladas de cada cepa a um sistema contínuo de 9 etapas simulando a boca (1ª-etapa) esôfago-estômago (2ª a 7ª etapa), duodeno (8ª etapa) e íleo (9ª etapa) em carne de frango irradiada (20 g; 5 log UFC/g). Os dados foram interpretados de acordo com os valores preconizados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (µg/mL). Antes da digestão *in vitro*, todas as cepas de *S. enterica* apresentaram resistência frente a pelo menos dois antibióticos e *S. Derby* apresentou a maior taxa de resistência. Nenhuma das cepas ensaiadas apresentou resistência à cefepima (FEP) e polimixina (PB) antes ou depois da digestão simulada. Após a digestão *in vitro*, 12 cepas com suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina (CIP) passaram a mostrar resistência a esse antibiótico. *S. Newport* mudou o fenótipo intermediário à ceftriaxona (CTX) para resistente a CTX. *S. Heidelberg* mudou de ampicilina (AMP) sensível para AMP-resistente. *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Newport*, *S. Albany* e *S. Corvallis* sensíveis ao sulfametoxazol/trimetoprima (SXT) antes da digestão mostraram fenótipo resistente a SXT após a digestão simulada. *S. Heidelberg*, *S. Newport*, *S. Albany* e *S. Corvallis* mostraram a maior taxa de alteração na suscetibilidade, apresentando novo fenótipo resistente frente AMP e CIP, CTX e SXT, CIP e SXT e CIP e SXT, respectivamente. Os resultados mostram que as condições impostas durante as condições humanas gastrointestinais simuladas podem alterar a suscetibilidade antimicrobiana de cepas epidêmicas de *S. enterica* a antibióticos e devem ser consideradas na seleção de terapias antibióticas para salmonelose humana.

Palavras-chave: cepas epidêmicas, carne de frango, digestão *in vitro*, salmonelose, antibioticoterapia

ABSTRACT

The increasing emerging antibiotic resistance in *Salmonella enterica* has been considered public health problem, however few it is known about the effects of exposure to gastrointestinal conditions on the resistance phenotype of epidemic strains of this pathogen. This study evaluated the effects of exposure of fifteen outbreak-linked *Salmonella enterica* strains in chicken meat to simulated human gastrointestinal conditions on susceptibility to 11 antibiotics of seven distinct classes were evaluated. The minimum inhibitory concentration of each antibiotic was determined by microdilution broth before and after the exposure of each strain to a 9-steps continuous system simulating the mouth (1st step), esophagus-stomach 2nd to 7th steps, duodenum (8th step) and ileum (9th step) in irradiated chicken meat (20g; 5 log CFU / g). Data were interpreted according Clinical and Laboratory Standards Institute breakpoints values ($\mu\text{g} / \text{mL}$). Before in vitro digestion, all strains of *S. enterica* showed resistance to at least two antibiotics and *S. Derby* presented the highest resistance frequency. None of the strains tested showed resistance to cefepime (FEP) and polymyxin (PB) before or after simulated digestion. Twelve strains with reduced susceptibility to ciprofloxacin (CIP) changed to CIP-resistant after in vitro digestion. *S. Newport* ceftriaxone (CTX)-intermediary changed to CTX-resistant. Ampicillin (AMP)-susceptible *S. Heidelberg* changed to AMP-resistant, while *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Newport*, *S. Albany* and *S. Corvallis* sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT)-susceptible changed to SXT-resistant. *S. Heidelberg*, *S. Newport*, *S. Albany* and *S. Corvallis* showed the highest frequency of change in antibiotic susceptibility with new-resistant phenotype to AMP and CIP, CTX and SXT, CIP and SXT and CIP and SXT, respectively. Conditions imposed by a simulated gastrointestinal environment changes the susceptibility of *S. enterica* to clinically relevant antibiotics and should be considered in the selection therapies for human salmonellosis.

Key words: epidemic strains, chicken meat, in vitro digestion, salmonellosis, antibiotic therapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação do anel azetidinona presente em antibióticos do grupo β -lactâmicos.....	16
Figura 2. Estrutura química da gentamicina.....	19
Figura 3. Estrutura química da canamicina.....	19
Figura 4. Estrutura química da tetraciclina.....	20
Figura 5. Estrutura química do sulfametaxazol.....	22
Figura 6. Estrutura química do trimetoprima.....	22
Figura 7. Estrutura química da ciprofloxacina.....	23
Figura 8. Distribuição dos sorovares de <i>Salmonella enterica</i> antes (A) e depois (B) da exposição as condições gastrointestinais humanas simuladas.....	36

ARTIGO

Figure 1. Distribution of <i>Salmonella enterica</i> strain before (A) and after (B) exposure to human simulated gastrointestinal conditions.....	63
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. As 15 cepas de <i>Salmonella enterica</i> e sua fonte de isolamento.	31
Tabela 2. <i>Breakpoints</i> das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) propostas pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2016) e utilizadas para determinar a suscetibilidade aos antibióticos.	33
Tabela 3. Condições usadas durante cada etapa do sistema gastrointestinal simulado.....	35

ARTIGO

Table 1. Antibiotic resistant phenotype of outbreak-linked <i>Salmonella enterica</i> strains belonging to fifteen distinct serovars before and after exposure to simulated human gastrointestinal conditions to eleven antibiotics of seven different classes.	59
Table 2. The fifteen epidemics strains of <i>Salmonella enterica</i> included in the study and their source of isolation.....	60
Table 3. Minimal Inhibition Concentration (MIC) <i>breakpoints</i> proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) to determine the phenotype of susceptibility or resistance of <i>S. enterica</i>	61
Table 4. The conditions used each step of the continuous system simulating the human gastrointestinal conditions.	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 EPIDEMIOLOGIA DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i>	13
2.2 ANTIBIÓTICOS DE USO NA CLÍNICA HUMANA E VETERINÁRIA	15
2.2.1 β -lactâmicos	16
2.2.2 Aminoglicosídeos	18
2.2.3 Tetraciclinas	19
2.2.4 Fenicois	20
2.2.5 Sulfonamidas e Trimetropim	21
2.2.6 Quinolonas	22
2.2.7 Polimixina	24
2.3 RESISTÊNCIA À ANTIBIÓTICOS EM <i>SALMONELLA ENTERICA</i>	25
2.3.1 Resposta a estresses em <i>Salmonella enterica</i>	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO	30
3.2 CEPAS TESTE, INÓCULO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	30
3.3 ANTIBIÓTICOS E SOLUÇÕES ESTOQUE	31
3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ANTIBIÓTICOS	32
3.5 AMOSTRAS DE PEITO DE FRANGO	33
3.6 EXPOSIÇÃO DE <i>S. ENTERICA</i> AS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS (DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>) EM PEITO DE FRANGO	34
3.7 REVERSÃO DAS ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS APÓS DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	35
3.8 REPRODUTIBILIDADE E VALIDAÇÃO DE DADOS	35
REFERÊNCIAS	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 ARTIGO	47
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64

1 INTRODUÇÃO

Salmonella enterica é reconhecida mundialmente como um dos patógenos mais importantes relacionados à surtos alimentares (BESSER, 2018). Diversos sorovares de *S. enterica* têm sido associados a surtos envolvendo à ingestão de alimentos, tais como queijos (FERRARI et al., 2013), manteiga de amendoim (ALVAREZ-ORDOÑEZ et al., 2012), frutas e vegetais minimamente processados (FISTAND et al., 2012; SANT'ANA et al., 2014), carne bovina (ROWLANDS et al., 2014), carne suína (LIMA et al., 2016), ovos e produtos à base de carne de frango (KOTTWITZ et al., 2010).

Estima-se que aproximadamente 95% dos casos de salmoneloses notificados em humanos estejam relacionados ao consumo de alimentos de origem animal (MELO et al., 2017; LYNNE et al., 2015). Essa prevalência é um dos principais fatores de risco associados à epidemiologia de *S. enterica* em todo o mundo.

A salmonelose caracteriza-se como uma gastroenterite autolimitada, que não requer antibioticoterapia. Entretanto, em pacientes imunocomprometidos, idosos, crianças ou pacientes com outras co-morbidades, este quadro pode evoluir para uma doença sistêmica (CORDEIRO et al., 2013). Devido à emergência de cepas de *S. enterica* que apresentam aumentada resistência antimicrobiana frente aos antibióticos de eleição para terapia clínica, o tratamento de salmoneloses tem sido abordado como um desafio para microbiologistas (CDC, 2018). Neste cenário, os sorovares de *S. enterica* multiresistentes a antibióticos representam uma ameaça porque podem comprometer a eficácia do tratamento terapêutico, resultando em falhas clínicas (KYLIE et al., 2017).

A resistência de *S. enterica* frente aos antibióticos tem sido relacionada em parte ao uso indiscriminado destes agentes na medicina humana e veterinária, seja para o tratamento e prevenção de doenças, ou como promotores de crescimento, respectivamente (ZHU et al., 2017; MOLE, 2013; PRUDEN et al., 2013). Além disso, as bactérias são continuamente expostas a estresses ambientais, tanto no seu habitat natural, como durante processos que visam a sua inativação, como por exemplo, a exposição extensiva a concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos, ou estresses físicos e químicos comuns do processamento de alimentos, o que contribui para o surgimento e propagação de cepas de *S. enterica* resistentes a antimicrobianos (HE et al., 2018; FONG; WANG, 2016).

Sorovares epidêmicos de *S. enterica* são capazes de lidar com uma variedade de estresses presentes no microambiente natural, durante o processamento de alimentos, na

comercialização, no armazenamento, bem como, durante sua passagem no trato gastrointestinal do hospedeiro (KENYON; SPECTOR, 2011).

No hospedeiro, cepas de *S. enterica* são inicialmente desafiadas pelo pH ácido do estômago. As células que conseguem sobreviver ao entrar no intestino e devem lidar com oxigênio reduzido, sais biliares, peptídeos antimicrobianos, ácidos fracos (produtos metabólicos da flora microbiana residente), aumento da osmolaridade e competição com microrganismos residentes por nutrientes e espaço. As células de *S. enterica* capazes de se adaptar e sobreviver a essas condições tipicamente colonizam e invadem a mucosa intestinal do hospedeiro (SPECTOR; KENYON, 2012).

Essa exposição a estresses ambientais diversos e em particular ao conjunto de estresses imposto durante a digestão tem sido citada como um fator que contribui para a resistência de patógenos aos antibióticos (AL-NABULSI et al., 2015). Além disso, tais exposições podem induzir mudanças fenotípicas e também induzir a proteção cruzada contra uma série de estresses, incluindo a resistência aos antibióticos (MCMAHON et al., 2007). Considerando estes aspectos, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da exposição às condições gastrointestinais simuladas em carne de frango, no perfil de resistência a antibióticos em cepas de *Salmonella enterica* pertencentes a 15 distintos sorovares envolvidos em surtos alimentares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGIA DE *Salmonella enterica*

Bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, mesófilos, sendo a maioria móvel por meio de flagelos peritríquios e pertencentes à família Enterobacteriaceae (WAN NORHANA et al., 2010). O gênero *Salmonella* é classificado em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. *S. bongori* inclui 20 subespécies, enquanto *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. salamae*, *S. houtanae* e *S. indica* (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Os sorovares de maior relevância clínica pertencem a *S. enterica* subespécie *enterica* (MAGWEDERE et al., 2015). A subespécie *S. enterica* é dividida em mais de 2.500 sorovares distintos classificados com base na caracterização de seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H) (YACHISON et al., 2017).

Estima-se que a infecção por *Salmonella enterica* cause 93,8 milhões de casos e 155.000 mortes em todo o mundo a cada ano (CDC, 2018). Aproximadamente 95% dos casos de salmoneloses notificados em humanos estejam relacionados ao consumo de alimentos de origem animal (MELO et al., 2017; LYNNE et al., 2015). Esta prevalência de matrizes alimentares animais é um dos principais fatores de risco associados a surtos alimentares em todo o mundo. Nos Estados Unidos, a cada ano mais de 300 óbitos são associados a salmonelose, que responde também pela maior taxa de hospitalização dentre as doenças de origem alimentar (CDC, 2018). No Brasil, segundo dados da Secretaria de vigilância em saúde, do total de surtos notificados entre os anos de 2000 a 2015, 14,4% estavam associados à *S. enterica*. Globalmente as melhores estimativas colocam os casos de salmonelose de origem alimentar em 80,3 milhões de acometidos (BRASIL, 2015; CDC, 2018).

A disseminação dos sorovares de *S. enterica* pode ocorrer por inúmeras vias, incluindo os alimentos. A eliminação intermitentemente de *S. enterica* nas fezes de animais representa uma importante fonte de contaminação para água e alimentos (KINGSLEY et al., 2002). A salmonelose tem sido associada ao consumo de uma variedade de produtos alimentícios, como queijos (FERRARI et al., 2013), frutas e hortaliças minimamente processadas (FISTAND et al., 2012; FOLEY et al., 2011) e carne bovina (ROWLANDS et al., 2014). Contudo, os alimentos podem ser contaminados em qualquer ponto da cadeia alimentar desde a produção até o processamento, distribuição, preparação e consumo (CDC, 2015).

Geralmente, infecções gastrointestinais causadas por *S. enterica* são gastroenterites autolimitadas, que não requerem antibioticoterapia. O indivíduo infectado apresenta quadros de diarreia, febre, cólicas abdominais, e /ou vômitos (WHO, 2016). Entretanto, em pacientes imunocomprometidos, idosos, crianças ou pacientes com outras co-morbidades a infecção pode agravar-se causando doença sistêmica (CORDEIRO et al., 2013).

Por se tratar de patógeno de origem alimentar, *Salmonella* deve resistir aos vários níveis de defesa durante a patogênese dentro de um hospedeiro. Ao ser ingerida em alimentos, ou água contaminada, inicialmente as células são desafiadas pela exposição ao pH ácido do estômago. As células sobreviventes que entram no intestino devem ainda superar obstáculos como oxigênio reduzido, sais biliares, os peptídeos antimicrobianos, ácidos fracos (produtos metabólicos da flora microbiana residente), aumento da osmolaridade, e competição com microrganismos residentes por nutrientes (SPECTOR e KENYON, 2012; YANG et al., 2014). Diversos sorovares de *S. enterica* são capazes de se adaptar e sobreviver nestas condições colonizando e invadindo a mucosa intestinal do hospedeiro (RYCHLIK e BARROW, 2005).

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, as células de *Salmonella* são fagocitadas por diferentes células (macrófagos, células dendríticas e polimorfonucleares), disseminando-se rapidamente através dos linfonodos eferentes e mesentéricos, atingindo baço, fígado, medula óssea por meio da circulação linfática e sanguínea pela via hematogêna (ALVAREZ-ORDOÑEZ et al., 2015). O estabelecimento da salmonelose, bem como sua gravidade, varia de acordo com o sorovar envolvido e com a competência dos sistemas de defesa específicos e inespecíficos do afetado (CAMPOS, 2002).

Alguns sorovares são citados como prevalentes, porém a prevalência de um sorovar específico pode ser alterada pela disponibilização de um novo nicho ecológico quando um sorovar específico é controlado (KOTTWITZ et al., 2010). Os dois sorovares mais comumente relatados nos casos de surtos de origem alimentar em humanos foram durante longo período *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (CDC, 2015; YADAV et al., 2016), embora *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* ainda sejam prevalentes. Nos Estados Unidos, estima-se que anualmente, *S. Typhimurium* é responsável por 1.821 doenças e 197 hospitalizações nos (WANG et al., 2017), porém, *S. Enteritidis* tem sido o mais frequentemente envolvido em casos de salmonelose humana (CDC, 2018). *S. Heidelberg* também tem sido frequentemente envolvida em surtos

relacionados a frango e ovos (CDC, 2018). Os alimentos mais envolvidos em salmonelose na Europa incluem ovos e derivados, produtos de confeitaria e carnes (EFSA, 2018).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância em Saúde (ANVISA) e o Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional Brasileiro (SISVAN) referem-se a *S. enterica* como um dos agentes etiológicos mais comuns de doenças veiculadas por alimentos (BRASIL, 2016a; BRASIL, 2017). Até o início de 1990, no Brasil, *S. Enteritidis* foi raramente encontrado em infecções humanas, sendo nesta época, *S. Typhimurium* o sorovar prevalente. A partir de 1993, houve aumento significativo da ocorrência de *S. Enteritidis* tanto em amostras humanas quanto não humanas (ALMEIDA et al., 2017). Vários estudos demonstraram que *S. Enteritidis* foi predominante em surtos de alimentos que ocorreram na região sul do Brasil (ALMEIDA et al., 2017). O sorovar *S. Infantis* também tem sido isolado no Brasil a partir de fezes de pacientes envolvidos em surtos e alimentos, incluindo maionese, carne de aves de capoeira, entre outros (FONSECA et al., 2006).

Em 2016, a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) elencou 13 zoonoses prioritárias, dentre as quais a salmonelose destaca-se como a infecção bacteriana mais relacionada à resistência a antibióticos (OPAS, 2016).

2.2 ANTIBIÓTICOS DE USO NA CLÍNICA HUMANA E VETERINÁRIA

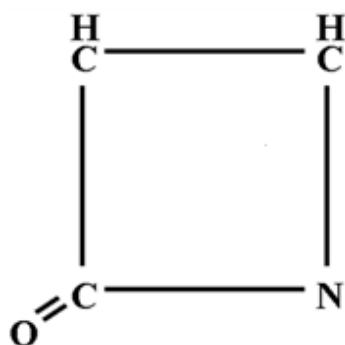
Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos classificados como bactericidas, quando causam a morte do microrganismo, ou bacteriostáticos, quando promovem sua inibição (WALSH, 2009). Os antibióticos naturais são substâncias produzidas por microrganismos (bactérias, fungos e actinomicetos) que inibem o crescimento microbiano. Já, os antibióticos sintéticos podem ser produzidos unicamente através de processos de síntese química ou através de culturas de microrganismos que são posteriormente modificadas quimicamente (antibióticos semi-sintéticos) (GRENNI et al., 2018)

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, lipopeptídeos, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas etc). Já os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES et al, 2010). Na sequência são apresentados os principais aspectos de diferentes classes de antibióticos utilizados na clínica humana e veterinária.

2.2.1 β -lactâmicos

Os β -lactâmicos compreendem uma classe ampla de antibióticos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e os monobactâmicos utilizados no tratamento terapêutico de infecções bacterianas, são caracterizados por sua alta eficácia terapêutica e baixa toxicidade. (GUIMARÃES et al., 2010). Estruturalmente β -lactâmicos têm um elemento estrutural farmacofórico em comum, o anel azetidinona de quatro membros, ou anel β -lactâmico (Figura 1) (SUARÉZ; GUDIOL, 2009). Estruturas ligadas diretamente ao anel β -lactâmico comum diferenciam penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos e os demais radicais presentes nas cadeias laterais caracterizam cada representante desses grupos (GUERRERO et al., 2014).

Figura 1. Representação do anel azetidinona presente em antibióticos do grupo β -lactâmicos.



Fonte: Guimarães et al., 2010.

Quatro mecanismos de resistência aos β -lactâmicos têm sido descritos: 1) alteração das proteínas ligadoras de penicilina PBPs, as quais são responsáveis pela ligação cruzada do peptidoglicano da parede celular 2) alteração da permeabilidade da membrana externa bacteriana, 3) efluxo ativo do antimicrobiano pela célula, 4) produção de enzimas β -lactamases (LLARRULL et al., 2010) As β -lactamases quebram o anel β -lactâmico por ação de grupo éster de serina, formando uma ligação covalente acil-éster e outras por meio de grupo dependente de zinco, denominadas metalo- β -lactamases, pois o ataque ao anel β -lactâmico é feito pelo zinco no sítio ativo da enzima (DZIDIC et al., 2008).

As β -lactamases constituem um grupo diverso de enzimas e podem ser classificadas de acordo com sua estrutura, sua funcionalidade e seus substratos específicos. Dentre as β -lactamases destacam-se as β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) frequentemente

encontradas em algumas espécies de bactérias Gram-negativas, as quais estão fortemente implicadas na resistência aos antibióticos do grupo β -lactâmicos (EFSA, 2011).

As ESBLs são capazes de hidrolisar as penicilinas, cefalosporinas e os monobactâmicos, não hidrolisando, porém, os carbapenemes e as cefalosporinas de quarta geração (LIEBANA et al., 2013). Além disso, os plasmídeos que carregam os genes codificados de ESBLs frequentemente contêm também genes de resistência a outros antibióticos como, aminoglicosídeos, sulfonamidas e tetraciclina (EFSA, 2011). Uma estratégia eficaz para ampliar a ação destes antibióticos é a utilização de compostos inibidores de β -lactamases, que são estruturalmente semelhantes às penicilinas, contendo a ligação amida do grupo β -lactâmico e uma cadeia lateral modificada, apresentando uma estrutura bicíclica, ligando-se de forma irreversível às β -lactamases e inativando-as (LLARRULL et al., 2010).

As penicilinas são antibióticos naturais, obtidos a partir de variedades do fungo *Penicillium*. Possui em sua estrutura o anel β -lactâmico, o anel tiazolidina e uma cadeia lateral. Sendo ativas contra vários bacilos e cocos Gram-positivo e Gram-negativo. Mas as penicilinas têm diversas desvantagens, principalmente pelo fato de serem suscetíveis à ação das beta-lactamases e pela sua rápida eliminação pelo organismo (GRUMACH e FERRARONI, 2006).

A Ampicilina é um derivado semi-sintético do ácido 6-aminopenicilânico, sintetizado a partir de modificações na cadeia lateral das penicilinas naturais. As modificações estruturais na cadeia lateral das penicilinas naturais modularam a estabilidade em meio ácido, a estabilidade frente às β -lactamases e, o espectro de ação frente a bactérias Gram negativas (GUIMARÃES et al., 2010).

O maior número de antibióticos β -lactâmicos em uso clínico pertencem à classe das cefalosporinas, que são subdivididas em cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações, em função do espectro de ação frente a bactérias Gram negativas, que devido à natureza mais complexa da parede celular são mais resistentes à ação de antibióticos (SUARÉZ; GUDIOL, 2009).

A ceftriaxona é uma cefalosporina de terceira geração, semi-sintética, muito usada atualmente. É uma droga que age inibindo a síntese da parede microbiana, possuindo amplo espectro de ação contra bactérias gram-negativas, possui relativa estabilidade na presença de β -lactamases (SILVA et al., 2014).

A cefepima é uma cefalosporina de quarta geração, conserva a ação sobre bactérias gram-negativas, incluindo atividade antipseudomonas, além de apresentar atividade contra cocos gram-positivos, especialmente *Staphylococcus*, *Streptococcus* dos grupos A e B, *Streptococcus pneumoniae* (exceto os com elevada resistência à penicilina). Sua atividade

contra bacilos gram-negativos abrange *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Haemophilus influenzae*, *Serratia*, além de *Pseudomonas aeruginosa*. Não tem ação sobre anaeróbios do grupo *Bacteroides fragilis*. Além disso, a cefepime é uma alternativa ao uso dos carbapenêmicos devido à sua maior estabilidade contra as ESBLs (RAMPHAL e AMBROSE, 2006).

2.2.2 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos constituídos por dois ou mais amino-açúcares unidos por ligação glicosídica à hexose ou amino-ciclitol, que habitualmente está em posição central. São antimicrobianos produzidos por cepas de *Streptomyces* spp., *Micromonospora* spp. e *Bacillus* spp. (GUIMARÃES et al., 2010).

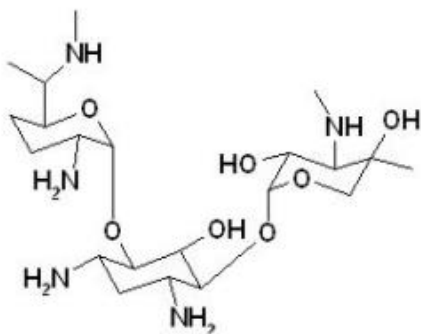
Os aminoglicosídicos apresentam efeito bactericida, por interagirem com a superfície celular de maneira passiva e sem gasto de energia. O aminoglicosídeo se liga a estruturas carregadas negativamente na parede celular e competitivamente desloca Ca^{2+} e Mg^{2+} formando-se “buracos” na parede celular e alterando a permeabilidade seletiva. O transporte através da membrana celular é dependente de energia, ocorrendo em duas fases. A energia utilizada é gerada pelo transporte de elétrons para manter o potencial transmembrana. Uma vez no interior da célula, os aminoglicosídeos se ligam à subunidade 30S do ribossomo, diminuindo a síntese proteica e levando à leitura incorreta do RNA mensageiro, causando alteração no funcionamento da membrana celular e consequentemente ocorre a saída de constituintes essenciais para o funcionamento da célula, o que provoca a morte celular (DURANTE et al., 2009). Os aminoglicosídeos mais conhecidos são: estreptomicina, neomicina, amicacina, gentamicina, canamicina, tobramicina, netilmicina, aprimicina e espectinomicina (BECKER, COOPER, 2013).

Aminoglicosídeos compreendem uma classe terapêutica essencial, porém devido ao seu potencial ototóxico, nefrotoxicidade e de bloqueio muscular devem ser utilizados com cautela. O uso clínico está associado, de maneira geral, ao combate de infecções provocadas por bactérias gram-negativas e bactérias gram-positivas, tanto em humanos quanto em animais (uso veterinário) sendo sua principal via de administração a parenteral (SANTOS, 2014).

A gentamicina foi isolada em 1962 (Figura 2) a partir de duas espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Micromonospora*. É um antibiótico amplamente utilizado no tratamento de infecções hospitalares por *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa*. Também possui larga aplicação no tratamento veterinário, podendo-se destacar o uso para o tratamento de mastites

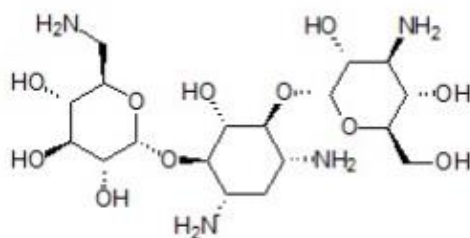
em bovinos (TAN et al., 2009). Já a canamicina é um antibiótico utilizado para tratar uma grande variedade de infecções (Figura 3), porém, seu uso é restrito devido a sua elevada capacidade de provocar efeitos colaterais, tais como, perda de audição, toxicidade para os rins e reações alérgicas (ZHU et al., 2012).

Figura 2. Estrutura química da gentamicina.



Fonte: Santos, 2014.

Figura 3. Estrutura química da canamicina.



Fonte: Santos, 2014.

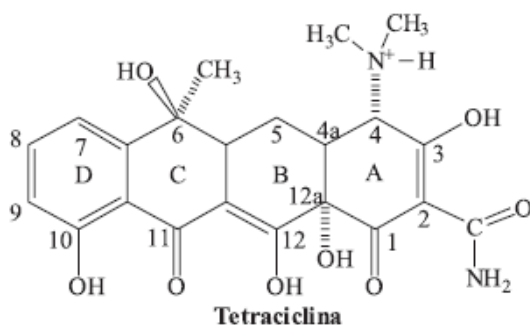
2.2.3 Tetraciclínas

Tetraciclínas possuem amplo espectro de ação frente a diversas bactérias Gram positivas e Gram negativas. Representam uma importante família farmacológica e incluem antibióticos naturais (por exemplo clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina e demeclociclina) e semissintéticos (por exemplo metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina, tigeciclina, PTK 7906) derivados de diferentes espécies de *Streptomyces* (THAKER et al., 2010).

As tetraciclina inibem a síntese de proteínas através da ligação com a subunidade 30S dos ribossomos, impedindo a ligação do aminoacil-tRNA. Como resultado, a adição de novos aminoácidos para o aumento da cadeia proteica é bloqueada e a liberação de proteínas é inibida (GOODMAN; GILMAN'S, 2008).

A estrutura química das tetraciclina contém um núcleo central de octa hidronaftaceno e uma grande variedade de grupos funcionais que juntam os quatro anéis da estrutura. A estrutura mais simples que mostra a atividade antimicrobiana é a 6-desoxi-6-dimetiltetraciclina (Figura 4). O grupo C4 dimetilamino do anel A confere as propriedades antibióticas (ALVAREZ; OTEO, 2010).

Figura 4. Estrutura química da tetraciclina.



Fonte: Goodman, Gilman's, 2008.

O uso desta classe na terapia antibiótica tem diminuído, devido ao aumento de resistência bacteriana. Além disso, sua indicação não é recomendada para crianças e gestantes, pois as tetraciclina podem se acumular em dentes e ossos em formação, uma vez que, a estrutura química desses antibióticos apresenta diversas possibilidades de ligação e forma com grande facilidade, complexos metálicos (GUIMARÃES et al., 2010).

2.2.4 Fenicois

Os fenicois são uma família de antibióticos de amplo espectro, compostos de cloranfenicol e análogos sintéticos de tianfenicol e florfenicol (ECCD, 2003). Estes antibióticos exercem a sua atividade antimicrobiana inibindo a síntese de proteínas bacterianas no nível ribossômico, ligando-se reversivelmente à proteína L16 localizada na subunidade 50S. Esta

proteína faz a mediação da ligação do tRNA à enzima peptidiltransferase e, portanto, seu bloqueio impede a formação de ligações peptídicas. (SCHWARZ et al., 2004).

O cloranfenicol é um antimicrobiano de amplo espectro, predominantemente bacteriostático e ativo contra gram positivos, gram negativos (VAN HOEK et al., 2011). Este antibiótico possui alto grau de lipossolubilidade o que em conjunto com a sua baixa ligação a proteínas e baixo peso molecular proporciona excelente difusão em tecidos e fluídos e barreiras biológicas (CARVALHO, 2002). Quanto ao seu mecanismo de ação, além da ação de bloqueio da síntese proteica, o cloranfenicol também pode impedir a ligação do mRNA ao ribossomo, fixando-se na fração 30S do ribossomo, competindo com o ácido nucleico (TAVARES, 2001).

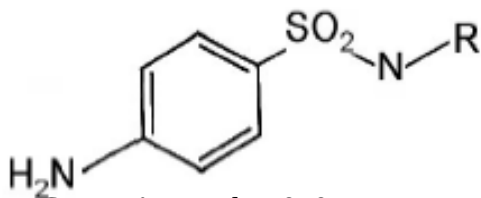
A resistência bacteriana ao cloranfenicol é mediada por plasmídeos, devido à presença da enzima cloranfenicol acetiltransferase, que catalisa uma reação que modifica os grupos hidroxil do antibiótico. Outros mecanismos de resistência incluem permeabilidade reduzida da membrana celular bacteriana, capacidade alterada de ligação na subunidade ribossômica 30S e inativação por nitrorredutases (RIVIERE; PAPICH, 2003).

2.2.5 Sulfonamidas e Trimetopim

As sulfonamidas são derivadas do ácido sulfanílico e caracterizadas por um grupo de sulfanilamida comum e um anel heterocíclico de cinco ou seis membros (Figura 5). As sulfonamidas possuem similaridade estrutural com o ácido p-aminobenzoico. Seu principal mecanismo de ação antimicrobiana é a inibição da enzima dihidropteroato sintetase. Essa enzima é responsável pela síntese de hidrofolato, um intermediário da síntese bacteriana de ácido fólico, importante na síntese de purinas (que são indispensáveis na síntese do DNA) (ALCAINE et al., 2007).

O grupo das sulfonamidas compreende seis fármacos principais: sulfanilamida, sulfisoxazol, sulfacetamida, ácido para-aminobenzoico, sulfadiazina e sulfametoxazol, sendo este último de considerável importância clínica pois possuem um amplo espectro de ação tanto contra Gram-negativos como Gram-positivos (BRASIL, 2016b). O sulfametoxazol (SMX), 4-amino-N-(5 metilisoxazol-3-il) benzeno sulfonamida (Figura 5), é um antibiótico de amplo espectro que inibe competitivamente a enzima bacteriana dihidropteroato-sintetase (NGUYEN DANG GIANG et al., 2015).

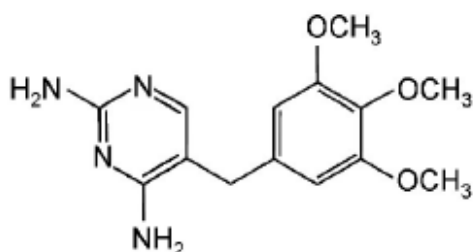
Figura 5. Estrutura química do sulfametaxazol.



Fonte: Guimarães et al., 2010.

O sulfametaxazol é utilizado em combinação sinérgica com a trimetoprima. A trimetoprima (TMP), 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2,4- pirimidinodiamina (Figura 6), é um derivado das diaminopirimidinas pertencente à classe de agentes quimioterapêuticos conhecidos como inibidores da dihidrofolato redutase, enzima que catalisa a conversão do ácido di-hidrofólico em ácido tetrahidrofólico. Essa associação produz uma atividade antibacteriana sinérgica devido ao bloqueio do metabolismo de ácido fólico que provoca uma queda na síntese de proteica bacteriana (ALCAINE et al., 2007).

Figura 6. Estrutura química do trimetoprima.



Fonte: Guimarães et al., 2010.

A introdução da associação sulfametaxazol/trimetoprim constituiu um importante avanço no desenvolvimento de fármacos antimicrobianos clinicamente eficazes. Esta combinação é indicada no tratamento de infecções do trato respiratório superior e inferior, no tratamento de infecções do trato urinário e renal, infecções gastrointestinais e outras infecções bacterianas (MORAIS E SILVA, 2017). Esta associação também é muito utilizada em profilaxia veterinária de infecções (NGUYEN DANG GIANG et al., 2015).

2.2.6 Quinolonas

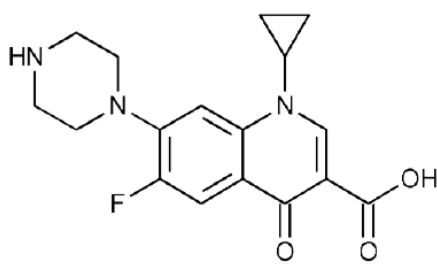
O ácido nalidíxico foi a primeira quinolona sintetizada acidentalmente em 1960, a partir de um composto secundário da síntese de um agente antimalárico denominado cloroquina (HIGGINS et al., 2003). Desenvolvido a partir do ácido 7-cloro-1-etil-1,4-diidro-4-oxo-3-quinolina-3-carboxílico, o ácido nalidíxico foi usado de forma limitada na prática clínica devido ao seu baixo espectro de ação, baixo nível plasmático e toxicidade. Particularmente, seu uso era fvoltado para o tratamento de infecções leves do trato urinário e gastroenterites causadas por bactérias Gram-negativas (VAN BAMBEKE et al., 2005). Entretanto o aumento da resistência de algumas bactérias, como por exemplo *S. enterica* limitou drasticamente o uso deste agente terapêutico (VELHNER et al., 2014). Entretanto, a partir da manipulação do núcleo quinolônico, moléculas com maior atividade antimicrobiana, maior espectro de ação e baixa toxicidade foram sintetizadas, tais como, ácido piromídico, ácido pipemídico e a cinoxacina (NABER, 2001). Na década de 1980, após intensas pesquisas realizadas a partir das quinolonas primárias, originaram as denominadas quinolonas de segunda geração, as fluoroquinolonas (VELHNER et al., 2014).

Quimicamente, as fluoroquinolonas diferem das demais quinolonas pela inserção do átomo de flúor na posição 6 (R₆) do anel quinolônico e um grupo piperazinil 7 (R₇). Essa inovação aumentou a capacidade de penetração na célula bacteriana, levou a uma satisfatória absorção e menor toxicidade, e consequentemente ampliou o espectro de ação e atividade contra microrganismos gram-negativos e gram-positivos (FABREGA et al., 2009).

A atividade antibacteriana das quinolonas e das fluoroquinolonas está relacionada à inibição de duas enzimas responsáveis e essenciais a replicação e transcrição do DNA bacteriano: a DNA girase, também conhecida como topoisomerase I e topoisomerase IV presentes respectivamente em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Estas enzimas são responsáveis por produzirem um super novelo negativo no DNA, permitindo a transcrição do DNA bacteriano (PRIMANI, 2014).

Denominada quimicamente fluoroquinolona, a ciprofloxacina ou ácido 1-ciclopropil-6-fluor-1,4-dihidro-7-(piperazinil)-4-oxoquinolona-3-carboxílico (Figura 7), é considerada uma das mais potentes fluoroquinolonas disponíveis (PRIMANI, 2014).

Figura 7. Estrutura química da ciprofloxacina.



Fonte: Fabrega et al., 2009.

Disponível em formulação parenteral e oral, a ciprofloxacina apresenta um perfil farmacocinético melhorado, possui uma capacidade elevada de atingir a concentração terapêutica plasmática e uma maior penetração tecidual, devido ao seu grande volume de distribuição (SHARMA et al., 2010).

2.2.7 Polimixina

Polimixinas são originadas dos peptídeos (lipopetídeos cíclicos) não ribossomais e constituem um grupo de cinco substâncias intimamente relacionadas, que receberam o nome de polimixinas A, B, C, D e E, sendo esta última chamada de colistina, produzida pelo *Bacillus colistinus*. Somente as polimixinas B e E são utilizadas clinicamente, em virtude da grande toxicidade das demais (VELKOV et al., 2010).

As polimixinas atuam primariamente nas membranas externa citoplasmática, com ação semelhante a detergentes catiônicos simples. Ligam-se a componentes do envelope celular como fosfolipídeos e lipopolisacárides (LPS), deslocando competitivamente os íons Ca e Mg que agem como estabilizadores da membrana, provocando ruptura da mesma, levando à perda do conteúdo celular e ocasionando morte da bactéria (KATZUNG, 2007).

Polimixina B é uma mistura de sulfatos de polipeptídeos contendo quatro componentes relacionados, polimixina B1 a B4, sendo a maioria dos componentes a polimixina B1 e polimixina B2 que contém os ácidos graxos 6-metiloctanoico e 6-metilheptanoico, respectivamente. Os quatros componentes diferem entre si apenas pelo ácido graxo (ELIAS, 2010). Trata-se de um antibiótico anfipático, conferindo, assim, uma propriedade de distribuição boa em ambientes aquosos ou não aquosos, o que resulta em boa solubilidade em água ou sangue, e em membranas lipídicas procarióticas e eucarióticas (MOSTARDEIRO, 2009). A polimixina B é ativa contra bactérias Gram negativas (TUON et al., 2014).

2.3 RESISTÊNCIA À ANTIBIÓTICOS EM *Salmonella enterica*

A crescente resistência aos antibióticos dos sorovares de *S. enterica* é relatada pela Organização mundial da saúde como um grave problema de saúde pública (WHO, 2014), pois pode comprometer a eficácia clínica dos antibióticos de eleição para o tratamento de salmoneloses (MOLINA-GONZÁLEZ et al., 2014).

Na indústria de alimentos, o uso extensivo e indiscriminado de concentrações sub-inibitórias de biocidas como aditivos alimentares, descontaminantes ambientais ou desinfetantes para controlar micro-organismos patogênicos, têm conduzido um “efeito obstáculo” que tem sido associado ao aumento da tolerância nos micro-organismos (CAPITA; ALONSO-CALLEJA, 2013; ALONSO-HERNANDO et al., 2009). Além disso, agentes antimicrobianos são rotineiramente administrados aos animais de produção, por meio de alimentos ou da água potável, ou por injeção, para o tratamento e prevenção de doenças. Esses agentes antimicrobianos em doses baixas e sub-terapêuticas são muitas vezes utilizados como promotores de crescimento para melhorar a eficiência da alimentação e promover o crescimento dos animais (MOLE, 2013; PRUDEN et al., 2013). Consequentemente, devido à exposição continuada a estes agentes, patógenos anteriormente sensíveis podem tornar-se resistentes e adquirir a capacidade de sobreviver mesmo na presença de um antibiótico para o qual anteriormente apresentava suscetibilidade (MARSHALL E LEVY, 2011).

Diversos agentes antimicrobianos utilizados na medicina veterinária estão intimamente relacionados com os medicamentos importantes utilizados na assistência à saúde humana. Assim, o surgimento e a propagação de bactérias resistentes a essas drogas limitam as opções terapêuticas para doenças humanas e podem causar doença prolongada, deficiência grave, e até mesmo a morte (MARSHALL E LEVY, 2011; MOLE, 2013). Neste cenário, o monitoramento da resistência aos antibióticos dos micro-organismos patogênicos de origem alimentar é essencial, tendo em vista que a antibioticoterapia é necessária nos casos graves de infecções gastrointestinais e infecções sistêmicas (REDDY et al., 2010).

Em *S. enterica* o desenvolvimento de resistência aos agentes antimicrobianos é atribuído a diversos mecanismos como: mudanças na permeabilidade da parede celular bacteriana, as quais restringem o acesso do agente antimicrobiano ao alvo; efluxo ativo do agente antimicrobiano do interior da célula bacteriana; modificação enzimática do agente antimicrobiano; degradação do agente antimicrobiano; aquisição de uma via metabólica alternativa àquela inibida pelo antimicrobiano; modificação no alvo do agente antimicrobiano; superprodução da enzima alvo (VAN HOEK et al., 2011). Os mecanismos desenvolvidos estão

intimamente relacionados com o mecanismo de ação dos antibióticos (GOODMAN; GILMAN'S, 2008; TENOVER, 2006), que por sua vez, são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação conforme descrito no tópico anterior (2.2).

Uma particular atenção tem sido dedicada ao aumento de resistência de *S. enterica* as quinolonas de segunda geração, devido a seu amplo uso na terapia de infecções de *S. enterica* (MACÍAS-FARRERA et al., 2018). Genes de resistência contra beta-lactâmicos (3ª e 4ª geração) e fluoroquinolonas, que são agentes antimicrobianos importantes na clínica humana, já foram identificados em muitas explorações pecuárias, e em particular na indústria avícola (EFSA, 2011). Análises genéticas de cepas bacterianas que possuem genes de resistência isoladas de animais de fazenda e de seres humanos possuem fortes semelhanças (LEVERSTEIN-VAN HALL et al., 2011).

Alcaine et al. (2016), avaliaram os níveis de resistência a antibióticos de 91 isolados de *Salmonella* spp. de 172 amostras de aves de capoeira de 06 fazendas distintas frente amoxicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, cefotaxima, gentamicina, canamicina, ácido nalidíxico, estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclinas e trimetoprim. As taxas de resistência de isolados de *Salmonella* spp. foram amoxicilina (64%), cloranfenicol (82%), ciprofloxacina (73%), cefotaxima (0%), gentamicina (0%); canamicina (18%), ácido nalidíxico (73%), estreptomicina (55%), sulfonamidas (73%), tetraciclina (73%), e trimetoprim (64%). A multi-resistência foi observada em 82% dos isolados de *Salmonella* spp.

Em outro estudo, Cui et al. (2016), investigaram a prevalência de *Salmonella* spp. em 9 fases distintas da cadeia de abastecimento de frango de corte na China e testaram a resistência dos isolados frente antibióticos. Um total de foram recolhidas durante agosto e setembro de 2013 em toda a cadeia de fornecimento de frangos de corte. No total de 172 *Salmonella* spp. a partir de 1148 amostras, 166 eram resistentes a um ou mais antibióticos testados. A maior taxa de resistência foi de ácido nalidíxico (88,95%), seguido de ampicilina (76,16%), enquanto que a resistência a outros agentes antimicrobianos foi relativamente baixa: doxiciclina, 34,88%; cefazolina, 29,07%; trimetoprim/sulfametoxazol, 22,67%; gentamicina, 20,93%; cloranfenicol, 14,53%; amoxicilina/ácido clavulânico, 8,14%; ceftazidima, 4,07%; ciprofloxacina, 1,16%; e meropenem, 0,58%.

Para o monitoramento e controle da disseminação de cepas multi-resistentes de *S. enterica* é fundamental entender os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da resistência aos antibióticos. A capacidade de *S. enterica* de sobreviver durante a exposição a estresses ambientais e impostos pelo hospedeiro após ingestão do alimento contaminado tem sido citada como um fator que contribui para a resistência de patógenos aos antibióticos

(ALVAREZ-ORDONEZ et al., 2015; Al-NABULSI et al., 2015). Particularmente a resposta ao estresse ácido parece estar implicada na tolerância bacteriana a outros estresses e aos antimicrobianos. Esta resposta é especialmente importante para cepas epidêmicas de *S. enterica* porque as células já expostas a diversos estresses durante o processamento de alimentos serão desafiadas com o estresse do ácido estomacal (SKANDAMIS et al., 2008) e implicação destas respostas pode impactar na resposta a antibioticoterapia.

2.3.1 Resposta a estresses em *Salmonella enterica*

As bactérias são continuamente expostas a estresses ambientais, tanto no seu habitat natural, como no contexto de processos de intervenção que visam a sua inativação. A partir de uma perspectiva de microbiologia alimentar, "o stress bacteriano" é geralmente definido como uma condição insuficiente para assegurar a morte bacteriana, porém que causa injúrias subletais às células (WESCHE et al., 2009).

Condições de crescimento ideais como quantidade de nutrientes, temperatura de crescimento, pH, níveis de oxigênio e níveis de soluto são de grande importância para o desenvolvimento bacteriano. No entanto, a variação em qualquer um destes parâmetros, muito acima ou abaixo dos valores ótimos, irá perturbar a taxa de crescimento máxima e, por conseguinte, representa estresse à célula microbiana (SPECTOR; KENYON, 2012).

Sorovares epidêmicos de *S. enterica* são capazes de lidar com uma variedade de estresses presentes no microambiente natural, durante o processamento de alimentos, na comercialização, no armazenamento, bem como, durante sua passagem no trato gastrointestinal do hospedeiro (KENYON; SPECTOR, 2011).

Quando ingeridos por meio de alimentos contaminados, no hospedeiro, sorovares de *S. enterica*, encontram primeiro o pH ácido do estômago, e posteriormente ao entrar no intestino e devem lidar com oxigênio reduzido, sais biliares, peptídeos antimicrobianos, ácidos fracos (produtos metabólicos da flora microbiana residente), aumento da osmolaridade e competição com microrganismos residentes por nutrientes e espaço. Sorovares capazes de se adaptar e sobreviver a essas condições tipicamente colonizam e invadem a mucosa intestinal do hospedeiro (SPECTOR; KENYON, 2012). As bactérias quando expostas a esses estresses podem desenvolver a capacidade de adaptação e resistência a exposições subsequentes mais extremas, denominada "proteção cruzada". A proteção cruzada à antibióticos, que resulta na resistência frente a estes agentes pode ocorrer por meio de ajustes fisiológicos, fenotípicos e genotípicos (DOYLE et al., 2006; DEPARDIU et al., 2007; McMAHON et al., 2007), porém

pouco é descrito sobre a proteção cruzada à antibióticos em decorrência de respostas a estresses. A exposição ao ácido tem sido relatada como um estresse importante e comumente encontrado pelos patógenos de origem alimentar, que pode conferir proteção cruzada a outros tipos de estresse, como, a exposição a grandes quantidades de sais, temperaturas elevadas, peróxidos e ácidos orgânicos (LUES; THERON, 2011; HUMPHREY, 2004; XU et al., 2008). Estas respostas durante a exposição a estresses subletais resultam em alterações nas características de virulência de patógenos transmitidos por alimentos, o que constitui uma preocupação importante entre microbiologistas de alimentos, processadores de alimentos e legisladores (THERON; LUES, 2007; PEREZ; GROISMAN, 2014). A capacidade de adaptação rápida às alterações ambientais e as respostas a mudanças ambientais são essenciais para a sobrevivência e virulência de *S. enterica* (SHEN; FANG, 2012; SILVA-ÂNGULO et al., 2014).

Em resposta aos estresses, as bactérias são capazes de induzir sistemas de reparação celular como mudança da composição lipídica da membrana celular, modificando a fluidez da membrana (LADO; YOUSEF, 2000; YUK; MARSHALL, 2004; YANG et al., 2014). Adaptações fenotípicas decorrentes da expressão de proteínas de choque podem induzir “proteção cruzada” contra os antibióticos (BEALES, 2004). Regulação negativa dos sítios de ligação da parede celular em resposta a estresses ambientais como, pressão osmótica e estresse ácido (McMAHON et al., 2007) e alteração da expressão gênica também pode contribuir para reduzir a susceptibilidade de patógenos aos antibióticos (ADAMS, 2004; BIKELS-GOSHEN et al., 2010). A ativação de fatores sigmas alternativos, tais como σ^S e σ^H capazes de regular a expressão de genes específicos em resposta ao estresse é reconhecida como uma das respostas mais importantes para garantir a sobrevivência de *Salmonella* spp. (YANG et al., 2014). Respostas adaptativas já foram relatadas em diversos sorovares de *S. enterica*, como por exemplo, *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Enteritidis*, *S. Gaminara*, *S. Heidelberg*, *S. Javiana*, *S. Mbandaka*, *S. Michigan*, *S. Montevideo*, *S. Pomona*, *S. Saintpaul*, *S. Senftenberg*, e *S. Typhi* (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2011).

Nesse contexto, células previamente expostas a condições de estresse sub-letal podem apresentar uma maior capacidade de respostas em ambientes potencialmente desfavoráveis, aumentando a probabilidade de sobrevivência no hospedeiro para o desenvolvimento da patogênese específica (SPECTOR; KENYON, 2012). Considerando que a capacidade das bactérias patogênicas para resistir a condições ambientais adversas representa um determinante presuntivo de seu potencial de virulência, a avaliação das respostas de tolerância ao estresse de patógenos bacterianos de origem alimentar é de interesse acadêmico e da indústria de alimentos

(ALVAREZ-ORDONEZ et al., 2015). Entretanto pouco se sabe acerca da influência que a exposição às condições do trato gastrointestinal pode ter sobre a susceptibilidade/resistência a antibióticos de uso clínico humano e veterinário.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa – PB.

3.2 CEPAS TESTE, INÓCULO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Quinze cepas de *S. enterica* identificadas como agentes etiológicos em surtos alimentares ocorridos no Sul do Brasil (Coleções de Referência do Laboratório Central do Estado do Paraná, Brasil e da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil) foram incluídos como cepas teste neste estudo (Tabela 1). As culturas estoque das cepas de *S. enterica* foram mantidas em criotubos a -20 °C em caldo *Tryptic Soy* (TSB) (HiMedia, Mumbai, Índia) contendo glicerol a 20% v/v. O inóculo de cada cepa foi obtido após a preparação de suspensões em solução salina estéril (0,85% NaCl, (p/v) de culturas crescidas em caldo TSB a 37 °C por 18 h. As células foram separadas por centrifugação (4500 x g, 15 min, 4 °C), lavadas duas vezes com uma solução salina estéril e ressuspensas no mesmo diluente para obter suspensões celulares. A densidade óptica das suspensões entre 0,03 e 0,06 a 625 nm (OD₆₂₅) proporcionou contagens de células viáveis de aproximadamente 6 log UFC/mL (MELO et al., 2017). A concentração final de células utilizada nos ensaios com antibióticos foi de 5 log UFC/mL.

Tabela 1 As 15 cepas de *Salmonella enterica* e suas fontes de isolamento.

Cepas	Sorovar	Fonte de isolamento
A46/99	<i>S. Typhimurium</i> ¹	Carne e Salame
A107/01	<i>S. Enteritidis</i> ¹	Carne moída e frango
P196/03	<i>S. Mveste</i> ¹	Fezes
P225/06	<i>S. Infantis</i> ¹	Fezes
P244/06	<i>S. Derby</i> ¹	Fezes
A281/02	<i>S. Heidelberg</i> ¹	Frango
A110/01	<i>S. Agona</i> ¹	Carne de peru defumado e salsicha
A170/05	<i>S. London</i> ¹	Frango
A178/06	<i>S. Johannesburg</i> ¹	Frango
A189/02	<i>S. Newport</i> ¹	Frango
A121/03	<i>S. Albany</i> ¹	Salada de Tomate
P28/00	<i>S. Mbandaka</i> ¹	Fezes
A292/05	<i>S. Ohio</i> ²	Frango
P246/06	<i>S. Anatum</i> ¹	Fezes
A297/06	<i>S. Corvallis</i> ²	Frango

A: Cepas isoladas de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose; P: Cepas isoladas de pacientes humanos envolvidos em surtos de salmonelose. 1 As cepas pertencem ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN), Curitiba, Paraná, Brasil. 2 As cepas pertencem à Coleção de Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, Universidade de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

3.3 ANTIBIÓTICOS E SOLUÇÕES ESTOQUE

Os antibióticos ensaiados incluíram tetraciclina (TET), o fenol cloranfenicol (CHL), os β -lactâmicos de espectro amplo ampicilina (AMP) e penicilina (PEN), as cefalosporinas de terceira e quarta geração ceftriaxona (CTX) e cefepima (FEP), respectivamente; os aminoglicosídeos canamicina (KAN) e gentamicina (GEN), a fluoroquinolona ciprofloxacina (CIP), a combinação sulfametoxazol e trimetoprima (SXT) e o lipopeptídeo cíclico polimixina B (PB). Todos os antibióticos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Estados Unidos). As soluções estoque dos antibióticos foram preparadas seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016). TET, PEN, CTX, PB, GEN, KAN, CIP foram dissolvidos em 30 mL de água Milli Q. AMP e FEP foram dissolvidos em 30 mL de solução tampão de fosfato de potássio, o CHL foi dissolvido em 30 mL de etanol a 95% v/v e a associação SXT foi dissolvida em 30 mL de água Milli Q com uma gota de 2,5 mmol/mL NaOH. Todas as soluções foram esterilizadas em membranas de 0,22 μ m (Merck-Millipore, Estados Unidos).

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MINIMA (CIM) DOS ANTIBIÓTICOS

A CIM de cada antibiótico frente às cepas teste de *S. enterica* foi determinada antes e após a exposição às condições gastrointestinais simuladas usando o método de microdiluição em caldo de acordo com os procedimentos descritos pelo CLSI (2016). O intervalo de concentrações testadas para cada antibiótico foi o seguinte: TET 2048 - 0,125 µg/mL, CHL 2048 - 0,125 µg/mL, AMP 1024 - 0,5 µg/mL, PEN 1024 - 0,5 µg/mL, CTX 512 - 0,02 µg/mL, FEP 32 - 0,06 µg/mL, KAN 1024 - 0,5 µg/mL, GEN 1024 - 0,125 µg/mL CIP 64 - 0,008 µg/mL, SXT 128/32 - 01 / 0,25 µg/mL e PB 64 - 0,008 µg/mL. As microplacas de 96 poços foram preparadas dispensando 50 µL de caldo TSB (Himedia, Índia), em seguida 50 µL da solução antibiótica dispensada no primeiro poço e seguindo com a diluição seriada dos poços seguintes (concentração final variando de acordo com o intervalo testado para cada antibiótico), por fim, 50 µL de suspensão bacteriana (concentração final 5 log UFC/mL). foram adicionados a cada poço. Cada microplaca incluiu seis poços contendo somente a suspensão bacteriana sem antibióticos (controle positivo). As placas foram incubadas a 37 ° C por 24 h. Após o período de incubação, o valor de CIM foi definido como a menor concentração (µg/mL) de cada antibiótico que foi capaz de inibir visualmente (formação de halo e turbidez) o crescimento da cepa teste. Cada cepa de *S. enterica* foi classificada como sensível, intermediária ou resistente de acordo com os valores dos pontos de corte do CLSI. Os resultados dos ensaios com a CIP consideraram o termo “susceptibilidade reduzida”, convencionalmente empregado para valores correspondentes ao fenótipo intermediário do CLSI (µg/mL) (Tabela 2).

Tabela 2. Breakpoints das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) propostas pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2016) e utilizadas para determinar a suscetibilidade aos antibióticos.

Antibióticos	CIM* breakpoint (µg/mL)		
	S**	I	R
Tetraciclina	≤ 4	8	≥ 16
Chloranfenicol	≤ 8	16	≥ 32
Penicilina	≤ 8	16	≥ 32
Ampicilina	≤ 8	16	≥ 32
Ceftriaxona	≤ 1	2	≥ 4
Cefepima	≤ 2	-	≥ 16
Canamicina	≤ 16	32	≥ 64
Gentamicina	≤ 4	8	≥ 16
Ciprofloxacina	≤ 0.06	0.12-0.5	≥ 1
Sulfamethoxazol/trimethoprim	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Polimixina B	≤ 2	4	≥ 16

*CIM: Concentração Inibitória Mínima, isto é, a concentração mais baixa dos antibióticos necessários para inibir o crescimento visível do microrganismo.

** S: Suscetível, I: Intermediário, R: Resistente.

3.5 AMOSTRAS DE PEITO DE FRANGO

As amostras de peito de frango (10 unidades; aproximadamente 2 kg, pH 5,7; atividade de água 0,95) foram obtidas de um abatedouro localizado na cidade de Guarabira (Paraíba, Brasil). A composição nutricional das amostras de peito de frango, determinada segundo procedimentos padronizados (AOAC, 2012), foi em média: umidade 72,89 g/100 g; cinzas 0,95 g/100 g; gordura 4,9 g/100 g e proteína 24,23 g/100 g. Amostras de peito de frango (250 g) foram trituradas em liquidificador doméstico e mantidas em sacos *Stomacher* (Stomacher®, Biomaster, Brasil) seladas a vácuo e congeladas a -20 °C. As amostras foram irradiadas em irradiador JS-7500 Nordiun inc (Kanata, Canadá), cuja taxa de dose foi 25 kGy; 2 h para eliminar a microbiota autóctone. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -20 °C e, quando necessário, descongeladas sob refrigeração (4 ± 1 °C) e utilizadas para os ensaios (JUNEJA et al., 2010). Amostras aleatórias foram testadas para verificar a eliminação da microbiota. Para tanto, a carne irradiada foi diluída em PBS (1:1, p/v) e inoculada diretamente na superfície (1 mL) de TSA com posterior incubação a 37 °C por 48 h.

3.6 EXPOSIÇÃO DE *S. enterica* AS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS (DIGESTÃO *in vitro*) EM PEITO DE FRANGO

Amostras de peito de frango triturado (9 g) e a suspensão de cada cepa teste (contagem final de 5 log UFC/g) foram suavemente homogeneizadas usando uma haste estéril de vidro estéril durante 1 min em frascos estéreis. As misturas foram submetidas a um sistema contínuo de nove etapas simulando as condições da boca (1ª etapa), esôfago-estômago (2ª a 7ª etapa) duodeno (8ª etapa) e íleo (9ª etapa) (Tabela 3). O volume total de trabalho aumentou durante a digestão simulada (como acontece durante a digestão real) atingindo o volume final de 92.750 mL (MELO et al., 2017).

Agitação mecânica a 37 °C foi usada para imitar as condições em cada compartimento digestivo. O pH de cada passo foi ajustado ao valor desejado utilizando solução de NaHCO₃ a 0,1 mM.L⁻¹ (etapas 1, 8 e 9) ou solução de HCl a 1 mM.L⁻¹ (etapas 2 a 7). Todas as soluções enzimáticas foram preparadas imediatamente antes dos ensaios e esterilizadas em filtro 0,22 µm (Millipore, Billerica, Estados Unidos). Após a esterilização, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo durante todo o período de simulação, antes da adição gradual (quando apropriada). O pH de cada amostra em cada etapa foi mensurado utilizando pHmetro digital (Modelo 021/15; Quimis, São Paulo, Brasil), o qual foi periodicamente sanitizado com etanol (90 mL/100 mL). Ao final da digestão *in vitro*, fragmentos de peito de frango foram removidos por filtração em gaze estéril e, em seguida, as células de *S. enterica* foram colhidas por centrifugação, lavadas e ressuspensas em caldo TSB para obter suspensões correspondente a contagens de aproximadamente 6 log UFC/mL seguindo os procedimentos descritos anteriormente (item 3.4).

Tabela 3. Condições usadas durante cada etapa do sistema gastrointestinal simulado.

Fases	Compartimentos	Solução enzimática	Agitação (rpm)	pH final	Tempo de exposição (min)
1	Boca	Amilase	200	6.9	2
2				5.5	10
3				4.6	10
4				3.8	10
5	Esôfago- Estomago	Pepsina	130	2.8	20
6				2.3	20
7				2.0	20
8				5.0	30
9	Íleo	Pancreatina + sais de bile	45	6.5	60

TSB: células testadas em Tryptic Soy Broth. O pH de cada passo foi ajustado ao valor alvo utilizando solução 0,1 mM.L⁻¹ NaHCO₃ (Passos 1, 8 e 9) ou solução 1 mM.L⁻¹ HCl (Passo 2 a 7). Peito de frango: células testadas em peito de frango.

3.7 REVERSÃO DAS ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS APÓS DIGESTÃO *IN VITRO*

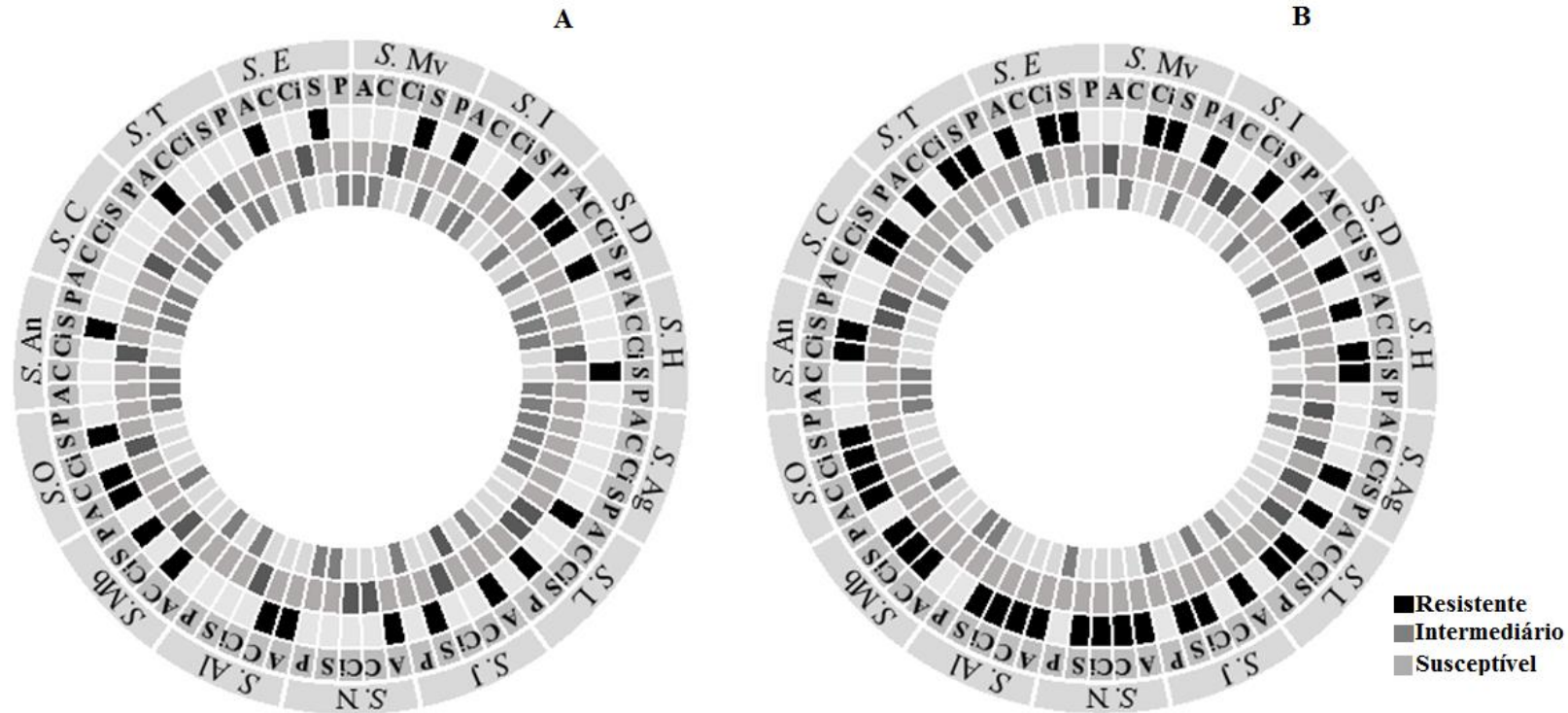
Para avaliar se as mudanças fenotípicas de resistência aos antibióticos testados seriam revertidas após novos cultivos, as cepas com o novo fenótipo foram mantidas em ágar TSB a 4 °C. Semanalmente, durante um mês, as cepas foram submetidas a um novo cultivo e à nova determinação de CIM seguindo os procedimentos anteriormente descritos (item 3.4) e utilizando especificamente os antibióticos-alvo (aqueles correspondentes a mudanças de resistência).

3.8 REPRODUTIBILIDADE E VALIDAÇÃO DE DADOS

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes. A leitura da CIM e de mudanças no fenótipo de resistência aos antibióticos ensaiados considerou o ponto de corte da atual designação do CLSI para a classificação de resistência a antibióticos (CLSI, 2016).

INFORMAÇÕES DE SUPORTE

Figura 8. Distribuição dos sorovares de *Salmonella enterica* antes (A) e depois (B) da exposição às condições gastrointestinais humanas simuladas.



Sorovares de *Salmonella enterica*: S.Mv: S. Mvester; S.I: S. Infantis; S.D: S. Derby; S.H: S. Heidelberg; S.Ag: S. Agona; S.L: S. London; S.J: S. Johannesburg; S. N: S. Newport; S.A: S. Albany; S.Mb: S. Mbandaka; S.O: S. Ohio; S.An: S. Anatum; S.C: S. Corvallis; S.T: S. Typhimurium; S.E: S. Enteritidis. Antibióticos: A: Ampicilina, C: Ceftriaxona, Ci: Ciprofloxacina, S: Sulfametoxazol / trimetoprim e P: Polimixina B.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. Microbial evolution in laboratory environments. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 311–318. 2004.
- ALCAINE, S. D.; MOLLA, L.; NUGEN, S. R.; KRUSE, H. Results of a pilot antibiotic resistance survey of Albanian poultry farms. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 4, p.60–64, 2016.
- ALCAINE, S. D.; WARNICK, L. D; WIEDMAN, M. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, v. 70, p.780-790, 2007.
- AL-NABULSI, A. A.; OSAILI, T. M.; SHAKER, R. R.; OLAIMAT, A. N.; JARADAT, Z. W.; ZAIN ELABEDEEN, N. A.; HOLLEY, R.A. Effects of osmotic pressure, acid, or cold stresses on antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 46, p. 154-160, 2015.
- ALONSO-HERNANDO, A.; CAPITA, R.; PRIETO,M.; ALONSO-CALLEJA, C. Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. **Food Control**, p.1108–1111, 2009.
- ALVAREZ-ORDÓÑEZ A.; BROUSSOLLE, V.; COLIN, P.; NGUYEN-THE, C.; PRIETO, M. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 213, p. 99–109, 2015.
- ALVAREZ-ORDONEZ, A.; BEGLEY, M.; PRIETO, M.; MESSENS, W.; LOPEZ, M.; BERNARDO, A.; HILL, C. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. **Microbiology**, v. 157, p.3268–3281, 2011.
- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; PRIETO, M.; BERNARDO, A.; HILL, C.; LÓPEZ, M. The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. **Food Research International**, v.45, p.482–492, 2012.
- ALVAREZ, L. G; OTEO, J. A. Efectos no antimicrobianos de las tetraciclinas. **Revista Española de Quimioterapia**, v.23, p. 4-11, 2010.
- AOAC-Association of Official Analytical Chemists. Official methods of Analysis the of AOAC Internacional. 17th ed. Washington, USA, 2000.
- BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperature, weak acid preservatives, low pH, osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science andFood Safety**, v.3, p. 1–20, 2004.

BECKER, B.; COOPER, M.A. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. **ACS Chemical Biology**, Washington. v.8, n.1, p.105-115, 2013.

BESSER, J.M. *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. **Food Microbiology**, v. 71, p. 55-59, 2018.

BIKELS-GOSHEN, T.; LANDAU, E.; SAGUY, S.; SHAPIRA, R. Staphylococcal strains adapted to epigallocatechin gallate (EGCG) show reduced susceptibility to vancomycin, oxacillin and ampicillin, increased heat tolerance, and altered cell morphology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 26–31, 2010.

BRASIL, **Ministério da Saúde. SISVAN-(Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional)**. Coordenação de vigilância das doenças de transmissão hídrica e alimentar. vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil. 2017. Disponível em: Acesso em: 04 Fevereiro 2018.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde**. Coordenação de vigilância de doenças transmissão hídrica e alimentar. Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. 2015.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde**. Dados epidemiológicos- Surtos Alimentares, Brasil. 2016a.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/sulfonamidas.htm. 2016b Acesso em: 07 out. 2016.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In.: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3ed. São Paulo: Atheneu, p. 229-234, 2002.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.53, p.11-48, 2013.

CARVALHO, F.L.Q. Lincosamidas, tetraciclinas e cloranfenicol. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. cap.104, p.1049-1055, 2002.

CDC-Center for Disease Control and Prevention. Timeline for reporting cases of *Salmonella* infection (2018).Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/reporting-timeline.html>.

CDC- Center for Disease Control and Prevention. Estimates of foodborne illness in the United States. (2015). Disponível em <<http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>>. Acesso em 24 de Julho de 2017.

CDC- Center for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg infections linked to Foster Farms brand chicken (final update). (2014b). Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-10-13/index.html>. Acesso em : 28 de Julho de 2017.

CDC- Center for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of salmonella infections linked to organic sprouted chia powder (final update). (2014a). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/newport-05-14/index.html>> acesso em 15 de julho de 2017.

CDC- Center for Disease Control and Prevention. Reports of active *Salmonella* outbreak investigations (2018). Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks-active.html>.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA. 2016.

CORDEIRO NICOLÁS, Y.L.; BETANCOR, L.; CEJAS, D.; GARCÍA-FULGUEIRAS, V.; MOTA, M.; VARELA, G.; ANZALONE, L.; ALGORTA, G.; GUTKIND, G.; AYALA, J.; CHABALGOITY, J.; VIGNOLI, R. Identification of the first *bla*_{CMY-2} gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from cases of paediatric diarrhoea illness detected in South America. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.1, p.143-148, 2013.

CUI, M.; XIE, M.; QU, Z.; ZHAO, S.; WANG, Y.; HE, T.; WANG, H.; ZUO, Z, WU, C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from an integrated broiler chicken supply chain in Qingdao, China. **Food Control**, v.62, p. 270–276, 2016.

DEPARDIEU, F.; PODGLAJEN, I.; LECLERCQ, R.; COLLATZ, E.; COURVALIN, P. Mods and modulations of antibiotic resistance gene expression. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n.1, p. 79–114, 2007.

DOYLE, M., BUSTA, F., CORDS, B., DAVIDSON, P., HAWAKE, J. Antimicrobial resistance: implication for the food system. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 5, p. 71–137, 2006.

DURANTE-MANGONI, E.; GRAMMATIKOS, A.; UTILI, R.; FALAGAS, M. E.; Do we still need the aminoglycosides. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.33, p, 201-205, 2009.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotics resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food Technology Biotechnology**, v. 46 , p.11-21, 2008.

ELIAS, L. da S. **Fatores de risco associados à mortalidade de pacientes tratados com polimixina B endovenosa**. 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

EFSA- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA Journal, 9, 2090.

EFSA-EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2011a). <http://www.efsa.europa.eu/en/corporate/doc/factsheetsalmonella.pdf>. Acesso em 24 de setembro de 2017.

EFSA-EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2018). Salmonella the most common cause of foodborne outbreaks in the European Union.

<https://www.efsa.europa.eu/en/news/salmonella-most-common-cause-foodborne-outbreaks-european-union>. Acesso em 26 de setembro de 2018.

FABREGA, A.; MADRUGA, S.; GIRALT, E.; VILLA, J. Mechanism of action of and resistance quinolone., **Oxford**, v.2 , n.1, p 40-61, 2009.

FERRARI, R.G.; GALIANA, A.; CREMARES, R; RODRIGUÉZ, J. C.; MAGNANI, M.; TOGNIM, M.C.B.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; ROYO, G. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and mutations in the topoisomerase genes of *Salmonella enterica* strains from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 657-662, 2013.

FINSTAD, S.; O'BRYAN, C. A.; MARCY, J. A.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C. *Salmonella* serotypes currently associated with broiler production in the US: relationship to foodborne salmonellosis. **Food Research International**, v.45, p.789-794, 2012.

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

FONG, K.; WANG, S. Heat resistance of *Salmonella enterica* is increased by pre-adaptation to peanut oil or sub-lethal heat exposure. **Food Microbiology**, v. 58, p.139-147, 2016.

FONSECA, E.L., MYKYTCZUC, O.L., ASENÍ, M.D., REIS, E.M.F., FERRAZ, L.R., PAULA, F.L., NG, L.K., RODRIGUES, D.P. Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of clinical Microbiology**, v.44, p.2767-2772, 2006.

GOODMAN; GILMAN'S. **Manual of Pharmacology and Therapeutics**. Nova Iorque: McGraw Hill, 2008.

GRENNI, P.; ANCONA, V., CARACCIOLO, A. B. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. **Microchemical Journal**, v.136, p. 25–39, 2018.

GRUMACH, A. S.; FERRARONI, N. F. O papel da penicilina na medicina moderna. DST, **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis** v.18 n.1, p.7-13, 2006.

GUERRERO, P.P.; F. SANCHEZ, G.; SABORIDO, D.G.; E I. GUERRERO LOZANO., G. I. Infecciones por enterobacterias. **Medicine**, v. 11, p.3276-82, 2014.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, No. 3, 667-679, 2010.

HE, S.; CUI, S.; QIN, X.; ZHANG, F.; SHIA, C.; GEORGE, C.; SHI, X. Influence of ethanol adaptation on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis survival in acidic environments and expression of acid tolerance-related genes. **Food Microbiology**, v.72, p 193-198, 2018.

HIGGINS, P.G.; FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.J. Fluoroquinolones: structure and target sites. **Current drug Targets**, v.4, p.181-189, 2003.

HUMPHREY, T., *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.504-509. 2004.

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

JUNEJA, V.K.; HWANG, C. H.; FRIEDMAN, M. Thermal inactivation and postthermal treatment growth during storage of multiple *Salmonella* serotypes in ground beef as affected by sodium lactate and oregano oil. **Journal of Food Science**, v.75, p.1-6, 2010.

KATZUNG, B. **Farmacologia Básica e Clínica** (10^a ed.). Brasil: McGraw Hill. 2007.

KENYON, W. J.; SPECTOR, M. P. Response of *Salmonella enterica* serovars to environmental stresses. In Hin-chung Wong (Ed.), Stress responses in foodborne microorganisms. Hauppauge, NY: **Nova Science Publishing**, Inc. 2011.

KINGSLEY, R. A.; BÉAUMER, A. J. Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. **Molecular Microbiology**, v.36, p.1006-1014, 2002.

KOTTWITZ, L.B.M., OLIVEIRA, T.C.R.M., ALCOCER, I., FARAH, S.M.S.S., ABRAHÃO, W.S.M., RODRIGUES, D.P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 32, n. 1, p. 9-15, 2010.

KYLIE, J.; MCEWEN, S.A.; BOERLIN, P.; REID-SMITH, R.J.; WEESE, J.S.; TURNER, P.V. Prevalence of antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in Canadian commercial meat, companion, laboratory, and shelter rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and its association with routine antimicrobial use in commercial meat rabbits. **Preventive Veterinary Medicine**, v.147, p. 53–57, 2017.

LADO, B.H.; YOUSEF, A.E. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p.433-440, 2002.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A.; DIERIKX, C. M.; COHEN STUART, J.; VOETS, G. M.; VAN DEN MUNCKHOF, M. P.; VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A.; PLATTEEL, T.; A. C. FLUIT, A.C.; VAN DE SANDE-BRUIJNSMA, N.; SCHARINGA, J , M. J. M. BONTEN, M. J. M.; MEVIUS, D, J. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes plasmids and strains. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, p.873-880, 2011.

LIEBANA, E., CARATTOLI, A., COQUE, T. M., HASMAN, H., MAQUIORAKOS, A. P., MEVIUS, D. 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 Infectious Diseases**, v.56, p.1030–1037. 2013.

LIMA A.L.; RODRIGUES, D. P.; ARAÚJO, M.S.; REIS, E. M. F.; FESTIVO, M.L.; RODRIGUES, E.C.P.; LÁZARO, N.S. Sorovares e perfil de suscetibilidade a

antimicrobianos em *Salmonella* spp. isoladas de produtos de origem suína. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.1, p.39-47, 2016.

LLARRULL, L.I.; TESTERO, S. A.; FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. The future of the β -lactams. **Currente opinion in microbiology**.v.13, n.5, p. 551-7, 2010.

LUES, J. F.; THERON, M. M. Comparing organic acids and salt derivatives as antimicrobials against selected poultry-borne *Listeria monocytogenes* strains in vitro. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n.12, p. 1126–1129, 2011.

LYNNE, A.M.. FOLEY, S. L.. HAN, J. *Salmonella*: properties and occurrence. Encycl. **Food Health**, p. 695–700, 2015.

MACÍAS-FARRERA, G. P.; OCA JIMÉNEZ, R. M.; VARELA-GUERRERO, J.; TENORIO-BORROTO, E.; RIVERA-RAMÍREZ, F.; MONROY-SALAZAR, H. G.; YONG-ANGEL, G.; Antibiotics susceptibility of quinolones against *Salmonella* spp. strains isolated and molecularly sequenced for *gyrA* gene. **Microbial Pathogenesis**. Jan;114:286-290, 2018.

MAGWEDERE, K.; RAUFF, D.; DE KLERK, G.; KEDDY, K. H.; DZIVA, F. Incidence of nontyphoidal *Salmonella* in food-producing animals, animal feed, and the associated environment in South Africa, 2012–2014. **Clinical Infectious Diseases**, v.6, p.283–9, 2015.

MARSHALL, B.M.; LEVY, S.B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clin. Microbiol. Rev.**v. 24, p.718-733, 2011.

MELO, A.N.F.; SOUZA, G.T.; SCHAFFNER, D.; OLIVEIRA, T.C.M.; MACIEL, J.F.; SOUZA, E. L.; MAGNANI, M. Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Typhimurium PT4 in chicken breast meat after exposure to sequential stresses. **International Journal of Food Microbiology**, v.251, p.15–23, 2017.

MOLE, B., MRSA: farming up trouble. **Nature**, p.398-400, 2013.

MOLINA-GONZÁLEZ, D.; ALONSO-CALLEJA, C.; ALONSO-HERNANDO, A.; CAPITA, R. Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. **Food Control**, v.40, p.329-334, 2014.

MORAIS, D. F.; SILVA, G. S. Sulfamethoxazole trimethoprim susceptibility and bacterial resistance: a theoretical review. **Boletim Informativo Geum**, v8., n.3 , p.32-40, jul./set., 2017.

MOSTARDEIRO, M. M. **Uso de polimixina em pacientes submetidos a transplante: Avaliação de eficácia e nefrotoxicidade**. 2009. 53 f. Tese (Mestrado em Ciências Médicas) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo.

MULLER, A.J.; KAISER, P.. DITTMAR, K.E.; WEBER, T. C.; HAUETTER, S.; ENDT, K.; SONGHET, P.; ZELLWEGE, C.; KREMER, M.; FEHLING, H.J.; HARDT, W.D. *Salmonella* gut invasion involves *ttss-2*-dependent epithelial traversal *salmonella* gut invasion involves *ttss-2*-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by

epithelium-sampling lamina propria phagocytes. **Cell Host and Microbe**, v 11, p.19-32. 2012.

MCMAHON, M., XU, J., MOORE, J., BLAIR, I., and MCDOWELL, D. Enviromental stress and antibiotic resistance in food-related pathogenes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 211–217.2007.

NABER, K.G. Which fluoroquinolones are suitable for the treatment of urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 331-341, 2001.

NGUYEN DANG GIANG, C.; Z. SEBESVARI, Z.; RENAUD, F.; ROSENDAHL, I.; HOANG MINH, Q.; AMELUNG, W. Occurrence and dissipation of the antibiotics sulfamethoxazole, sulfadiazine, trimethoprim, and enrofloxacin in the Mekong Delta, Vietnam. **PLoS One**, 10, 2015.

OPAS (PAHO) – **Organização Pan-Americana da Saúde**. Zoonoses bacterianas relacionadas a resistência bacteriana, 2016.

PEREZ, J.C., GROISMAN, E.A. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology**, v.63, p. 283–293, 2014.

PRIMAMI, L. P. **Desenvolvimento de um metodo simples, limpo e rápido para a determinação de fluoroquinolona em formulações farmacêuticos**. 2014- Universidade Estadual Paulista, Araquara 2014.

PRUDEN, A.; LARSSON, D. G. J.; AMEZQUITA, A.; COLLIGNON, P., BRANDT, K.K., GRAHAM, D.W. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. **Environmental Health Perspectives**, v.121, p. 878-885. 2013.

RAMPHAL, R. P.G. AMBROSE. Extended-spectrum β -lactamases and clinical outcomes: current data. **Clinical Infectious Diseases**. v.42, 2006.

REDDY, T.; CHOPRA, T.; MARCHAIM, D.; POGUE, J.M.; ALANGADEN, G.; SALIMNIA, H.; BOIKOV, D.; NAVON-VENEZIA, S.; AKINS, R.; SELMAN, P.; DHAR, S.; KAYE, K.S. Trends in antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* isolates from a metropolitan Detroit health system. **Antimicrob Agents Chemother**. May;54(5):2235-8, 2010.

RIVIERE, J.E.; PAPICH, M.G. Cloranfenicol e derivados, macrolídeos, lincosamidas e antimicrobianos diversos. In: ADAMS, H.R. Farmacologia e terapêutica em veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.726-749, 2003.

ROWLANDS, R. E.; RISTORI, C. A.; IKUNO, A. A.; BARBOSA, M. L.; JAKABI, M.; FRANCO, B. D. Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. Isolated from foods associated or not with Salmonellosis em brazil. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v.56, n. 6, p. 461-467, 2014.

RYCHLIK, I.; BARROW, P. A. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p. 1021–1040, 2005

SANTANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M.; SCHAFFNER, D.W. Risk of infection with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* due to consumption of ready-to-eat leafy vegetables in Brazil, **Food control**, v. 42, p.1-8, 2014.

SANTOS, H.S. **Interação entre aminoglicosídeos e nanopartículas de ouro e o desenvolvimento de sonda para a determinação de espectrofotométrica ultra traço de tobramicina**. Dissertação apresentada de pós-graduação em química. Rio de Janeiro, 2014.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, p. 519–542, 2004.

SHARMA, P. C.; JAIN, A.; JAIN, S.; PAHWA, R.; YAR, M. S. Ciprofloxacin: Review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 25, p.577–589, 2010.

SHEN, S.; FANG, F.C. Integrated stress responses in *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v.152, p.75–81, 2012.

SILVA-ANGULO, A.B.; ZANINI, S.F.; RODRIGO, D.; ROSENTHAL, A.; MARTINEZ, A. Growth kinetics of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* under exposure to carvacrol and the occurrence of sublethal damage. **Food Control**, v.37, p.336–342, 2014.

SILVA, T.F.A., FILHO, M.A.A., BRITO, M.R.M.B., FREITAS, R.M. Mecanismo de ação, efeitos farmacológicos e reações adversas da ceftriaxona: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. XI, n. 3, p. 48–57, 2014.

SKANDAMIS, P.N., YOON, Y., STOPFORTH, J.D., KENDALL, P.A., SOFOS, J.N. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. **Food Microbiology**, v. 25, p.294-303, 2008.

SPECTOR, M. P.; KENYON, W. J. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses, **Food Research International**, v.45, p. 455–481, 2012.

SUARÉZ, C.; GUDIOL, F.[Beta-lactam antibiotics].**Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 27, 116, 2009.

TAN, X.; JIANG, Y.W.; HUANG, Y.J.; HU, S.H. Persistence of gentamicin residues in milk after the intramammary treatment of lactating cows for mastitis. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 10, n.4, p. 280- 284, 2009.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, p. 292. 2001.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Control**, v.119, p.3-10, 2006.

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.

THERON. M.M.; J.F.R. LUES. Organic acids and meat preservation: a review. **Food Reviews International**, v. 23,p.141-158, 2007.

TUON, F.F.; RIGATTO, M.H.; LOPES, C.K.; KAMEI, L.K.; ROCHA, J.L.; ZAVASCKI, A. P. Risk factors for acute kidney injury in patients treated with polymyxin b or colistin methanesulfonate sodium. **Brazilian Journal of Nephrology**,v.43, p:349-352, 2014.

VAN BAMBEKE, F., MICHOT, J. M., VAN ELDERE, J.; TULKENS, P. M. Quinolones in 2005: An update. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.11, p. 256–280, 2005.

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**, v. 2, n. 203, 2011.

VELHNER, M., KOZODEROVIĆ, G., GREGO, E., GALIĆ, N., STOJANOV I., JELESIĆ, 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 Public Health**,v.61, n.5, p. 364-70, 2014.

VELKOV T, THOMPSON PE, NATION, R. L, LI J. Structure--activity relationships of polymyxin antibiotics. **Journal of Medicinal Chemistry**. v.53, p.1898-916, 2010.

WALSH, C.; **Antibiotics: actions, origins, resistance**, ASM Press: Washington, 2009.

WAN NORHANA, M.N.; POOLE, S. E.; DEETH, H. C.; DYKES, G. A. The effects of temperature, chlorine and acids on the survival of *Listeria* and *Salmonella* strains associated with uncooked shrimp carapace and cooked shrimp flesh. **Food Microbiology**, v.27, p. 250-256, 2010.

WANG, Y.X., ZHANG, A., YANG, Y., LEI, C., JIANG, W., LIU, B., SHI, H., KONG, L., CHENG, G., ZHANG, X., YANG, X., WANG, H. Emergence of *Salmonella enterica* serovar Indiana and California isolates with concurrent resistance to cefotaxime, amikacin and ciprofloxacin from chickens in China International Journal of **Food Microbiology**, v. 262, p 23–30, 2017.

WESCHE, A. M.; GURTNER, J. B.; MARKS, B. P.; RYSER, E. T. Stress, sublethal injury, resuscitation and virulence of bacterial foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 5, p.1121-1138, 2009.

WHO, Antimicrobial Resistance: Global Report On Surveillance, **World Health Organization**, 2014.

WHO. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 5th rev. Geneva: World Health Organization, 2016.

XU, H.; LEE, H. Y.; AHN, J. Cross-protective effect of acid-adapted *Salmonella enterica* on resistance to lethal acid and cold stress conditions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 290–297, 2008.

YACHISON CA, YOSHIDA C, ROBERTSON J, ET AL. The validation and implications of using whole genome sequencing as a replacement for traditional serotyping for a national *Salmonella* reference laboratory. **Frontier in Microbiology**, v. 8, p.1–7, 2017.

YADAV, A. S.; SAXENA G. K.; SAXENA, V. K.; KATARIA, J. M. Study on heat stress response in *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis and its impact on their attachment to dressed broiler skin surface. **Asian journal of animal and Veterinary Advanced**, v. 11, n. 2, p. 114-121, 2016.

YANG, Y.; KHOO, W.J.; ZHENG, Q.; CHUNG, H.J.; YUK, H.G. Growth temperature alters *Salmonella* Enteritidis heat/acid resistance, membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression. **International. Journal of. Food Microbiology**, v.172, p.102–109, 2014.

YUK, H.G., MARSHALL, D.L. Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 3500–3505, 2004.

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

ZHU, Y.; CHANDRA, P.; SONG, K.; BAN, C.; SHIM, Y. Label-free detection of kanamycin based on the aptamer-functionalized conducting polymer/gold nanocomposite. **Biosensor and Bioelectronics**, v. 36, p. 29-34, 2012.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão do presente estudo foram formatados em um artigo científico, em atendimento às normas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos (PPGCTA).

4.1 ARTIGO

SALES, C. V.; et al. Changes in antibiotic resistance phenotype in outbreak-linked *Salmonella enterica* strains after exposure to human simulated gastrointestinal conditions in chicken meat. **Journal of Food Protection**. v.81, p. 1844-1850, 2018.

1844

Journal of Food Protection, Vol. 81, No. 11, 2018, Pages 1844–1850
doi:10.4315/0362-028X.JFP-18-213
Copyright ©, International Association for Food Protection

Research Paper

Changes of Antibiotic Resistance Phenotype in Outbreak-Linked *Salmonella enterica* Strains after Exposure to Human Simulated Gastrointestinal Conditions in Chicken Meat

CAMILA VERÍSSIMO DE SALES,¹ ADMA NADJA FERREIRA DE MELO,¹ KATARZYNA MARIA NIEDZWIEDZKA,²
EVANDRO LEITE DE SOUZA,³ DONALD W. SCHAFFNER,⁴ AND MARCIANE MAGNANI^{1*}

¹Department of Food Engineering, Center for Technology (ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7771-0479> [M.M.]), and ³Department of Nutrition Sciences, Center of Health Sciences, Federal University of Paraíba, Campus I, João Pessoa 58051-900, Brazil; ²Medical University of Warsaw, Żwirki i Wigury St., 02-091 Warsaw, Poland; and ⁴Department of Food Science, Rutgers, The State University of New Jersey, 65 Dudley Road, New Brunswick, New Jersey 08901, USA

MS 18-213; Received 15 May 2018/Accepted 1 August 2018/Published Online 16 October 2018

Changes of antibiotic resistance phenotype in outbreak-linked *Salmonella enterica* strains after exposure to human simulated gastrointestinal conditions in chicken meat

Running headline: Resistant phenotypes in *S. enterica*

SIGNIFICANCE AND IMPACT OF THE STUDY

The emergence of antibiotic-resistant phenotype in *S. enterica* strains is a cause of global concern. This study provides important information regarding changes in antibiotic susceptibility in distinct serovars *S. enterica* after exposure to stress imposed during the simulated human digestion. The findings show development of cross-protection to some antibiotics currently used for therapy of salmonellosis which may represent a serious public health problem.

ABSTRACT

The effects of exposure of fifteen outbreak-linked *Salmonella enterica* strains in chicken meat to simulated human gastrointestinal conditions on susceptibility to 11 antibiotics of seven distinct classes were evaluated. The minimum inhibitory concentration of each antibiotic was determined by microdilution broth before and after the exposure of each strain to a continuous system simulating conditions the mouth, esophagus-stomach, duodenum and ileum. Strains were inoculated onto chicken breast (9 g; inoculated at 5 log cfu.g⁻¹) prior to exposure. Data were interpreted according Clinical and Laboratory Standards Institute breakpoints values. Twelve strains with reduced susceptibility to ciprofloxacin (CIP) changed to CIP-resistant after in vitro digestion. *S. Newport* ceftriaxone (CTX)-intermediary changed to CTX-resistant. Ampicillin (AMP)-susceptible *S. Heidelberg* changed to AMP-resistant, while *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Newport*, *S. Albany* and *S. Corvallis* sulfamethoxazole/ trimethoprim(SXT)-

susceptible changed to SXT-resistant. *S. Heidelberg*, *S. Newport*, *S. Albany* and *S. Corvallis* showed the highest frequency of change in antibiotic susceptibility with new-resistant phenotype to AMP and CIP, CTX and SXT, CIP and SXT and CIP and SXT, respectively. Conditions imposed by a simulated gastrointestinal environment changes the susceptibility of *S. enterica* to clinically relevant antibiotics and should be considered in the selection therapies for human salmonellosis.

Key-words: resistance, *Salmonella*, antibiotics, food safety, stress response

INTRODUCTION

Salmonella enterica infection causes approximately 93.8 million cases and 155,000 deaths worldwide each year (CDC, 2018). Salmonellosis severity ranges from the common *Salmonella* gastroenteritis to a systemic illness requiring antibiotic therapy (Luo *et al.* 2017). The consumption of a variety of food products has been associated with salmonellosis, however, chicken is the food most commonly involved (EFSA 2015; CDC, 2018).

Epidemic strains of *S. enterica* exhibit a dynamic interaction within the host and frequently present phenotypes of multiple drug resistance (Luo *et al.* 2017). *S. enterica* serovars presenting resistance to the antibiotics of choice used to treat salmonellosis (e.g., fluoroquinolones and third-generation cephalosporin) represent a clear public health threat (Burke *et al.* 2014; Wang *et al.* 2017).

Multidrug resistant *S. enterica* serovars could be a consequence of the widespread overuse and misuse of antibiotics in human and veterinary medicine (Capita and Alonso-Calleja, 2013). Various antibiotics used in intensive animal production or veterinary medicine, such as ampicillin, chloramphenicol, gentamicin, kanamycin, ciprofloxacin, trimethoprim,

sulfamethoxazole and tetracycline, are closely related to antibiotics used in human health care (Cameron-Veras *et al.* 2018; Zhu *et al.* 2017).

Epidemic *S. enterica* cells can survive a variety of stresses during food processing, storage, and passage through the host where cells are exposed to acidic conditions in stomach and increased osmolarity and presence of bile salts in intestine (Melo *et al.* 2017). Exposure to conditions insufficient to cause bacterial death may induce bacterial cells to mount protective adaptive responses, resulting in increased resistance to more extreme environmental conditions (Sirsat *et al.* 2011). This study evaluated if the antibiotic resistance phenotype of epidemic *S. enterica* strains of different serovars is altered following exposure to simulated gastrointestinal conditions in chicken breast meat.

RESULTS AND DISCUSSION

Resistance of *S. enterica* strains before in vitro digestion varied as follow: TET 80% (12/15), KAN 73% (11/15), SXT 67% (10/15), PEN and AMP 60% (9/15), CHL, GEN and CTX 26.67% (4/15) and FEP, CIP and PB 0% (0/15) as shown in Table 1.

Twelve strains showed reduced susceptibility to CIP before in vitro digestion, while after in vitro digestion these same strains showed CIP-resistant phenotype (Table 1). These findings are noteworthy because emerging *S. enterica* serovars with CIP-resistant phenotype are a global concern related to possible failure in clinical treatments (Ferrari *et al.* 2013; Luo *et al.* 2017).

Twelve strains were resistant to TET before in vitro digestion, and no change in this phenotype was observed after exposure to in vitro digestion (Table 1). *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Mvestre* and *S. Derby* were the only strains with CHL-resistant phenotype before in vitro digestion, with no change after in vitro digestion. CHL and TET are broad-spectrum bacteriostatic antibiotics active against a wide variety of bacteria. Lack of changes in resistance

phenotype to TET and CHL is encouraging because these antibiotics are largely used as growth promoters in animal production (Zhu *et al.* 2017; Cameron-Veras *et al.* 2018).

S. Derby, *S. Albany*, *S. Mbandaka* and *S. Ohio* strains showed CTX-resistant phenotype, and *S. London* and *S. Newport* strains showed CTX-intermediary phenotype before in vitro digestion. CTX-intermediary *S. Newport* changed to CTX-resistant phenotype and CTX-susceptible *S. Enteritidis* and *S. Infantis* changed to CTX-intermediary phenotype after in vitro digestion (Table 1). CTX is a third-generation cephalosporin commonly used in human and veterinary medicine to treat *Salmonella* infections and its overuse is associated with increased resistance in epidemic *Salmonella* (Fey *et al.* 2000).

Nine strains showed PEN-resistant phenotype, eleven strains showed KAN-resistant phenotype and only four strains showed GEN-resistant phenotype before in vitro digestion. No changes were observed in resistance of these strains to PEN, KAN and GEN after exposure to in vitro digestion (Table 1). This is in contrast to reports that exposure to acid stress (pH 3.5) increased the susceptibility of *Cronobacter sakazakii* to GEN and KAN (Al-Nabulsi *et al.* 2011). Specific features of bacterial species (*S. enterica* vs *C. sakazakii*) could explain the differences between our findings and those reported in that study.

Nine strains were AMP-resistant before in vitro digestion; three strains (*S. Mvestre*, *S. Agona* and *S. Corvallis*) changed from AMP-susceptible to AMP-intermediate and one (*S. Heidelberg*) to AMP-resistant phenotype after in vitro digestion (Table 1). Increased bacterial resistance to AMP after acid-stress could result from alterations in cell envelope, including reduced porin synthesis, changes in LPS and alteration of antibiotic target sites (Potenski *et al.* 2006).

Ten strains showed SXT-resistant phenotype before exposure to gastrointestinal conditions, and the five STX-susceptible strains (*S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Newport*, *S. Albany* and *S. Corvallis*) changed to SXT-resistant phenotype after in vitro digestion (Table 1).

SXT is one of the antibiotic association widely used in prophylaxis of veterinary infections (Cameron-Veras *et al.* 2018), which might be related to the increased resistance observed after exposure to stressful conditions.

None of the *S. enterica* serovars tested displayed resistance to PB before in vitro digestion; however, *S. Agona* and *S. Anatum* changed to PB-intermediate after in vitro digestion (Table 1). None of the *S. enterica* serovars displayed resistance to FEP before or after in vitro digestion. This is important because FEP is a fourth-generation cephalosporin resistant to β -lactamases and *S. enterica* strains producing extended-spectrum- β -lactamase have been isolated from human and animals (Zhang *et al.* 2015).

S. Heidelberg, *S. Newport*, *S. Albany* and *S. Corvallis* presented new-resistant phenotype for two antibiotics (*S. Heidelberg*: AMP and CIP; *S. Newport*: CTX and SXT, *S. Albany* and *S. Corvallis*: CIP and SXT) after in vitro digestion (Table 1; Figure 1). These serovars were rarely linked to *Salmonella* outbreaks, but the dissemination of resistance to antimicrobials has changed this scenario (EFSA, 2015). An earlier study observed increased resistance of *Listeria monocytogenes* to AMP, TET, GEN, PEN and CIP after exposure to acid stress (Al-Nabulsi *et al.* 2015).

Resistance of *S. enterica* strains varied after in vitro digestion as follow: SXT 100% (15/15), TET and CIP 80% (12/15), KAN 73% (11/15), AMP 67% (10/15), PEN 60% (9/15), CTX 33% (5/15), CHL and GEN 27% (4/15), FEP and PB 0% (0/15) as shown in Table 1. Bacteria exposed to environmental stresses act to reduce the impact of harsh conditions on survival via phenotypic and genotypic adaptations (Spector and Kenyon, 2012). The mechanisms underlying the short-term phenotypic changes include down-regulation of cell wall binding sites. Cells may reduce their sensitivity and increase their ability to survive in high concentrations of one or more antibiotics in response to environmental stresses like digestion

(McMahon *et al.* 2007; Al-Nabulsi *et al.* 2015). No reversion of the new-resistant or new-intermediary phenotypes to CIP, STX, CTX, AMP and PEN were observed in our study.

The simulated stomach acidity challenged the *S. enterica* strains throughout in vitro digestion. Induction of shock proteins is described in *S. Typhimurium* as a mechanism that provides cross protection against antibiotics during acid stress (McMahon *et al.* 2007). The induction of multiple antibiotic resistance operon, which regulates the expression of at least one broad-specificity efflux pump (the *arcAB* efflux pump) is also a well-described occurrence in *S. enterica* epidemic strains (Ferrari *et al.* 2013). Changes in bacterial membrane lipid composition and membrane fluidity are also reported as important physiological alterations in *S. enterica* to survive under unfavorable environmental conditions (Yang *et al.* 2014). Genotypic changes (e.g., point mutations in target sites for antibiotic binding or changes in mutation rate) may also result in long-term alterations and/or decreased antibiotic susceptibility (Spector and Kenyon, 2012; Al-Nabulsi *et al.* 2015) as observed here. Further studies should focus on mechanisms underlying these phenotypic changes in tested epidemic *S. enterica* strains.

MATERIALS AND METHODS

Test strains, inoculum and growth conditions

Fifteen strains of *Salmonella enterica* identified as the etiological agents in food outbreaks occurred in the South of Brazil were used (Table 2). Stock cultures of these strains were maintained in cryovials at -20 °C in tryptic soy (TSB) broth (HiMedia, Mumbai, India) containing glycerol 20% v.v⁻¹. Each strain was suspended in sterile saline solution (0.85% NaCl, w.v⁻¹) from cultures grown in TSB broth at 37 °C for 18 h. Cells were harvested by centrifugation (4,500 × *g*, 15 min, 4 °C) and washed twice with a sterile saline solution (NaCl, 0.85% v.v⁻¹) and re-suspended in sterile saline solution to obtain standard cell suspensions with

optical density at 625 nm (OD_{625}) corresponding to approximately six log CFU.mL⁻¹ (Melo *et al.* 2017).

Antibiotics and stock solutions

The antibiotics assayed were tetracycline (TET), chloramphenicol (CHL), ampicillin (AMP) and penicillin (PEN), ceftriaxone (CTX) and cefepime (FEP), kanamycin (KAN) and gentamicin (GEN), ciprofloxacin (CIP), sulfamethoxazole and trimethoprim (SXT), and polymyxin B (PB). All antibiotics were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, US). Antibiotic stock solutions were prepared following standard recommendations (CLSI, 2017) and sterilized using a 0.22 µm membrane (Merck-Millipore, US).

Determination of minimum Inhibitory Concentrations (MIC)

MIC of each antibiotic against each strain was determined before and after exposure to simulated gastrointestinal conditions using a microdilution broth method (CLSI, 2017). The range of concentrations assayed (µg.mL⁻¹) for each antibiotic was: TET 2048-0.125; CHL 2048-0.125, AMP 1024-0.5; PEN 1024-0.5; CTX 512-0.02; FEP 32-0.06; KAN 1024-0.5; GEN 1024-0.125; CIP 64-0.008, SXT 128/32-01/0.25; and PB 64-0.008. Each plate included six wells with only the test strain without antibiotics (positive controls) and the antibiotic without the test strain (blank). The plates were incubated at 37 °C for 24 h. MIC value was defined as the lowest concentration (µg.mL⁻¹) capable of inhibiting visual growth of the test bacterial strain. *S. enterica* strains were classified as sensitive, intermediate or resistant considering standard breakpoints MIC values (CLSI, 2017). Results of assays with CIP considered the conventional term “reduced susceptibility”, which corresponds to intermediate CLSI breakpoints values (Table 3).

Chicken breast samples

Chicken breast samples (2 kg, pH 5.7; a_w 0.95) were obtained from a slaughterhouse located in city of Guarabira (Paraíba, Brazil). Average gross composition (g.100g⁻¹) of the

chicken breast, determined according to standard procedures (AOAC, 2012) was moisture 72.89; ash 0.95; fat 4.9 and protein 24.23. Chicken breast samples (250 g) were ground using a domestic blender, distributed in stomacher bags (Stomacher®, Biomaster, Brazil), vacuum-sealed, frozen at -20 °C and irradiated (25 kGy; 2 h) to eliminate indigenous microflora. Irradiated bags were stored at -20 °C and thawed under refrigeration (7 ± 1 °C) prior to use (Juneja *et al.* 2010). Random samples were tested to verify elimination of microflora by diluting (1:1) the irradiated ground chicken in PBS, followed by direct surface-plating of the suspension onto TSA and incubating at 37°C for 48 h.

Exposure to simulated gastrointestinal conditions in chicken breast

Ground chicken breast (9 g) and the inoculum suspension of each test strain (final counts five log CFU.g⁻¹) were gently mixed using a sterile glass rod for 9 min in sterile flasks. The mixtures were submitted to 9-step continuous system simulating the mouth (1st-step), esophagus-stomach (2nd- to 8th-step), duodenum (8th-step) and ileum (9th-step) as shown in Table 4. Overall working volume increased during simulated digestion (as happens during actual digestion) reaching a final volume of 92.75 mL (Melo *et al.* 2017).

Mechanical agitation at 37 °C was used to mimic the conditions in each digestive compartment. The pH of each step was adjusted to the target value using 0.1 mM.L⁻¹ NaHCO₃ (Steps 1, 8 and 9) or 1 mM.L⁻¹ HCl solution (Step 2 to 7). Enzyme solutions were freshly prepared and filter-sterilized using a 0.22 µm membrane filter (Millipore, Billerica, MA, USA) prior to use. Meat fragments were removed by sterile gauze filtration at the end of the *in vitro* digestion, and the cells were harvested by centrifugation, washed and re-suspended in TSB broth to obtain viable counts of approximately 6 log CFU.mL⁻¹ as previously described. Each strain was submitted to a new MIC determination following simulated digestion.

Reversion of the phenotype changes post-in vitro digestion

The strains with new resistance to one or more antibiotics were plated on TSB agar and maintained at 4 °C to assess if the phenotype changes in antibiotic resistance were reversed after cultivation. Strains were submitted to a new cultivation and MIC determination using only the target antibiotics weekly for one month. All assays were performed in triplicate in three independent experiments.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the CNPq-Brazil the financial support and the scholarship awarded to C.V. Sales.

REFERENCES

- Al-Nabulsi, A.A., Osaili, T.M., Shaker, R.R., Olaimat, A.N., Jaradat, Z.W., Zain Elabedeen, N.A. and Holley, R.A. (2015) Effects of osmotic pressure, acid, or cold stresses on antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* **46**, 154-160.
- Al-Nabulsi, A.A., Osaili, T.M., Elabedeen, N.A., Jaradat, Z.W., Shaker, R.R., Kheirallah, K.A., Tarazi, Y. H. and Holley, R.A. (2011) Impact of environmental stress desiccation, acidity, alkalinity, heat or cold on antibiotic susceptibility of *Cronobacter sakazakii*. *Int J Food Microbiol* **146**, 137–143.
- AOAC. (2012) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 18th ed. (Washington, DC, USA).
- Burke, L., Hopkins, K.L., Meunier, D., de Pinna, E., Fitzgerald-Hughes, D., Humphreys, H. and Woodford, N. (2014) Resistance to third-generation cephalosporins in human non-typhoidal *Salmonella enterica* isolates from England and Wales, 2010–12. *J. Antimicrob. Chemother* **69** 977–981.
- Cameron-Veras, K., Fraile, L., Napp, S., Garrido, V., Grilló, M. and Migura-Garcia, L. (2018) Multidrug resistant *Salmonella enterica* isolated from conventional pig farms using antimicrobial agents in preventative medicine programmes. *Vet J* **234**, 36–42.
- Capita, R. and Alonso-Calleja, C. (2013) Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit Rev Food Sci Nutr* **53**, 11-48.
- CDC. (2018) Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella*. <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html/> (Acesso em 04 de abril de 2018).

- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. (2016) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA.
- EFSA-ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). (2015) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, **13**, 3991.
- Fey, P.D., Safraneck, T.J., Rupp, M.E., Dunne, E.F., Ribot, E., Iwen, P.C., Bradford, P.A., Angulo, F.J. and Hinrichs, S.H. (2000) Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *J. Med* **342**, 1242-1249.
- Ferrari, R.G., Galiana, A., Cremades, R., Rodríguez, J.C., Magnani, M., Tognim, M.C.B., Oliveira, T.C.R.M. and Royo, G. (2013) Expression of the *marA*, *soxS*, *acrB* and *ramA* genes related to the AcrAB/TolC efflux pump in *Salmonella enterica* strains with and without quinolone resistance-determining regions *gyrA* gene mutations. *Braz J Infect Dis* **17**, 125-130.
- Juneja, V.K., Hwang, C.A. and Friedman, M. (2010) Thermal inactivation and post thermal treatment growth during storage of multiple *Salmonella* serotypes in ground beef as affected by sodium lactate and oregano oil. *J Food Sci* **75**, M1–M6.
- Luo, Y., Yi, W., Yao, Y., Zhu, N. and Qin, P. (2017) Characteristic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* from gastroenteritis. *J Infect Chemother* **24**, 251-255.
- McMahon, M., Xu, J., Moore, J., Blair, I. and McDowell, D. (2007) Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Appl Environ Microbiol* **73**, 211–217.
- Melo, A.N.F., Souza, G.T., Schaffner, D., Oliveira, T.C.M., Maciel, J.F., Souza, E. L. and Magnani, M. (2017) Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Typhimurium PT4 in chicken breast meat after exposure to sequential stresses. *Int J Food Microbiol* **251**, 15–23.
- Potenski, C.J., Gandhi, M. and Matthews, K.R. (2006) Exposure of *Salmonella* Enteritidis to chlorine or food preservatives increases susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* **220**, 181–186.
- Sirsat, S.A., Burkholder, K.M., Muthaiyan, A., Dowd, S.E., Bhunia, A.K. and Ricke, S.C. (2011) Effect of sublethal heat stress on *Salmonella* Typhimurium virulence. *J Appl Microbiol* **110**, 813–822.
- Spector, M.P. and Kenyon, W.J. (2012) Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Res Int* **45**, 455–481.
- Wang, Y., Zhang, A., Yang, Y., Leia, C., Jiang, W., Liu, B., Shia, H., Kong, L., Cheng, G., Zhang, X., Yang, X. and Wang, H. (2017) Emergence of *Salmonella enterica* serovar Indiana and California isolates with concurrent resistance to cefotaxime, amikacin and ciprofloxacin from chickens in China. *Int J Food Microbiol* **262**, 23-30.
- Yang, Y., Khoo, W.J., Zheng, Q., Chung, H.J. and Yuk, H.G. (2014) Growth temperature alters *Salmonella* Enteritidis heat/acid resistance, membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression. *Int. J. Food Microbiol* **172**, 102–109.

- 283
284 Zhang, H., Zhou, Y., Guo, S. and Chang, W. (2015) Multidrug resistance found in extended-
285 spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from rural water reservoirs in
286 Guantao, China. *Front Microbiol* **6**, 1- 4.
287
288 Zhu, Y., Lai, H., Zou, L., Yin, S., Wang, C., Han, X., Xia, X., Hu, K., He, L., Zhou, K., Chen,
289 S., Ao, X. and Liu, S. (2017) Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains
290 isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. *Int J Food Microbiol*
291 **259**, 43–51.

Table 1. Antibiotic resistant phenotype of outbreak-linked *Salmonella enterica* strains belonging to fifteen distinct serovars before and after exposure to simulated human gastrointestinal conditions to eleven antibiotics of seven different classes.

*Classification of MIC values according breakpoints proposed by CLSI (2017); R: resistance, I: intermediate, S: susceptible, SR: reduced susceptibility

Antibiotics class*																						
Strains	Tetracycline		Phenicol		β-Lactams				Aminoglycosides				Fluoroquinolone		Sulfonamide		Polymyxin					
	Tetracycline µg.ml ⁻¹		Chloramphenicol µg.ml ⁻¹		Penicillin µg.ml ⁻¹		Ampicillin µg.ml ⁻¹		Ceftriaxone µg.ml ⁻¹		Cefepime µg.ml ⁻¹		Kanamycin µg.ml ⁻¹		Gentamicin µg.ml ⁻¹		Ciprofloxacin µg.ml ⁻¹		Sulfamethoxazole/ trimethoprim µg.ml ⁻¹		Polymyxin b µg.ml ⁻¹	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
S. Typhimurium	128 ^R	1024 ^R	256 ^R	512 ^R	16 ^I	16 ^I	32 ^R	32 ^R	0.25 ^S	1 ^S	1 ^S	2 ^S	8 ^S	8 ^S	4 ^S	4 ^S	0.12 ^{SR}	1 ^R	2/0.50 ^S	128/32 ^R	0.25 ^S	0.50 ^S
S. Enteritidis	256 ^R	512 ^R	256 ^R	512 ^R	16 ^I	16 ^I	32 ^R	32 ^R	1 ^S	2 ^I	1 ^S	2 ^S	8 ^S	16 ^S	4 ^S	2 ^S	0.25 ^{SR}	1 ^R	128/32 ^R	128/32 ^R	0.02 ^S	0.02 ^S
S. Mvester	256 ^R	1024 ^R	256 ^R	512 ^R	16 ^I	8 ^I	8 ^S	16 ^I	1 ^S	1 ^S	2 ^S	4 ^S	8 ^S	8 ^S	2 ^S	0.25 ^S	0.12 ^{SR}	1 ^R	64/16 ^R	64/16 ^R	0.12 ^S	0.12 ^S
S. Infantis	512 ^R	512 ^R	1 ^S	1 ^S	256 ^R	256 ^R	32 ^R	32 ^R	1 ^S	2 ^I	0.50 ^S	1 ^S	64 ^R	128 ^R	4 ^S	0.25 ^S	0.02 ^S	0.25 ^{SR}	128/32 ^R	128/32 ^R	0.25 ^S	0.25 ^S
S. Derby	256 ^R	128 ^R	1024 ^R	1024 ^R	256 ^R	256 ^R	32 ^R	32 ^R	16 ^R	16 ^R	0.25 ^S	0.50 ^S	64 ^R	128 ^R	16 ^R	32 ^R	0.02 ^S	0.02 ^S	128/32 ^R	128/32 ^R	0.02 ^S	0.02 ^S
S. Heidelberg	256 ^R	128 ^R	8 ^S	2 ^S	16 ^I	8 ^I	8 ^S	32 ^R	0.25 ^S	1 ^S	2 ^S	2 ^S	128 ^R	64 ^R	8 ^I	8 ^I	0.25 ^{SR}	4 ^R	64/16 ^R	64/16 ^R	0.50 ^S	0.50 ^S
S. Agona	64 ^R	16 ^R	1 ^S	2 ^S	128 ^R	64 ^R	4 ^S	16 ^I	0.25 ^S	0.06 ^S	0.25 ^S	0.50 ^S	8 ^S	1 ^S	4 ^S	2 ^S	0.06 ^S	0.25 ^{SR}	2/0.50 ^S	64/16 ^R	1 ^S	4 ^I
S. London	64 ^R	16 ^R	2 ^S	2 ^S	256 ^R	128 ^R	32 ^R	32 ^R	2 ^I	2 ^I	2 ^S	4 ^S	64 ^R	64 ^R	4 ^S	4 ^S	0.12 ^{SR}	2 ^R	128/32 ^R	128/32 ^R	0.25 ^S	0.25 ^S
S. Johannesburg	128 ^R	16 ^R	4 ^S	4 ^S	256 ^R	128 ^R	32 ^R	16 ^R	1 ^S	0.25 ^S	0.50 ^S	0.50 ^S	128 ^R	64 ^R	4 ^S	2 ^S	0.12 ^{SR}	4 ^R	64/16 ^R	64/16 ^R	0.02 ^S	0.02 ^S
S. Newport	4 ^S	4 ^S	2 ^S	4 ^S	256 ^R	128 ^R	32 ^R	16 ^R	2 ^I	4 ^R	0.50 ^S	0.50 ^S	256 ^R	128 ^R	4 ^S	2 ^S	0.12 ^{SR}	1 ^R	2/0.50 ^S	128/32 ^R	0.12 ^S	0.12 ^S
S. Albany	64 ^R	16 ^R	4 ^S	2 ^S	256 ^R	128 ^R	32 ^R	16 ^R	16 ^R	32 ^R	2 ^S	2 ^S	64 ^R	64 ^R	8 ^I	8 ^I	0.12 ^{SR}	2 ^R	2/0.50 ^S	128/32 ^R	0.25 ^S	0.25 ^S
S. Mbandaka	4 ^S	1 ^S	1 ^S	0.25 ^S	8 ^S	4 ^S	2 ^S	8 ^S	16 ^R	8 ^R	1 ^S	2 ^S	128 ^R	128 ^R	2 ^S	2 ^S	0.12 ^{SR}	4 ^R	128/32 ^R	128/32 ^R	0.50 ^S	1 ^S
S. Ohio	256 ^R	256 ^R	4 ^S	4 ^S	128 ^R	64 ^R	32 ^R	32 ^R	256 ^R	128 ^R	0.50 ^S	2 ^S	256 ^R	512 ^R	256 ^R	256 ^R	0.25 ^{SR}	4 ^R	128/32 ^R	128/32 ^R	0.25 ^S	0.25 ^S
S. Anatum	64 ^R	16 ^R	2 ^S	4 ^S	256 ^R	256 ^R	4 ^S	4 ^S	1 ^S	1 ^S	0.25 ^S	0.50 ^S	256 ^R	512 ^R	512 ^R	256 ^R	0.25 ^{SR}	4 ^R	64/16 ^R	64/16 ^R	1 ^S	4 ^I
S. Corvallis	1 ^S	1 ^S	1 ^S	4 ^S	8 ^S	8 ^S	8 ^S	16 ^I	1 ^S	1 ^S	0.50 ^S	0.50 ^S	64 ^R	64 ^R	16 ^R	16 ^R	0.25 ^{SR}	4 ^R	2/0.50 ^S	128/32 ^R	0.25 ^S	0.50 ^S

295

296

Table 2. The fifteen epidemics strains of *Salmonella enterica* included in the study and their source of isolation.

Strain	Serovar	Source
F46/99	<i>S. Typhimurium</i> ¹	Beef and salami
F107/01	<i>S. Enteritidis</i> ¹	Ground beef and Chicken
P196/03	<i>S. Mveste</i> ¹	Feces
P225/06	<i>S. Infantis</i> ¹	Feces
P244/06	<i>S. Derby</i> ¹	Feces
F281/02	<i>S. Heidelberg</i> ¹	Chicken
F110/01	<i>S. Agona</i> ¹	Smoked turkey meat and sausage
F170/05	<i>S. London</i> ¹	Chicken
F178/06	<i>S. Johannesburg</i> ¹	Chicken
F189/02	<i>S. Newport</i> ¹	Chicken
F121/03	<i>S. Albany</i> ¹	Tomato salad
P28/00	<i>S. Mbandaka</i> ¹	Feces
F292/05	<i>S. Ohio</i> ²	Chicken
P246/06	<i>S. Anatum</i> ¹	Feces
F297/06	<i>S. Corvallis</i> ²	Chicken

*F: Strains isolated of foods involved in salmonellosis outbreaks; P: Strains isolated of human patients involved in salmonellosis outbreaks.¹Strains belong to Central Laboratory of the Parana State, Curitiba, Parana State, Brazil. ²Strains belong to the Food Microbiology Laboratory Collection, Londrina University, Londrina, Paraná State, Brazil.

Table 3. Minimal Inhibition Concentration (MIC) breakpoints proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) to determine the phenotype of susceptibility or resistance of *S. enterica*.

Antibiotic	MIC* breakpoint ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			318
	S**	I	R	319
Tetracycline	≤ 4	8	≥ 16	
Chloramphenicol	≤ 8	16	≥ 32	320
Penicillin	≤ 8	16	≥ 32	321
Ampicillin	≤ 8	16	≥ 32	
Ceftriaxone	≤ 1	2	≥ 4	322
Cefepime	≤ 2	-	≥ 16	
Kanamycin	≤ 16	32	≥ 64	323
Gentamicin	≤ 4	8	≥ 16	324
Ciprofloxacin	≤ 0.06	0.12-0.5	≥ 1	
Sulfamethoxazole/trimethoprim	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$	325
Polymyxin B	≤ 2	4	≥ 16	326

*. MIC: Minimal Inhibitory Concentration, i.e. the lowest concentration of the antibiotics required to inhibit the visible growth of the microorganism.

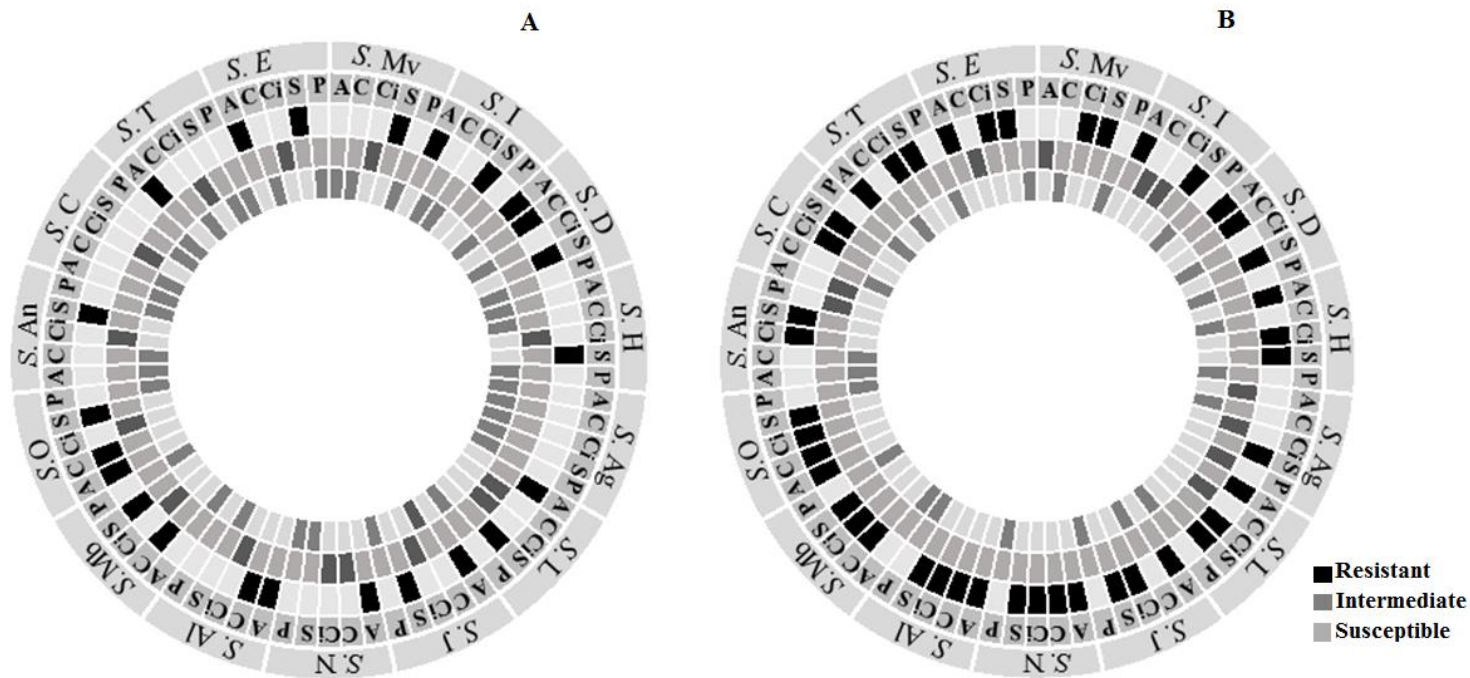
**. S: Susceptible, I: Intermediate, R: Resistant.

Table 4. The conditions used during each step of the continuous system simulating the human gastrointestinal conditions.

Steps	Compartment	Conditions	Stirring (rpm)	Final Ph	Exposure Time (min)
1	Mouth	Amylase	200	6.9	2
2				5.5	10
3				4.6	10
4				3.8	10
5				2.8	20
6				2.3	20
7				2.0	20
8	Duodenum	Pancreatin + bile salts	45	5.0	30
9				6.5	60

TSB: células testadas em Tryptic Soy Broth. O pH de cada passo foi ajustado ao valor alvo utilizando solução 0,1 mM.L⁻¹ NaHCO₃ (Passos 1, 8 e 9) ou solução 1 mM.L⁻¹ HCl (Passo 2 a 7). Peito de frango: células testadas em peito de frango.

371

372 **Supporting Information**373 **Figure 1.** Distribution of *Salmonella enterica* strain before (A) and after (B) exposure to human simulated gastrointestinal conditions.

374

375 *Salmonella enterica* strains: S. Mv: S. Mvester; S. I: S. Infantis; S. D: S. Derby; S. H: S. Heidelberg; S. Ag: S. Agona; S. L: S. London; S. J: S.
 376 Johannesburg; S. N: S. Newport; S. A: S. Albany; S. Mb: S. Mbandaka; S. O: S. Ohio; S. An: S. Anatum; S. C: S. Corvallis; S. T: S. Typhimurium;
 377 S. E: S. Enteritidis. Antibiotics: A: Ampicillin, C: Ceftriaxone, Ci: Ciprofloxacin, S: Sulfamethoxazole/trimethoprim and P: Polymyxin B

378 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

379

380 Baseado nos resultados do presente estudo conclui-se que os sorovares epidêmicos de
381 *S.enterica* após a exposição às condições simulados do trato gastrointestinal humano
382 apresentam mudanças no fenótipo de resistência. Constituindo uma preocupação importante
383 para saúde pública, por representar um comprometimento na eficácia do tratamento terapêutico
384 frente aos antibióticos testados, resultando em falhas clínicas no tratamento de salmoneloses.
385 Estudos futuros contribuirão para esclarecer os mecanismos envolvidos nos efeitos de outros
386 antibióticos frente a resistência de sorovares.