

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA GABRIELA SANTIN

**COMPARATIVO MICROBIOLÓGICO DE CEPAS DE BACTÉRIAS
RESISTENTES OU NÃO AO ANTIMICROBIANO RIFAMPICINA**

CURITIBA

2017

PAULA GABRIELA SANTIN

**COMPARATIVO MICROBIOLÓGICO DE CEPAS DE BACTÉRIAS
RESISTENTES OU NÃO AO ANTIMICROBIANO RIFAMPICINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do
Paraná.

Orientação: Prof.º Dr.º Rogério Ribas Lange

CURITIBA

2017

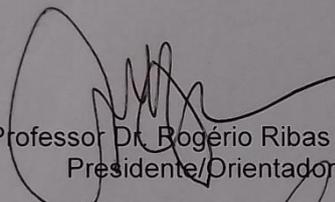
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



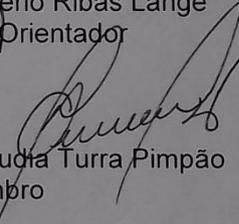
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **"COMPARATIVO MICROBIOLÓGICO DE CEPAS DE BACTÉRIAS RESISTENTES OU NÃO AO ANTIMICROBIANO RIFAMPICINA"** apresentada pela Mestranda **PAULA GABRIELA SANTIN** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata Apta para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

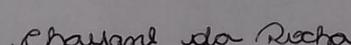
Curitiba, 27 de março de 2017



Professor Dr. Rogério Ribas Lange
Presidente/Orientador



Professora Dra. Cláudia Turra Pimpão
Membro



Professora Dra. Chayane da Rocha
Membro

AGRADECIMENTOS

À Deus por saber exatamente o motivo de todos os meus passos e me encorajar nos momentos difíceis.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e compreensão durante esta caminhada.

Ao meu orientador Dr. Rogério Ribas Lange, que no profissionalismo de sua pessoa me apoio nesta jornada.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, na pessoa do seu coordenador Prof. Fabiano Montianni Ferreira, e a todos os professores e colaboradores deste Programa por todos os ensinamentos durante esses dois anos.

A responsável professora Dra. Elizabeth Santin, funcionários e estagiários do Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia pelo auxílio técnico e prático na realização do experimento “in vivo” desta pesquisa.

À Fundação CAPES pela oportunidade de dedicação exclusiva.

E enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, seja de forma direta ou indireta, fica registrado aqui, o meu muito obrigado!

RESUMO

Como primeiros organismos adaptados ao meio, as bactérias estão há milhares de anos em transformação, entretanto os primeiros relatos de aplicações e pesquisas que temos para controlar as bactérias patogênicas não passam de 4.000 anos. Um longo período adaptativo possibilitou as bactérias uma resistência às condições externas e internas muito mais adequada, estando sempre um passo à frente da medicina e da ciência. A resistência de bactérias a antimicrobianos vem sendo estudada principalmente para o entendimento de seus mecanismos e diferenças para tentar conter seus avanços. Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo realizar um comparativo microbiológico de cepas de bactérias resistentes ou não ao antimicrobiano rifampicina. Este estudo está dividido em dois capítulos, sendo o primeiro capítulo uma revisão sucinta sobre os antimicrobianos e os mecanismos de resistência adotados por algumas bactérias contra estes. Já o segundo capítulo como uma análise prática, previamente autorizado pela comissão de ética da UFPR, comparando o crescimento microbiológico e desempenho em frangos de corte entre um controle negativo e duas cepas de *Salmonella* Enteritidis. Uma das cepas apresentadas era de origem tradicional e outra possuía uma resistência aos Antimicrobianos da família das rifampicinas, que age na síntese de ácidos nucleicos das bactérias. Foram utilizados 108 pintinhos de um dia, machos da linhagem Cobb®, três tratamentos, Tratamento controle (TC), *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Enteritidis resistente (SEres), sendo aplicadas quatro repetições em grupos de nove aves cada. As aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical e necropsiadas aos 9, 14 e 21 dias de idade, onde foram coletados fígado e ceco para contagem microbiológica. Todas as aves foram pesadas para análise de conversão alimentar (CA), ganho de peso (GP) e consumo médio de ração (CRM). Observou-se em todos os períodos que não houve diferença estatística no desempenho das aves, mas a contagem microbiológica demonstrou que a bactéria que possuía uma resistência a antimicrobianos, mesmo sem a presença específica deste composto nas aves, se mostrou estatisticamente maior ($P \leq 0,05$) em todos os períodos e órgãos. Deste modo observou-se que a contagem do crescimento microbiológico por bactérias resistente se mostrou maior.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, resistência bacteriana, síntese ácidos nucleicos, efeito de antimicrobianos

ABSTRACT

As the first organisms adapted to the environment, bacteria are for thousands of years in transformation, however the first reports of applications and research that we have to control the pathogenic bacteria are not more than 4,000 years. A long adaptive period allowed bacteria a much more adequate resistance to external and internal conditions, being always one step ahead of medicine and science. Resistance of bacteria to antimicrobials has been studied mainly for the understanding of their mechanisms and differences to try to contain their advances. In view of the above, the present study aims to perform a microbiological comparison of strains of bacteria resistant or not to the antimicrobial rifampicin. This study is divided into two chapters, the first chapter being a succinct revision on the antimicrobials and mechanisms of resistance adopted by some bacteria against them. The second chapter, as a practical analysis, previously authorized by the ethics committee of UFPR, comparing the microbiological growth and performance in broilers between a negative control and two strains of Salmonella Enteritidis. One of the strains presented was of traditional origin and another had an antimicrobial resistance of the rifampicin family, which acts on the nucleic acid synthesis of the bacteria. A total of 108 day-old chicks, males of the Cobb® strain, three treatments, Control Treatment (CT), Salmonella Enteritidis (SE) and resistant Salmonella Enteritidis (SEres) were used, and four replicates were applied in groups of nine birds each. The birds were euthanized by cervical dislocation and necropsied at 9, 14 and 21 days of age, where liver and cecum were collected for microbiological counting. All birds were weighed for feed conversion analysis (FCA), weight gain (WG) and average feed intake (AFI). It was observed in all periods that there was no statistical difference in the performance of the birds, but the microbiological count showed that the bacterium that had an antimicrobial resistance, even without the specific presence of this compound in the birds, was statistically larger ($P \leq 0,05$) in all periods and organs. In this way, it was observed that the count of microbiological growth by resistant bacteria was higher.

Key words: Salmonella Enteritidis, bacterial resistance, nucleic acid synthesis, antimicrobial effect

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	7
1.1	OBJETIVO GERAL	8
1.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	8
2.	CAPÍTULO 1 REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE AÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS NAS BACTÉRIAS E A CAPACIDADE ADAPTATIVA DE RESISTÊNCIA AOS MESMOS	9
2.1	RESUMO	10
2.2	ABSTRACT	10
2.3	INTRODUÇÃO	10
2.4	Classificação e mecanismos de ação dos antimicrobianos	12
2.5	Mecanismos de ação da resistência bacteriana a antimicrobianos	18
2.6	Resistência bacteriana intrínseca	19
2.7	Resistência bacteriana adquirida ou por mutação.....	20
2.8	CONCLUSÃO.....	22
2.9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
3.	CAPÍTULO 2 COMPARATIVO DE CONTAGEM MICROBIOLÓGICA EM CEPAS DE BACTÉRIAS RESISTENTES OU NÃO AO ANTIMICROBIANO INIBIDOR DA SÍNTESE DE ÁCIDOS NUCLEICOS	27
3.1	RESUMO	28
3.2	ABSTRACT	28
3.3	INTRODUÇÃO.....	29
3.4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.5	Pesquisa de design	30
3.6	Desafio	32
3.7	Coleta de dados.....	32
3.8	Desempenho	33
3.9	Microbiologia	33
3.10	Análise Estatística.....	34
3.11	ANÁLISE DE RESULTADOS.....	34
3.12	Desempenho	34
3.13	Microbiologia	36
3.14	CONCLUSÕES	39
3.15	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
4.1	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
5.	Anexo A – Aprovação Comissão de Ética	48

1. INTRODUÇÃO

A descoberta da penicilina no final da década de 20 por Alexander Fleming foi um grande marco na ciência do século XX, pois nesta época iniciaram-se as descobertas em torno dos antimicrobianos. Recurso este que é amplamente utilizado nos dias de hoje para o controle da incidência de infecções bacterianas (BROWN, 2005; PEREIRA; PITA, 2005).

Os antimicrobianos atuam sobre alvos específicos nos microrganismos, alterando a expressão de proteínas ou enzimas, que são importantes para o metabolismo da célula bacteriana. No entanto, a descoberta de medicamentos antimicrobianos é singularmente difícil, devido à baixa penetração dos compostos nas células bacterianas, por esta razão, quanto mais específicas estas ações, mais eficiente é o antimicrobiano (BLAIR et al., 2014; LING et al., 2015).

A resistência bacteriana é um fenômeno espontâneo de preservação da espécie, entretanto existe a possibilidade do consumo elevado de antimicrobianos ao longo dos anos ter propiciado uma adaptação acelerada dos mecanismos de resistência, aumentando assim o número de bactérias resistentes a diversos antimicrobianos (WHO, 2014).

O termo resistência se dá, quando as concentrações do antimicrobiano não são suficientes para o controle dos microrganismos, pois eles apresentam mecanismos de resistência específicos para o agente bloqueador. Estas bactérias geralmente apresentam genes que podem gerar uma mutação espontânea de DNA ou por transferência de plasmídeos (LAXMINARAYAN et al., 2013; PAPHITOU, 2013). O termo resistência á antimicrobiano também é utilizado para controle de infecções virais e fúngicas. Entretanto, neste trabalho quando referido o termo resistência a antimicrobiano, a expressão se refere especificamente às bactérias.

Tendo em vista a crescente ameaça para a saúde pública mundial, organizações nacionais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e internacionais como a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), a Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB), Food and Drug Administration (FDA) e a Organização Mundial de Saúde (OMS), reconheceram a relevância do estudo da resistência microbiana e o desenvolvimento de sistemas de vigilância e controle (ANVISA, 2016; FDA, 2012).

A recente descoberta na China, de uma cepa de *E. coli* estirpe SHP45 com resistência mediada por plasmídeos a polimixina, antimicrobiano este que é utilizado

como última alternativa de controle, conduz à discussões importantes sobre a necessidade de novos compostos, visto também que os últimos antimicrobianos descobertos e aplicados são da década de 60 (LIU et al., 2016).

Novos compostos estão sendo estudados em laboratórios, como é o caso da *anthracimycin*, derivado de sedimentos de actinomicetes marinhos, com capacidade significativa para o controle de *Bacillus anthracis* (JANG et al., 2013), e a teixobactina atuante em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a outros antimicrobianos (LING et al., 2015). Descobertas promissoras, mas que necessitam mais estudos para então serem disponibilizados no controle de cepas resistentes.

O presente estudo foi conduzido, comparando o crescimento microbiológico e o desempenho de frangos de corte. Diante do exposto o objetivo do estudo foi realizar um comparativo microbiológicos sobre a resistência de antimicrobianos aplicados a saúde humana e animal, sobretudo se estas bactérias resistentes podem apresentar um risco duplo de contaminação e patogenicidade.

1.1 OBJETIVO GERAL

Comparativo microbiológico de cepas de bactéria resistente ou não a antimicrobiano inibidor da síntese de ácidos nucleicos.

1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Comparativo estatístico da microbiologia em indivíduos semelhantes sem desafio, com inoculados com cepas de *Salmonella* Enteritidis.

Comparativo estatístico da microbiologia em indivíduos inoculados com cepa resistente a antimicrobiano inibidor da síntese de ácidos nucleicos.

Comparativo estatístico do desempenho de aves desafiadas e não desafiadas com *Salmonella* Enteritidis.

**2. CAPÍTULO 1 REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE AÇÃO DOS
ANTIBIÓTICOS NAS BACTÉRIAS E A CAPACIDADE ADAPTATIVA DE
RESISTÊNCIA AOS MESMOS**

REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE AÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS NAS BACTÉRIAS E A CAPACIDADE ADAPTATIVA DE RESISTÊNCIA AOS MESMOS

SYSTEMATIC REVIEW ON THE ACTION OF ANTIBIOTICS IN BACTERIA AND THE ADAPTATIVE CAPACITY OF RESISTANCE TO THE SAME

2.1 RESUMO

O crescimento gradual da resistência apresentada por bactérias aos antimicrobianos destaca a necessidade de estudos que avaliem constantemente a circulação de cepas resistentes, tendo em vista a capacidade de disseminação das características pertinentes à adaptação, para outras espécies. A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode ocorrer tanto de forma natural (divisão celular) como adquirida (transformação, conjugação e conjunção). O crescente isolamento de bactérias apresentando resistência a um ou vários antimicrobianos provenientes de fontes biológicas ou quimioterápicas, é considerado alarmante e tem se constituído uma importante adversidade na saúde pública. Considerando a extensão do tema, faremos uma breve revisão sobre os mecanismos de resistência bacteriana a antimicrobianos.

Palavras-chave: Resistência, antimicrobiano, mecanismos de resistência.

2.2 ABSTRACT

The gradual growth of the resistance presented by bacteria to the antimicrobials highlights the need for studies that constantly evaluate the circulation of resistant strains, considering the capacity of dissemination of the characteristics pertinent to the adaptation, for other species. Bacterial resistance to antimicrobials can occur both naturally (cell division) and acquired (transformation, conjunction and conjugation). The increasing isolation of bacteria presenting resistance to one or more antimicrobials from biological or chemotherapeutic sources is considered alarming and has constituted an important adversity in public health. Considering the extension of the topic, we will briefly review the mechanisms of bacterial resistance to antimicrobials.

Key words: Resistance, antimicrobial, mechanisms of resistance.

2.3 INTRODUÇÃO

Os primeiros relatos dos antimicrobianos advêm de 4.000 anos atrás, onde papiros expunham que chineses utilizavam bolores para tratar tumores e feridas, uma

utilização oriunda do conhecimento empírico, muitas vezes aplicada pela tentativa e erro (CHAMBERLAIN, 2015).

Ao contrário da crença comum de que a utilização dos antimicrobianos está confinada à "era moderna", algumas pesquisas revelam que este não é o caso. Evidências histológicas de 350-550 D.C. relatam a utilização de tetraciclina em populações de vários sítios arqueológicos no Egito, Sudão, e Jordânia, utilizando microscopia de fluorescência na ossatura, foram observadas evidências de deposição de coloração de amarelo-verde fluoróforo, semelhante ao produzido por tetraciclina, sugerindo uma exposição significativa da população ao antimicrobiano, evidenciando que eles poderiam ter produzido misturas de fermentação contendo culturas de *Streptomyces* sp. ou outras espécies que conferiam efeitos nutritivos e farmacológicos (AMINOV, 2010; NELSON et al., 2010).

A utilização empírica de derivados de microrganismos já era presente em 1928, quando Alexander Fleming, buscando uma substância que pudesse ser usada no combate a infecções bacterianas, descobriu por uma série de coincidências, a ação bactericida do fungo *Penicillium*. Fleming trabalhava com placas de cultura de *Staphylococcus aureus* responsável na época, por graves infecções no corpo humano. Ao se ausentar as esqueceu na bancada e em seu retorno, semanas depois, percebeu que algumas dessas placas estavam contaminadas com mofo. Discutindo com Merlin Pryce, seu assistente, Fleming notou que em uma das placas havia uma área transparente ao redor do mofo, indicando que não havia bactérias naquela região, visivelmente o fungo que tinha ocasionado o mofo secretava substâncias que suprimiam o crescimento das bactérias (CUTLER, 2004; BROWN, 2005; DOSANI, 2005).

Posteriormente, descobriu-se que a penicilina controlava também o crescimento de outros tipos de bactérias, sem apresentar toxicidade ao corpo humano, podendo assim ser usada como medicamento. Inicialmente esta descoberta não despertou maior interesse pela comunidade científica. Foi somente com a eclosão da Segunda Guerra Mundial, em 1939, que dois cientistas, Howard Florey e Ernst Chain, retomaram as pesquisas e conseguiram produzir penicilina com fins terapêuticos em escala industrial (KARDOS; DEMAIN, 2013; ALHARBI et al., 2014).

Apesar de relatos sobre a utilização de antimicrobianos ser de muitas décadas. Waksman em 1943 descreveu-o como substâncias sintetizadas por microrganismos, sendo capaz de agir como tóxicos seletivos, em pequenas concentrações (WAKSMAN; FLYNN, 1973; GILLINGS, 2013).

Na produção animal, a introdução de antimicrobianos às rações deu-se a partir das descobertas de Moore et al. (1946), onde foram obtidos resultados significativos na melhoria do crescimento em aves suplementadas com estreptomicina. Além do benefício inicial também foi observada uma redução acentuada nas bactérias coliformes. Posteriormente, Lev & Forbes (1959) verificaram que esta dinâmica de melhorias no crescimento não era presente em aves livres de patógenos específicos (SPF - *Specific Pathogen Free*), mas que a presença do antimicrobiano controlou o desenvolvimento de *Clostridium welchii* no intestino dos animais podendo amenizar a perda de peso corporal devido ao desafio. Desde então muitos estudos vêm demonstrando as alterações no desempenho e resposta imune ocasionada pela adição dos promotores de crescimento na produção animal (ABU-ELALA, 2013; KABPLOY et al., 2016; KIM et al., 2016; PALAMIDI et al., 2016).

Esta breve revisão sistemática tem como objetivo relatar algumas questões básicas sobre os mecanismos de ação dos antibióticos e resistência adotados pelas bactérias para combater a ação dos mesmos.

2.4 Classificação e mecanismos de ação dos antimicrobianos

Apesar da descoberta da penicilina ter sido evidenciada em 1928, os indícios de novos antimicrobianos somente tiveram início na década de 1940. O método utilizado por Selman Waksman para a descoberta da estreptomicina e a descrição para o conceito de antimicrobiano, foi amplamente adotado pela indústria farmacêutica e proporcionou que as principais classes de antimicrobianos fossem descobertas ao longo dos 40 anos seguintes, algumas sendo demonstradas na Figura 1 (SILVER, 2011; LEWIS, 2012).

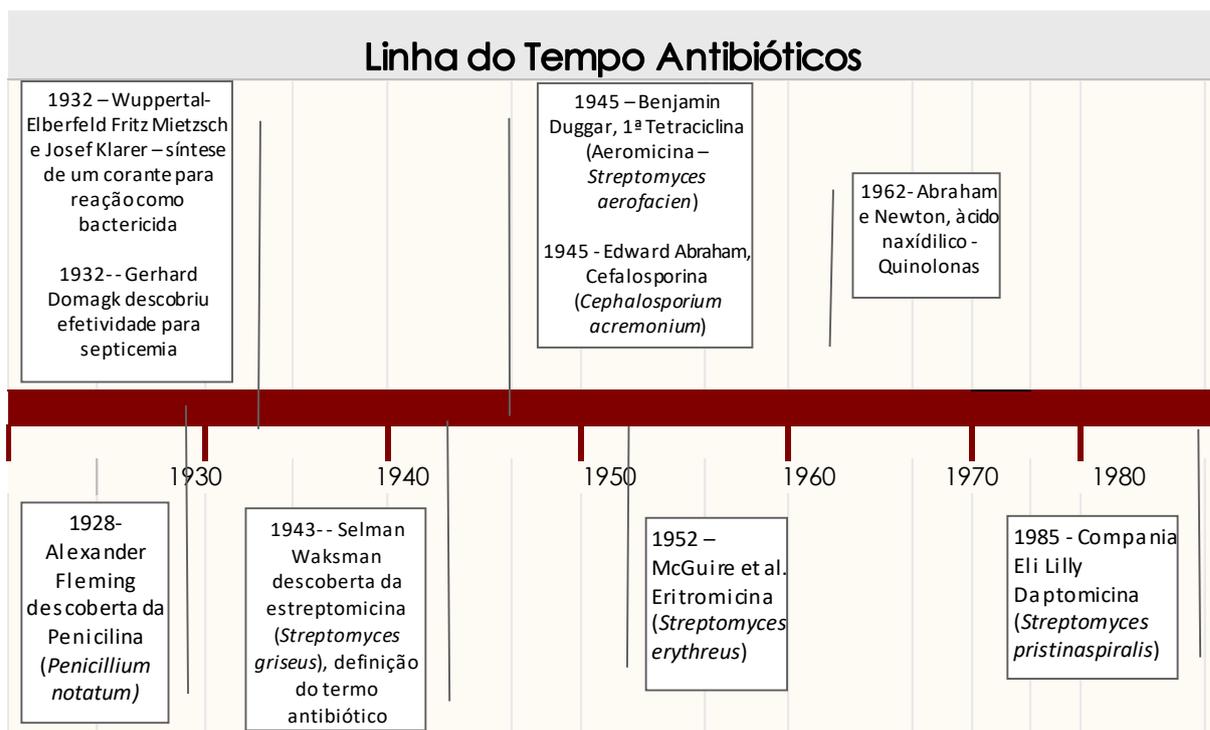


Figura 1 - Linha do tempo

Fonte: Adaptado de Chabner; Brunton; Knollman, (2011); Lewis, (2012)

Os antimicrobianos podem ser efetivos mesmo em baixas concentrações, e quando presentes no metabolismo da bactéria podem ser capazes de inibir a sua multiplicação, neste caso, apresentando ação bactericida que se atribui às interações específicas de cada classe de antimicrobiano, podendo também interromper ou inibir algumas funções metabólicas geralmente ligadas às subunidades 30S e 50S do ribossoma, sendo então, um agente de ação bacteriostática (KOHANSKI et al., 2007; OCAMPO et al., 2014).

Posteriormente foi verificada a presença de moléculas com potencial antimicrobiano que também derivam de plantas, sendo assim definidos como quimioterápicos. Este conceito abrange substâncias sintetizadas em laboratório ou de origem vegetal, que apresentam toxicidade baixa para as células normais do hospedeiro, e alta para o agente patogênico (CHABNER; BRUNTON; KNOLLMAN, 2011; TAVARES, 2014).

Os antimicrobianos não possuem classificação padrão aplicada aos seus compostos. Pode-se classificá-los baseando-se nos microrganismos susceptíveis, em sua origem, atividade antibacteriana, mecanismo de ação e espectro de ação conforme Tabela 1. Para esta revisão será adotada a classificação por *mecanismos de ação dos antimicrobianos*, método este também utilizado pela ANVISA.

TIPO	CLASSIFICAÇÃO	EXEMPLO
Microrganismos suscetíveis	Antibacterianos	Beta-lactâmico
	Antifúngicos	Griseofulvina
	Antivirais	Aciclovir
	Antiparasitários	Pirimetamina
Origem do antimicrobiano	Antimicrobianos: produzidos por microrganismos	Aminoglicosídeo
	Quimioterápicos: sintetizados em laboratório	Sulfamidas
Atividade antibacteriana	Bactericida: matam os microrganismos	Quinolona
	Bacteriostático: inibem a multiplicação dos microrganismos, sendo necessária a atuação do sistema imunitário para eliminação do agente.	Macrolídeos
Mecanismo de Ação	Alteração de parede celular	Beta-lactâmico
	Alteração de membrana citoplasmática	Anfotericina B
	Interferência na replicação cromossômica	Antifúngicos/antivirais
	Inibição da síntese proteica	Aminoglicosídeo
Espectro de Ação	Inibição metabólica	Sulfonamida
	Espectro para Gram-positivas	Penicilina
	Espectro para Gram-negativas	Aminoglicosídeos
	Amplio espectro	Cloranfenicol
	Ativo sobre protozoários	Tetraciclina
	Ativo sobre fungos	Nistatina
	Ativo sobre espiroquetas	Eritromicina
	Ativo sobre riquetsias, micoplasma e clamídias	Macrolídeos
Ativo sobre micobactérias	Estreptomicina	
Ativo sobre algas	Anfotericina B	

Tabela 1 – Tipos de Classificação dos antimicrobianos

Fonte: Adaptado de Chabner; Brunton; Knollman (2011); Spinosa (2011); Tavares (2014); ANVISA (2016).

Nesta classificação da Tabela 1 são apresentados cinco subgrupos, observando que substâncias do mesmo grupo apresentam mecanismos de ação semelhantes e partilham total ou parcialmente os microrganismos sobre os quais atuam (WALSH, 2000; TAVARES, 2014).

Na Tabela 2 estão apresentados os representantes do grupo pelo mecanismo de ação, bem como seu espectro de ação e alguns possíveis mecanismos de resistências adquiridos pelas bactérias para driblar a ação destes fármacos.

Inibidores da Parede Celular				
Classe	Grupos	Espectro de ação		Mecanismos de resistências
Beta-lactâmicos	Penicilinas	Gram +	Gram -	Produção de β-lactamases;
	Carbapenemes	Gram +	Gram -	Modificações das proteínas ligadoras de penicilina;
	Cefalosporinas	Gram +	Gram -	Diminuição da permeabilidade por modificações nas porinas;
	Monobactâmicos	Gram -		
Glicopeptídeos	Vancomicina	Gram +		Alterações genéticas na bactéria (gen vanA);
	Teicoplanina	Gram +		Espessamento da parede celular bacteriana;
Inibidores da Membrana Celular				
Classe	Grupos	Espectro de ação		Mecanismos de resistências
Lipopeptídeos	Daptomicinas	Gram +		Mutações pontuais que conduzem a retirada do fármaco do meio intracelular
	Equinocandinas			
Polipeptídeos	Polimixinas	Gram -		Mecanismos naturais de seleção da membrana
	Tirotrincinas			
	Bacitracinas			
	Capreomicinas			
Inibidores da Síntese Proteica				
Classe	Grupos	Espectro de ação		Mecanismos de resistências
Aminoglicosídeos	Estreptomicina	Gram -		Alteração dos sítios de ligação no ribossomo; Alteração na permeabilidade; Modificação enzimática da droga.
	Gentamicina			
	Tobramicina			
	Aminacina			
	Neomicina			
	Espectromicina			
Tetraciclina e Cloranfenicol	Minociclina	Gram +	Gram -	Inativação enzimática da molécula do antibiótico, alteração da permeabilidade da membrana, bombas de efluxo e alterações do alvo
	Doxiciclina	Gram +	Gram -	
	Cloranfenicol	Gram -		
Macrolídeos	Azitromicinas	Gram +	Gram -	Diminuição da permeabilidade da célula; Alteração no sítio receptor da porção 50S do ribossoma; Inativação enzimática.
	Eritromicinas			
	Espiramicinas			
	Roxitracinas			
	Diritromicinas			
	Claritromicinas			
Inibidores da Síntese de ácidos nucleicos				
Classe	Grupos	Espectro de ação		Mecanismos de resistências
Quinolonas	Fluoroquinolonas	Gram +	Gram -	Alteração de permeabilidade e hiperexpressão de bombas de efluxo;
				Alterações do sítio de ação (topoisomerases); Resistência mediada por plasmídeos; Alteração enzimática da molécula do antimicrobiano.
Antituberculoso	Rifampicina	Gram +	Gram -	Mutações da RNA-polimerase bacteriana
Antiparasitário	Metronidazol	Gram +	Gram -	Alteração de genes para produção de enzima redutase

Tabela 2 - Classificação dos antimicrobianos – Mecanismos de ação.

Fonte: Adaptado de Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

O primeiro grupo apresentado na Tabela 2 são antimicrobianos ativos na parede celular da bactéria, antimicrobianos que envolvem a inibição da síntese de peptídeoglicanos, base estrutural da parede celular, podem causar a autólise enzimática e alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática, ocasionando a interferência na síntese de RNA citoplasmático. Portanto são geralmente bactericidas, as células bacterianas podem sofrer a lise celular em uma série de maneiras diferenciadas, exemplos dos quais incluem: (I) despolarização da membrana-; (II) danos nos processos intracelulares, tais como a síntese macromoléculas, a degradação da parede celular, ou a alteração da composição lipídica na bicamada da membrana ou em casos extremos, (III) a desintegração da membrana e micelização (PAPO & SHAI, 2005; SPINOSA, 2011).

O segundo grupo da Tabela 2 de antimicrobianos atuam inibindo a síntese da membrana plasmática, representado pelas classes de lipopeptídeos e polipeptídeos, realiza a despolarização do potencial de membrana e aumenta a sua permeabilidade (QUINN et al., 2005; CHABNER; et al. 2011). Neste grupo estão presentes as daptomicinas, um antimicrobiano que apresenta atividade antimicrobiana *in vitro* aos enterococos resistentes à vancomicina, e por esta razão têm sido recomendados em situações controladas. A agregação de lipídios pela daptomicinas produz alterações locais na curvatura de membrana. A alteração na curvatura do folheto externo é repassada com uma alteração na curvatura interna, levando a célula a identificar incorretamente um local e potencializar a divisão celular, causando assim a inibição localizada da biossíntese da parede celular (POGLIANO et al. 2012; TRAN et al., 2013).

O terceiro grupo desta mesma tabela, são os inibidores da síntese proteica, geralmente ligam-se à fração 30S ou 50S do ribossoma, inibindo assim a síntese de RNA ou perturbando a sua conformação, o que prejudica gravemente a sua capacidade para decodificar com precisão o RNA mensageiro (RNA-m), também alterando a fixação do RNA-m ribossomal; por alterações no ribossoma ou na fixação do RNA de transporte ao ribossoma (KOHANSKI et al., 2007; DEMIRCI et al., 2013).

Já os antimicrobianos inibidores da síntese de ácidos nucleicos, presentes no quarto grupo, têm como principal ação a inibição da síntese de RNA, um dos mecanismos envolvidos é o de interagir com enzimas essenciais na replicação do DNA, como é o caso das enzimas topoisomerases, que mantem o estado condensado do ácido nucleico e são reguladores críticos no processo de tradução e replicação celular. A enzima responsável é a DNA-girase (uma topoisomerase do tipo II responsável pela quebra de cadeias duplas de DNA), têm a função de catalisar a remoção da força de torção que se acumula nos

cromossomas bacterianos. Esta resposta garante a reparação do DNA e a sobrevivência de células. As quinolonas são inibidoras das subunidades A da DNA-girase e com isso relaxam o fragmento, ocupando um espaço maior do que o contido na bactéria (QUINN et al., 2005; JARA et al., 2016).

Os inibidores dos processos metabólicos são constituídos por antimicrobianos do grupo das Sulfonamidas que possui atualmente uma associação comercial de trimetoprim com sulfametoxazol, designada cotrimoxazol[®]. Seu espectro de ação atinge bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, têm efeito bacteriostático e inibem o metabolismo do ácido fólico, por mecanismo competitivo. A resistência bacteriana pode ocorrer por alteração do local de ação e da sensibilidade das enzimas alvo (MIETZSCH, 1938; BUZÁS, 2015).

Em cada mecanismo de ação dos antimicrobianos existem fatores relacionados à estrutura individual do organismo, bem como seus mecanismos de defesa natural.

2.5 Mecanismos de ação da resistência bacteriana a antimicrobianos

Em seu discurso para receber o prêmio Nobel de 1945, Alexander Fleming já expunha um conceito para as resistências bacterianas à penicilina. No momento em questão chamou à atenção a administração de antimicrobianos, pois a utilização incorreta dos mesmos poderia ocasionar efeitos adversos ao esperado, causando uma possível resistência (FLEMING, 1945). O surgimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos ainda é um dos grandes desafios da saúde pública em todo o mundo, tanto sob o ponto de vista econômico, quanto da saúde humana. (BUSH et al., 2011; LAXMINARAYAN et al., 2013).

As bactérias podem apresentar duas formas diferentes de resistência, sendo estas divididas em resistência intrínseca ou adquirida devido a mutações (BUSH et al., 2011; CHABNER et al. 2011; D. WRIGHT, 2011; WELLINGTON et al., 2013; BLAIR et al., 2014; RUER et al., 2015). Na Figura 2, são apresentados as formas e mecanismos de resistência bacterianos expostos nesta revisão.

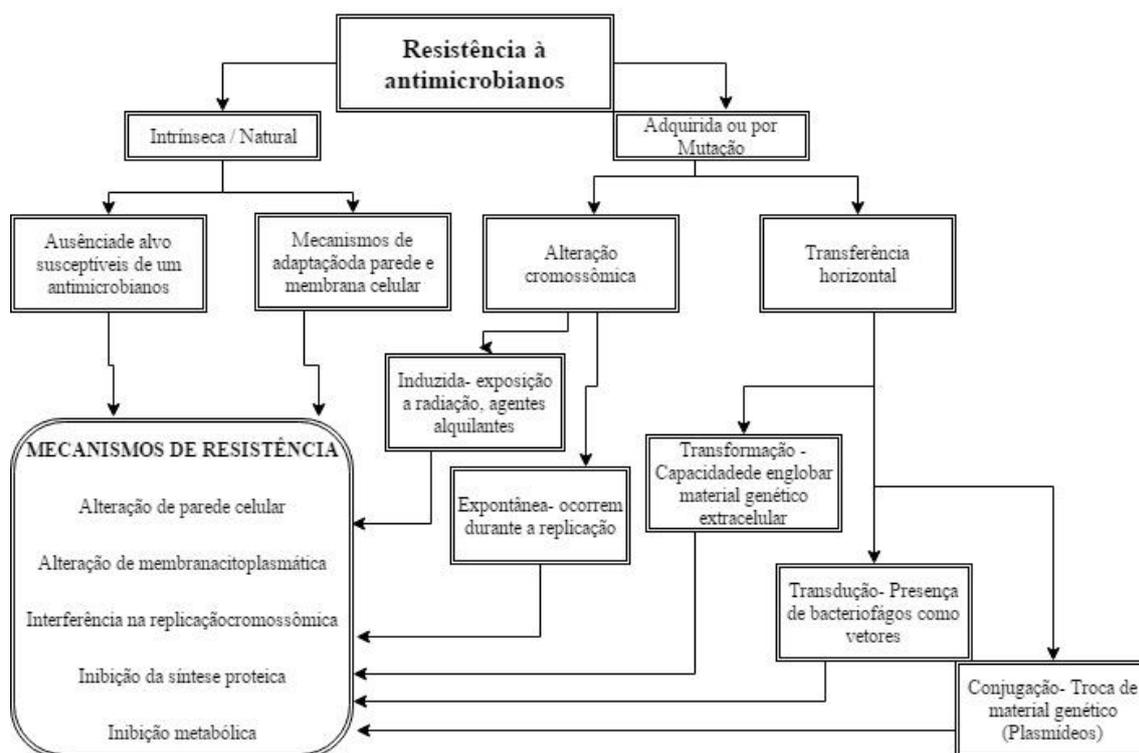


Figura 2 – Mecanismos de resistência dos antimicrobianos

Fonte: Adaptado de Chabner; Brunton; Knollman (2011); Spinosa (2011); Tavares (2014); ANVISA (2016).

2.6 Resistência bacteriana intrínseca

A resistência natural está ligada a capacidade de resistir à ação nociva do antimicrobiano na bactéria. Um exemplo pode ser a aplicação do lipopeptídeo daptomicina, que atua sobre bactérias Gram-positivas, mas perde sua eficácia em bactérias Gram-negativas. Isso se deve provavelmente devido à baixa proporção de fosfolípidios aniônicos nas bactérias Gram-negativas, resultando em locais insuficientes para a ligação de Ca^{2+} , prejudicando a inserção necessária para a daptomicina exercer seu efeito antibacteriano. Desta forma não podendo ser considerada como um potencial antimicrobiano contra os agentes patogênicos Gram-negativos (TALLY; DEBRUIN, 2000; RANDALL et al., 2013).

Alguns fatores importantes da resistência natural são, a incapacidade de alguns compostos atravessarem a membrana externa da bactéria, por estas possuírem mecanismos mais específicos de permeabilidade, a ausência de algum processo metabólico influenciável pelo antimicrobiano e a existência de enzimas que apresentem a capacidade de inativá-los (CHABNER et al. 2011; LING et al., 2015).

2.7 Resistência bacteriana adquirida ou por mutação

As alterações genéticas que causam essas resistências podem ocorrer pela mutação de um gene bacteriano no cromossoma (Alteração cromossômica) ou pela aquisição de um gene de resistência (Transferência horizontal) a partir de outros organismos por alguma forma de troca genética (conjugação, transdução ou transformação). No caso de aquisição ou transferência, os genes de resistência a antimicrobianos exógenos são encontrados em alguns elementos genéticos móveis (plasmídeos e bacteriófagos) ou material genético extracelular (CHABNER et al. 2011; D. WRIGHT, 2011). No caso de alterações cromossômicas, estas podem ocorrer de forma induzidas ou espontâneas (ITO et al., 2003; NEIDHARDT, 2004).

A resistência por alteração cromossômica dependente da mutação espontânea sucedida pela replicação do DNA por alguma deleção, substituição ou adição na estrutura dos nucleotídeos. Já as alterações cromossômicas induzidas devem-se a exposição constata a radiações ou agentes alquilantes. Eventos raros são dirigidos quase sempre a uma só droga e os genes são transferidos com frequência relativamente baixa (BUSH et al., 2011; LOUREIRO et al., 2016).

No caso de mutações por transferência horizontal, a aquisição dos genes de resistência por transformação é um processo de incorporação pela bactéria, de fragmentos totais ou parciais de DNA exógeno. Esses fragmentos de DNA podem ser proveniente do resíduo de plasmídeos ou de uma célula que sofreu lise e contém códons de expressão gênica com genes de resistência incorporados que passaram para a bactéria incorporadora e se tornaram ativos em determinadas condições de desafios a antimicrobianos (NEIDHARDT, 2004; PALMER & KISHONY, 2013).

No processo de transdução existe a atividade de um vetor transportador, os bacteriófagos (também designados fagos). Estes fagos quando presentes em bactérias com genes resistentes, podem incorporar pequenos fragmentos de DNA, pois utilizam do DNA bacteriano para sua própria replicação. Ao infectar uma nova bactéria transportam estes genes, podendo ser incorporados pelo DNA bacteriano que expressar a determinada resistência (CHABNER et al. 2011; MUNIESA; COLOMER-LLUCH & JOFRE, 2013).

A conjugação ocorre entre células bacterianas, da mesma ou de diferentes espécies, que ao entrarem em contato direto trocam pequenas porções de material genético, como plasmídeos. Certos plasmídeos possuem genes responsáveis pela síntese

de enzimas que destroem um antimicrobiano antes que ele destrua a bactéria. São os chamados plasmídeos R (de resistência aos antimicrobianos). Eles também possuem genes que permitem sua passagem de uma bactéria para outra (fator F). Quando dois ou mais tipos de plasmídeos R estão presentes em uma mesma bactéria, os genes de um deles podem passar para outro por recombinação gênica. Esse mecanismo faz com que surjam plasmídeos R portadores de diversos genes para resistência a diferentes antimicrobianos (NEIDHARDT, 2004; D. WRIGHT, 2011; OCAMPO et al., 2014). Os plasmídeos podem estar integrados no cromossomo, sendo capazes de transferir genes cromossômicos (WALSH, 2000; BLAIR et al., 2014; TAVARES, 2014).

Na forma de resistência genética adquirida ou por mutação podem ocorrer três diferentes mecanismos efetivos e específicos de resistência bacteriana a antimicrobianos sendo: alteração da molécula alvo do antimicrobiano, alteração da permeabilidade de membrana, degradação enzimática do antimicrobiano (BLAIR, 2014).

A alteração de moléculas alvo do antimicrobiano é a diminuição ou até mesmo ausência da afinidade do antimicrobiano ao local de ação, que pode se observar na resistência adquirida pelas bactérias de *S. pneumoniae* aos macrolídeos que alteram o alvo de ação do antimicrobiano no ribossoma (LECLERCQ, 2002; TENOVER, 2006).

Alterações da permeabilidade de membranas, previnem a acumulação intracelular do antimicrobiano e pode ocorrer diminuindo a entrada do fármaco ou aumentando seu efluxo para fora da célula. Modificações genéticas nas porinas diminuem a entrada do fármaco no interior da bactéria, um exemplo é a resistência a fosfomicina apresentada por bactérias Gram-positivas, que não possuem um sistema de transporte muito complexo (HAWKEY, 1998; FORBES et al. 2007). As bactérias também podem diminuir a concentração do antimicrobiano intracelular por aumentar as bombas de efluxo, mecanismo que resulta na atividade de proteínas que promovem o rápido bombeamento do antimicrobiano indo do meio intracelular para o meio extracelular. Este processo é feito por transporte ativo, ou seja, com gasto energético (SPINOSA, 2011; BLAIR et al., 2014; LIU; XIE, 2014). As bombas de efluxo da estirpe *Bacillus licheniformis* são compostas por 3 proteínas, BcrA, BcrB e BcrC, capazes de promover a resistência a este fármaco. A bactéria *E. coli* também apresenta a proteína tipo BcrC, responsável pela resistência a bacitracina, e algumas proteínas ligadas a resistência à quinolonas (TENOVER, 2006; PONS et al., 2014).

A degradação enzimática do antimicrobiano está associada à produção de enzimas pelas bactérias, capazes de degradar ou inativar o antimicrobiano. Já foram

descritas enzimas como as esterases e fosfotransferases responsáveis pela inativação de macrólídeos como a eritromicina em bactérias da família das Enterobacteriaceae, como *Escherichia* sp. ou *Klebsiella* sp. Em *S. aureus* também já foram descritas enzima fosfotransferases responsável pela elevada resistência contra macrólídeos, lincosamidas (Clindamicina e Lincosamida) e estreptogramina B (LECLERCQ, 2002; DULHUNTY et al., 2013).

2.8 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que existem diferentes mecanismos de resistência nas bactérias aos antibióticos, demonstrando que a capacidade adaptativa destes organismos é altamente estruturada. A utilização inadequada e indiscriminada de antimicrobianos altera a resposta adaptativa bacteriana e provoca o agravante da resistência. As bactérias sempre encontrarão mecanismos para sua sobrevivência, sendo de extrema importancia estudos e monitoramentos sobre estes mecanismos, assim como buscar novas ferramentas para o controle de bactérias resistentes.

2.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-ELALA, N.; MARZOUK, M.; MOUSTAFA, M. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 21–29, 2013.

ALHARBI, S. A. et al. What if Fleming had not discovered penicillin? **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 4, p. 289–293, 2014.

AMINOV, R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, p. 134, 2010.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde**. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/cEv>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2014.

BROWN, K. **Penicillin Man: Alexander Fleming and the Antibiotic Revolution**. Brimscombe Port: The History Press, 2005.

BUSH, K. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 894–6, 2011.

BUZÁS, G. M.; SUPURAN, C. T. The history and rationale of using carbonic anhydrase inhibitors in the treatment of peptic ulcers. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.31, n.4, p. 1–7, 2015.

CHABNER, B.; BRUNTON, L.; KNOLLMAN, B. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. ed. California: McGraw-Hill Education, 2011.

CHAMBERLAIN, R. From bark to bacteria: the natural sources of modern medicine. **Biochemical Society**, december, 2015.

CUTLER, S. J. Penicillin Man: Alexander Fleming and the Antibiotic Revolution. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 444–445, 2004.

D. WRIGHT, G. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical Communications**, v. 47, n. 14, p. 4055–4061, 2011.

DEMIRCI, H. et al. A structural basis for streptomycin-induced misreading of the genetic code. **Nature Communications**, v. 4, p. 1355, 2013.

DOSANI, S. Book: Penicillin Man: Alexander Fleming and the Antibiotic Revolution. **BMJ : British Medical Journal**, v. 330, n. 7481, p. 50, 2005.

DULHUNTY, J. M. et al. Continuous infusion of beta-lactam antibiotics in severe sepsis: a multicenter double-blind, randomized controlled trial. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 56, n. 2, p. 236–44, 2013.

FDA. El compromiso mundial Administración de Alimentos y Medicamentos de los EUA. **Food and Drug Administration**. 2012.

FLEMING, A. **Penicillin Nobel Lecture**. Stockholm, 1945.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Diagnostic Microbiology**. 12. ed. St. Louis: Evolve, 2007.

GILLINGS, M. R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 4, 2013.

HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **BMJ - British Medical Journal**, v. 317, n. 7159, p. 657–60 1998.

ITO, T. et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resistance Updates**, v. 6, n. 1, p. 41–52, 2003.

JANG, K. H. et al. Anthracimycin, a Potent Anthrax Antibiotic from a Marine-Derived Actinomycete. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 30, p. 7822–7824, 22 jul. 2013.

JARA, L. M. et al. Novobiocin Inhibits the Antimicrobial Resistance Acquired through DNA Damage-Induced Mutagenesis in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 637–639, jan. 2016.

KABPLOY, K. et al. Effect of Antibiotic Growth Promoters on Anti-oxidative and Anti-inflammatory Activities in Broiler Chickens. **Thai Journal Veterinary Medical**, v. 46, n. 1, p. 89–95, 2016.

KARDOS, N.; DEMAIN, A. L. Ernst Chain: a great man of science. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 15, p. 6613–6622, 22 ago, 2013.

KIM, J. et al. Effects of the Antibiotics Growth Promoter Tylosin on Swine Gut Microbiota. **Journal of microbiology and biotechnology**, v.6, n.5, p.876-882, 12 fev, 2016.

KOHANSKI, M. A. et al. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 797–810, 2007.

LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057–1098, 2013.

LECLERCQ, R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 482–492, 15 fev. 2002.

LEV, M. & FORBES, M. Growth responde to dietary penicilin of germ-free chicks with a defined intestinal flora. **British Journal of Nutrition**. v.13, p. 78-84, 1959.

LEWIS, K. Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. **Nature**, v. 485, n. 7399, p. 439–440, 23 maio 2012.

LING, L. L. et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 455–459, 7 jan, 2015.

LIU, H.; XIE, J. Comparative Genomics of *Mycobacterium tuberculosis* Drug Efflux Pumps and Their Transcriptional Regulators. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 24, n. 2, p. 163–180, 2014.

LIU, Y.-Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, fev. 2016.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de Antimicrobianos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v.34, n.1, p.77-84, 2016.

- MIETZSCH, F. Zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionskrankheiten. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 71, n. 1, p. A15–A28, 1938.
- MOORE, P. R. et al. Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick*. **Journal Biotechnology Chemotherapy**, v. 165, p. 437–441, 1946.
- MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465–470, 2005.
- MUNIESA, M.; COLOMER-LLUCH, M.; JOFRE, J. Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. **Future microbiology**, v. 8, n. 6, p. 739–51, 23 jun. 2013.
- NEIDHARDT, F. C. **Bacterial genetics Sherris Medical Microbiology - An introduction to infectious diseases**. 4. ed. Michigan: McGraw-Hill Education, 2004.
- NELSON, M. L. et al. Brief communication: Mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350-550 CE. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 143, n. 1, p. 151–154, 2010.
- OCAMPO, P. S. et al. Antagonism between Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotics Is Prevalent. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4573–4582, 1 ago. 2014.
- PALAMIDI, I. et al. Probiotic form effects on growth performance, digestive function, and immune related biomarkers in broilers. **Poultry science**, p.052, 4 mar. 2016.
- PALMER, A. C.; KISHONY, R. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. **Nature reviews. Genetics**, v. 14, n. 4, p. 243–8, abr. 2013.
- PAPHITOU, N. I. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, p. S25–S28, 2013.
- PAPO, N.; SHAI, Y. Visions & Reflections Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. **CMLS, Cell Molecular Life Science**, v. 62, p. 784–790, 2005.
- PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. ALEXANDER FLEMING (1881-1955) Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras História**, v. 6, p. 129–151, 2005.
- POGLIANO, J.; POGLIANO, N.; SILVERMAN, J. A. Daptomycin-Mediated Reorganization of Membrane Architecture Causes Mislocalization of Essential Cell Division Proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 17, p. 4494–4504, 1 set. 2012.
- PONS, M. J. et al. Analysis of quinolone-resistance in commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from infants in Lima, Peru. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 1, p. 22–8, jan. 2014.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RANDALL, C. P. et al. The Target of Daptomycin Is Absent from *Escherichia coli* and Other Gram-Negative Pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 637–639, 1 jan. 2013.

RUER, S. et al. Virulence-targeted Antibacterials: Concept, Promise, and Susceptibility to Resistance Mechanisms. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, n. 4, p. 379–399, out. 2015.

SILVER, L. L. Challenges of Antibacterial Discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 71–109, 2011.

SPINOSA, H. DE S. **Farmacologia Aplicada À Medicina Veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2011.

TALLY, F. P.; DEBRUIN, M. F. Development of daptomycin for Gram-positive infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 523–526, 2000.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos para o clínico**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2014.

TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. S3–S10, 2006.

TRAN, T. T. et al. Daptomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Diverts the Antibiotic Molecule from the Division Septum and Remodels Cell Membrane Phospholipids. **mBio**, v. 4, n. 4, p. e00281–13–e00281–13, 23 jul. 2013.

WAKSMAN, S. A.; FLYNN, J. E. History of the word “antibiotic”. **Journal of the history of medicine and allied sciences**, v. 28, n. 3, p. 284–6, jul. 1973.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, p. 775–781, 2000.

WELLINGTON, E. M. et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 155–165, 2013.

WHO, W. H. O. **WHO | Antibiotic resistance**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

**3. CAPÍTULO 2 COMPARATIVO DE CONTAGEM MICROBIOLÓGICA DE
CEPAS DE BACTÉRIAS RESISTENTES OU NÃO AO
ANTIMICROBIANO RIFAMPICINA**

COMPARATIVO DE CONTAGEM MICROBIOLÓGICA EM CEPAS DE BACTÉRIAS RESISTENTES OU NÃO A ANTIMICROBIANO RIFAMPICINA

COMPARISON OF MICROBIOLOGICAL COUNT IN RESISTANT STRAINS OF BACTERIA OR ANTIMICROBIAL RIFAMPICIN

3.1 RESUMO

Os mecanismos de resistência das bactérias aos antimicrobianos afetam indivíduos saudáveis e também com o sistema imune comprometido, ambos de diferentes maneiras e intensidades. De qualquer modo é importante compreender como a resistência atua sob o indivíduo em qualquer condição. Deste modo o objetivo deste estudo foi observar o crescimento microbiológico entre bactérias resistentes e não resistentes, acometendo indivíduos semelhantes. Para tanto, submeteu a comparação de crescimento microbiológico e desempenho em frangos de corte, um controle negativo e duas cepas de *Salmonella* Enteritidis. Uma das cepas apresentadas era de origem tradicional e outra possuía uma resistência aos antimicrobianos da família das rifampicinas, que age na síntese de ácidos nucleicos das bactérias. Foram utilizados 108 pintinhos de um dia, machos da linhagem Cobb[®], distribuídos em três tratamentos e aplicadas quatro repetições em grupos de nove aves cada, sendo Tratamento controle (TC), *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Enteritidis resistente (SEres). Aos 9, 14 e 21 dias de idade as aves foram pesadas para análise de conversão alimentar (CA), ganho de peso (GP) e consumo médio de ração (CRM) após eutanasiadas por deslocamento cervical e necropsiadas para coleta de fígado e ceco para contagem microbiológica. Observou-se que nos períodos avaliados não houve diferença estatística no desempenho das aves, mas a contagem microbiológica demonstrou que a bactéria que possuía uma resistência ao antimicrobiano, mesmo sem a presença específica deste, mostrou-se estatisticamente maior ($P \leq 0,05$) em todos os períodos e órgãos. Deste modo observou-se que as bactérias que possuem um mecanismo de resistência a este antimicrobiano apresentaram uma contagem microbiológica maior, comparada as contagens de cepas que não possuíam esta resistência.

Palavras-chave: Resistência bacteriana, ácidos nucleicos, contagem.

3.2 ABSTRACT

The mechanisms of resistance of bacteria to antimicrobials affect healthy individuals and also with the compromised immune system, both in different ways and in intensity. In any case it is important to understand how resistance works under the individual in any condition. Thus the objective of this study was to observe the microbiological growth between resistant and nonresistant bacteria, affecting similar individuals. To do so, it underwent comparison of microbiological growth and performance in broiler chickens, one negative control and two strains of *Salmonella*

Enteritidis. One of the strains presented was of traditional origin and another had antimicrobial resistance in the rifampicin family, which acts on the nucleic acid synthesis of bacteria. A total of 108 male Cobb ® broilers were used in three treatments and four replicates were applied in groups of nine birds each, being Controlled Treatment (CT), Salmonella Enteritidis (SE) and Salmonella Enteritidis resistant (SEres). At 9, 14 and 21 days of age the birds were weighed for analysis of feed conversion (FC), weight gain (WG) and average feed intake (AFI) after euthanasia by cervical dislocation and necropsies for collection of liver and cecum for microbiological counting. It was observed that in the evaluated periods there was no statistical difference in the performance of the birds, but the microbiological count showed that the bacterium that had an antimicrobial resistance, even without the specific presence of it, was statistically higher ($P \leq 0.05$) in all periods and organs. In this way, it was observed that the bacteria that have a mechanism of resistance to this antimicrobial presented a greater microbiological count, compared the counts of strains that did not have this resistance.

Keys works: resistance bacteria, nucleic acid, comparasion.

3.3 INTRODUÇÃO

A resistência á antibióticos constituem uma das maiores preocupações em hospitais e comunidades, dificultando a ação nos indivíduos com a imunidade comprometida, e proporcionando a incorporação de genes de resistência por bactérias não específicas em indivíduos fora do âmbito hospitalar (VELAZQUEZ-ACOSTA, 2016).

O desenvolvimento da resistência é um fenômeno natural utilizado pelos microrganismos para a manutenção e preservação da espécie, a partir da aquisição de genes por processos de transdução, transformação ou conjugação bacteriana (CHABNER et al. 2011; D.WRIGHT, 2011).

A transdução pode ser caracterizada como a transferência de material genético mediada por vírus (bacteriófagos), a transformação corresponde à incorporação de DNA livre, geralmente decorrente da lise celular. E a conjugação consiste no processo de transferência de DNA de uma bactéria para outra, envolvendo o contato entre as duas células (NEIDHARDT, 2004, WANJUGI & HARWOOD, 2013). Porém este método tem passado por uma aceleração de processos seletivos. A pressão exercida pelo uso indevido de antimicrobianos em humanos e animais, e a atual falta de novos antimicrobianos no horizonte para substituir os que se tornam ineficazes, traz mais urgência à necessidade de proteger a eficácia dos medicamentos existentes (WHO, 2014).

Há muitos anos, a OMS promove o monitoramento global da resistência à antibióticos e tomou medidas para consciência da iminente crise da saúde pública, ressaltando também a necessidade de acompanhamento e disponibilização de dados

relevantes para o entendimento dos mecanismos e novas ferramentas para o controle destas bactérias (WANNMACHER, 2004).

O problema envolvendo a resistência aos antimicrobianos não está ligado somente ao processo de anulação ou redução da efetividade deste, mas também a processos de manutenção e evolução biológica, como é demonstrado em estudos realizados por Ferreira (2015), onde é verificado a presença de bactérias resistentes a antimicrobianos, desinfetantes e radiação solar oriundas de águas residuais de hospitais e de estações de tratamento de esgoto (ETE) responsáveis pelo tratamento, este levantamento reforça a necessidade de controle de resíduos, visto que a utilização da água é um movimento cíclico e não finito.

Por questões como estas que a sociedade encontra-se em um momento de decisões e escolhas mais específicas e criteriosas, são ponderados os valores nutricionais, produção, riscos e acima de tudo, benefícios. Desde a diferenciação entre a resistência dita como convencional ou induzida, à ação imediata e futura dos antibióticos, é visado o entendimento por completo de como atuam nos sistemas celulares e imunológicos (HUBER, 2011, VELAZQUEZ-ACOSTA, 2016).

Diante do exposto o objetivo deste trabalho é realizar um comparativo de contagem microbiológica em cepas de bactérias resistentes ou não a um antimicrobiano inibidor da síntese de ácidos nucleicos, buscando comparar se existe um benefício de adaptação exercido pela bactéria possuidora do gene de resistência.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.5 Pesquisa de design

Este estudo foi analisado e autorizado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) do setor de Ciências agrárias da Universidade Federal do Paraná, sob protocolo de número 014/2016 (Anexo A), aprovado em 27 de abril de 2016. Sendo o experimento *in vivo* realizado de 03 de maio de 2016 à 24 de maio de 2016, em ambiente controlado, as aves foram alojadas em gaiolas de quatro andares (Figura 3) adequadas para esta espécie animal, com iluminação e aquecimento, onde as bandejas estavam providas de cama de maravalha auto clavadas, para melhor conforto e mantidas em salas com fluxo único de ar em sistema de pressão negativa, previamente limpas e desinfetadas.



Figura 3 – Gaiolas de quatro andares para alojamento das aves.

Fonte: Banco de dados LABMOR – Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia

O estudo utilizou 108 pintinhos machos da linhagem Cobb® de um dia de idade, em um delineamento experimental inteiramente casualizado, distribuídos em três tratamentos (Tabela 1) com quatro repetições de nove aves cada.

A distribuição normal foi realizada pesando e distribuindo as aves em quatro classes. Sendo classificadas como, pesadas (50g e 51g), médias (48g e 49g), leves (46 e 47g) e mistas (onde neste grupo eram incluídas 3 aves pesadas, 3 médias e 3 leves). Cada repetição do tratamento foi composta por uma classe.

Os animais foram mantidos de 1 a 21 dias em temperatura ideal mensurada diariamente, visando o conforto das aves de acordo com a idade estabelecida pela empresa fornecedora das aves (COBB, 2013) com fornecimento de água potável e ração à vontade.

As dietas disponibilizadas encontravam-se formuladas de acordo com a necessidade nutricional, conforme manual da empresa fornecedora das aves (COBB, 2013)

TABELA 1. DESCRIÇÃO DOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS.

Tratamento	Desafio
TC	Tratamento Controle
SE	<i>Salmonella</i> Enteritidis
SEres	<i>Salmonella</i> Enteritidis resistente

3.6 Desafio

O procedimento para inocular as aves com o desafio respectivo ao seu tratamento, foi aplicado no laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia da Universidade Federal do Paraná. Culturas contendo *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Enteritidis resistente a rifampicina, eram mantidas em ágar “stock”, foram estriadas e incubadas por 24 horas à 37°C em Ágar Verde Brilhante.

Após a coleta de uma porção de colônias isoladas com um cotonete estéril, este ficou retido por 12 horas à 37°C em caldo de infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion - BHI), posteriormente plaqueada em meio Ágar Mueller Hinton mantendo-a por 24 horas em estufa a 37°C, procedimento este realizado para recuperar as cepas.

Colônias típicas foram transferidas para solução salina estéril a 0,9% e homogeneizada para obter a turbidez de 0,5 na escala de MacFarland, correspondendo assim a uma concentração de 10⁸ UFC (Unidades Formadoras de Colônia) (PICKLER, L. et al. 2012).

Aos sete dias de idade as aves do tratamento T2 foram desafiadas com 1mL da solução de *Salmonella* Enteritidis, e o tratamento T3 com inóculo de *Salmonella* Enteritidis resistente a rifampicina.

3.7 Coleta de dados

As coletas foram realizadas uma vez na semana durante 21 dias iniciando aos 9 de idade das aves e sequenciando aos 14 e 21 dias. Doze aves de cada tratamento foram pesadas para obtenção de seu desempenho, eutanasiadas por deslocamento cervical e necropsiadas para coleta de fígado e íleo e posterior análise microbiológica.

No decorrer do experimento, não houve mortalidade natural, utilizando-se as 108 aves em todo o estudo.

3.8 Desempenho

No momento do recebimento as aves foram pesadas e separadas em quatro grupos de pesos iguais dividindo-as em leves, médias, pesadas e mistas, estando alojadas aleatoriamente com 9 aves em cada repetição, respeitando assim a uniformidade do lote.

Aos sete dias de idade os animais foram anilhados para acompanhamento individual de grupos, gerando assim resultados de ganho de peso (GP) semanal.

Os dados de 1 a 21 dias de idade resultaram em medidas de Consumo médio de ração (CRM), Ganho de peso (GP) e Conversão alimentar (CA), conforme formulas de representação abaixo:

$$GP = PM \text{ final (cor. mort.)} - PM \text{ inicial (cor. mort.)}$$

$$CA = \frac{\text{Consumo Ração}}{\text{Ganho de peso (corrigido)}}$$

$$CMR = \text{Ração Inicial} - \text{Ração final}$$

O consumo de ração foi obtido pela diferença entre os valores de ração oferecida no início e as sobras, corrigidos pela mortalidade. O índice de conversão alimentar foi calculado pela relação entre o consumo de ração e o ganho de peso corrigido pelo peso das aves mortas.

3.9 Microbiologia

A metodologia bacteriológica utilizada foi adaptada de Pickler L. et al. 2012, para o diagnóstico consiste na realização do procedimento de contagem de *Salmonella*. Para tanto, porções de fígados e cecos coletados, foram macerados em água peptonada 2% em proporção de 1:9, sendo este utilizado como um meio de pré-enriquecendo para a seleção bacteriana. Foram então retirados 1 mL da solução de ceco em água peptonada 2% e pipetado em um tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e assim sucessivamente até a diluição 10^{-4} .

Uma alíquota de 100 μ L de cada diluição de ceco foi plaqueada em duplicata em meio Ágar Verde Brillhante, meio altamente seletivo para *Salmonella*, com adição de

novobiocina a 2%. Para a contagem de *Salmonella* Enteritidis resistente foi adicionado também o Antimicrobiano rifampicina as placas de contagem. O líquido foi espalhado na placa com uma alça de drigalsky. As placas foram incubadas em estufa regulada a 35°C por 24h e submetidas a posterior contagem. Colônias típicas róseas foram consideradas positivas para a presença de *Salmonella*.

A solução inicial de fígado em água peptonada 2% foi incubada à 35°C por 24h, então sendo retirados 100 µL e 1 mL da solução inicial em água peptonada 2% e acrescentados em tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e 10 mL de caldo Tetrionato (TT) acrescido de solução iodo-iodetada, respectivamente. Os caldos de enriquecimento seletivo foram incubados em estufa regulada a 42°C por 24h, após este período foram plaqueados com alças esterilizadas e descartáveis, em placas de Ágar Verde Brilhante para confirmação da presença ou ausência de *Salmonella*. Os resultados das contagens de colônias foram expressos de acordo com Procedimentos de Contagem de Colônia de acordo com a Normativa nº62 publicada em 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003).

3.10 Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram analisados pelo programa estatístico Statistix 9 for Windows Copyright 2008, sendo submetidos a análise de variância (ANOVA). Os resultados de contagem de colônias foram transformados em Log¹⁰ previamente à análise estatística. Foram aplicados os testes de Tukey ao nível de significância de P≤0,05 para os dados de desempenho e contagem microbiológica em íleo. Para os dados de fígado os resultados de presença e ausência foram submetidos ao teste de Qui-quadrado.

3.11 ANÁLISE DE RESULTADOS

3.12 Desempenho

Sorovares como SE tem extensa colonização no trato digestório e causam doenças com envolvimento do sistema imunológico, principalmente quando o indivíduo se encontra comprometido imunologicamente, mas de maneira geral as salmonelas

paratíficas não interferem de forma significativa no desempenho zootécnico das aves devido a sua adaptação mais equilibrada com o hospedeiro (GAST E BENSON, 1995).

Na Tabela 2 estão demonstrados os resultados de ganho de peso dos 7 aos 9, 7 aos 14 e 7 aos 21 dias de idade, onde a avaliação estatística não apresentou uma diferença significativa entre os períodos e as diferentes cepas avaliadas.

TABELA 2. Ganho de peso (GP) dos 7 aos 9, 7 aos 14 e 7 aos 21 dias de idade.

Tratamentos		GP 7-9 Dias	GP 7-14 Dias	GP 7-21 Dias
Desafio	Não	69±2,85	334±11,56	778±29,65
	SE	74±3,88	325±12,35	790±17,26
	SEres	70±2,13	300±17,04	835±27,67
Valor de P		0,514	0,219	0,254

Nas análises de consumo médio de ração (CMR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (Tabela 3), pode-se observar que no período de 1 a 21 dias não houve diferença estatística entre os tratamentos.

TABELA 3. Consumo médio de ração (CMR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA), do dia 1 aos 21 de idade.

Tratamentos		CMR 1-21 dias	GP 1-21 dias	CA 1-21 dias
Desafio	TC	1206±47,54	841±40,42	1,43±0,01
	SE	1261±29,16	828±26,63	1,52±0,06
	SEres	1204±48,19	870±32,34	1,38±0,01
Valor de P		0,580	0,666	0,071

Estudo correlato com cepa resistente realizado por Leandro et al. (2010) verificou piores resultados para ganho de peso e conversão alimentar, sugerindo uma infecção capaz de prejudicar o desempenho das aves infectadas por *Salmonella* Enteritidis ao ácido nalidíxico comparando-o ao controle negativo. Dados contrários foram observados em estudo por Tournut (1998), no qual aves desafiadas com cepa de *Escherichia coli* hemolítica apresentaram melhor desempenho.

Estudos realizados por Klasing K. C. (2007) demonstrou que o aumento na produção de células como resposta imunológica resulta em redistribuição e maior gasto

de nutrientes como lisina. Nestes casos a resposta do organismo é a produção aumentada de células e proteínas como as proteínas de fase aguda sintetizadas pelo fígado e consequente piora no desempenho zootécnico.

Baseado nos resultados de prevalência de *Salmonella* no grupo controle, podemos afirmar que as aves neste estudo foram submetidas a baixo desafio sanitário, já que foram criadas em salas experimentais, com reduzido número de aves, não evidenciando a diferença estatística entre os grupos. De acordo com Loddi (2003), o desempenho de aves pode ser alterado em condições de desequilíbrio da microbiota natural.

3.13 Microbiologia

As amostras de fígado e ceco coletadas ao primeiro dia apresentaram resultado negativo para *Salmonella* sp. e o grupo não desafiado permaneceu negativo durante todo o período experimental, indicando o bom isolamento das instalações de alojamento.

O desafio com os diferentes sorovares de *Salmonella* permitiu a colonização do fígado e ceco dos frangos, resultado este que pode ser observado pela positividade encontrada nos resultados.

A análise microbiológica realizada às 48 horas pós-inoculação, 14 e 21 dias de idade dos animais encontram-se descritas na Tabela 4 e na Tabela 5. Apresentando a prevalência em fígado e a contagem em Log¹⁰ (devido à contagem microbiológica expressa em UFC) de ceco respectivamente. Evidenciou-se em ambos os órgãos a diferença estatística ($P \leq 0,001$) entre SÉres comparando com o Tratamento controle e tratamento com SE sem a resistência.

TABELA 4 – Presença e ausência de *Salmonella* Enteritidis em fígado às 48 horas Pós-inoculação (PI), 14 e 21 dias de idade das aves, expressa em porcentagem.

Tratamentos		48 hrs PI % (+/total)	14 Dias % (+/total)	21 Dias % (+/total)
Desafio	Não	0 (0/12) c	0 (0/12) c	0 (0/12) c
	SE	8,33 (1/12) b	58,33 (7/12) b	50 (6/12) b
	SÉres	58,33 (7/12) aB	100 (12/12) aA	58,33 (7/12) aB
Valor de P		$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

TABELA 5 – Contagem de colônias em ceco às 48 horas pós-inoculação (PI), 14 e 21 dias de idade, expressa com média e desvio padrão, expressa em Log¹⁰.

Tratamentos		48hrs PI	14Dias	21 Dias
Desafio	Não	0,00±0,00 b	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c
	SE	1,27±0,67 b	5,17±0,40 b	3,32±0,63 b
	SEres	5,06±0,27 a	6,24±0,20 a	6,70±0,19 a
Valor de P		≤0,001	≤0,001	≤0,001

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P < 0,05).

Estudo realizado por Gonzales (2004) dispõe que o equilíbrio da microbiota intestinal favorece a saúde da ave e promove sua maturidade, diminuindo as limitações nos processos de digestão e absorção dos nutrientes, resultando então em um bom desempenho.

Em concordância, Lan et. Al. (2005) afirma e acrescenta que este período médio de adaptação da microbiota em frangos de corte seria de 6 a 7 semanas em ceco, no presente estudo o período estudado não entrou em conformidade com este período de adaptação da microbiota, pois o mesmo foi analisado em 3 semanas.

De tal modo a diferença estatística encontrada na Tabela 4 (P ≤ 0,05) referenciada na horizontal em letras maiúsculas, aos 21 dias de idade das aves inoculadas com SERes apresentou uma contagem microbiológica menor quando comparadas aos dias anteriores do mesmo tratamento. Fato este que corrobora ao encontrado por Leandro et al. (2010) onde sugere que as alterações da microbiota em períodos menores de 6 a 7 semanas podem estar relacionadas aos fatores variáveis, como idade do hospedeiro, contaminação do ambiente e dietas utilizadas.

Ponderando as diferenças estatísticas dentro do mesmo período e entre os tratamentos apresentados, a SERes evidenciou uma diferença estatística (P ≤ 0,05), com maior contagem em comparação aos demais tratamentos em todos os dias analisados tanto em fígado quanto em ceco. Este crescente na contagem microbiológica é verificado pelo amplo número de estudos de determinação da contagem microbiológica em carcaças de frangos de corte, demonstrando o crescimento de cepas resistentes a antibióticos com diversos mecanismos de ação. Em estudo realizado por Narciso A. et al. (2011) é demonstrado um aumento de cepas resistentes do ano de 2008 para 2010, onde diversas bactérias possuíam resistência à amoxicilina (44,8%), trimetropim/sulfametoxazol (26,1%) e ciprofloxacina (16,1%).

A ciprofloxacina é um antibiótico muito utilizado no tratamento de *Klebsiella pneumoniae* e que têm como mecanismo de ação a inibição da síntese de ácidos nucleicos (DÍAZ P. et al. 2004), assim como o mecanismo de resistência á rifampicina apresentado pela bactéria deste estudo.

De acordo com estudo realizado por Jin D. J. et al. (1988), a caracterização do gene *rpoB* em *Echerichia coli* demonstrou que a rifampicina interage especificamente com a subunidade β da RNA polimerase e que mutações no locus *rpoB* conferem trocas adequadas, impedindo uma ligação eficiente do fármaco e, conseqüentemente, a resistência. Este gene está presente em todas as bactérias, mas o seu comprimento e sequência de nucleotídeos variam entre espécies bacterianas, incluindo micobactérias.

Processos envolvendo a RNA polimerase, alteram toda a fisiologia das células, por estar diretamente ligada a produção de aminoácidos, principal metabolizador celular, sua ocorrência ser relacionada a outras resistências, agregam mecanismos diferenciados para se adaptar ao meio. Na maioria dos casos, está associada a outros fármacos, permitindo também uma atuação mais ampla da bactéria. (ANDRE E. et al. 2017).

Entretanto nesta mesma linha de entendimento observa-se que esta quantificação mais acentuada em placas de SRes, pode ser vinculada à competição pela utilização de nutrientes do meio de cultura, visto que as placas de contagem da SRes possuíam a aplicação do Antimicrobiano rifampicina para seleção das cepas resistentes, a presença deste Antimicrobiano pode ter conferido um benefício de quebra de competitividade entre organismos que utilizam do mesmo meio de cultura como é o caso da *E. coli*.

Guedes Neto et al. (2005) apontam alguns organismos que possuem uma atividade antagonista natural de bactérias ácido-lácticas frente a elas, a outras bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo de coalho, aos patógenos isolados dos mesmos queijos e a cepas de patógenos de referência. Visto que esta atividade pode ser observada em processos de competição podem também ser evidenciadas em processos de favorecimento, como é o caso da aplicação de mais um Antimicrobiano ao meio de cultura.

A importância da microbiota devidamente estabilizada e completa em termos de competição e variedade bacteriana, é explanado por Paixão & Castro (2016), onde conectam a utilização indiscriminada de antibióticos desde a infância até a vida adulta, com alterações seletivas da microbiota e de bactérias resistentes patogênicas. Exemplificando como poderia ocorrer o aumento da contagem no resultado *in vitro* encontrado neste estudo.

3.14 CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que o desempenho das aves até os 21 dias não foi estatisticamente distinto entre os tratamentos, condição está que pode estar relacionada a adaptação natural dos organismos ao trato digestivo das aves. Já a microbiologia demonstrou uma contagem maior, sendo relacionada ao microrganismo mais adaptado ou a reduzida condição externa de competitividade na placa.

Faça-se necessário estudos complementares e com o intuito de objetivar se esta diferença apresentada está relacionada diretamente a resposta celular ou a capacidades externas de adaptação.

3.15 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRE E. et al. Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated rpoB gene mutations in pathogenic mycobacteria. **Clinical Microbiology and Infection**. v.23, n.3, p. 167-172. 2017.

BRASIL - MAPA. **Instrução Normativa nº62**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

CHABNER, B.; BRUNTON, L.; KNOLLMAN, B. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. ed. California: McGraw-Hill Education, 2011.

COBB. **Manual de manejo de frangos de corte**. Disponível em: <http://cobb-vantress.com/languages/guidefiles/b5043b0f-792a-448e-b4a1-4aff9a30e9eb_pt.pdf>. Acesso em: 01 de março de 2017.

DÍAZ P. Q. et al. Resistance to gentamicin, amikacin and ciprofloxacin among nosocomial isolates of klebsiella pneumoniae subspecies pneumoniae producing extended spectrum beta-lactamases. **Revista medica de Chile**. v.132, n.10, p.1173-1178. 2004.

D.WRIGHT, G. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical Communications**, v. 47, n. 14, p. 4055–4061, 2011.

FERREIRA, João Cairo. Bactérias potencialmente resistentes a antibióticos, desinfetantes e radiação ultravioleta, isoladas de esgoto hospitalar e esgoto sanitário. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2015.

GAST R.K. & BENSON S.T. The comparative virulence for chicks of Salmonella enteritidis phage type 4 isolates and isolates of phage types commonly found in poultry in the United States. **Avian Diseases**. v. 39, p.567-574, 1995.

GONZALES, E. **Ação pró-nutritiva dos aditivos alimentares**. Curso de fisiologia da digestão e metabolismo dos nutrientes em aves. Jaboticabal: UNESP, p.48, 2004

GUEDES NETO, L. G. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.57, supl. 2, p.245-250, 2005.

HUBER, H. et al. Organic food and impact on human health: Assessing the status quo and prospects of research. **NJAS - Wageningen Journal of life Sciences**. v.58, p. 103-109. 2011.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N. et al. Effects of adherent Lactobacillus cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. **Animal and Feed Science Technology**, v.70, p.197-209, 1998.

KLASING K. C. Nutrition and the immune system. **British poultry science**. v.48, n.5, p. 525-537, 2007.

LAN, Y.; et al. The role of commensal gut microbial community in broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, v.61, n.1, p.95-104, 2005.

LEANDRO, N. S. M. et al. Probiótico na ração ou inoculado em ovos embrionados. 1. Desempenho de pintos de corte desafiados com Salmonella Enteritidis. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.39, n7, p.1509-1516, 2010.

LODDI, M.M.; et al. O uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, rendimento e qualidade de carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.4, p.1124-1131, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NCR. **Nutrient requirements of poultry**. 9.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 155p, 1994.

NARCISO A. et al. Susceptibilidade aos antibióticos de bactérias responsáveis por cistites não complicadas: estudo comparativo dos isolados de 2008 e 2010. **Acta Urológica**. v.1, p.17. 2011.

NEIDHARDT, F. C. **Bacterial genetics Sherris Medical Microbiology - An introduction to infectious diseases**. 4. ed. Michigan: McGraw-Hill Education, 2004.

PAIXÃO, L. A. & CASTRO F. F. S. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. Universitas: Ciências da Saúde. Brasília, v.14, n.1, p85-96. 2016

PICKLER, L., et al. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.27-36, 2012.

TOURNUT, J.R. Probiotics. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1998, Botucatu. **Anais**. Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.179-199, 1998.

VELAZQUEZ-ACOSTA, C.; CORNEJO-JUAREZ, P.; VOLKOW-FERNANDEZ, P. Resistencia bacteriana de cultivos de orina en un hospital oncológico: seguimiento a diez años. **Salud pública México**, Cuernavaca , v. 58, n. 4, p. 446-452, agosto 2016 .

WANJUGI, P; HARWOOD, V.J. The influence of predation and competition on the survival of commensal and pathogenic fecal bacteria in aquatic habitats. **Environmental Microbiology**. v. 15, n. 2, p. 517-526, 2013.

WANNMACHER, Lenita. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida. Uso racional de medicamentos: temas selecionados, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.

WILLIAMS, D. L. et al. Characterization of Rifampin Resistance in Pathogenic Mycobacteria. **Antimicrob Agents and Chemotherapy**, p. 2380-2386, 1994.

WHO, W. H. O. **WHO | Antibiotic resistance**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou que a capacidade adaptativa destes organismos é altamente estruturada. A presença do antimicrobiano altera a adaptação da bactéria ao meio, mas ao mesmo tempo, a resistência antimicrobiana não se limita a presença do composto específico.

Os resultados encontrados demonstraram que, mesmo sem a presença do Antimicrobiano rifampicina, nas aves, o crescimento microbiológico das bactérias que possuíam um mecanismo de resistência envolvendo a síntese de ácidos nucleicos, se demonstrou maiores e mais efetivos. Inicialmente não impactando em seu ganho de peso, consumo médio de ração e conversão alimentar.

Com este trabalho aplica-se novas questões envolvendo as bactérias que possuem uma determinada resistência. Estas podem estar utilizando de seu mecanismo, não necessariamente em momentos de sobrevivência contra o composto, mas como uma ferramenta para se desenvolver com maior facilidade. Estudos sequentes devem ser

encaminhados para a comparação imunológica e a níveis de metabolismo celular, bem como um mapeamento onde poderá se demonstrar alterações a níveis genéticos.

As bactérias sempre encontrarão mecanismos para sua sobrevivência, é extremamente importante que sejam realizados constantes estudos e monitoramentos sobre estes mecanismos e bactérias, assim como buscar novas ferramentas para o controle de bactérias resistentes.

4.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-ELALA, N.; MARZOUK, M.; MOUSTAFA, M. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 21–29, 2013.

ALHARBI, S. A. et al. What if Fleming had not discovered penicillin? **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 4, p. 289–293, 2014.

AMINOV, R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, p. 134, 2010.

ANDRE E. et al. Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated *rpoB* gene mutations in pathogenic mycobacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. v.23, n.3, p. 167-172. 2017.

BROWN, K. **Penicillin Man: Alexander Fleming and the Antibiotic Revolution**. Brimscombe Port: The History Press, 2005.

BUSH, K. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 894–6, dez. 2011.

BUZÁS, G. M.; SUPURAN, C. T. The history and rationale of using carbonic anhydrase inhibitors in the treatment of peptic ulcers. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, p. 1–7, 25 jun. 2015.

CHABNER, B.; BRUNTON, L.; KNOLLMAN, B. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. ed. California: McGraw-Hill Education, 2011.

CHAMBERLAIN, R. From bark to bacteria: the natural sources of modern medicine. **Biochemical Society**, 2015.

COBB. **Manual de manejo de frangos de corte**. Disponível em: <http://cobb-vantress.com/languages/guidefiles/b5043b0f-792a-448e-b4a1-4aff9a30e9eb_pt.pdf>. Acesso em: 01 de março de 2017.

CUTLER, S. J. Penicillin Man: Alexander Fleming and the Antibiotic Revolution. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 444–445, 2004.

D. WRIGHT, G. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical Communications**, v. 47, n. 14, p. 4055–4061, 2011.

DEMIRCI, H. et al. A structural basis for streptomycin-induced misreading of the genetic code. **Nature Communications**, v. 4, p. 1355, 15 jan. 2013.

DÍAZ P. Q. et al. Resistance to gentamicin, amikacin and ciprofloxacin among nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* subspecies *pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamases. **Revista medica de Chile**. V.132, n.10, p.1173-1178. 2004.

DOSANI, S. Book: Penicillin Man: Alexander Fleming and the Antibiotic Revolution. **BMJ : British Medical Journal**, v. 330, n. 7481, p. 50, 2005.

DULHUNTY, J. M. et al. Continuous infusion of beta-lactam antibiotics in severe sepsis: a multicenter double-blind, randomized controlled trial. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 56, n. 2, p. 236–44, jan. 2013.

FERREIRA, João Cairo. Bactérias potencialmente resistentes a antibióticos, desinfetantes e radiação ultravioleta, isoladas de esgoto hospitalar e esgoto sanitário. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2015.

FLEMING, A. **Penicillin Nobel Lecture** Stockholm, 1945.

FORBES, B. A; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Diagnostic Microbiology**. 12. ed. St. Louis: Evolve, 2007.

GAST R.K. & BENSON S.T. The comparative virulence for chicks of *Salmonella enteritidis* phage type 4 isolates and isolates of phage types commonly found in poultry in the United States. **Avian Diseases**. v. 39, p.567-574, 1995.

GUEDES NETO, L. G. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.57, supl. 2, p.245-250, 2005.

GILLINGS, M. R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 4, 2013.

GONZALES, E. **Ação pró-nutritiva dos aditivos alimentares**. Curso de fisiologia da digestão e metabolismo dos nutrientes em aves. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, 48p, 2004.

HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **BMJ - British Medical Journal**, v. 317, n. 7159, p. 657–60, 5 set. 1998.

- HUBER, H. et al. Organic food and impact on human health: Assessing the status quo and prospects of research. **NJAS - Wageningen Journal of life Sciences**. v.58, p. 103-109. 2011.
- ITO, T. et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resistance Updates**, v. 6, n. 1, p. 41–52, 2003.
- JANG, K. H. et al. Anthracimycin, a Potent Anthrax Antibiotic from a Marine-Derived Actinomycete. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 30, p. 7822–7824, 22 jul. 2013.
- JARA, L. M. et al. Novobiocin Inhibits the Antimicrobial Resistance Acquired through DNA Damage-Induced Mutagenesis in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 637–639, jan. 2016.
- JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N. et al. Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. **Animal and Feed Science Technology**, v.70, p.197-209, 1998.
- KABPLOY, K. et al. Effect of Antibiotic Growth Promoters on Anti-oxidative and Anti-inflammatory Activities in Broiler Chickens. **Thai Journal of Veterinary**, v. 46, n. 1, p. 89–95, 2016.
- KARDOS, N.; DEMAINE, A. L. Ernst Chain: a great man of science. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 15, p. 6613–6622, 22 ago. 2013.
- KIM, J. et al. Effects of the Antibiotics Growth Promoter Tylosin on Swine Gut Microbiota. **Journal of microbiology and biotechnology**, 12 fev. 2016.
- KLASING K. C. Nutrition and the immune system. **British poultry science**. v.48, n.5, p. 525-537.2007.
- KOHANSKI, M. A. et al. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 797–810, 2007.
- LAN, Y.; et al. The role of commensal gut microbial community in broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, v.61, n.1, p.95-104, 2005.
- LEANDRO, N. S. M. et al. Probiótico na ração ou inoculado em ovos embrionados. 1. Desempenho de pintos de corte desafiados com *Salmonella Enteritidis*. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.39, n7, p.1509-1516, 2010.
- LECLERCQ, R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 482–492, 15 fev. 2002.
- LEV, M. & FORBES, M. Growth responde to dietary penicilin of germ-free chicks with a defined intestinal flora. **British Journal of Nutrition**. v.13, p. 78-84. 1959.
- LEWIS, K. Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. **Nature**, v. 485, n. 7399,

p. 439–440, 23 maio 2012.

LING, L. L. et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 455–459, 7 jan. 2015.

LIU, H.; XIE, J. Comparative Genomics of Mycobacterium tuberculosis Drug Efflux Pumps and Their Transcriptional Regulators. **Critical Reviews TM in Eukaryotic Gene Expression**, v. 24, n. 2, p. 163–180, 2014.

LODDI, M.M.; et al. O uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, rendimento e qualidade de carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.4, p.1124-1131, 2000.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v.34, n.1, p.77-84, 2016.

MIETZSCH, F. Zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionskrankheiten. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 71, n. 1, p. A15–A28, 1938.

MOORE, P. R. et al. Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 165, p. 437–441, 1946.

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465–470, 2005.

MUNIESA, M.; COLOMER-LLUCH, M.; JOFRE, J. Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. **Future microbiology**, v. 8, n. 6, p. 739–51, 23 jun. 2013.

NARCISO A. et al. Susceptibilidade aos antibióticos de bactérias responsáveis por cistites não complicadas: estudo comparativo dos isolados de 2008 e 2010. **Acta Urológica**. v.1, p.17. 2011.

NEIDHARDT, F. C. **Bacterial genetics Sherris Medical Microbiology - An introduction to infectious diseases**. 4. ed. Michigan: McGraw-Hill Education, 2004.

NELSON, M. L. et al. Brief communication: Mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350–550 CE. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 143, n. 1, p. 151–154, set. 2010.

OCAMPO, P. S. et al. Antagonism between Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotics Is Prevalent. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4573–4582, 1 ago. 2014.

PAIXÃO, L. A. & CASTRO F. F. S. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. *Universitas: Ciências da Saúde*. Brasília, v.14, n.1, p85-96. 2016

- PALAMIDI, I. et al. Probiotic form effects on growth performance, digestive function, and immune related biomarkers in broilers. **Poultry science**, p. pew052, 4 mar. 2016.
- PALMER, A. C.; KISHONY, R. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. **Nature reviews. Genetics**, v. 14, n. 4, p. 243–8, abr. 2013.
- PAPO, N.; SHAI, Y. Visions & Reflections Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.**, v. 62, p. 784–790, 2005.
- POGLIANO, J.; POGLIANO, N.; SILVERMAN, J. A. Daptomycin-Mediated Reorganization of Membrane Architecture Causes Mislocalization of Essential Cell Division Proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 17, p. 4494–4504, 1 set. 2012.
- PONS, M. J. et al. Analysis of quinolone-resistance in commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from infants in Lima, Peru. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 1, p. 22–8, jan. 2014.
- QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- RANDALL, C. P. et al. The Target of Daptomycin Is Absent from *Escherichia coli* and Other Gram-Negative Pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 637–639, 1 jan. 2013.
- RUER, S. et al. Virulence-targeted Antibacterials: Concept, Promise, and Susceptibility to Resistance Mechanisms. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, n. 4, p. 379–399, out. 2015.
- SILVER, L. L. Challenges of Antibacterial Discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 71–109, 1 jan. 2011.
- SPINOSA, H. DE S. **Farmacologia Aplicada À Medicina Veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2011.
- TALLY, F. P.; DEBRUIN, M. F. Development of daptomycin for Gram-positive infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 523–526, 1 out. 2000.
- TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos para o clínico**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2014.
- TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. S3–S10, 2006.
- TOURNUT, J.R. Probiotics. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1998, Botucatu. **Anais**. Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.179-199, 1998.

TRAN, T. T. et al. Daptomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Diverts the Antibiotic Molecule from the Division Septum and Remodels Cell Membrane Phospholipids. **mBio**, v. 4, n. 4, p. e00281-13-e00281-13, 23 jul. 2013.

VELAZQUEZ-ACOSTA, C.; CORNEJO-JUAREZ, P.; VOLKOW-FERNANDEZ, P. Resistencia bacteriana de cultivos de orina en un hospital oncológico: seguimiento a diez años. **Salud pública México**, Cuernavaca , v. 58, n. 4, p. 446-452, 2016 .

WAKSMAN, S. A.; FLYNN, J. E. History of the word “antibiotic”. **Journal of the history of medicine and allied sciences**, v. 28, n. 3, p. 284–6, jul. 1973.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, p. 775–781, 2000.

WANJUGI, P; HARWOOD, V.J. The influence of predation and competition on the survival of commensal and pathogenic fecal bacteria in aquatic habitats. **Environmental Microbiology**. v. 15, n. 2, p. 517-526, 2013.

WANNMACHER, Lenita. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.

WELLINGTON, E. M. et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 155–165, 2013.

WHO, W. H. O. **WHO | Antibiotic resistance**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

5. Anexo A – Aprovação Comissão de Ética



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 014/2016, referente ao projeto **"COMPARAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *SALMONELLA ENTERITIDIS* RESISTENTE OU NÃO A RIFAMPICINA: USO DE BUTIRATO COMO CONTROLADOR DE *SALMONELLA*"**, sob a responsabilidade de Elizabeth Santin – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 2 de invasividade, em reunião de 27/04/2016.

Vigência do projeto	Abril/2016 até Maio/2016
Espécie/Linhagem	Frango de corte / Cobb
Número de animais	240
Peso/Idade	50 g / 1 dia
Sexo	Macho
Origem	Incubatório comercial em Guarapuava – PR

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 014/2016, regarding the project **"IMMUNE RESPONSE COMPARISON OF BROILERS CHALLENGED WITH RIFAMPICIN RESISTENT OR NOT *SALMONELLA ENTERITIDIS*: BUTYRATE USE AS *SALMONELLA* CONTROLLER"** under Elizabeth Santin supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 2 of invasiveness, in session of 27/04/2016.

Duration of the project	April/2016 until May/2016
Specie/Line	Broiler / Cobb
Number of animals	240
Weight/Age	50 g / 1 day
Sex	Male
Origin	Commercial incubatory at Guarapuava – PR

Curitiba, 27 de abril de 2016.

Simone Tostes de Oliveira Stedile

Presidente CEUA-SCA