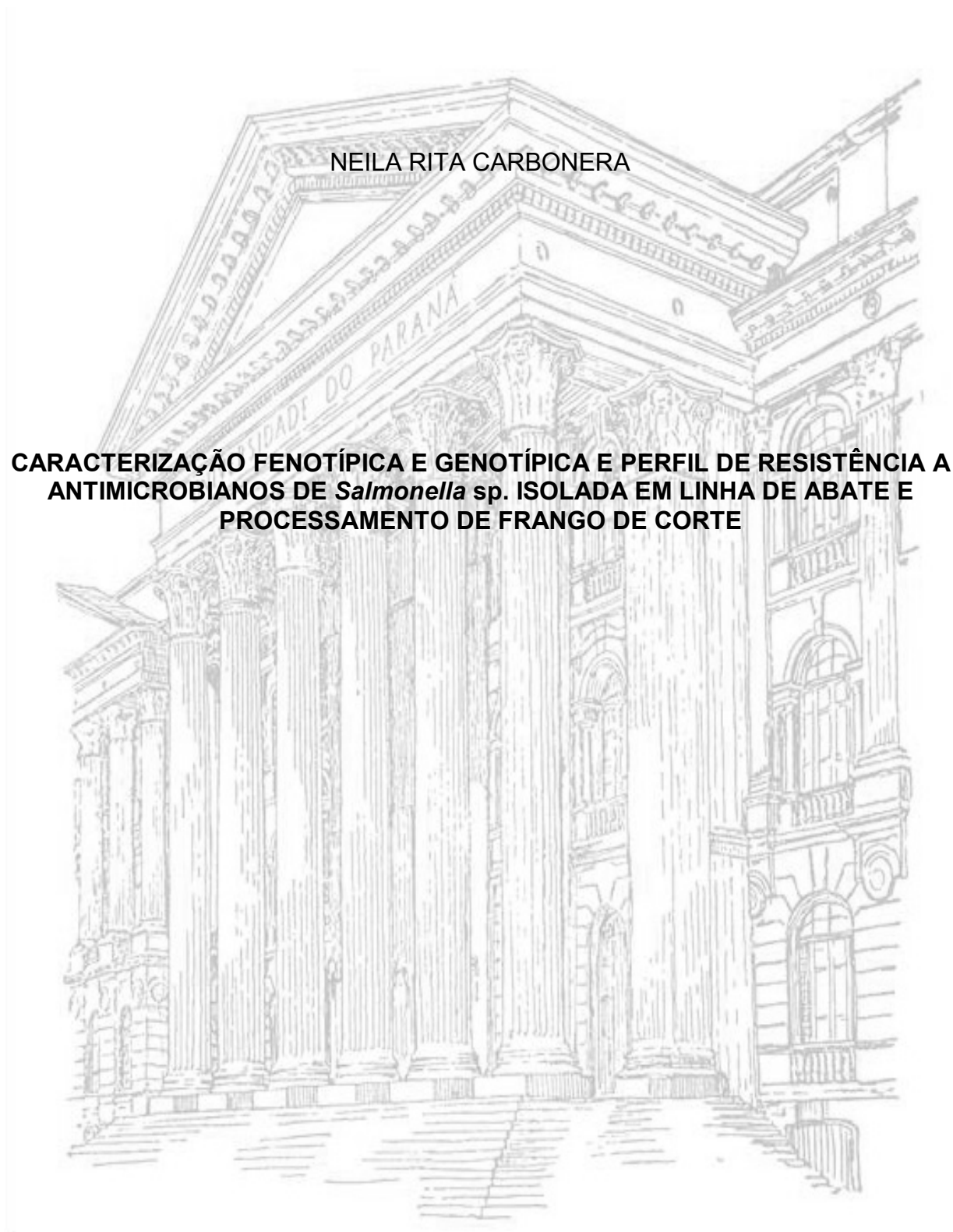


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NEILA RITA CARBONERA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA E PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS DE *Salmonella* sp. ISOLADA EM LINHA DE ABATE E
PROCESSAMENTO DE FRANGO DE CORTE**



PALOTINA
2018

NEILA RITA CARBONERA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA E PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS DE *Salmonella* sp. ISOLADA EM LINHA DE ABATE E
PROCESSAMENTO DE FRANGO DE CORTE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C264 Carbonera, Neila Rita
Caracterização fenotípica e genotípica e perfil de resistência a antimicrobianos de *salmonella sp* isolada em linha de abate e processamento de frango de corte / Neila Rita Carbonera.
-- Palotina, 2018
72f.

Orientador: Luciano dos Santos Bersot
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. *Salmonella*. 2. Heidelberg . 3. Multiresistência. 4. PFGE
I. Bersot, Luciano dos Santos. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NEILA RITA CARBONERA** intitulada: **Caracterização fenotípica, genotípica e perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* sp. isolada em linha de abate e processamento de frangos de corte**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 23 de Fevereiro de 2018.



LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



VINICIUS CUNHA BARCELLOS
Avaliador Interno (UFPR)



JOSÉ PAES DE ALMEIDA NOGUEIRA PINTO
Avaliador Externo (UNESP)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus por ter me possibilitado tantas escolhas corretas ao longo de minha vida. Agradeço também por me guiar e dar forças para superar os obstáculos a cada dia.

Ao meu marido André, por todo o companheirismo, pela ajuda e dedicação com nossos filhos, por entender a minha ausência e cansaço em tantas noites e finais de semana de dedicação ao estudo. Seu apoio foi essencial para que eu não desistisse.

Aos meus filhos, Daniel e Lucas, por compreenderem minha ausência durante os estudos.

Aos meus pais, que sempre foram exemplo de trabalho e honestidade, e apesar das dificuldades, nunca mediram esforços pelos meus estudos desde a minha infância.

À Cooperativa Agroindustrial Consolata – Copacol, em especial à Márcia Joseane Ferrari, pelo apoio e incentivo.

Ao meu orientador professor Luciano, por acreditar em mim e contribuir para o meu desenvolvimento acadêmico. Sou muito grata pela oportunidade.

Aos colegas do LACOMA, em especial à Kadigia, Carolina, Thiago e Mallú, obrigada pela ajuda no desenvolvimento das análises. Meus sinceros agradecimentos.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal e sua equipe, por disponibilizar todos os equipamentos e estrutura necessária para realização de etapas do presente trabalho.

À UFPR e aos professores, que além do conhecimento técnico, nos fizeram refletir sobre nossos valores. Muito obrigada!

Destino não é uma questão de sorte, mas uma questão de escolha, não é uma coisa que se espera, mas que se busca.

(William Jennings Bryan)

RESUMO

Salmonella está entre os principais patógenos causadores de gastroenterites associada ao consumo de produtos de origem animal, como a carne de aves. Este fato é fundamental a realização de estudos a respeito desse patógeno. O objetivo deste estudo foi investigar os sorotipos, a similaridade genética e o perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* spp., isolada nas diferentes etapas da linha de abate e processamento de frangos de corte, em estabelecimento habilitado à exportação localizado no Estado do Paraná. A amostragem foi realizada ao longo da linha de abate, nas etapas de recepção das aves, abate e processamento. Foram obtidas 125 culturas de *Salmonella* sp., as quais foram submetidas aos testes de sorotipificação, suscetibilidade a antimicrobianos, produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Nesta análise, além das culturas de *Salmonella* da presente pesquisa comparou-se 10 culturas obtidas a partir de amostras de corte congelados de frango do comércio varejista. Dentre os 125 isolados avaliados foram identificados três sorotipos diferentes, sendo que a maior ocorrência foi de *Salmonella* Heidelberg com 123 isolados, seguido de *Salmonella* Abony e *Salmonella* O:4,5 um isolado de cada, mostrando a predominância de *S. Heidelberg* (98,4%). Nos resultados do PFGE, pode-se observar que isolados com perfil genéticos idênticos foram obtidos a partir de gaiolas de transporte, carcaças e cortes da etapa de abate e processamento e cortes adquiridos no comércio varejista. Os isolados de *S. Heidelberg* demonstraram a permanência no ambiente em períodos prolongados e influência do campo na contaminação do ambiente industrial. Foi constatada 100% de resistência para os antimicrobianos tetraciclina, doxiciclina e ácido nalidíxico e multirresistente em 121 (96,8%) dos isolados, sendo que 24 desses demonstraram padrão fenotípico para produção de enzimas ESBL.

Palavras-chave: *Salmonella*, Heidelberg, PFGE, Multirresistência.

ABSTRACT

Salmonella is among the main pathogens causing gastroenteritis associated with the consumption of animal products, such as poultry meat. This fact is essential to carry out studies on this pathogen. The objective of this study was to investigate the serotypes, genetic similarity and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* spp. isolated in the different stages of the line of slaughter and processing of broilers in a large establishment qualified to export located in the State of Paraná. Sampling was carried out along the slaughter line, in the stages of poultry reception, slaughter and processing. 125 cultures of *Salmonella* sp. submitted to serotyping tests, antimicrobial susceptibility, production of extended-spectrum beta-lactamases enzymes (ESBL) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). In this analysis, in addition to the *Salmonella* cultures of the present study, 10 cultures obtained from frozen chicken cut samples of the retail trade. Among the 125 isolates evaluated, three different serotypes were identified, with the highest occurrence being *Salmonella* Heidelberg with 123 isolates, followed by *Salmonella* Abony and *Salmonella* O: 4.5 each isolate, showing the predominance of *S. Heidelberg* (98, 4%). In the PFGE results, it can be observed that isolates with identical genetic profiles were obtained from poultry transport cages, carcasses and cuts from the slaughter and processing stage and cuts purchased in the retail trade. Isolated from *S. Heidelberg* demonstrated the permanence in the environment in prolonged periods and influence of the field in the contamination of the industrial environment. 100% resistance was observed for the antimicrobials tetracycline, doxycycline and nalidixic acid and multidrug resistant in 121 (96.8%) of the isolates, of which 24 demonstrated a phenotypic pattern for the production of ESBL enzymes.

Key-words: *Salmonella*, Heidelberg, PFGE, Multiresistance.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - PERÍODO DA OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DA INDÚSTRIA E DO VAREJO.....34
- FIGURA 2 - DENDOGRAMA OBTIDO POR MEIO DE PFGE, INDICANDO A RELAÇÃO GENÉTICA, SOROTIPO PERTENCENTE E PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DOS.....35
- FIGURA 3 - FOTO DO GEL DEMOSTRANDO A FORMAÇÃO DAS BANDAS DA AMOSTRA 70 EM RELAÇÃO AOS MARCADORES E AS DEMAIS ISOLADOS DE HEIDELBERG DO MESMO GEL.....37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SOROTIPOS DE <i>Salmonella</i> IDENTIFICADOS NA LINHA DE ABATE E PROCESSAMENTO DE FRANGO DE CORTE.....	30
TABELA 2 - RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>Salmonella</i> sp. FRENTE ÀS CLASSES DE ANTIMICROBIANOS TESTADOS.....	39
TABELA 3 - PERCENTUAL DE ISOLADOS DE <i>Salmonella</i> sp. RESISTENTES A AOS ANTIMICROBIANO TESTADO	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	CARACTERÍSTICAS DE <i>Salmonella</i> sp.	14
3.2	IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA.....	16
3.3	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	18
3.4	MEDIDAS DE CONTROLE DE <i>Salmonella</i> NA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGO DE CORTE.....	20
4	ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA <i>FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASES</i>.....	24
4.1	INTRODUÇÃO.....	26
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.2.1	Amostragem.....	27
4.2.2	Sorotipificação	27
4.2.3	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	27
4.2.4	Perfil de Resistência a Antibióticos	29
4.2.5	Produção de Enzimas ESBL	29
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.3.1	Sorotipificação e Perfil de Macrorrestrição dos Isolados	30
4.3.2	Resistência a Antimicrobianos	38
4.4	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS.....	45
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICES.....	64

APÊNDICE 1 - DENDOGRAMA OBTIDO POR MEIO DE PFGE SEPARADO POR <i>CLUSTER</i>	64
APÊNDICE 2 - TESTE FENOTÍPICO PARA PRESENÇA DE ENZIMAS ESBL EM ISOLADOS DE <i>Salmonella</i> sp.....	68
APÊNDICE 3 - ESTRUTURA ANTIGÊNICA DOS SOROTIPOS HEIDELBERG, TYPHIMURIUM, ABONY, SCHWARZENGRUND, SALMONELLA <i>ENTERICA</i> SUBSP <i>ENTERICA</i> O: 4,5.....	69
APÊNDICE 4 - DIRETRIZES DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS.....	70

1 INTRODUÇÃO GERAL

A avicultura de corte brasileira é uma das atividades econômicas de destaque no cenário mundial. O Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango, sendo que o estado do Paraná ocupa o primeiro lugar na produção, e foi responsável por 35,85% do volume de exportação do ano de 2016, de um total de 4.384 mil toneladas, segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2016). Para que a avicultura continue a apresentar estes excelentes números é necessário, entre outros aspectos, um constante monitoramento sanitário de toda a cadeia produtiva, além do controle dos perigos microbianos de importância em saúde pública, como é o caso de *Salmonella* sp., patógeno de grande destaque na ocorrência de surtos de origem alimentar em todo o mundo, cujas medidas de controle devem ser nas diversas etapas de produção.

Atualmente a comercialização da carne de aves enfrenta barreiras sanitárias internacionais rigorosas, com o objetivo de garantir a ausência desse patógeno no produto final. A ocorrência de *Salmonella* no ambiente, nas matérias primas e nos alimentos contribui para que assuma um papel de grande importância na saúde pública mundial.

Salmonella sp. está amplamente distribuída na natureza, possui capacidade de sobreviver em condições ambientais desfavoráveis e pode colonizar o intestino das aves e outros animais sem causar sintomas. A transmissão na granja pode ocorrer de diversas formas, permanecendo no ambiente por um grande período, o que favorece a contaminação dos lotes seguintes (SILVA e DUARTE, 2002). As aves são infectadas pelo contato com outras aves, cama, alimentação, água, roedores, insetos ou animais domésticos e, depois de infectadas, passam a excretar *Salmonella* pelas fezes aumentando o número de bactérias eliminadas no ambiente (FORSHELL e WIERUP, 2006), podendo ainda se disseminar durante o transporte, o abate e o processamento tecnológico.

Programas de monitoramento e controle de *Salmonella* na cadeia de aves foram definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, como o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) e o Programa de Redução de Patógenos (PRP). Esses programas estabelecem medidas de erradicação de *Salmonella Pullorum* e *S. Gallinarum*, sorotipos de grande importância para a

sanidade avícola, e de controle e monitoramento de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, e também de outros sorotipos patogênicos aos humanos e, conseqüentemente, de grande relevância para saúde pública. Essas medidas visam reduzir o número de aves portadoras de *Salmonella* sp. que chegam ao abate.

Dada a estreita relação que *Salmonella* tem com a cadeia produtiva de frangos de corte é fundamental o monitoramento constante da ocorrência em estudos horizontais de contaminação. A caracterização fenotípica e genotípica das cepas envolvidas e a avaliação do perfil de resistência antimicrobiana que constituem importantes ferramentas para investigações epidemiológicas, além de contribuir no estabelecimento de estratégias eficientes para o controle desse patógeno.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os sorotipos, a similaridade genética e o perfil de resistência a antibióticos de *Salmonella* spp. isolada nas diferentes etapas da linha de abate e processamento de frangos de corte e de amostras comerciais de estabelecimento habilitado à exportação localizado no Estado do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a ocorrência de *clusters* de *Salmonella* com similaridade genética mínima de 90%.

Verificar a capacidade de produção de enzimas Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) dos isolados de *Salmonella* sp.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CARACTERÍSTICAS DE *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, são bastonetes curtos (1 a 2 µm) gram-negativas, anaeróbias facultativas, com capacidade de fermentar a glicose (exceto *S. Typhi*) (FRANCO; LANDGRAF, 1996). A maioria das espécies é móvel, por meio de flagelos peritríquos, com exceção dos sorotipos *S. Galinarum* e *S. Pullorum* que são imóveis. A maior parte dos sorotipos é produtora de gás, H₂S, lisina e ornitina descarboxilase (POPOFF; LE MINOR, 2005; ISO/ST, 2012; RUSSEL, 2012).

São bactérias mesófilas com temperatura ótima de multiplicação entre 35 a 37°C e mínima de 5°C. Alguns sorotipos têm multiplicação preferencialmente em temperaturas um pouco mais elevadas, na faixa dos 41°C (FRANCO; LANDGRAF 1996). A multiplicação de *Salmonella* é fortemente retardada em baixas temperaturas, sendo cessada em temperaturas abaixo de 0°C, mantendo-se ainda viável (GAMA, 2001). Desse modo, o controle desta variável é de grande importância para retardar o desenvolvimento de *Salmonella* especialmente nos produtos de origem animal. Outros fatores que influenciam a multiplicação de *Salmonella*: (I) pH mínimo e máximo de 4,5 e 9,0, e ótimo na faixa de 6,5 a 7,5; (II) atividade de água (Aw) mínima de 0,940 para o seu crescimento e o ideal de 0,995 (FRAZIER e WESTHOFF, 1993).

O gênero *Salmonella* possui duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. A primeira é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*; *S. enterica* subsp. *salamae*; *S. enterica* subsp. *arizonae*; *S. enterica* subsp. *diarizonae*; *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica*. (TINDALL et al., 2005; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014).

Atualmente estão identificados 2.659 sorotipos, sendo que *S. enterica* subespécie *enterica* compreende 1.586 sorotipos, sendo a subespécie que contém os principais sorotipos que acometem humanos e animais (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014).

A classificação de *Salmonella* spp. utilizada em estudos epidemiológicos, está relacionada com a sorotipificação baseada nas diferenças encontradas nas

estruturas superficiais das células, que são antigênicas. Essas estruturas são diferenciadas por seus antígenos O, H e Vi, por meio do esquema de Kauffmann-White: parede celular (antígenos somáticos “O”), flagelos (antígenos flagelares “H”) e envelope celular ou cápsula (antígenos capsulares “Vi”) (CAMPOS, 2002; GRIMONT; WEILL, 2007). Frequentemente novas fórmulas antigênicas são identificadas pelo Centro de Pesquisa e Referência sobre *Salmonella* spp. do Instituto Pasteur na França. Sendo esses sorotipos listados nas atualizações do esquema Kauffmann-White (POPOFF et al., 2003; POPOFF et al., 2004; GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Salmonella spp. possui uma estrutura complexa de lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa. Os antígenos “O” são compostos por polissacarídeos, componentes mais externos destes LPS da superfície celular, normalmente composto por 4 a 6 açúcares. São identificados por números arábicos e caracterizam os sorogrupos de *Salmonella*, por isso o mesmo antígeno “O” é comum a vários sorotipos (CDC, 2011).

Os antígenos “H” são as porções filamentosas do flagelo bacteriano. São de natureza proteica, composto de subunidades de proteína chamadas de flagelina. A porção variável da flagelina é a região do meio que está exposta na superfície do flagelo. Designados por letras minúsculas do alfabeto e por números arábicos, esses antígenos podem ocorrer em duas fases, denominadas de fase 1 e fase 2, sendo que alguns sorotipos de *Salmonella* podem ter flagelos em uma fase apenas (monofásica), porém, a maioria apresenta flagelos da fase 1 e de fase 2, consideradas bifásicas (CAMPOS, 2002; CDC, 2011).

Salmonella sp. pode infectar hospedeiros tanto de sangue quente como de sangue frio. Isso reflete a capacidade de adaptação desse patógeno a uma variedade de ambientes diferentes, inclusive no interior dos macrófagos (PROST; MILLER, 2008). A permanência nas células hospedeiras é determinante para a doença, sendo que cepas com falha nesta propriedade não são virulentas (CORBUM, et al., 2007). Após a penetração na célula hospedeira, *Salmonella* se aloja dentro de vacúolos onde é capaz de sobreviver e multiplicar-se (BAKOWSKI, et al., 2008).

A infecção é causada pela penetração de *Salmonella* do lúmen, para as células do epitélio do intestino delgado, onde se multiplica. Em seguida a bactéria invade o

íleo e o colo, sendo que a infecção gera uma resposta inflamatória (HANSEN-WESTER, et al., 2002; FORSYTHE, 2013). Uma vez dentro da célula hospedeira, esses fatores são capazes de alterar as funções celulares do hospedeiro, como arquitetura do citoesqueleto, trânsito pela membrana, sinal de transdução e expressão de genes de citocinas que resultam em sobrevivência intracelular bacteriana e colonização (HARAGA, et al., 2008).

Os sintomas característicos de doença de origem alimentar causados por *Salmonella* são diarreia, náuseas, vômito, dor abdominal, febre branda, às vezes cefaleia. O período de incubação é de 12 a 36 horas, a enfermidade costuma ser autolimitante e persiste de 4 a 7 dias (FORSYTHE, 2013; HOHMANN, 2001). Complicações gastrointestinais podem ocorrer e incluem apendicite, pancreatite, colecistite e abscessos abdominais (HOHMANN, 2001). A infecção sistêmica apresenta formas clínicas variáveis, sendo mais grave em pacientes imunocomprometidos. A manifestação sistêmica mais comum ocorre em 5% dos pacientes infectados e está associada a outras complicações extra intestinais (GORDON, 2008). O órgão extra intestinal mais frequentemente comprometido é o pulmão, outras manifestações são meningite, encefalopatia, endocardite, infecção do trato urinário, osteomielite ou artrite (FISKER, et al., 2003).

3.2 IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA

Uma grande variedade de alimentos de origem animal pode veicular *Salmonella* sp. para humanos. Neste sentido, o consumo de carnes e derivados de aves mal cozidos, além do consumo de ovos e produtos que contenham ovos crus são apontados como os principais alimentos que representam perigo para a saúde pública. Esses produtos assumem grande relevância devido às condições de criação em sistema intensivo e abate das aves, favorecendo a ocorrência do patógeno desde as etapas iniciais de criação até o produto final (SANTOS et al., 2000; TESSARI et al., 2003; SCVPH, 2003; FORSHELL e WIERUP, 2006; GAST, 2008; GREIG; RAVEL, 2009;).

Estima-se que 22 milhões de casos de gastroenterites ocorrem anualmente em todo o mundo devido *Salmonella* sp. levando a 155 mil mortes (MAJOWICZ et al., 2010). Na Europa a incidência de doenças associadas à salmonelose é de 20 casos

para cada 100.000 habitantes por ano, número bem menor que países mais pobres da África e Ásia que é de 100 casos por 100.000 habitantes por ano. Em 2013 *S. Enteritidis* foi isolada em 39,5% dos casos de salmonelose humana e *S. Typhimurium* em 20,2% (SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2011; EFSA, 2015a; EFSA, 2015b).

Na Inglaterra e País de Gales, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* representaram mais de 80% das infecções por *Salmonella* em humanos no período de 1991 a 1995 (HUMPHREY, 2000).

Nos Estados Unidos, entre 1990 e 2006, 22,3% dos casos de salmonelose humana foram atribuídos ao consumo de carne de aves. Nos anos de 2014 e 2015, registraram 17,6 casos de salmonelose por 100 mil habitantes, sendo que entre os 13 diferentes sorotipos houve maior prevalência de *S. Enteritidis* e *Typhimurium* (CDC, 2011; CDC, 2016).

Apesar da prevalência de *S. Enteritidis* nos surtos com carne de aves, os dados do Programa de Redução de Patógenos Americano mostram que em 2014, o sorotipo mais isolado em carne de frango não foi *S. Enteritidis*, mas sim *S. Kentucky*, em 43% das amostras. *S. Enteritidis* foi o segundo sorotipo mais isolado, presente em 9,5% das amostras, seguido pelos sorotipos Montevideo e *Typhimurium* (CDC, 2014). Além de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, outros sorotipos são capazes de causar doença gastrointestinal com gravidade variável em seres humanos. Existe uma crescente preocupação sobre os sorotipos Heidelberg, Infantis, Agona, Hadar, e Virchow, como causadores de infecções em humanos (FORSHELL e WIERUP, 2006; FREITAS NETO et al., 2010).

S. Heidelberg possui relatos recentes de envolvimento em surtos nos Estados Unidos. No período de janeiro de 2015 a julho de 2017, houve relatos de pessoas infectadas com o sorotipo Heidelberg em 14 estados, com 30% das pessoas hospitalizadas, no entanto nenhuma morte foi relatada (CDC, 2017).

No Brasil existe uma deficiência com relação às notificações de casos de doenças transmitidas por alimentos, e na identificação dos agentes etiológicos envolvidos em surtos. Dados do Ministério da Saúde indicam que no ano de 2015 foram notificados 673 surtos de origem alimentar no Brasil (BRASIL, 2016b). Entre os anos de 2000 e 2015, foram notificados 10.666 surtos, com 155 óbitos. Dentre os

micro-organismos que foram caracterizados, *Salmonella* sp. aparece como o principal agente, envolvido em 14,4% dos surtos (BRASIL, 2015).

No Estado do Rio Grande do Sul, dos 99 surtos registrados no ano de 2000, 74% foram ocasionados por *Salmonella* sp., entre os alimentos envolvidos na maioria dos surtos, estavam os ovos e alimentos preparados com ovos (72,2%) e carne de frango (11,4%) (NADVORNY et al., 2004). No Paraná, desde o ano de 1995, a salmonelose passou a ser a principal enfermidade transmitida por alimentos. Dados de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) apontam como agentes etiológicos mais frequentes os de origem bacteriana, com grande destaque para *Salmonella* sp. (AMSON et al., 2006; ALCOCER et al., 2006). Os dados relativos as DTA oferecem grande destaque para a salmonelose, no entanto, para diferentes países é difícil a realização de comparações, devido a diferenças nos programas de vigilância e critérios de notificações (MEAD et al., 2010).

3.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

O uso indiscriminado de antibióticos em humanos e animais tem levado ao aumento da resistência a drogas em diferentes cepas bacterianas. Esse fato representa um risco para a saúde pública, pela transferência de cepas com genes de resistência aos humanos em função do consumo de alimentos contaminados (KELLEY, et al., 1998; BADA-ALAMBEDJI, et al., 2006). Entre os micro-organismos resistentes, existem os multirresistentes (MR), que se caracterizam por apresentar fenótipo resistente pelo menos a três classes de antimicrobianas (NGOI; THONG, 2013).

Desde 1990, quando houve o relato de uma cepa *S. Typhimurium*, fagotipo denominado DT104, isolada originalmente em amostras animais do Reino Unido, resistente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina, que se disseminou ao redor do mundo, o número de *Salmonella* multirresistentes aumentou em muitos países (HELMS et al., 2011). De acordo com o National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS), 4,1% dos isolados dos Estados Unidos, entre os anos de 2005 e 2006, apresentaram menor suscetibilidade às cefalosporinas e 84% apresentaram fenótipos de resistência a múltiplos fármacos (SJÖLUND-KARLSSON, et al., 2010).

Conforme pesquisa Europeia, de 2000 a 2004 em mais de 134.000 isolados de *Salmonella* oriundos de casos de infecção humana, observou-se resistência a antimicrobianos variando de 57 a 66%, incluindo resistência a múltiplos fármacos de 15 e 18% (MEAKINS, et al., 2008). Países asiáticos e africanos têm identificado o aumento do número de cepas resistentes a cefalosporinas e relatos de resistência de cefalosporinas associados a produção da beta-lactamase de espectro entendido (RAN, et al., 2011; JABEEN, et al., 2010; KRUGER, et al., 2004).

Uma justificativa da alta resistência de *Salmonella* aos antimicrobianos, é o fato de que estes micro-organismos estão expostos a elementos genéticos que transportam genes de resistência, bem como os mecanismos necessários para a recombinação desses genes. Desta forma, ocorrem transferências gênicas horizontais, onde os genes podem ser adquiridos de outros micro-organismos da mesma geração. Esse fenômeno envolve uma célula doadora que contribui com parte de seu genoma para uma célula receptora, que pode ser de uma espécie ou de um gênero diferente. Após a transferência, parte do DNA da doadora é incorporado ao DNA da receptora (THOMAS & NIELSEN, 2005; BAUMAN, 2009; TORTORA et al., 2012). Os genes codificadores de antígenos em *Salmonella* são altamente propensos à recombinação e transferência gênica horizontal de modo que antígenos similares podem ser encontrados em cepas não relacionadas (LI et al., 1994).

São conhecidos três mecanismos de resistência bacteriana. Um deles é a produção de proteínas específicas, as quais alteram o antimicrobiano, sendo que o mesmo perde a ação esperada. Um exemplo é a produção de enzimas beta-lactamases por *Salmonella* sp., responsáveis por inativar a classe dos beta-lactâmicos (FOLEY & LYNNE, 2008).

Outro mecanismo de resistência é a modificação química do sítio de ligação do antimicrobiano, impedindo que ele se ligue ao alvo, alterando a afinidade do micro-organismo a droga (CROFT et al., 2007). O terceiro mecanismo de resistência são as bombas de efluxo que bombeiam ativamente os antimicrobianos para fora da bactéria, de forma que as concentrações antimicrobianas na célula nunca alcancem o limiar necessário para interferir nos processos metabólicos da mesma (FORSYTHE, 2013).

A produção de beta-lactamases por bactérias gram-negativas, que é o mais importante mecanismo de resistência contra os antibióticos beta-lactâmicos, e foi identificada na década de 1960 com a descrição de um isolado de *E. coli* resistente a aminopenicilinas pela produção de TEM-1 beta-lactamase (PAGE, 1999; CANTON, et al., 2008). Na década de 1980 iniciou-se o uso das cefalosporinas de terceira geração, com estrutura molecular resistente à ação das enzimas beta-lactamases. Três anos após o início do uso dessas drogas foi relatada a primeira beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) denominada SHV-2 em *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* (KNOTHE et al., 1983).

Essas enzimas constituem um grupo de proteínas que degradam ou modificam os fármacos, catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico das penicilinas, cefalosporinas e compostos relacionados, antes deles atingirem as proteínas de ligação, inativando esses antimicrobianos e tornando o tratamento ineficaz (FONZÉ et al., 1995; FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009).

Em 1989 foi descrita a primeira cepa de *Salmonella* não-tifoide produtora da enzima CTX-M-2 na Argentina, beta-lactamases de espectro estendido mais prevalentes em Enterobacteriaceae, geralmente localizadas em plasmídeos. Com a disseminação das cepas de *Salmonella* sp. produtoras de ESBL, as mesmas passaram a ser relatadas, em isolados de amostras de humanos doentes, também em animais de produção e, em alimentos de origem animal, principalmente carne de aves, possibilitando sua transferência para humanos por meio do consumo de alimentos (BAUERNFEIND et al., 1996; PEIRANO et al., 2006; YANG et al., 2014).

3.4 MEDIDAS DE CONTROLE DE *Salmonella* NA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGO DE CORTE

A avicultura de corte ocupa uma importante posição no segmento agroindustrial brasileiro, com volume expressivo de exportações. Diante desse desenvolvimento e da frequente relação de DTA com a ocorrência de *Salmonella* nos produtos de origem avícola, deve-se destacar a necessidade de se implantar medidas de controle na cadeia produtiva de frango de corte, considerando-se também que a redução do número de aves portadoras de *Salmonella* que entram no abate é um fator essencial para garantir a segurança do produto final.

A presença de *Salmonella* sp. em carne de aves torna-se um obstáculo para o comércio nacional e internacional. A preocupação com a elevada ocorrência de casos de salmonelose levou vários países a definir padrões microbiológicos para carne “in natura” de frango que podem gerar obstáculos ao comércio, como o uso de critérios que implicam em tolerância “zero para *Salmonella*” (MEAD et al., 2010).

O MAPA instituiu programas de monitoramento e controle de *Salmonella* na cadeia de aves. O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) e o Programa de Redução de Patógenos (PRP) estabelecem medidas de erradicação de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, de grande importância para a sanidade avícola, e de controle e monitoramento, de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, de grande relevância para saúde pública.

A Instrução Normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003, determinou a erradicação da *S. Pulorum* e *S. Galinarum* através do abate de matrizes portadoras e a vacinação dos lotes de aves reprodutoras com vacinas inativadas para *S. Enteritidis* (BRASIL, 2003a).

A Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003, institui o PRP para o controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus (Brasil, 2003b). Esse programa foi implementado com o objetivo de construir um sistema de informações sobre a contaminação por micro-organismos patogênicos para avaliação da contaminação dos produtos examinados, viabilizando a determinação do nível adequado de proteção ao agente, o que permite a melhor eficiência das medidas de controle, como componente importante da Análise de Risco Microbiológico (ARM). Essa instrução normativa previa a análise de 51 amostras a cada ciclo amostral, sendo aceitável no máximo 12 amostras positivas. O processo de tomada de amostras em cada ciclo relacionava-se com o volume de abate de cada estabelecimento industrial, e as amostras colhidas imediatamente após o sistema de pré resfriamento (BRASIL, 2003b).

Em 21 de outubro de 2016, foi instituída a Instrução Normativa nº 20 com a missão de substituir a Instrução Normativa nº 70. Ela traz algumas modificações relacionadas ao ciclo amostral e aos laboratórios onde as amostras serão analisadas. As análises microbiológicas para pesquisa de *Salmonella* sp. nas carcaças são divididas em dois monitoramentos. Um monitoramento de auto-controle, onde as análises podem ser realizadas em laboratório definido pela

empresa, desde que atenda as exigências e metodologias preconizadas pelo MAPA, com amostragem de 51 carcaças a cada ciclo amostral, sendo aceitável no máximo 12 amostras positivas. Outro monitoramento compreende um ciclo de 8 amostras, aceitável no máximo 2 amostras positivas com análises realizadas nos laboratórios da rede oficial ou credenciados pelo MAPA (BRASIL, 2016a).

Ainda na Instrução Normativa nº 20 são definidas análises de swab de arrasto para análise de *Salmonella* sp. em todos os lotes de frango de corte. As coletas de amostras devem ser realizadas o mais próximo possível da data do abate do lote das aves, de tal maneira que os resultados sejam conhecidos antes do seu envio para o abate.

Em janeiro de 2001 a ANVISA publicou a RDC 13, com o Regulamento Técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados (BRASIL, 2001), considerando natural a presença de *Salmonella* sp. em carne de aves e os riscos que esse patógeno representa aos consumidores. A RDC 13 estabeleceu a obrigatoriedade de instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carnes de aves e miúdos, os quais orientam o consumidor no controle do risco associado ao consumo de alimentos onde *Salmonella* sp. poderia estar presente. As instruções obrigatórias são:

Este alimento se manuseado incorretamente e ou consumido cru pode causar danos à saúde; mantenha refrigerado ou congelado; descongele somente no refrigerador ou no micro-ondas; mantenha o produto cru separado dos outros alimentos; lave com água e sabão as superfícies de trabalho (incluindo as tábuas de corte), utensílios e mãos depois de manusear o produto cru; consuma somente após cozido, frito ou assado completamente (BRASIL, 2001).

Além disso, o processo produtivo conta com outras ferramentas que visam produzir um alimento inócuo e seguro do ponto de vista microbiológico como Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), Boas Práticas de Fabricação (BPF) e os Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO).

O APPCC baseia-se na prevenção, eliminação ou redução dos perigos em todas as etapas do processo produtivo. Realizando análise de cada etapa, são identificados perigos específicos e medidas preventivas para seu controle, objetivando a segurança do alimento. Tem como pré-requisito os programas de BPF e PPHO, sendo que o BFP se baseia na higiene do estabelecimento, higiene

peçoal e higiene da produção, enquanto o PPHO se baseia nos cuidados com a higiene das superfícies de contato com o alimento e demais estruturas, prevenção contra a contaminação cruzada, além dos cuidados com relação a contaminantes.

4 ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASES*

ISSN: 1535-3141

Indexado em: MEDLINE; PubMed; PubMed Central; Current Contents®/Agriculture, Biology & Environmental Sciences; Science Citation Index Expanded; Journal Citation Reports/Science Edition; EMBASE/Excerpta Medica; EMBiology; Scopus; EMCare; AGRICOLA; CAB Abstracts; Global Health; FSTA - Food Science and Technology Abstracts.

Caracterização fenotípica e genotípica e perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* sp. isolada em linha de abate e processamento de frango de corte

RESUMO

Salmonella está entre os principais patógenos causadores de gastroenterites associada ao consumo de produtos de origem animal, como a carne de aves. Por este fato, é fundamental a realização de estudos a respeito desse patógeno. O objetivo deste estudo foi investigar os sorotipos, a similaridade genética e o perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* spp., isolada nas diferentes etapas da linha de abate e processamento de frangos de corte, em estabelecimento habilitado à exportação localizado no Estado do Paraná. A amostragem foi realizada ao longo da linha de abate, nas etapas de recepção das aves, abate e processamento. Foram obtidas 125 culturas de *Salmonella* sp., as quais foram submetidas aos testes de sorotipificação, suscetibilidade a antimicrobianos, produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Nesta análise, além das culturas de *Salmonella* da presente pesquisa comparou-se 10 culturas obtidas a partir de amostras de corte congelados de frango do comércio varejista. Dentre os 125 isolados avaliados foram identificados três sorotipos diferentes, sendo que a maior ocorrência foi de *Salmonella* Heidelberg com 123 isolados, seguido de *Salmonella* Abony e *Salmonella* O:4,5 um isolado de cada, mostrando a predominância de *S. Heidelberg* (98,4%). Nos resultados do PFGE, pode-se observar que isolados com perfil genéticos idênticos foram obtidos a partir de gaiolas de transporte, carcaças e cortes da etapa de abate e processamento e cortes adquiridos no comércio varejista. Os isolados de *S. Heidelberg* demonstraram a permanência no ambiente em períodos prolongados e influência do campo na contaminação do ambiente industrial. Foi constatada 100% de resistência para os antimicrobianos tetraciclina, doxiciclina e ácido nalidíxico e multirresistente em 121 (96,8%) dos isolados, sendo que 24 desses demonstraram padrão fenotípico para produção de enzimas ESBL.

Palavras-chave: *Salmonella*, Heidelberg, PFGE, Multirresistência.

4.1 INTRODUÇÃO

A avicultura de corte brasileira é uma das atividades econômicas de destaque no cenário mundial, estando o Brasil posicionado como o terceiro maior produtor e maior exportador de carne de frango (ABPA, 2016). Para que a avicultura continue a ocupar uma posição de destaque no cenário da produção mundial é necessário constante monitoramento sanitário de toda a cadeia produtiva, além do controle dos perigos microbianos de importância em saúde pública, como é o caso de *Salmonella* sp., patógeno de grande destaque na ocorrência de surtos de origem alimentar em todo o mundo, sendo que as medidas de controle devem se dar nas diversas etapas de produção (CHEN et al., 2013; CRUMP et al., 2015; ANTUNES et al., 2016).

Atualmente a comercialização da carne de aves enfrenta barreiras sanitárias internacionais rigorosas a fim de garantir a ausência desse patógeno no produto final, tornando-se um fator decisivo para sequência das exportações. Dessa forma a permanência de *Salmonella* no ambiente, nas matérias primas e no produto final assume um papel de grande importância na saúde pública mundial (KOTTWITZ et al., 2013; GURAN et al., 2017).

Salmonella sp. possui capacidade de sobreviver em condições ambientais desfavoráveis e pode ser encontrada em toda a cadeia produtiva de aves. A transmissão na granja pode ocorrer de diversas formas, permanecendo no ambiente por um grande período, o que favorece a contaminação dos lotes seguintes. Depois de infectadas as aves, passam a excretar a *Salmonella* pelas fezes aumentando o número de bactérias eliminadas no ambiente. A bactéria ainda pode se disseminar durante o transporte, o abate e processamento tecnológico contaminando o produto final (FORSHELL; WIERUP, 2006; ANTUNES et al., 2016).

Dada à importância e a estreita relação que *Salmonella* tem com a cadeia produtiva de frangos de corte é fundamental o monitoramento constante da ocorrência em estudos horizontais de contaminação. O objetivo deste trabalho foi investigar os sorotipos, a similaridade genética e o perfil de resistência a antibióticos de *Salmonella* spp. isolada nas diferentes etapas da linha de abate e processamento de frangos de corte e de amostras comerciais de estabelecimento habilitado à exportação localizado no Estado do Paraná.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Amostragem

A amostragem foi realizada em um abatedouro-frigorífico de aves de grande porte com abate médio de 330 mil frangos/dia, dois turnos de trabalho, com linhas automáticas de evisceração e cortes, localizado no estado do Paraná, fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal, habilitado ao mercado externo para destinos como União Europeia, China, Rússia, Japão e África do Sul.

Entre setembro de 2014 e agosto de 2015, a partir de um estudo prévio (DIANIN, 2016), foram realizadas 10 coletas ao longo da linha de abate, nas etapas de recepção das aves, abate e processamento. O objetivo foi isolar *Salmonella* sp. de amostras de gaiolas de transporte das aves, carcaças nas etapas após depenagem, após evisceração e após pré-resfriamento, produtos finais (coxa, asa e peito), mesas e facas utilizadas para manipulação do produto e mãos dos manipuladores.

A partir deste estudo foram obtidas 125 culturas de *Salmonella* sp. As análises realizadas foram sorotipificação, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), verificação do perfil de resistência a antibióticos e a produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Adicionalmente foram avaliados no PFGE 10 isolados obtidos no Paraná a partir de amostras do comércio varejista (PERIN, 2017).

4.2.2 Sorotipificação

A caracterização de 125 culturas de *Salmonella* sp. com base nos antígenos somáticos (O) e flagelares (H) de acordo com o sistema Kauffmann-White foi realizada pelo Laboratório de Enterobactérias (Labent) do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

4.2.3 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A PFGE foi realizada segundo protocolo descrito por Ribot et al. (2006) com a 124 culturas de *Salmonella* da presente pesquisa (um dos isolados não foi utilizado), e também comparando com outros 10 isolados obtidos no Paraná a partir

de amostras de corte congelados de frango obtido no comércio varejista (PERIN, 2017).

Os isolados de *Salmonella* sp. foram inoculados em caldo BHI e incubados a 37°C por 24 horas. Após esse período, ajustou-se a densidade óptica de cada caldo para aproximadamente 1 ($\lambda=610\text{nm}$) e uma alíquota de 400 μl da suspensão ajustada foi transferida para microtubo e centrifugada a 20.000 x G, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* tratado com proteinase K para homogeneizar com *seake gold agarose* 1% e formar os *plugs*, estes foram adicionados à solução de *cell lysis buffer* e depois lavados com água mili Q e *TE buffer*. Para a digestão enzimática, cerca de 1/3 do *plug* original foi seccionado e depositado em microtubos de 1,5 ml contendo 200 μl de buffer e 50 U da enzima *XbaI* (NewEngland Biolabs, Inc.), seguido de incubação a 37°C por 2 horas.

O DNA digerido foi separado em equipamento CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) utilizando o protocolo de um bloco com *inital switch time* de 2,2s, *final switch time* de 63,8s, voltagem de 6 V/cm, ângulo de 120° e tempo de corrida de 16 horas. O tampão de corrida utilizado foi o TBE 0,5X e a temperatura durante a corrida do gel foi mantida em 14°C. Como marcador de peso molecular foi utilizada a cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Braenderup (ATCC® BAA- 664™). Os géis foram corados com intercalante UniSafe Dye Nucleic Acid Staining Solution (Uniscience Corporation, Miami, USA) em banho de imersão de 30 minutos. Em seguida, cada gel foi submetido a três lavagens com água destilada, de 20 minutos cada, e então visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta.

Os padrões de restrição obtidos por PFGE foram analisados usando o *software* BioNumerics versão 7.6 (Applied-Maths, Kortrijk, Belgium). Para gerar o dendograma, o padrão de bandas foi comparado usando o coeficiente de similaridade de Dice, com tolerância de 5%, e análise de clusters UPGMA (Unweighed Pair Group Method Using Arithmetic Average).

Para interpretação dos resultados, perfis com similaridade $\geq 90\%$ foram considerados semelhantes e aqueles com similaridade de 100% foram considerados perfis clonais.

4.2.4 Perfil de Resistência a Antibióticos

Os isolados de *Salmonella* sp. foram submetidos a avaliação de suscetibilidade aos antibióticos de acordo com as normas M31-A3 (CLSI, 2008) e M100-S23 (CLSI, 2013) do Clinical Laboratory Standards Institute para disco-difusão em ágar. Como controle foi utilizada uma cepa de *Escherichia coli* ATCC® 25922.

Cada um dos 125 isolados foi testado frente a 6 classes de antibióticos: (1) Beta-lactâmicos: Ampicilina – AMP (10µg), Cefepime – CPM (30 µg), Ceftriaxone – CRO (30 µg), Meropenem – MER (10 µg), Imipenem – IPM (10 µg), Aztreonam – ATM (30 µg) e Amoxicilina com Ácido Clavulânico – AMC (20/10 µg); (2) Aminoglicosídeos: Gentamicina – GEN (10 µg), Amicacina – AMI (30 µg) e Tobramicina –TOB (10 µg); (3) Tetraciclinas: Tetraciclina – TET (30 µg) e Doxiciclina – DOX (30 µg); (4) Quinolonas: Ácido Nalidíxico – NAL (30 µg) e Ciprofloxacina – CIP (5 µg); (5) Inibidores do Folato: Sulfametoxazol com Trimetoprim – SUT (23,75/1,25 µg); (6) Cloranfenicol: CLO (30 µg) (Cecon®).

4.2.5 Produção de Enzimas ESBL

Após o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, os isolados que apresentaram resistência ou resistência intermediária a um ou ambos agentes ceftazidime e cefotaxime, foram testados para produção de enzimas ESBL, por meio do método de disco-difusão dupla (EUCAST, 2013). Para isso, foi aplicado um disco central contendo a combinação de amoxicilina com ácido clavulânico - AMC (20/10 µg) (Cecon®). Em um raio de 20mm a partir do disco central foram aplicados três discos, dois de cefalosporinas de terceira geração (ceftazidime – CAZ – 30 µg e cefotaxime – CTX – 30 µg) e uma cefalosporina de quarta geração (cefepime – CPM – 30 µg). O controle do teste foi realizado com uma cepa de *Escherichia coli* ATCC® 25922.

Foram considerados positivos para produção de enzimas ESBL os isolados de *Salmonella* sp. que apresentaram zonas de inibição em torno de qualquer cefalosporina aumentadas na direção do disco central contendo amoxicilina com ácido clavulânico (20/10 µg) (EUCAST, 2013).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Sorotipificação e Perfil de Macrorrestrição dos Isolados

Dentre os 125 isolados avaliados foram identificados três sorotipos diferentes, sendo que a maior ocorrência foi de *Salmonella* Heidelberg com 123 isolados, seguido de *Salmonella* Abony e *Salmonella* O:4,5 um isolado de cada, mostrando a predominância indiscutível de *S. Heidelberg* (98,4%) tendo sido encontrada em todas os pontos de coleta no abatedouro frigorífico do estudo (Tabela 1).

TABELA 1. SOROTIPOS DE *Salmonella* IDENTIFICADOS NA LINHA DE ABATE E PROCESSAMENTO DE FRANGO DE CORTE DE ACORDO COM A ETAPA DE COLETA.

Etapa	Ponto de coleta	Número de cultivos	<i>Salmonella</i> Heidelberg (%)	<i>Salmonella</i> Abony (%)	<i>Salmonella</i> O:4,5 (%)
Recepção	Gaiola	8	7 (87,5%)	0	1 (12,5%)
	Carcaça após depenagem	24	23 (95,8%)	1 (4,2%)	0
Abate	Carcaça após evisceração	32	32 (100%)	0	0
	Carcaça após pré-resfriamento	36	36 (100%)	0	0
Processamento	Mesa	2	2 (100%)	0	0
	Faca	2	2 (100%)	0	0
	Mão	1	1 (100%)	0	0
	Peito	7	7 (100%)	0	0
	Coxa	7	7 (100%)	0	0
	Asa	6	6 (100%)	0	0
Total		125	123 (98,4%)	1 (0,8%)	1 (0,8%)

FONTE: A autora (2017)

Salmonella Enteritidis não foi isolada em nenhuma amostra do estabelecimento, diferente dos dados oficiais do Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), publicados por Medeiros et al. (2011), que mostraram os sorotipos mais prevalentes em carcaça de frango no Brasil, entre 2004 e 2006, Enteritidis, Infantis, Typhimurium

e Heidelberg, sendo *S. Enteritidis* como responsável por quase a metade dos sorotipos nacionais identificados pelo PREBAF.

Do total dos 125 isolados a presença de *S. Heidelberg* foi observada em 98,4% dos isolados. Existe uma grande variação dos sorotipos de *Salmonella* sp. isolados ao longo do tempo. Até o início dos anos 2000, *S. Enteritidis* era o principal sorotipo encontrado em amostras de carne de frango, com percentuais próximos a 60%, quando comparado aos demais sorotipos (SANTOS et al., 2000). Nos anos seguintes, a ocorrência de *S. Enteritidis* em amostras biológicas de frango caiu de 77% em 2006 para 9% em 2010, enquanto que a ocorrência dos demais sorotipos aumentou de 23% para 91% no mesmo período (KOTTWITZ et al., 2013).

Outros estudos realizados após este período, com amostras de aviários de frango de corte e abatedouro, também não identificaram *S. Enteritidis* em seus isolados (VOSS-RECH et al., 2015; MION et al., 2016). Esse comportamento provavelmente é reflexo da implantação de Programas Nacionais de Controle de *Salmonella* sp., especialmente do PNSA, que determinou o abate de matrizes portadoras de *S. Pulum* e *S. Galinarum* e a vacinação dos lotes de aves reprodutoras com vacinas inativadas para *S. Enteritidis* (BRASIL, 2003). As estratégias de vacinação podem ter contribuído na redução da prevalência desse sorotipo em frangos de corte e aumentado os problemas causados por novos sorotipos que encontraram condições favoráveis para sua manutenção no ambiente de criação avícola (CHAMBERS, 2002; GAST, 2007).

No Brasil, o primeiro isolamento de *S. Heidelberg* em aves ocorreu em 1982, no estado de Santa Catarina, devendo ser considerada a hipótese de infecções em pintos de um dia, importados dos EUA. Porém, este fato não mostrou importância epidemiológica (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1997). De 1950 a 1990, um total de 45.862 cepas foram identificadas no Instituto Adolfo Lutz e até o ano de 1966 não havia prevalência significativa de qualquer sorotipo. A partir do ano de 1968 houve um aumento de *S. Typhimurium* em isolados de origem humana e não humana, tornando-se importante nas décadas seguintes. Entre os anos de 1993 e 1995 constatou-se um aumento expressivo nos isolamentos de *S. Enteritidis* associado a ocorrências de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos. Neste período *S. Enteritidis* foi também o sorotipo mais prevalente em materiais de origem não

humano como ovos, aves e meio ambiente (TAUNAY et al., 1996; TAVECCHIO et al., 1996).

No ano de 2006, Moreira et al. (2008) analisaram 363 amostras de carcaças de frango produzidas e comercializadas no estado de Goiás. Foram encontrados 11 diferentes sorotipos, com predomínio da *S. Albany* com 25% e *S. Enteritidis* com 13,5%. No mesmo ano Cortez et al. (2006) analisaram 288 amostras de um abatedouro do estado de São Paulo, onde identificaram 9 sorotipos, sendo que se destacaram *S. Kentucky* 34,5%, *S. Enteritidis* 20,8% e *S. Anatum* 13,8% dos isolados. Em ambos estudos *S. Heidelberg* não foi isolada.

Mais recentemente em outros dois estudos realizados também no estado do Paraná, *S. Heidelberg* foi isolada em granjas avícolas entre os anos de 2010 e 2011 (12,82% do total de isolados) e em cortes congelados de frango entre 2015 e 2016 (39% do total de isolados) sendo o primeiro e o segundo sorotipo mais frequentes nestes estudos, respectivamente. Evidenciando um aumento expressivo de *S. Heidelberg* nos últimos anos (PANDINI, et al., 2014; PERIN, 2017).

Mas não é só no Brasil que *S. Heidelberg* tem apresentado destaque nos isolados obtidos em carne de frango. Estudos realizados na América do Norte têm demonstrado grande importância, tendo sido considerado um dos cinco sorotipos mais importantes associado a toxi-infecção em seres humanos, causando desde diarreia leve até doenças sistêmicas graves, uma vez que *S. Heidelberg* tende a causar infecções mais invasivas quando comparados a outros sorotipos. Desta forma apresentando aspectos relevantes em saúde pública (CURRIE et al., 2005; CHITTICK et al., 2006; CDC, 2006; FOLEY; LYNNE, 2008; ZHAO et al., 2008; GURAN et al., 2017).

O fato de *S. Heidelberg* ter aumentado sua ocorrência nos últimos anos, aumentando sua prevalência em relação a outros sorotipos de *Salmonella*, pode estar relacionado em particular com a sua alta capacidade de adaptação ao ambiente, podendo permanecer viável por longos períodos nos galpões. Além disso, pode-se destacar algumas características como a capacidade invasiva, facilidade na formação de biofilmes e resistência a pH extremos, o que contribuiu na sua perpetuação no ambiente em toda a cadeia avícola (RODRIGUES et al., 2009; RAGHIANTE et al., 2010; TOZZO et al., 2017).

A avaliação dos perfis de macrorrestrição dos isolados de *Salmonella* sp. foi composta pelos 124 isolados da linha de abate e processamento juntamente com os 10 isolados de amostras adquiridas no comércio (FIGURA 1). Nesta figura, ao lado de cada sorotipo estão destacados o ponto de coleta e o perfil de resistência aos antibióticos. Ao total, foram obtidos 60 pulsotipos sendo 59 deles distribuídos em quatro *clusters* (considerando uma similaridade de 90%) e um isolado, que não formou *cluster*, pertencente ao sorotipo S. Heidelberg isolado de amostra de asa. A opção de comparar os resultados obtidos de amostras do comércio varejista foi no sentido de verificar a epidemiologia de *Salmonella* desde a indústria até a comercialização. Deste modo, os 10 isolados de amostras de comércio foram de produtos de dois abatedouros-frigoríficos, da mesma empresa onde foi feita a avaliação no processamento.

O *cluster* 1 foi composto somente por S. Heidelberg, com 11 isolados e 8 pulsotipos, entre os isolados, 4 apresentaram similaridade de 100%, incluindo carcaças da linha de abate e um corte proveniente do processamento, observou-se ainda similaridade maior que 95% entre a cepa 35, faca utilizada no processo, com a cepa 10-A, corte (coxinha da asa) originário do varejo.

O *cluster* 2 apresentou 56 isolados e 27 pulsotipos em sua maioria S. Heidelberg exceto por um isolado de S. *enterica* subsp. *enterica* O:4,5. Foi composto por cepas originadas da linha de abate e processamento, não incluindo cepa alguma originária de amostras do comércio varejista. Neste *cluster* observaram-se inúmeros isolados de S. Heidelberg apresentando 100% de similaridade, incluindo isolados oriundos de carcaças da linha de abate, cortes da linha de processamento, mesas de manipulação e mão de funcionário evidenciando uma fonte comum de contaminação e a disseminação horizontal desse patógeno. Cabe destaque as cepas 22 (mesa) e 84 (asa) clone das cepas 01, 05, 17, 31 e 32 (carcaças). Também a cepa 36 (mesa) clone da cepa 07 (mão), 18, 53 e 68 (asa, coxa e peito, respectivamente) mostrando a ampla disseminação na relação ambiente, produto e humano.

No *cluster* 3, os 33 isolados revelaram 11 pulsotipos que foram em sua maior parte de S. Heidelberg além de 4 isolados de S. Typhimurium. Foi mesclado por isolados originários de amostras da linha de abate e processamento e cortes adquiridos no comércio varejista. Neste cluster foram agrupados oito dos 10 isolados

de origem em amostras obtidas no comércio varejista. Entre os 100% de similaridade, cabe destaque ao isolado do varejo 08-A (filé de peito) que foi clone de sete isolados, oriundos de amostras de gaiola (86), cortes (85) e carcaças durante o processo (65, 87, 91, 111, 39). Destacou-se também a cepa 54 (asa) clone das cepas 55 e 71 de origem nas gaiolas de transporte de aves vivas, mostrando a influência do campo na contaminação do ambiente industrial e aos cortes produzidos. A cepa do varejo 02-A (frango a passarinho) com 100% de similaridade das cepas 82 (carcaça) e 94 (asa). Ênfase também ao período de obtenção dos isolados onde as amostras do varejo foram coletadas e analisadas no período de agosto de 2015 a fevereiro de 2016. Diferentemente dos isolados da indústria, provenientes de coletas distribuídas ao longo do período de setembro de 2014 a agosto de 2015 com aves oriundas de diferentes granjas conforme demonstrado na FIGURA 1. Estes achados permitem afirmar que há uma perpetuação de clones selecionados e que se mantém na cadeia produtiva por períodos prolongados, sendo que aqueles isolados caracterizados como de S. Heidelberg demonstraram a permanência no ambiente em períodos superiores a um ano.

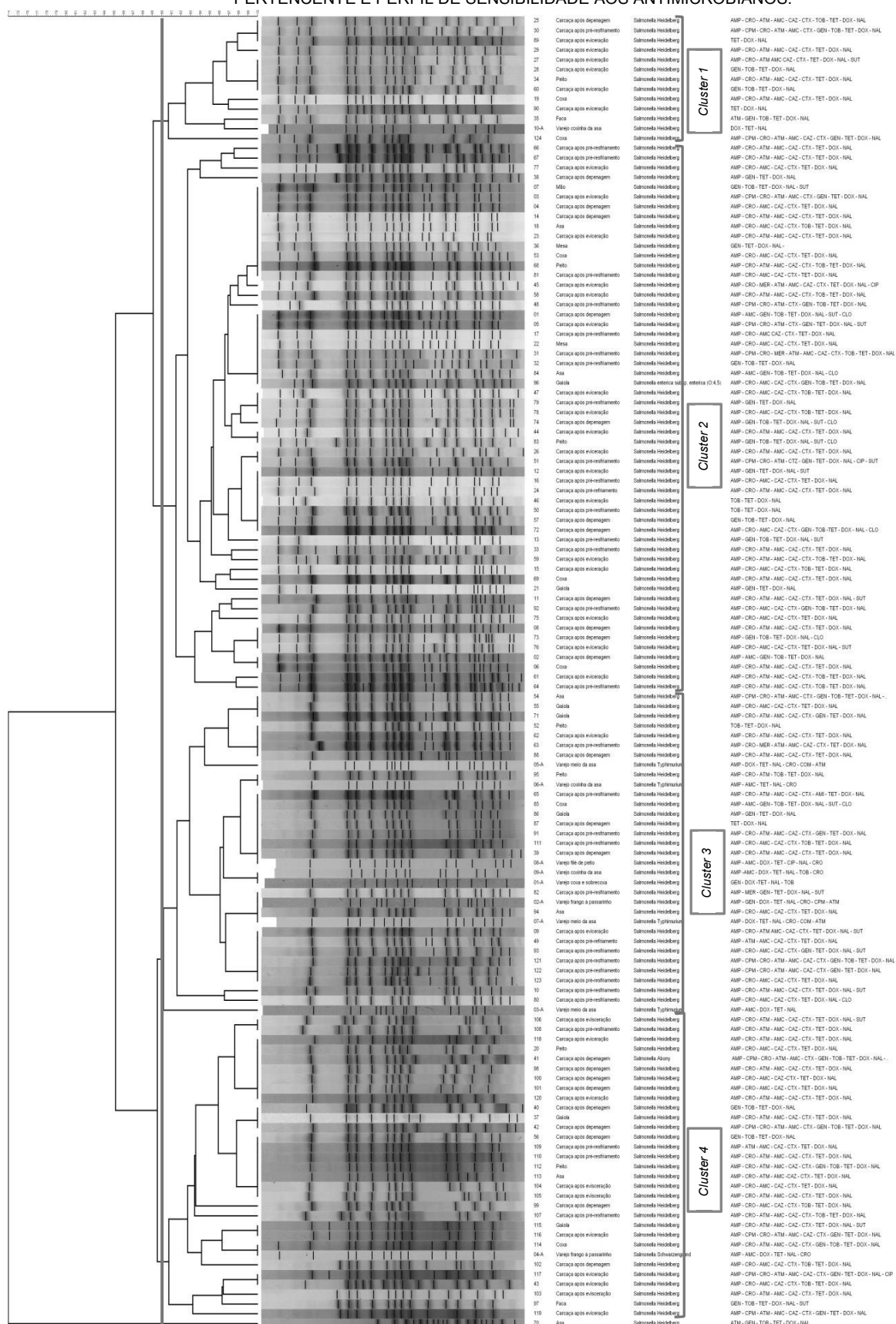
FIGURA 1 – PERÍODO DE OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DA INDÚSTRIA E DO VAREJO.



FONTE: A autora (2017)

O *cluster* 4, com 32 isolados e 13 pulsotipos, foi constituído pelos sorotipos Heidelberg, Abony e Schwarzengrund. Da mesma forma, este *cluster* apresentou isolados provenientes de carcaças, cortes da linha de abate e processamento e gaiolas de transporte de aves apresentando 100% de similaridade genética entre eles. Neste cluster também foi confirmada a disseminação de isolados clonais oriundo de gaiolas para carcaças em processamento e cortes finais.

FIGURA 2 – DENDOGRAMA OBTIDO POR MEIO DE PFGE, INDICANDO A RELAÇÃO GENÉTICA, SOROTIPO PERTENCENTE E PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.



FONTE: A autora (2017)

Os dados deste estudo foram parecidos com os resultados obtidos por Dias et al. (2016), analisando amostras de diferentes etapas de dois abatedouros de aves localizados no estado de Minas Gerais, onde os isolados obtidos no abate e processamento apresentaram perfis genéticos idênticos a isolados obtidos na recepção de aves. Isolados obtidos de diferentes lotes também apresentaram perfis idênticos. No trabalho realizado por Perin (2017), observou-se a presença de perfis clonais idênticos em várias regiões do Paraná, indicando a circulação da mesma cepa de *Salmonella* sp. entre as diferentes localidades do estado.

Estudos rastrearam as rotas de contaminação de *Salmonella* sp. nas diversas etapas da cadeia produtiva de aves. No geral, os resultados destes estudos, citados a seguir, demonstraram que houve uma persistência de clones por longos períodos, entretanto alguns deles indicaram também uma grande variabilidade entre as culturas, Chen et al. (2011) demonstraram a permanência de *Salmonella* sp. por mais de seis anos em uma cadeia de produção de carne de frango, através da análise de PFGE.

Outros estudos também observaram perfis genéticos idênticos de *Salmonella* sp. isolados em granjas, incubatórios e carcaças obtidas na indústria, reforçando a importância da criação como fonte de contaminação para o produto final, assim como se conceitua em termos “from farm to fork”, mostrando a necessidade de cuidados em toda a cadeia produtiva (LEE et al., 2007; NI et al., 2017).

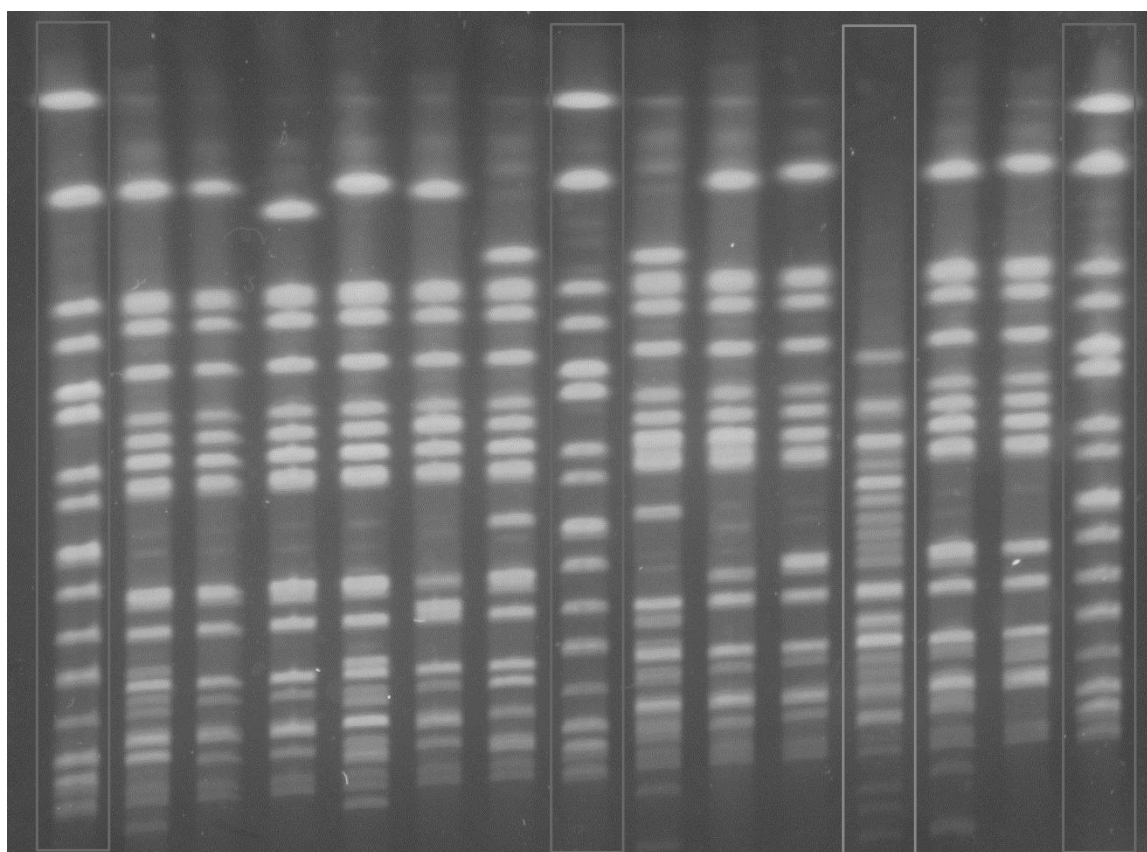
Voss-Rech et al. (2015), em granjas de frango de corte dos estados de Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul, observaram uma alta variabilidade genética dos isolados de *Salmonella*, sugerindo que o micro-organismo entrou nas granjas através de fontes de contaminação distintas. A diversidade genética dos isolados obtidos em granjas de aves da Coreia, e sua disseminação na indústria também foi observado por Kim et al. (2007). Da mesma forma, no estudo realizado por Clotheier e Byrne (2016), no estado da Califórnia, EUA, com 49 isolados de *S. Heidelberg* encontrou uma alta diversidade genética.

Em avaliações realizadas com *S. Heidelberg* foi observado que alta semelhança nos perfis genéticos, não refletiu necessariamente na semelhança em características fenotípicas importantes, como por exemplo, a resistência antimicrobiana, que poderiam estar associadas principalmente ao material genético

extra cromossômico e atribuídos a transferência de plasmídeos (ANDRYSIAK et al., 2008; NISAR et al., 2017). Torpdahl et al, (2005) utilizaram 110 isolados de 25 sorotipos, originários de seres humanos, que a análise genotípica por PFGE gerou agrupamentos semelhantes correspondendo ao sorotipo.

Observou-se ainda, através da FIGURA 2, o isolado de número 70, amostra de corte de frango, sorotipo Heidelberg, apresentou MR a 4 classes de antimicrobianos, não produtor de ESBL, que constituiu um único pulsotipo com similaridade menor que 75% em relação aos demais *clusters*. Na FIGURA 3 é possível observar as bandas formadas por este isolado que estiveram posicionadas entre o peso molecular 310.1 e 20.5, demonstrando padrões de bandas e perfil genético distintos, este fato destaca a relevância de outras fontes de contaminação, as quais podem chegar até o produto final.

FIGURA 3 – FOTO DO GEL DEMOSTRANDO A FORMAÇÃO DAS BANDAS DA AMOSTRA 70 EM RELAÇÃO AOS MARCADORES E AS DEMAIS ISOLADOS DE HEIDELBERG DO MESMO GEL.



□ Marcador de peso molecular *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Braenderup.

□ Isolado número 70.

FONTE: A autora (2017)

Salmonella é encontrada em toda a cadeia produtiva das aves colonizando o trato digestório das aves vivas durante a criação permanecendo até o momento do abate, contaminando o produto final. Esta situação é um fator problemático para a indústria avícola e de processamento de carne, já que o patógeno pode ser transferido para carcaças durante o processamento tecnológico, tornando-se um risco para a saúde pública (REZENDE et al., 2008; ANTUNES et al., 2016).

4.3.2 Resistência a Antimicrobianos

Todos os 125 isolados testados foram resistentes a pelo menos duas classes de antimicrobianos, sendo que 121 (96,8%) se apresentaram multirresistentes (MR), ou seja, resistente a pelo menos 3 classes de antimicrobianos, conforme descrito na TABELA 2.

Esses dados demonstraram MR superiores aos trabalhos realizados recentemente. Em avaliações com cepas obtidas no ambiente de abatedouro e granjas de frango de corte também no estado do Paraná, foram identificados 86% dos isolados com fenótipo MR (ZIECH et al. 2016; PERIN, 2017). Já o trabalho de Pandini et al. (2014) demonstrou MR em 25% das amostras de swab de arrasto em granjas de frango de corte. No entanto, o sorotipo Heidelberg foi o que apresentou maior índice de múltipla resistência.

Também foi demonstrado por Medeiros et al. (2011) a partir de amostras de 15 estados brasileiros, todos os isolados resistentes a pelo menos uma classe de antimicrobianos e 53,2% com resistência a três ou mais classes, sendo que os 16 isolados de *S. Heidelberg* demonstraram 100% de resistência a múltiplos antibióticos. O perfil de resistência da *S. Heidelberg* geralmente inclui altos índices de resistência ao ceftiofur, o qual está altamente correlacionado com as resistências a ampicilina, amoxicilina-clavulanato e ceftriaxona. O aumento da resistência às cefalosporinas de amplo espectro é significativo para a saúde pública, já que são medicamentos de primeira escolha para o tratamento de formas graves de salmonelose (PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA, 2005; DUTIL et al. 2010; NEVES et al., 2016; NISAR et al., 2017). Neste estudo foi possível observar elevados níveis de resistência a essas drogas.

TABELA 2. RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE *Salmonella* sp. FRENTE ÀS CLASSES DE ANTIMICROBIANOS TESTADOS.

CLASSE DE ANTIMICROBIANOS	NÚMERO DE ISOLADOS	%	NÚMERO DE CLASSES COM RESISTÊNCIA
Tetraciclina, Quinolonas	4	3,2	2
Aminoglicosídeos, Tetraciclina, Quinolonas	9	7,2	3
Beta-lactâmicos, Tetraciclina, Quinolonas	45	36	
Aminoglicosídeos, Tetraciclina, Quinolonas, Inibidores do Folato	1	0,8	
Beta-lactâmicos, Tetraciclina, Quinolonas, Inibidores do Folato	7	5,6	4
Beta-lactâmicos, Tetraciclina, Quinolonas, Cloranfenicol	1	0,8	
Beta-lactâmicos, Aminoglicosídeos, Tetraciclina, Quinolonas	42	33,6	
Beta-lactâmicos, Aminoglicosídeos, Tetraciclina, Quinolonas, Inibidores do Folato	3	2,4	
Beta-lactâmicos, Aminoglicosídeos, Tetraciclina, Quinolonas, Cloranfenicol	3	2,4	5
Beta-lactâmicos, Aminoglicosídeos, Tetraciclina, Quinolonas, Inibidores do Folato	6	4,8	
Beta-lactâmicos, Aminoglicosídeos, Tetraciclina, Quinolonas, Inibidores do Folato, Cloranfenicol	4	3,2	6

FONTE: A autora (2017)

Neves et al. (2016) avaliaram o perfil de resistência antimicrobiana da *S. Heidelberg* e realizaram uma comparação com isolados de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, utilizando amostras de granjas e abatedouros dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Os resultados mostraram um maior percentual de resistência da *S. Heidelberg* em relação aos outros dois sorotipos, demonstrando um maior potencial para transmissão de genes de resistência. Mion et al. (2014) também identificaram a progressão da resistência de *S. Heidelberg* isolada em abatedouros de aves do estado do Rio Grande do Sul entre os anos de 2005 e 2009.

Globalmente, a resistência de *Salmonella* sp. isolada de alimentos de origem animal aos antimicrobianos, sobretudo em aves, parece estar aumentando (ANTUNES et al. 2003; HUR et al. 2011; FRYE E JACKSON, 2013). O uso descontrolado dos agentes antimicrobianos na produção animal, de forma profilática, terapêutica ou como promotores de crescimento é uma das prováveis causas da emergência de cepas de *Salmonella* sp. resistentes (ANTUNES et al., 2003; SILVA e LINCOPAN, 2012).

No presente estudo foram observados altos índices de resistência dos isolados para tetraciclina, doxiciclina e ácido nalidíxico (100%), ampicilina (86,4%), amoxicilina com ácido clavulânico (80,8%), cefotaxime (80%), aztreonam e ceftriaxone (76%), ceftazidime (74,4%), tobramicina e gentamicina (62,4%) (TABELA 3). Resultados próximos foram relatados no Brasil por Ribeiro et al. (2011), encontrando 90% dos isolados de *Salmonella* sp. resistentes a tetraciclina, 70% ao ácido nalidíxico e 60% a ampicilina. Na China, Yang et al. (2013) também descreveram percentuais elevados de *Salmonella* sp. resistente a esses três antimicrobianos, evidenciando a disseminação global de cepas resistentes.

Durante muitos anos o ácido nalidíxico foi utilizado na criação de aves no Brasil (SEYFARTH et al., 1997). A obtenção de resistência a quinolonas foi relatada como sendo um processo multifatorial, que inclui entre as possibilidades as mutações e a resistência mediada por plasmídeos (CRUMP, et al., 2011; PIDDOCK, 2002).

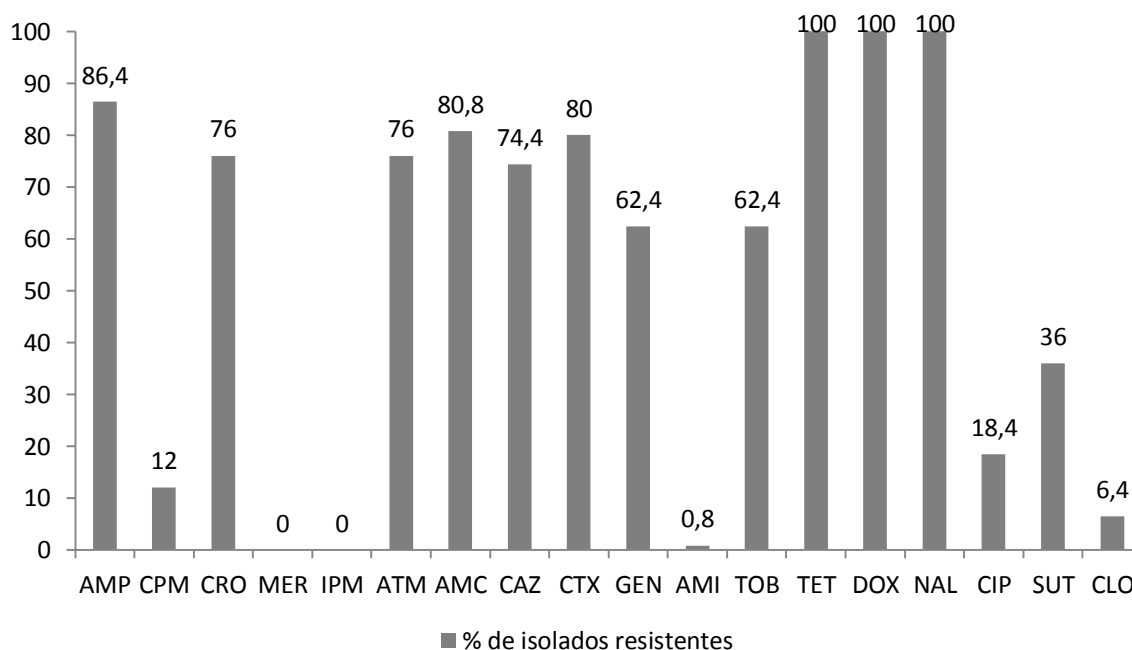
A pesar do uso de tetraciclina como aditivo na alimentação animal ser proibido no Brasil desde 1992, ele ainda é utilizado como terapêutico, além disso, este antibiótico foi um dos primeiros adotados para uso na produção animal, evidenciando que o uso contínuo das tetraciclinas tem aumentado os índices de

resistência a este antibiótico e tornando mais restritas as opções terapêuticas disponíveis (BRASIL, 1992; MUHAMMAD, et al. 2010)

Para o cloranfenicol, os dados se assemelham ao trabalho de Pandini et al. (2014) onde somente o sorotipo *S. Heidelberg* apresentou resistência. Em outro trabalho, realizado por Nisar et al. (2017), identificaram 9% dos isolados de *Heidelberg* resistentes a esta droga. Este é um dos primeiros medicamentos utilizados na medicina veterinária e sua utilização em animais de produção foi proibida desde 1998 (BRASIL, 1998).

Todos os isolados foram sensíveis aos carbapenêmicos (meropenem, MER e imipenem, IPM) essa informação de sensibilidade aos carbapenêmicos é importante, pois esses antimicrobianos são os de primeira escolha para combater infecções causadas por micro-organismo produtores de enzimas ESBL (ZHANEL et al., 2007; VARDAKAS et al., 2012).

TABELA 3. PERCENTUAL DE ISOLADOS DE *SALMONELLA* SP. RESISTENTES A CADA AGENTE ANTIMICROBIANO TESTADO.



Cepas que apresentaram resistência intermediária foram classificadas como resistentes.

AMP: Ampicilina; CPM: Cefepime; CRO: Ceftriaxone; MER: Meropenem; IPM: Imipenem; ATM: Aztreonam; AMC: Amoxicilina com Ácido Clavulânico; CAZ: Ceftazidime; CTX: Cefotaxime; GEN: Gentamicina; AMI: Amicacina; TOB: Tobramicina; TET: Tetraciclina; DOX: Doxiciclina; NAL: Ácido Nalidíxico; CIP: Ciprofloxacina; SUT: Sulfametoxazol com Trimetoprim; CLO: Cloranfenicol.

FONTE: A autora (2017)

Dos 125 isolados, 94 apresentaram resistência a ceftazidime ou ao cefotaxime ou a ambos. Sendo submetidos a teste para produção de enzimas ESBL, sendo que, 24 isolados apresentaram padrão fenotípico compatível com a produção dessas enzimas, representando percentual de 19,2% dos isolados. Nesses isolados que apresentaram resultado positivo para a produção de ESBL, 23 pertenciam ao sorotipo Heidelberg e uma ao sorotipo Abony.

No trabalho realizado por Ziech et al. (2016) a atividade ESBL foi detectada em 45% das cepas. Das cepas positivas para a produção ESBL, o perfil de resistência mais frequente foi para beta-lactâmicos, quinolonas e tetraciclina (38/44). Genes responsáveis pela expressão das enzimas ESBL, tem sido relatados no Brasil, como o gene *bla_{CTX-M}* e o gene *bla_{TEM}* inclusive a associação entre os dois (PERIN, 2017; SILVA; LINCOPAN, 2012; PEIRANO et al., 2006). Shahada et al. (2010) realizaram caracterização molecular de isolados de *Salmonella* sp. com fenótipo multirresistente, o principal resultado foi a presença de 32 cepas portadoras do gene *bla_{TEM}* responsável pela resistência a ampicilina, cefalotina, ceftazidime e cefotaxime.

Alguns estudos reproduziram experimentalmente a transferência de genes de resistência entre sorotipos de *Salmonella* e outras bactérias através de plasmídeos conjugativos. Alguns grupos de plasmídeos são muito prevalentes em enterobactérias aparecendo junto com genes de resistência (CARATTOLI, 2011). Um exemplo disso é a presença repetida de genes de beta-lactamase no gênero *Salmonella*, que confere a resistência às classes dos beta-lactâmicos (ZIOGA et al., 2008; SHAHADA et al., 2010). Diversos isolados de *Salmonella* multirresistente possuem plasmídeos contendo diferentes elementos genéticos, importantes na dispersão dessa característica entre as cepas (FOLEY; LYNNE, 2008).

Frente ao constante uso de drogas antimicrobianas, as bactérias são capazes de desenvolver alternativas para que seja garantida a sua sobrevivência e das gerações seguintes, adquirindo o perfil de resistência à ação desses fármacos (MOREIRA et al., 2013).

Neste estudo foi possível observar que as cepas demonstraram um grau preocupante de MR aos antimicrobianos. O que pode dificultar o tratamento de salmonelose em aves e humanos. O sorotipo Heidelberg confirmou um alto nível de resistência a antibióticos, diminuindo as opções para o controle durante as etapas de

criação das aves, podendo comprometer a qualidade microbiológica do produto final. Faz-se necessário uma avaliação a respeito da conduta para utilização de antibióticos na produção animal.

4.4 CONCLUSÃO

Há circulação de perfis clonais de *Salmonella* sorotipo Heidelberg desde a criação das aves até os produtos finais expostos à venda, os mesmos clones se mantiveram circulantes por um período de 18 meses, mostrando a ampla disseminação horizontal e a grande adaptação e persistência deste sorotipo à cadeia de frangos de corte, indicando a necessidade de medidas de controle mais rigorosas na criação das aves e no abate e processamento, a fim de reduzir a perpetuação de *Salmonella*.

Foram identificados altos índices de multirresistência e presença de culturas produtoras de ESBL, mostrando que *S. Heidelberg* é um grande desafio com relação à resistência antimicrobiana, demonstrando a necessidade de que as estratégias para a utilização racional de antibióticos em aves sejam constantemente revisadas e monitoradas.

Não houve identificação de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, micro-organismos de grande relevância em saúde pública, alvos de programas de controle oficiais, mostrando bons resultados dos programas de controle especificamente para estes sorotipos na cadeia produtiva de aves.

REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2016. 2016b. Disponível em: <http://abpa-br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf> acesso em 25 agosto de 2017.
- Andrysiak AK, Olson, AB, Tracz, DM, et al. Genetic characterization of clinical and agri-food isolates of multi drug resistant *Salmonella* enterica serovar Heidelberg from Canada. BMC Microbiol, 2008; 8:89.
- Antunes P, Réu C, Souza JC, Peixe L, Pestana N. Incidence of Salmonella from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. Int Journal Food Microbiol, 2003; 82:97–103.
- Antunes P, Mourão J, Campos J, Peixe L. Salmonellosis: the role of poultry meat. Clin Microbiol Infect, 2016; 22:110–121.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003. Aprovar as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium. Diário Oficial da União.
- Brasil. Portaria nº159, de 23 de junho de 1992. Dispõe sobre a proibição do uso de clortetraciclina, oxitetraciclina e penicilina como promotores de crescimento. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasília.
- Brasil. Portaria n. 448, de 10 de setembro de 1998. Dispõe sobre a proibição de fabricação, importação, comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações, e de aditivos alimentares que especifica e revoga a portaria que menciona. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasília.
- Carattoli A. Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance in *Salmonella* enterica. Curr Issues Mol Biol, 2003; 5:113-122.
- CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2006. FoodNet surveillance report,. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 2006
- Chambers JR, Lu X. Probiotics and maternal vaccination for *Salmonella* control in broiler chickens. J. Appl. Poult. Res, 2002; 11:320–327.
- Chen MH, Hwang WZ, Wang SW, Shih YC, Tsen HY. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis for multidrug resistant *Salmonella* enterica serovar schwarzengrund isolates collected in six years (2000–2005) from retail chicken meat in Taiwan. Food Microbiol, 2011; 28:399-405.

Chen HM, Wang Y, Su LH, Chiu CH. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatr Neonatol*, 2013; 54:147–152.

Chittick P, Sulka A, Tauxe RV, Fry AM. A summary of national reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. *J Food Prot*, 2006; 69:1150–1153.

Clothier KA, Byrne BA. Phenotypic and genotypic characterization of animal-source *Salmonella* Heidelberg isolates. *J Vet Med*, 2016; 89.

CLSI 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard. 3rd ed. CLSI document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA.

CLSI 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 23th Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Cortez ALL, Carvalho ACFB, Ikuno AA, Bürger KP, Vidal-martins AMC. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. *Arq Inst Biol*, 2006; 73:157-163.

Crump JA, Medalla FM, Joyce KW, Krueger AL, Hoekstra RM, Whichard JM. Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella* enterica in the United States, national antimicrobial resistance monitoring system, 1996-2007. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011; 55:1148–1154.

Crump JA, Sjolund-karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. *Clin Microbiol Rev*, 2015; 28:901–937.

Currie A, Macdougall L, Aramini J, Gaulin C, Ahmed R, Asaacs S. Frozen chicken nuggets and strips and eggs are leading risk factors for *Salmonella* Heidelberg infections in Canada. *Epidemiol Infect*, 2005; 133:809–816.

Dianin KS. Indicadores de higiene e pesquisa de *Salmonella* spp. em linha de abate e processamento de frango de corte. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, 2016.

Dias MR, Cavicchioli VQ, Camargo AC, Lanna FGPA, Pinto PSA, Bersot LS, Nero LA. Molecular tracking of *Salmonella* spp. in chicken meat chain: from slaughterhouse reception to end cuts. *J Food Sci Technol*, 2016; 53:1084-1091.

Dutil L, Irwin R, Finley R, King L, Avery B, Boerlin P, Bourgault AM. Ceftiofur resistance in *Salmonella* enterica serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg Infect Dis*, 2010; 16:48–54.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Sweden, 2013.

Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. J Anim Sci., 2008;86:173-187.

Forshell LP, Wierup M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal foods products. Rev Sci Tech, 2006; 25:541-554.

Frye JG, Jackson CR. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. Front Microbiol, 2013; 4:135.

Gast R. K. Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. Avian Dis, 2007; 51:817–828.

Guran HS, Mann D, Alali WQ. *Salmonella* prevalence associated with chicken parts with and without skin from retail establishments in Atlanta metropolitan area, Georgia, Food Control, 2017; 73:462-467.

Hofer E, Silva Filho SJ, Reis EMF. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves do Brasil. Pesq Vet Bras, 1997; 17: 55-62.

Hur J, Kim J.H, Park JH, Lee YJ, Lee JH. Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry. Vet Journal, 2011; 189:306–311.

Kim A, Lee YJ, Kang MS, Kang SI, Cho JK. Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. J Vet Sci, 2007; 8:155-161.

Kottwitz LBM, Back A, Leão JA, Frausto HSEG, Magnani M, Oliveira TCRM. Decline of *Salmonella* Enteritidis in poultry, British Food J, 2013; 115:1541-1546.

Lee YJ, et al. Characterization of *Salmonella* spp. isolated from na integrated broiler chicken operation in Korea. J Vet Med Sci, 2007; 69:399-404.

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

Mion L, Parizotto L, Santos LA, Webber B, Cisco IC, Pilotto F, Rodrigues LB, Nascimento VP, Santos LR. *Salmonella* spp. Isolated by Miniaturized Most Probable Number and Conventional Microbiology in Poultry Slaughterhouses. Acta Scientiae Veterinariae, 2016; 44:1393.

Mion L, Colla FL, Cisco IC, Webber B, Diedrich LN, Pilotto F, Rodrigues LB, Nascimento VP, Santos LR. Perfil de resistência a antimicrobianos por *Salmonella*

Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2014; 42:1220.

Moreira NM, Sola MC, Feistel JC, Oliveira JJ, Freitas FA. Os mecanismos de resistência bacteriana da *Salmonella* sp. frente à utilização de antibióticos. *Enciclopédia Biosfera*, 2013; 9:1134.

Moreira GN, Rezende CSM, Carvalho RN, Mesquita SQP, Oliveira AN, Arruda MLT. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 2008; 67:126-130.

Muhammad M, Muhammad LU, Ambali AG, Mani A, Azard US, Barco L. Prevalence of *Salmonella* associated with chick mortality at hatching and their susceptibility to antimicrobial agents. *Vet. Microbiol*, 2010; 140:131–135.

Neves GB, Stefani LM, Pick E, Araujo DN, Giuriatti J, Percio C, Brisola MC. *Salmonella* Heidelberg Isolated from Poultry Shows a Novel Resistance Profile. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2016; 44:1418.

Nisar M, Kassem II, Rajashekara G, Goyal SM, Lauer D, Voss S, Nagaraja KV. et al. Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of *Salmonella* Heidelberg isolated from chickens and turkeys in the Midwestern United States. *Journal of Vet Diag Investigation*, 2017; 29:370-375.

Ni P, Xu Q, Yin Y, Liu D, Zhang J, Wu Q, Tian P. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars isolated from farm products in Shanghai, *Food Control*, 2017; 85:269-275.

Pandini JA, Pinto FGS, Muller JM, Weber LD, Moura AC. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. *Arq Inst Biol*, 2014; 82.

Peirano G, Agerso Y, Aarestrup FM, Reis EM, Rodrigues DP. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella* enterica from Brazil. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 58:305–309.

Perin, A. P.; Ocorrência e quantificação de *Salmonella* sp. em cortes de frango congelados: levantamento epidemiológico no estado do Paraná e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, 2017.

Piddock LJ, Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol Rev*, 2002; 26:3–16.

Public Health Agency of Canada, 2005. *Salmonella* Heidelberg – Ceftiofur- Related Resistance in Human and Retail Chicken Isolates, Disponível em: <https://www.canada.ca/content/dam/phac-aspc/migration/phac-spc/cipars-picra/heidelberg/pdf/heidelberg_e.pdf> acesso em 22 de outubro de 2017.

Raghiante F, Rocha TS, Rossi DA, Silva PL. Penetration Time of *Salmonella* Heidelberg Through Shells of White and Brown Commercial Eggs. *Braz J Med Biol*, 2010; 12:272-277.

Rezende CSM, Mesquita AJ, Andrade MA, Strinchini JH, Chaves LS, Minafra CS, Lage ME. Ácido acético em rações de frangos de corte experimentalmente contaminadas com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, 2008;9:516-528.

Ribeiro VB, Lincopan N, Landgraf M, Franco BDG. M, Destro MT. Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella* enterica isolates from foodstuff and related sources. *Braz. J. Microbiol*, 2011; 42:685-692.

Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis*, 2006; 3:59-67.

Rodrigues LB, Santos LR, Rizzo NN, Tagliari VZ, Oliveira AP, Trenhago G, Rodegheri SC, Taglieti RM, Dickel EL, Nascimento VP. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2009; 37:225-230.

Seyfarth AM, Wegener HC, Frimodt-moller N. Antimicrobial resistance in *Salmonella* enterica subesp. enterica serovar Typhimurium from humans and production animals. *J Antimicrob Chemother*, 1997; 40:67-75.

Santos DMS, Berchieri A, Fernandes SA, Tavecchio AT, Amaral LA. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesq Vet Brasileira*, 2000; 20:39-42.

Shahada F, Sugiyama H, Chuma T, Sueyoshi M, Okamoto K. Genetic analysis of multi-drug resistance and the clonal dissemination of beta-lactam resistance in *Salmonella* Infantis isolated from broilers. *Vet Microbiol*, 2010; 140:136-144.

Silva KC, Lincopan N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *J Bras Patol Med Lab*, 2012; 48:91-99.

Taunay AE, Fernandes SA., Tavecchio AT, Neves BC, Dias AMG, Irino K. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med.*, 1996; 38:119-127.

Tavecchio AT, Fernandes SA, Neves BC, Dias AMG, Irino K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med.*, 1996; 38:315-322.

Torpdahl M, Skov MN, Sandvang D, Baggesen DL. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *J Microbiol Methods*, 2005; 63:173-184.

Tozzo K, Neto AFG, Spercoskic KM, Ronnau M, Soares VM, Bersot LS. Migration of *Salmonella* serotypes Heidelberg and Enteritidis in previously frozen chicken breast meat, *Food Microbiol*, 2017; 69:204-211.

USDA/FSIS. Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products and Carcass and Environmental Sponges. p. 19, In: Service, U.S.D.o.A.F.S.a.I. (ed.). 2014.

Vardakas KZ, Tansarli GS, Rafailidis PI, Falagas ME. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*, 2012; 67:2793–2803.

Voss-rech D, Vaz CSL, Alves L, Coldebella A, Leão JA, Rodrigues DP, Back A. A temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. *Poultry Science*, 2015; 94:433-441.

Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L. et al. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*, 2007; 67:1027–1052.

Zhao S, White DG, Friedman SL, Glenn A, Blickenstaff K, Ayers SL, Abbott JW, Hall-robinson E, Mcdermott PF. Antimicrobial resistance in *Salmonella* enterica serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006. *Appl Environ Microbiol*, 2008; 74:6656–6662.

Ziech RE, Lampugnani C, Perin AP, Sereno MJ, Sfaciotte RAP, Viana C, Soares VM, Pinto JPAN, Bersot LS. Multidrug resistance and ESBL-producing *Salmonella* spp. isolated from broiler processing plants. *J Microbiol Brazilian*, 2016; 47:191-195.

Zioga A, Whichard JM, Joyce KJ, Tzelepi E, Tzouvelekis LS, Miriagou V. Evidence for chromosomal and plasmid location of CMY-2 cephalosporinase gene in *Salmonella* serotype Typhimurium. *J Antimicrob Chemother*, 2008; 61:389–1399.

Yang B, Qiao L, Zhang X, Cui Y, Xia X, Cui S, Wang X, Meng X, Ge W, Shi X, Wang D, Meng J. Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulsed field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in Henan Province, China. *Food Control*, 2013; 32:228-235.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos neste trabalho demonstraram a predominância de *S. Heidelberg* na linha de abate e processamento de frangos de corte, mostrando uma grande variação dos sorotipos de *Salmonella* isolados ao longo do tempo, com a emergência de *S. Heidelberg* fato preocupante, já que pode causar infecções invasivas em humanos.

Com base nos resultados do PFGE, pode-se concluir que há circulação de perfis clonais de *Salmonella* sorotipo Heidelberg desde a criação das aves até os produtos finais expostos à venda, os mesmos clones se mantiveram circulantes por um período superior a um ano mostrando a ampla disseminação horizontal e a grande adaptação e persistência deste sorotipo à cadeia de frangos de corte, indicando a necessidade de medidas de controle mais rigorosas na criação das aves, a fim de reduzir a perpetuação de *Salmonella*. O recebimento de aves com presença de *Salmonella* na indústria é um fator relevante para a inocuidade do produto final, já que outros fatores, como aves desuniformes e equipamentos mal regulados podem aumentar a probabilidade de contaminação das carcaças durante o processo de abate.

Foram identificados altos índices de multirresistência e presença de culturas produtoras de ESBL, mostrando que *S. Heidelberg* é um grande desafio com relação à resistência antimicrobiana, demonstrando a necessidade de que as estratégias para a utilização racional de antibióticos em aves sejam constantemente revisadas e monitoradas, já que o abuso na utilização de antibióticos pode contribuir para a seleção de micro-organismos resistentes, e a disseminação dessa resistência de forma vertical ou horizontal.

Não houve identificação de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, micro-organismos de grande relevância em saúde pública, alvos de programas de controle oficiais, mostrando bons resultados dos programas de controle especificamente para estes sorotipos na cadeia produtiva de aves.

REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2016. 2016b. Disponível em: <http://abpa-br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf> acesso em 25 agosto de 2017.
- ALCOCER, I. et al. Discriminação de Sorovares de Salmonella Spp. Isolados de Carcaças de Frango por Rep E Eric-Pcr e Fagotipagem do Sorovar Enteritidis. **Ciência e Tecnologia Alimentar**. Campinas, v. 26, n. 2, p. 414-420, 2006.
- AMSON, V. G; HARACEMIV, S. M. C; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos às ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n. 6, p.1139-1145, 2006.
- ANDRYSIAK A. K., OLSON, A. B., TRACZ, D. M., et al. Genetic characterization of clinical and agri-food isolates of multi drug resistant *Salmonella* enterica serovar Heidelberg from Canada. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 89, p. 1-13, 2008.
- ANTUNES, P.; RÉU, C.; SOUZA J. C.; PEIXE, L.; PESTANA, N.; Incidence of Salmonella from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **International Journal Food Microbiology**, v. 82, p. 97–103, 2003.
- ANTUNES, P., MOURÃO, J., CAMPOS J., PEIXE, L. Salmonellosis: the role of poultry meat, **Clinical Microbiology and Infection**, n. 22, p. 110–121, 2016.
- BADA-ALAMBEDJI, R.; FOFANA, A.; SEYDE, M.; AKAKPO, A. J. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from poultry carcasses in Dakar (Senegal). **Brazilian Journal Microbiology**, v. 37, p. 510-515, 2006.
- BAKOWSKI, M. A.; BRAUN, V.; BRUMELL, J. H.; Salmonella-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. **SCV Trafficking**, v. 9, n. 12, p. 2022-2031, 2008.
- BAUMAN, R. W. Microbial Genetics. **Microbiology**. 2.ed. San Francisco: Pearson,, cap. 7, p. 197-328, 2009.
- BRASIL, 2001. Resolução 13 - Regulamento Técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados, p. 4p. In: Sanitária-ANVISA, Brasília, DF, Brasil.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003a. Aprovar as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de Salmonella Gallinarum e de Salmonella Pullorum e Livres ou Controlados para Salmonella Enteritidis e para Salmonella Typhimurium. **Diário Oficial da União**.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003b. Institui o Programa de Redução de Patógenos,

Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. Diário Oficial da União.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016a. Controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF). **Diário Oficial da União**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2016b.

BRASIL. Portaria nº159, de 23 de junho de 1992. Dispõe sobre a proibição do uso de clortetraciclina, oxitetraciclina e penicilina como promotores de crescimento. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasília.

BRASIL. Portaria n. 448, de 10 de setembro de 1998. Dispõe sobre a proibição de fabricação, importação, comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações, e de aditivos alimentares que especifica e revoga a portaria que menciona. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasília; 1998.

CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; OMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**, Atheneu, São Paulo, 3 ed., p. 229 – 234, 2002.

CANTON, R.; MOROSINI, M. I.; MARTINS, O.; MAZA, S.; GOMES, E.; PEDROSA, G. **Clinical Microbiology Infection**, v. 14, p. 53-62, 2008.

CARATTOLI, A. Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica*. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 5, p. 113-122, 2003.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Reports of *Salmonella* Outbreak Investigations from 2017. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks-2017.html> > acesso em 07 de setembro de 2017.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of Multidrug-Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Contact with Dairy Bull Calves. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-11-16/index.html> > acesso em 07 de setembro de 2017.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2014.

CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2006. FoodNet surveillance report,. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 2006

CHAMBERS, J. R.; LU, X. Probiotics and maternal vaccination for Salmonella control in broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, p. 320–327, 2002.

CHEN, M. H.; HWANG, W. Z.; WANG, S. W.; SHIH, Y. C.; TSEN, H. Y. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis for multidrug resistant *Salmonella* enterica serovar schwarzengrund isolates collected in six years (2000–2005) from retail chicken meat in Taiwan. **Food Microbiology**, v. 28, p. 399-405, 2011.

CHEN, H.M.; WANG, Y.; SU, L.H.; CHIU C.H. Nontyphoid Salmonella infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. **Pediatrics and Neonatology**, v. 54, p. 147–152, 2013.

CHITTICK, P.; SULKA, A.; TAUXE, R. V.; FRY, A. M. A summary of national reports of foodborne outbreaks of Salmonella Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 5, p. 1150–1153, 2006.

CLOTHIER, K. A.; BYRNE, B.A. Phenotypic and genotypic characterization of animal-source Salmonella Heidelberg isolates. **Journal of Veterinarian Medical**, 2016.

CLSI 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Aproved Standard.3rd ed. CLSI document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute.Wayne, PA.

CLSI 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.23th Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CORBUM, B.; GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. Salmonella, the host and disease: a brief review. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 112-118, 2007.

CORTEZ, A. L. L.; CARVALHO, A. C. F. B.; IKUNO, A. A.; BÜRGER, K. P.; VIDAL-MARTINS, A. M. C. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. **Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 157-163, 2006.

CROFT, A. C.; D'ANTONI, A. V.; TERZULLI, S. L. Update on the antibacterial resistance crisis. **Medical Science Monitor**, v. 13, n. 6, p. 103-118, 2007.

CRUMP, J.A.; MEDALLA, F. M.; JOYCE, K.W.; KRUEGER, A.L.; HOEKSTRA, R.M.; WHICHARD, J.M. Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal Salmonella enterica in the United States, national antimicrobial resistance monitoring system, 1996-2007. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 1148–1154, 2011.

CRUMP, J.A.; SJOLUND-KARLSSON, M.; GORDON, M.A.; PARRY, C.M. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, p. 901–937, 2015.

CURRIE, A., MACDOUGALL, L., ARAMINI, J., GAULIN, C., AHMED, R., ASAACS, S. Frozen chicken nuggets and strips and eggs are leading risk factors for *Salmonella* Heidelberg infections in Canada. **Epidemiology and Infection**, n. 133, p. 809–816, 2005.

DIANIN, K. S.; Indicadores de higiene e pesquisa de *Salmonella* spp. em linha de abate e processamento de frango de corte. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Federal do Paraná, 2016.

DIAS, M. R.; CAVICCHIOLI, V. Q.; CAMARGO, A. C.; LANNA, F. G. P. A.; PINTO, P. S. A.; BERSOT, L. A.; NERO, L. A. Molecular tracking of *Salmonella* spp. in chicken meat chain: from slaughterhouse reception to end cuts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 1084–1091, 2016.

DUTIL, L.; IRWIN, R.; FINLEY, R.; KING, L.; AVERY, B.; BOERLIN, P.; BOURGAULT, A. M. Ceftiofur resistance in *Salmonella* enterica serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16 n. 1, p. 48–54, 2010.

EFSA. European Food Safety Authority. The european union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v.13, n.1, p.165, 2015a.

EFSA. European Food Safety Authority. The european union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. **EFSA Journal**, v.13, n.4329, p.191, 2015b.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Sweden, 2013.

FISKER, N.; VINDING, K.; MØLBAK, K.; HORNSTRUP, M. K. Clinical review of nontyphoid *Salmonella* infections from 1991 to 1999 in a Danish county. **Clinical Infection Diseases**, v. 37, n. 4, p. 47–52, 2003.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M. Food animal-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**, v. 86, p.173–187, 2008.

FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal foods products. **Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties**, v.25, n.2, p. 541–554, 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. N. **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo: Atheneu, p. 182, 1996.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiología de los Alimentos**. Zaragoza (España), editora Acribia, 1993.

FREITAS NETO, O.C.; PENHA FILHO, R. A. C.; BARROW, P.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.12, n.1, p. 01-11, 2010.

FRYE, J. G., JACKSON, C. R. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 135, p. 1-22, 2013.

GAMA, N. M. S. Q. *Salmonella* spp em aves de postura comercial. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, 2001.

GAST, R. K. Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. **Avian Diseases**, v. 51, p. 817–828, 2007.

GORDON, M. A. *Salmonella* infections in immunocompromised adults. **Journal Infection**, v. 56, n. 6, p. 413-422, 2008.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *International Journal of Food Microbiology*, v. 130, n. 2, p. 77–87, 2009.

GRIMONT, P. A. D., WEILL, F. X., Antigenic Formulae of the *Salmonella* Sorovars, **Institut Pasteur**, ed. 7, 2007.

GUIBOURDENCHE, M., ROGGENTIN, P., MIKOLEIT, M., FIELDS P. I., BOCKEMÜHL J., GRIMONT, P. A.D., WEILL, F. X. Supplement 2003 e 2007 (Nº 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 26-29, 2010.

GURAN, H. S., MANN, D., ALALI, W. Q. *Salmonella* prevalence associated with chicken parts with and without skin from retail establishments in Atlanta metropolitan area, Georgia, **Food Control**, v. 73, p. 462-467, 2017.

HANSEN-WESTER, I.; STECHER, B.; HENSEL, M.; Type III secretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated effectors and SseFG, **Infection and Immunity**, v. 70, N. 3. P. 1403-1409, 2002.

HARAGA, A.; OHLSON, M. B.; MILLER, S. I.; *Salmonella* interplay with host cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 53-66, 2008.

HELMS, M.; ETHELBERG, S.; MOLBAK, K.; International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 859-867, 2005.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 55-62, 1997.

HOHMANN, E. L. Nontyphoidal salmonellosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 2, p. 263-269, 2001.

HUMPHREY, T. J. Public-health aspects of *Salmonella* infection. In: Wray, C & Wray, A. ***Salmonella in Domestic animals***. New York: CABI Publishing, Cap. 15, p. 245-263, 2000.

HUR, J.; KIM, J.H.; PARK, J.H.; LEE, Y.J.; LEE, J.H.; Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry. **Veterinary Journal**, v. 189, p. 306–311, 2011

ISO/ST, 2012. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*—part 2: enumeration by a miniaturized most probable technique (ISO/TS 6579-2: 2012).

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; et al. Supplement 2008-2010 (nº 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526–530, 2014.

JABEEN, K; ZAFAR, A.; IRFAN, S.; KHAN, E.; MEHRAJ, V.; HASAN, R.; Increase in isolation of extended spectrum beta lactamase producing multidrug resistant non typhoidal *Salmonellae* in Pakistan. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, 2010.

KELLEY, T. R.; PANCORBO, O. C.; MERKA, W. C.; BARNHARTS, H. M. Antibiotic resistance of bacterial litter isolates. **Poultry Science**; v. 77, p. 243-247, 1998.

KIM, A., LEE, Y. J., KANG, M. S., KANG, S. I., CHO, J. K. Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. **Journal Veterinary Science**, v. 8, p. 155-161, 2007.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRCMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofur, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315–317, 1983.

KOTTWITZ, L. B. M.; BACK, A.; LEÃO, J. A.; FRAUSTO, H. S. E. G.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Decline of *Salmonella* Enteritidis in poultry, **British Food Journal**, v. 115, n. 11, p. 1541-1546, 2013.

KRUGER, T.; SZABO, D.; KEDDY, K. H.; DEELEY, K.; MARSH, J.W.; HUJER, A. M.; et al. Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel

TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4263-4270, 2004.

LEE, Y. J. et al. Characterization of *Salmonella* spp. isolated from na integrated broiler chicken operation in Korea. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 69, p. 399-404, 2007.

LI, J.; NELSON, K.; MCWHORTER, A. C.; WHITTAM, T. S.; SELANDER, R. K. Recombinational basis of serovar diversity in *Salmonella* enterica. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 2552-2556, 1994.

MAJOWICZ, S. E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F. J.; O'BRIEN, S. J.; JONES, T. F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R. M. The Global Burden of Nontyphoidal Gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 882-889, 2010.

MEAD, G.; LAMMERDING, A. M.; COX, N.; DOYLE, M. P.; HUMBERT, F.; KULIKOVSKIY, A.; PANIN, A.; NASCIMENTO, V. P.; WIERUP, M. Scientific and Technical Factors Affecting the Setting of *Salmonella* Criteria for Raw Poultry: A Global Perspective. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 8, p. 1566-1590, 2010.

MEAKINS, S.; FISHER, I.S.T.; BERGHOLD, C.; GERMER-SMIDT, P.; TSCHÄPE, H.; CORMICAN, M.; et al. Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000e2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network. **Microbial Drug Resistance**, v. 14, p. 31-35, 2008.

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

MION, L.; PARIZOTTO, L.; SANTOS, L. A.; WEBBER, B.; CISCO, I. C.; PILOTTO, F.; RODRIGUES, L. B.; NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R. *Salmonella* spp. Isolated by Miniaturized Most Probable Number and Conventional Microbiology in Poultry Slaughterhouses. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1393, 2016.

MION, L., COLLA, F. L., CISCO, I. C., WEBBER, B., DIEDRICH, L. N., PILOTTO, F., RODRIGUES, L. B., NASCIMENTO, V. P., SANTOS, L. R., Perfil de resistência a antimicrobianos por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, p. 1220, 2014.

MOREIRA, N. M., SOLA, M. C., FEISTEL, J. C., OLIVEIRA, J. J., FREITAS, F. A., Os mecanismos de resistência bacteriana da *Salmonella* sp. frente à utilização de antibióticos. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.16; 2013.

MOREIRA, G. N.; REZENDE, C. S. M.; CARVALHO, R. N.; MESQUITA, S. Q. P.; OLIVEIRA, A. N.; ARRUDA, M. L. T. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 2, p. 126-130, 2008.

MUHAMMAD, M., MUHAMMAD, L. U., AMBALI, A. G. MANI, A. AZARD, U. S., and BARCO, L. Prevalence of *Salmonella* associated with chick mortality at hatching and their susceptibility to antimicrobial agents. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p.131–135, 2010.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M. S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 1, p. 47 - 51, 2004.

NEVES, G. B., STEFANI, L. M., PICK, E., ARAUJO, D. N., GIURIATTI J., PERCIO, C., BRISOLA, M. C., *Salmonella* Heidelberg Isolated from Poultry Shows a Novel Resistance Profile. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 44, 2016.

NGOI, S. T.; THONG, K. L. Molecular characterization showed limited genetic diversity among *Salmonella* Enteritidis isolated from humans and animals in Malaysia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 4, p. 304–311, 2013.

NISAR, M.; KASSEM, I. I.; RAJASHEKARA, G.; GOYAL, S. M.; LAUER, D.; VOSS, S.; NAGARAJA, K. V. et al. Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of *Salmonella* Heidelberg isolated from chickens and turkeys in the Midwestern United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 3, p. 370-375, 2017.

NI, P., XU, Q., Yin, Y., LIU, D., ZHANG, J., WU, Q., TIAN, P. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars isolated from farm products in Shanghai, **Food Control**, v. 85, p. 269-275, 2017.

PAGE, M.I. The reactivity of b-lactams, the mechanism of catalysis and the inhibition of b-lactamases. **Current Pharmaceutical Diseases**, v. 5, n. 11, p. 895–913, 1999.

PANDINI, J. A.; PINTO, F. G. S.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; MOURA, A. C. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p.1-6, 2014.

PEIRANO, G.; AGERSO, Y.; AARESTRUP, F. M.; DOS REIS, E. M.; RODRIGUES, D. P. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella* enterica from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p.305–309, 2006.

PERIN, A. P. Ocorrência e quantificação de *Salmonella* sp. em cortes de frango congelados: levantamento epidemiológico no estado do Paraná e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Federal do Paraná, 2017.

PIDDOCK, L. J., Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 3–16, 2002.

POPOFF, M. Y., BOCKEMÜHL, J., GHEESLING, L. L., Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann–White scheme. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 173–174, 2003.

POPOFF, M. Y., BOCKEMÜHL, J., GHEESLING, L. L., Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 568–570, 2004.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L.E. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Vol. 2: The Proteobacteria. 2nd ed. New York, NY: Springer-Verlag US, p. 2816, 2005,

PROST, L. R.; MILLER, S. I.; The Salmonellae PhoQ sensor: mechanisms of detection of phagosome signals. **Cellular Microbiology**, v. 10, N. 3, p. 576-582, 2008.

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA, 2005, *Salmonella* Heidelberg – Ceftiofur-Related Resistance in Human and Retail Chicken Isolates, Disponível em: <https://www.canada.ca/content/dam/phac-aspc/migration/phac-spc/cipars-picra/heidelberg/pdf/heidelberg_e.pdf> acesso em 22 de outubro de 2017.

RAGHIANTE, F.; ROCHA, T. S.; ROSSI, D. A.; SILVA, P. L. Penetration Time of *Salmonella* Heidelberg Through Shells of White and Brown Commercial Eggs. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 4, p. 272-277, 2010.

RAN, L.; WU, S.; GAO, Y.; ZHANG, X.; FENG, Z.; WANG, Z.; et al. Laboratory-based surveillance of nontyphoidal *Salmonella* infections in, China. **Foodborne Pathogens the Disease**, v. 8, p. 921-197, 2011.

REZENDE, C. S. M.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; STRINCHINI, J. H. CHAVES, L. S.; MINAFRA, C. S.; LAGE, M. E. Ácido acético em rações de frangos de corte experimentalmente contaminadas com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 516-528, 2008.

RIBEIRO, V. B.; LINCOPAN, N.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella* enterica isolates from foodstuff and related sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 685-692, 2011.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N.; HUNTER, S. B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 59-67, 2006.

RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; RIZZO, NADIN, N.; TAGLIARI, V. Z.; OLIVEIRA, A. P.; TRENHAGO, G.; RODEGHERI, S. C.; TAGLIETI, R. M.; DICKEL,

E. L.; NASCIMENTO, V. P. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 3, p. 225-230, 2009.

RUSSEL, M. S. Controlando *Salmonella* na produção e processamento de aves. CRC press, 4 ed., p. 289, 2012.

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

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI, A.; FERNANDAS, S. A.; TAVECHIO, A. T.; AMARAL, L. A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 39-42, 2000.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON VETERINARY MEASURES RELATING TO PUBLIC HEALTH (SCVPH) – European Union (EU)/SANCO. Opinion of the SCVPH on *Salmonellae* in foodstuffs. Adopted on 14-15 April. SCVPH, Brussels, 2003.

SEYFARTH, A. M.; WEGENER, H. C.; FRIMODT-MOLLER, N. Antimicrobial resistance in *Salmonella* enterica subesp. enterica serovar Typhimurium from humans and production animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, p. 67-75, 1997.

SHAHADA, F.; SUGIYAMA, H.; CHUMA, T.; SUEYOSHI, M.; OKAMOTO, K. Genetic analysis of multi-drug resistance and the clonal dissemination of beta-lactam resistance in *Salmonella* Infantis isolated from broilers. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 136-144, 2010.

SILVA, E.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

SJÖLUND-KARLSSON, M.; RICKERT, R.; MATAR, C.; PECIC, G.; HOWIE, R. L.; JOYCE, K.; et al. *Salmonella* isolates with decreased susceptibility to extended-spectrum cephalosporins in the United States. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 7, p. 1503-1509, 2010.

TAUNAY, A. E.; FERNANDES, S. A.; TAVECCHIO, A. T.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista Instituto Medecina**, v. 38, p. 119-127, 1996.

TAVECCHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista Instituto Medecina**, v. 38, p. 315-322, 1996.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; ZANATTA, G. F.; KANASHIRO, A. M. I. Incidência de *Salmonella* spp. em pintos de corte recém-nascidos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 3, p. 279-281, 2003.

TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G. M.; EUZÉBY, J. P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 521–524, 2005.

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

TORPDAHL, M.; SKOV, M. N.; SANDVANG, D.; BAGGESEN, D. L., Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. **Journal Microbiological of Methodos**, v. 63, p. 173-184, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. In: Microbiologia. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TOZZO, K.; NETO, A. F. G.; SPERCOSKIC, K. M.; RONNAU, M.; SOARES, V. M.; BERSOT, L. S. Migration of *Salmonella* serotypes Heidelberg and Enteritidis in previously frozen chicken breast meat, **Food Microbiology**, p. 204-211, n. 69, 2017.

USDA/FSIS. Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products and Carcass and Environmental Sponges. p. 19, In: Service, U.S.D.o.A.F.S.a.I. (ed.). 2014.

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

VARDAKAS, K. Z.; TANSARLI, G. S.; RAFAILIDIS, P. I.; FALAGAS, M. E. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum b-lactamases: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 12, p. 2793–2803, 2012.

ZHANEL, G.G.; WIEBE, R.; DILAY, L.; et al. Comparative review of the carbapenems. **Drugs**, v. 67, p. 1027–1052, 2007.

ZHAO, S.; WHITE, D. G.; FRIEDMAN, S. L.; GLENN, A.; BLICKENSTAFF, K.; AYERS, S. L.; ABBOTT J. W.; HALL-ROBINSON, E.; MCDERMOTT, P. F. Antimicrobial resistance in *Salmonella* enterica serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6656–6662, 2008.

ZIECH, R. E.; LAMPUGNANI, C.; PERIN, A. P.; SERENO, M. J.; SFACIOTTE, R. A. P.; VIANA, C.; SOARES, V. M.; PINTO, J. P. A. N.; BERSOT, L. S. Multidrug

resistance and ESBL-producing *Salmonella* spp. isolated from broiler processing plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 191-195, 2016.

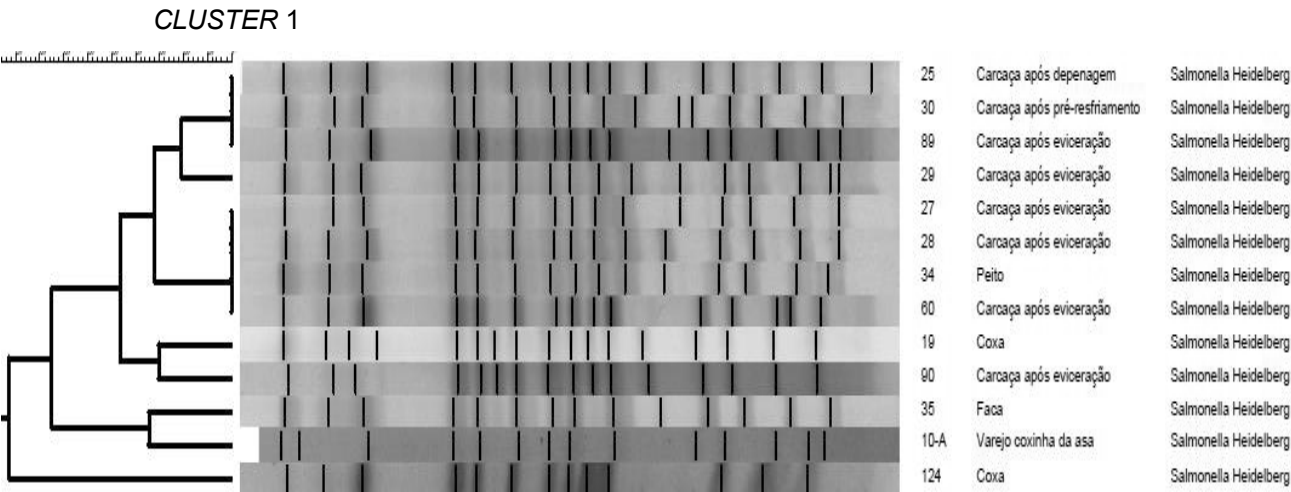
ZIOGA, A.; WHICHARD, J. M.; JOYCE, K. J.; TZELEPI, E.; TZOUVELEKIS, L. S.; MIRIAGOU, V. Evidence for chromosomal and plasmid location of CMY-2 cephalosporinase gene in *Salmonella* serotype Typhimurium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 1389–1399, 2008.

YANG, B.; QIAO, L.; ZHANG, X.; CUI, Y.; XIA, X.; CUI, S.; WANG, X.; MENG, X.; GE, W.; SHI, X.; WANG, D.; MENG, J. Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulsed field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in Henan Province, China. **Food Control**, v. 32, p. 228-235, 2013.

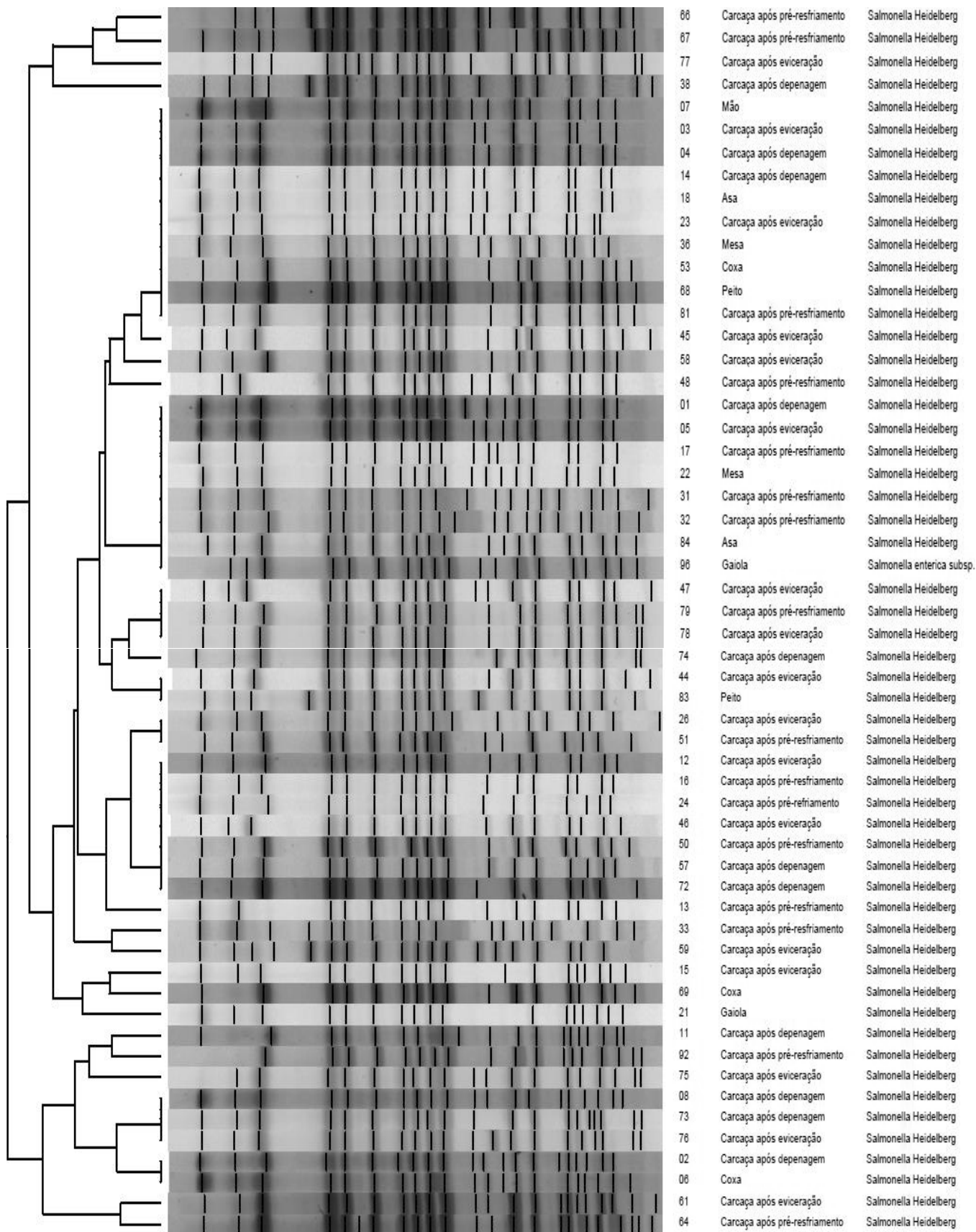
YANG, B.; WANG, Q.; CUI, S.; WANG, Y.; SHI, C.; XIA, X.; XI, M.; WANG, X.; SHI, X.; WANG, D.; ZHANG, Z.; MENG, J. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Salmonella* strains isolated from retail foods in Shaanxi and Henan Province, China. **Food Microbiology**, v. 42, p. 14-18, 2014.

APÊNDICES

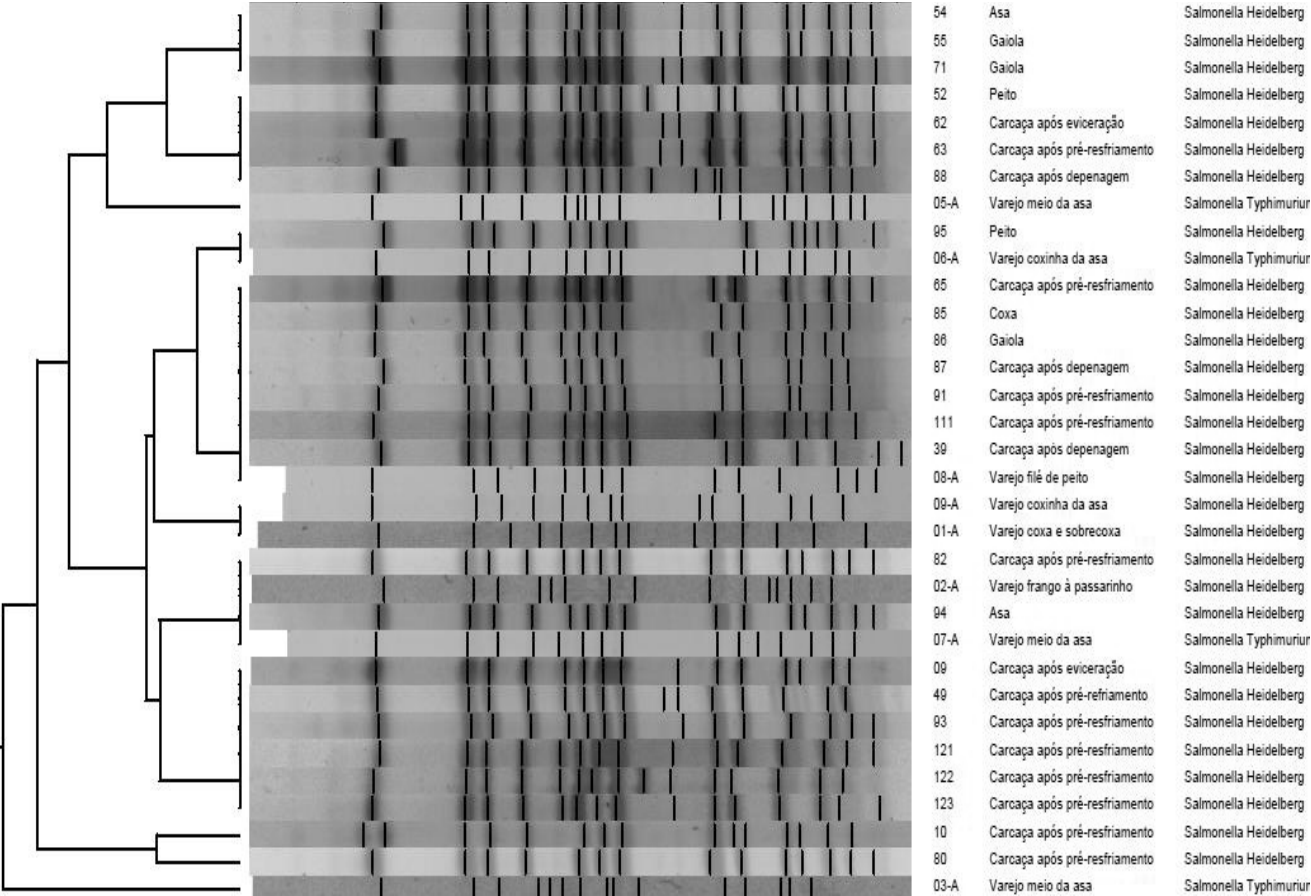
APÊNDICE 1 - DENDOGRAMA OBTIDO POR MEIO DE PFGE SEPARADO POR CLUSTER



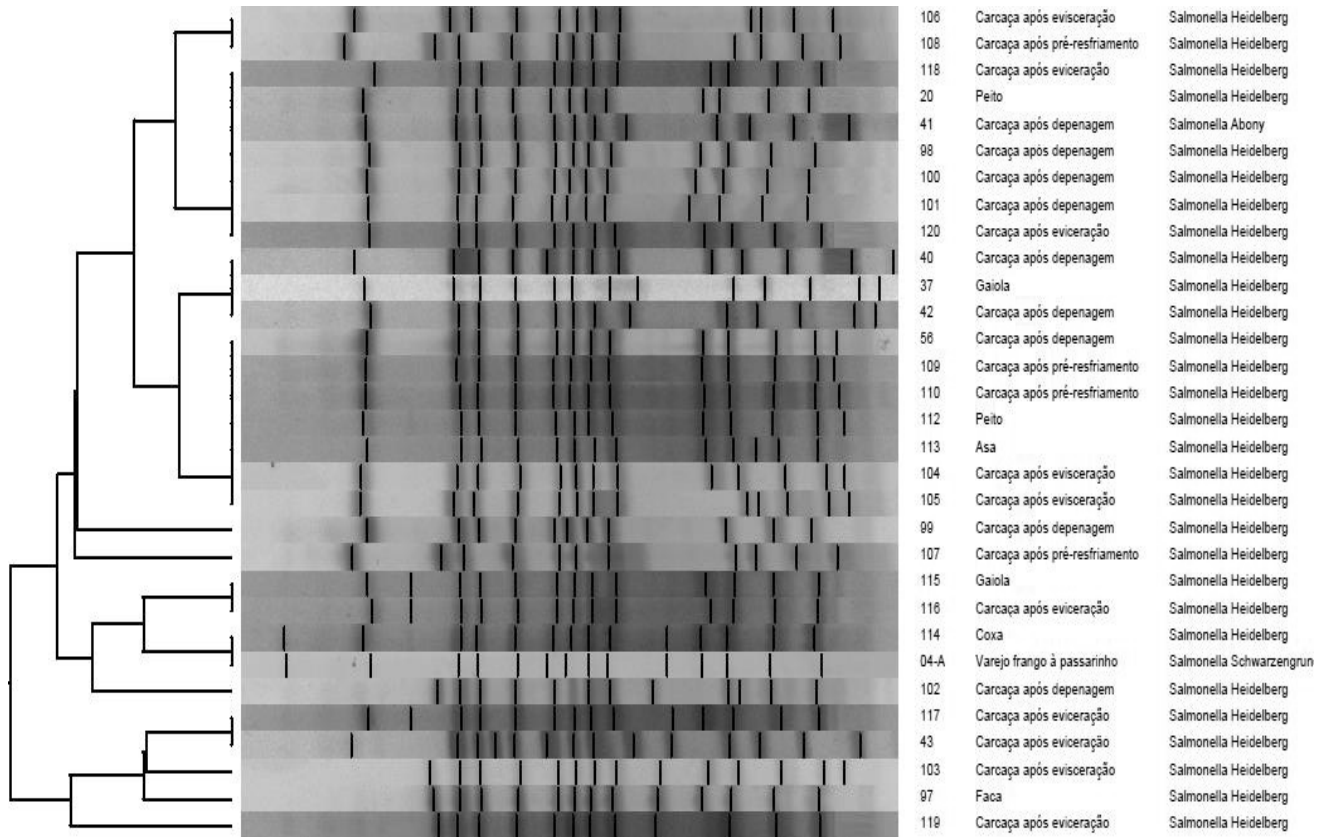
CLUSTER 2



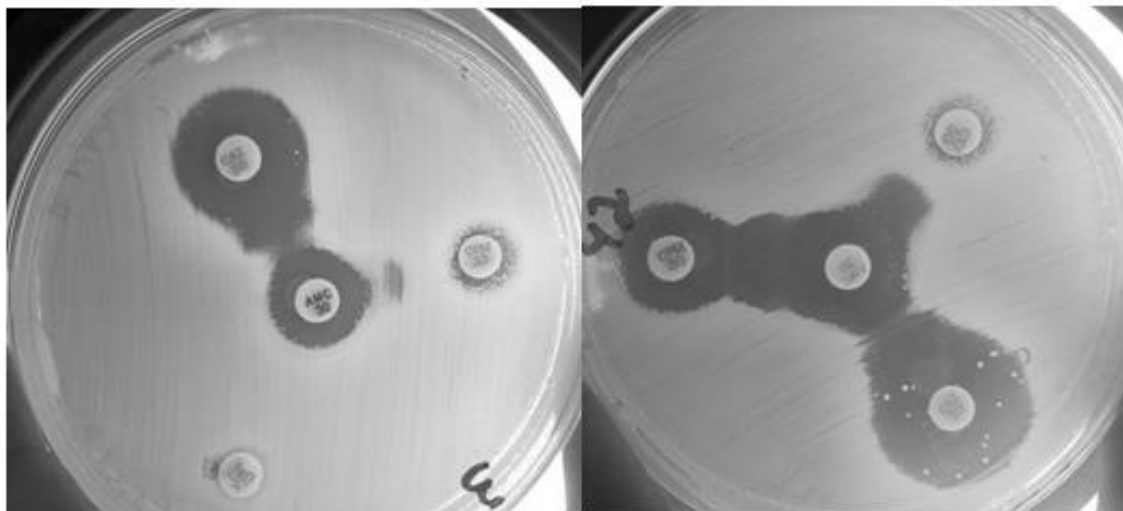
CLUSTER 3



CLUSTER 4



APÊNDICE 2 - TESTE FENOTÍPICO PARA PRESENÇA DE ENZIMAS
ESBL EM ISOLADOS DE *Salmonella* sp.



Isolado de *Salmonella* Heidelberg positivos para produção de enzimas ESBL;

APÊNDICE 3 - ESTRUTURA ANTIGÊNICA DOS SOROTIPOS HEIDELBERG, TYPHIMURIUM, ABONY, SCHWARZENGRUND, SALMONELLA *ENTERICA* SUBSP *ENTERICA* O: 4,5

Sorotipo	Antígeno Somático Grupo B (O:4)	Antígenos Flagelares (H)	
		Fase 1	Fase 2
Heidelberg	<u>1</u> ,4,[5],12	r	1,2
Typhimurium	<u>1</u> ,4,[5],12	i	1,2
Abony	<u>1</u> ,4,[5],12, <u>27</u>	b	e,n,x
Schwarzengrund	<u>1</u> ,4,12, <u>27</u>	d	1,7
Salmonella <i>enterica</i> subsp <i>enterica</i> O: 4,5	4,[5]	Estrutura flagelar não detectada	

FONTE: adaptado Institut Pasteur, (2007).

APÊNDICE 4 - DIRETRIZES DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS.

Público-alvo e Escopo

O público-alvo da “Foodborne Pathogens and Disease” são as comunidades médica, veterinária, agrícola e de pesquisa. O escopo da “Foodborne Pathogens and Disease” é abrangente e inclui tópicos como: patógenos emergentes de alimentos; problemas de saúde / doenças causadas por agentes patogênicos transmitidos pelos alimentos; emergência de resistência a medicamentos em patógenos transmitidos pelos alimentos; métodos e tecnologia para a detecção rápida e precisa de agentes patogênicos transmitidos pelos alimentos; estratégias para destruir ou controlar patógenos transmitidos por alimentos em ambientes de produção e processamento de alimentos; desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção e controle de doenças de plantas e animais que afetem a segurança alimentar; e disseminação de materiais educativos inovadores para alimentação de alimentos e patógenos alimentares. “Foodborne Pathogens and Disease” é uma revista internacional revisada por pares que publica documentos de pesquisa originais e comunicações curtas sobre novas informações importantes sobre pesquisa de patógenos transmitidos por alimentos e doenças causadas por patógenos transmitidos por alimentos.

Autoria

Todos os autores, incluindo os coautores, devem ser responsáveis por uma parte significativa do manuscrito. Todos os autores e coautores devem ter participado na redação do manuscrito, revisá-lo e revisar seu conteúdo intelectual e técnico. Qualquer autor cujo nome aparece em um documento assume responsabilidade e responsabilidade pelos resultados.

Preparação do Manuscrito

Folha de rosto: a página de título deve incluir os nomes e afiliações dos autores, um título de aproximadamente 45 caracteres (incluindo espaços) e as informações de contato completas para o autor correspondente.

Resumo: fornecer um resumo estruturado de não mais de 300 palavras. O resumo deve revisar objetivos, materiais, resultados, conclusões e aplicativos

importantes de forma tão concisa quanto possível. O resumo difunde informações científicas através de serviços de resumo e é uma conveniência para os leitores.

Palavras-chave: inserir palavras-chave ou frases; estes serão usados para criar o índice do assunto na “Foodborne Pathogens and Disease”. Na maioria dos casos, essas palavras-chave devem ser tiradas do título.

Texto: organizar o texto da seguinte maneira: Introdução (perguntas, objetivos, razões para pesquisa e literatura relacionada), Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos e Referências. No primeiro uso de um termo, especificar o termo e dar a abreviatura ou sigla entre parênteses, posteriormente, use a abreviatura. Utilize nomes genéricos para drogas sempre que possível. Se você deseja usar um nome do medicamento de referência, a primeira vez que aparece, use o nome genérico seguido pelo nome de referência, fabricante, cidade e estado entre parênteses. Se os nomes de referência forem ser usados, inclua informações de marca registrada. Os nomes científicos das espécies devem aparecer com o gênero soletrado na íntegra na primeira ocorrência e abreviado posteriormente. Os nomes das famílias devem aparecer na primeira ocorrência de espécies incomuns. Todos os microrganismos devem ser nomeados por gênero e espécie de acordo com a última edição do Manual de Bergey de Bacteriologia Determinativa Lippincott, Williams & Wilkens, 9th ed., 1994.

Bacteriologia: o nome do gênero deve aparecer na íntegra na primeira vez que o micro-organismo é citado no resumo, no corpo do artigo e em cada tabela e legenda de figuras. Posteriormente, o gênero pode ser abreviado pela primeira inicial a menos que seja confundido com outros microrganismos citados no artigo, caso em que cada gênero deve ser abreviado para usar letras suficientes para evitar confusão. Os nomes de todos os microrganismos devem estar em itálico. As designações específicas de cepas e números devem ser usados quando apropriado. Os vírus devem receber a classificação e nomes recomendados pelo Comitê Internacional de Nomenclatura de Vírus.

Agradecimentos: o autor deve reconhecer apenas as pessoas e instituições que fizeram contribuições significativas para o estudo. Os detalhes das fontes de financiamento devem ser fornecidos.

Divulgação do autor: Espera-se que todos os autores divulguem quaisquer afiliações institucionais ou comerciais que possam constituir um conflito de

interesses em relação à publicação de um manuscrito. As afiliações institucionais, conforme indicado na página de título, devem incluir todas as afiliações corporativas e quaisquer fontes de financiamento que apoiem o trabalho. Outros tipos de afiliação, incluindo consultoria, honorários, propriedade de ações, participação patrimonial, acordos sobre patentes ou outros interesses adquiridos devem ser divulgados na seção Agradecimentos.

Referências: devem ser citadas no texto usando o método de nome/data. A lista de referência no final do trabalho deve ser organizada alfabeticamente por nome e ano. Fornecer os nomes de todos os autores para cada referência. Abreviar os nomes dos artigos de acordo com as Fontes de Série do BIOSIS (BIOSIS, Filadélfia, PA, 2003). Para documentos aceitos ainda não publicados, a citação deve ser escrita. Se houver referências a comunicações pessoais ou dados não publicados, cite-os entre parênteses no texto e não nas referências. Os autores são responsáveis pela precisão das referências. As referências devem ser apresentadas da seguinte forma:

Citação de artigos: King JC, Black RE, Doyle MP. Foodborne illnesses and nutritional status: A statement from an American Society for Nutritional Sciences Working Group. *J Nutr* 2000; 130:2613-2617.

Citação de livros: Oliver DO and Riemann HP. *Foodborne Diseases*, 2nd edition. San Diego, CA: Academic Press, 2002.

Capítulo de livro editado: Spoerke DG Jr. Identification of mushroom poisoning. In: *Foodborne Disease Handbook*, Volume 2. Hui YH, Sattar SY, Murrell DK, Wai-Kit N, and Stanfield PS (eds.). New York: Marcel Dekker, 2001, pp. 323–359.

Tabelas: criar cada tabela como um arquivo separado, usar algarismos arábicos para numerar as tabelas. Os detalhes das condições experimentais devem ser incluídos nas notas de rodapé da tabela. Legendas de tabelas e notas de rodapé devem ser de dois espaços.

Disponível em <<http://www.liebertpub.com/editorialboard/foodborne-pathogens-and-disease/108/>> acesso em 11 de janeiro de 2018.