

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ADILSON RIBEIRO RESENDE

**FATORES DE PATOGENICIDADE E ESTUDO
EPIDEMIOLÓGICO DE *Salmonella* Minnesota DE ORIGEM
AVÍCOLA**

UBERLÂNDIA

2015

ADILSON RIBEIRO RESENDE

FATORES DE PATOGENICIDADE E ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE *Salmonella*
Minnesota DE ORIGEM AVÍCOLA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Produção Animal.

Linha de pesquisa: Manejo e eficiência de produção dos animais, seus derivados e subprodutos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Daise Aparecida Rossi

UBERLÂNDIA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R433f
2015 Resende, Adilson Ribeiro, 1975
 Fatores de patogenicidade e estudo epidemiológico de Salmonella
 Minnesota de origem avícola / Adilson Ribeiro Resende. - 2015.
 67 f. : il.

 Orientadora: Daise Aparecida Rossi.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
 Inclui bibliografia.

 1. Veterinária - Teses. 2. Salmonelose - Teses. 3. Salmonela - Teses.
 4. Frango de corte - Doenças - Teses. I. Rossi, Daise Aparecida. II.
 Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
 Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

FATORES DE PATOGENICIDADE E ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE
Salmonella Minnesota DE ORIGEM AVÍCOLA

Dissertação aprovada para obtenção do
título de Mestre no Programa de Pós
Graduação em Ciências Veterinárias da
Universidade Federal de Uberlândia (MG)
pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 26 de junho de 2015.

Prof.^a Dr.^a Daise Aparecida Rossi, UFU/MG

Prof.^a Dr.^a Belchiolina Beatriz Fonseca, UFU/MG

Prof.^a Dr.^a Aline Teodoro de Paula, Unitri/MG

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e pelo suporte financeiro.

A minha família, pela importância em minha vida. Sempre do meu lado, me fazendo acreditar que posso mais que imagino.

Aos professores, funcionários, técnicos e colegas que me auxiliaram no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada.

À minha orientadora, pela aceitação, confiança e afeto oferecidos.

Aos amigos do LABIO, em especial Priscila, Guilherme, Eliane e Roberta pela grande colaboração na execução desse trabalho, pela atenção, carinho e paciência.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Adilson Ribeiro Resende – Nascido em Araguari, Minas Gerais em 03 de junho de 1975, filho de Diva Ribeiro Resende e Hamilton Alves Resende. Iniciou a carreira em laboratório como estagiário em março de 1993 e formou em Técnico em Química Industrial em dezembro de 1995. Ingressou no Curso de Graduação em Biologia em agosto 1999 e recebeu o título de Biólogo em junho de 2002. Devido ao curso de química já atuava na área de laboratório bromatológico e microbiológico de produtos agropecuários com o mesmo seguimento que trabalha até os dias atuais. Através do processo seletivo em Setembro de 2012 ingressou no Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da UFU e realizou a pesquisa microbiológica e molecular com *Salmonella* Minnesota.

RESUMO

A salmonelose é uma enfermidade de importância mundial que preocupa as autoridades sanitárias pelo potencial zoonótico e por ser barreira ao comércio internacional de alimentos. Alguns sorovares são diretamente associados à saúde pública por serem mais incriminados na etiologia da enfermidade em humanos, mas outros, como *S. Minnesota*, têm trazido preocupação pelo aumento no número de isolamentos na cadeia de produção de frangos de corte. Pouco se conhece sobre a virulência deste sorovar e seu potencial em causar doença humana. Objetivou-se avaliar características de virulência, o perfil de resistência antimicrobiana e o padrão de similaridade genética de 71 cepas de *S. Minnesota* isoladas na cadeia produtiva de frangos de corte. As cepas foram isoladas no período de 2009 a 2010 em duas unidades de uma empresa (A e B) com ciclo completo de produção, localizadas em estados diferentes. Os isolados foram sorotipificados e submetidos ao teste de susceptibilidade antimicrobiana pelo teste de difusão em disco. Após, utilizando PCR, foi avaliada a presença dos genes *invA* (invasão), *lpfA* (fímbria-adesão), *agfA* (fímbria-biofilme) e *sefA* (fímbria-adesão). Utilizando PCR, foi realizada a identificação de genes de resistência aos beta-lactâmicos (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}). A relação filogenética foi determinada por método de RAPD-PCR. Dentre as drogas testadas, os maiores percentuais de resistência foram para tetraciclina e sulfonamida, com 93,8% na unidade A e 89,7% na unidade B. Foram reconhecidos oito perfis de resistência aos antimicrobianos (A1 a A8) dentre as cepas isoladas na indústria A, sendo que 30 (93,8%) apresentaram resistência ou resistência intermediária a pelo menos um antibiótico. Dezesesseis (53,3%) foram resistentes a dois antimicrobianos (A1) e 14 (46,7%) consideradas multi resistentes, pois apresentaram resistência a três ou mais classes de drogas (A2 a A7). Das 39 cepas provenientes da indústria B, 11 perfis foram identificados (B1 a B11), sendo 35 (89,7%) cepas resistentes ou com resistência intermediária a pelo menos uma droga. Destas, 10 (28,6%) foram resistentes a dois antibióticos (B1), e 25 (71,4%) multi resistentes (B2 a B10). Do total de cepas das duas indústrias, 100% foram positivas para o gene *invA*, 98,6% para o gene *agfA*, 49,3% para o gene *lpfA* e nenhuma cepa apresentou o gene *sefA*. Houve 52,1% de positividade para dois genes concomitantemente, e 47,9% para três dos genes avaliados. Quanto aos

genes de resistência estudados, apenas três cepas foram positivas para o gene *bla*_{TEM} (4,2%), 11 (15,5%) para o gene *bla*_{CTX-M}, não havendo positividade para o gene *bla*_{SHV}. A avaliação filogenética demonstrou a presença de sete *clusters* com similaridade superior a 80% e três perfis distintos. Com base no dendrograma observou-se a disseminação de um mesmo perfil em ambas as empresas, a ração como possível fonte de contaminação e a persistência do agente por longos períodos no ambiente. A presença dos genes de virulência e o perfil de resistência aos antimicrobianos observados nas cepas de *S. Minnesota* demonstram a necessidade de um constante monitoramento na cadeia de produção avícola para minimizar os perigos de contaminação do produto final.

Palavras-chave: RAPD. Resistência antimicrobiana. Salmonelose. Virulência.

ABSTRACT

Salmonellosis is an illness of global importance that worries health authorities by zoonotic potential and by being a barrier to international trade in food. Some serovars are directly associated with public health because they are incriminated in the etiology of the disease in humans, but others, like *S. Minnesota*, have brought concern the increase in the number of isolates in broiler production chain. Little is known about the virulence of this serovar and its potential to cause human disease. It aimed to evaluate virulence characteristics, antimicrobial resistance profile and the pattern of genetic similarity of 71 strains of *S. Minnesota* isolated in the production chain of broilers. The strains were isolated from 2009 to 2010 period, into two units of a company (A and B) with complete cycle of production, located in different states. Isolates were serotyped and submitted to antimicrobial susceptibility by disk diffusion test. Later, using PCR, were evaluated the presence of *invA* (invasion), *lpfA* (pili-adhesion), *agfA* (pili-biofilm) and *sefA* (pili-adhesion) genes. Next, using PCR, was performed the identification of genes conferring resistance to beta-lactams (*bla*_{TEM}, and *bla*_{SHV} *bla*_{CTX-M}). The phylogenetic relationship was determined by RAPD-PCR method. Among the drugs tested, the highest percentages of resistance were to tetracycline and sulfonamide, with 93.8% in unit A and 89.7% in unit B. Were recognized eight antimicrobial resistance profiles (A1 to A8) among strains isolated in industry, and 30 (93.8%) were resistant or intermediate resistance to at least one antibiotic. Sixteen (53.3%) were resistant to two antibiotics (A1) and 14 (46.7%) were considered multi resistant, because they were resistant to three or more classes of drugs (A2 to A7). Of the 39 strains from the B industry, 11 profiles have been identified (B1 to B11), being 35 (89.7%) resistant strains or with intermediate resistance to at least one drug. Of these, 10 (28.6%) were resistant to two antibiotics (B1), and 25 (71.4%) multiple resistant (B2 to B10). Of all strains of both industries, 100% were positive for the *invA* gene, 98.6% for *agfA* gene, 49.3% for *lpfA* gene and no strain showed the *sefA* gene. There was positivity of 52.1% for two genes simultaneously, and 47.9% for three of the evaluated genes. As to the resistance genes studied, only three strains (4,2%) were positive for *bla*_{TEM} gene, 11 (15.5%) for *bla*_{CTX-M} gene, and there was no positivity for *bla*_{SHV} gene. Phylogenetic evaluation showed the presence of seven clusters with similarity greater than 80% and three

distinct profiles. Based on the dendrogram we observed the spread with similar profiles in both companies, the feed as a possible source of contamination and the persistence of the agent for long periods in the environment. The presence of virulence genes and antimicrobial resistance profile observed in *S. Minnesota* strains demonstrate the need for constant monitoring in the poultry production chain to minimize end-product contamination hazards.

Keywords: RAPD. Antimicrobial Resistance. Salmonellosis. Virulence.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	10
1.1 Caracterização do gênero <i>Salmonella</i>	11
1.2 <i>Salmonella</i> na cadeia produtiva do frango de corte.....	13
1.3 Salmonelose e saúde pública.....	16
1.4 Resistência antimicrobiana em <i>Salmonella</i> spp.....	17
1.5 Genes de resistência antimicrobiana.....	20
1.6 Genes de virulência.....	23
1.7 Tipagem molecular por RAPD-PCR.....	26
CAPÍTULO 2 - <i>S. Minnesota</i> de origem avícola apresentam fatores de virulência e risco potencial aos humanos.....	29
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXO – INSTRUÇÕES AOS AUTORES – Pesquisa Veterinária Brasileira.....	54

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Salmonella é reconhecida como um dos mais importantes patógenos de origem alimentar para humanos e animais, causando doenças com gravidade variada e gerando custos médicos elevados (LEE et al., 2015). A carne de frango continua a ser identificada como a principal fonte para salmonelose humana (FINSTAD et al., 2012).

Esse agente está ligado às aves desde o início da história da produção avícola e sua epidemiologia e controle são extremamente complexos, dependendo de inúmeras variáveis como o sorovar, o hospedeiro, o ambiente e também as características geográficas (MUNIZ, 2014).

O Brasil tem se firmado atualmente como um grande produtor de aves, sendo que aproximadamente 32% de toda a produção nacional é exportada. Desde 2008 o país conquistou o posto de maior exportador de carne de frango no mundo e ainda hoje tem sustentado esta posição de destaque. Os principais mercados externos para o produto avícola brasileiro são a Europa, Ásia e Oriente Médio (UBABEF, 2014). Neste contexto, o controle da *Salmonella* spp. dentro da cadeia produtiva ganha importância, pois a presença do patógeno na carne é parâmetro de qualidade e interfere na relação comercial entre os países, podendo levar até mesmo a destruição do produto exportado caso seja detectada a positividade (BACK; ISHIZUKA, 2010).

Os agravos causados por *Salmonella* não tifoide (SNT) representam um problema de saúde pública em todo o mundo. Estima-se que este patógeno seja responsável por 93 milhões de casos novos de gastroenterite todos os anos, dos quais 155 mil evoluem para óbito (MAJOWICZ et al., 2010). Nos países da União Europeia as salmoneloses foram a segunda maior causa das doenças zoonóticas em 2012, atrás apenas da campilobacteriose, com 91.034 casos confirmados e 61 óbitos (EFSA/ECDC, 2014). Em 2005, o Sistema Nacional Australiano de Vigilância de Doenças Notificáveis registrou 7.720 casos de salmonelose, sendo esta a segunda maior causa de infecções por bactérias no país (HALL et al., 2008). Em 2008, nos Estados Unidos, SNT foi o patógeno que mais causou infecções, contando com 7.444 casos de salmonelose confirmados, o que representou 38,95% das infecções por bactérias naquele ano (NYACHUBA, 2010).

Entre os anos de 2000 e 2014, foram registrados 9.719 surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, cujo principal patógeno foi *Salmonella* sp., apontado como causa primária de 38,2% (1.564/4.099) dos surtos em que houve identificação do agente etiológico (BRASIL, 2014).

Embora haja constantes mudanças na ordem de classificação, no Brasil, os sorovares mais isolados de aves incluem *Salmonella* Enteritidis, *S. Minnesota*, *S. Agona* e *S. Infantis* (FREITAS, 2011). Destes sorovares, *Salmonella Minnesota* tem ligação limitada a salmonelose humana, enquanto *Salmonella Typhimurium* e Enteritidis são os sorotipos mais identificados com casos notificados (FINSTAD et al., 2012).

Estudos epidemiológicos são de extrema importância na identificação de cepas semelhantes ao longo do processo produtivo de frangos, na constatação de perfis homólogos disseminados em locais distintos e na investigação da causa de surtos de origem alimentar. A técnica de RAPD-PCR (*random amplified polymorphic DNA*) tem sido amplamente utilizada para esses tipos de análises (NAWAR; KHEDR, 2014; TURKI et al., 2014; VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS et al., 2014).

Sendo assim, a caracterização de cepas de *S. Minnesota* isoladas do ambiente avícola por técnicas molecular e fenotípica é importante para a compreensão do risco desse agente nas plantas avícolas e para o consumidor final. Paralelamente, a análise epidemiológica permite avaliar o nível de disseminação do agente ao longo da cadeia produtiva de frangos e analisar os perfis circulantes no país.

1.1 Caracterização do gênero *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* foi nomeado em homenagem a Daniel Salmon, um microbiologista veterinário do Departamento de Agricultura dos EUA (GAST, 2003; SALYERS; WHITT, 2002). As bactérias deste gênero pertencem à família *Enterobacteriaceae*, e possuem forma de bacilos curtos, com largura de 0,7 a 1,5 µm e comprimento de 2,0 a 5,0 µm, Gram-negativos e não formadores de esporos. São na maioria móveis pela presença de flagelos peritríquios, com exceção dos sorotipos Pullorum e Gallinarum. São aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, crescem em temperatura variando de 5 a 45°C, com temperatura de crescimento

ótima a 37°C, e pH ideal de 7, podendo sobreviver com valores de pH de 4 a 9 (D'AOUST; MAURER, 2007; HOLT et al., 1994).

As salmonelas são oxidase negativa e catalase positiva, reduzem nitrato a nitrito (exceto 2% das cepas do sorotipo Choleraesuis) e são vermelho de metila positivas (exceto 9% das cepas do sorotipo Pullorum). A atividade de água mínima para crescimento é de 0,94 (ICMSF, 1996). Fermentam a glicose com produção de ácido (100% das cepas) e gás (96% das cepas), não fermentam a lactose e a sacarose. Produzem H₂S (95% das cepas), com exceção dos sorotipos Paratyphi A (90% das cepas negativas) e Choleraesuis (50% das cepas negativas). Não produzem indol, não hidrolisam ureia e descarboxilam lisina e ornitina. Fermentam o dulcitol, com exceção dos sorotipos Typhi, Pullorum e Choleraesuis. Não utilizam o malonato e a maioria dos sorotipos utiliza o citrato (D'AOUST; MAURER, 2007).

A bactéria é sensível ao calor e geralmente são destruídas por aquecimento a 60°C, de 15 a 20 minutos, enquanto que o processo de congelamento leva apenas a uma redução significativa do número de células viáveis, não sendo capaz de provocar a destruição completa (D'AOUST; MAURER, 2007).

De acordo com Popoff, Bockemühl e Gheesling (2004), o gênero *Salmonella* é constituído pelas espécies *S. enterica* e *S. bongori*, sendo a primeira dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Cada subespécie, ou espécie, no caso de *S. bongori*, ainda é subdividida em sorotipos ou sorovares em função de seu perfil antigênico, pela presença dos antígenos somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi), sendo que a espécie *S. bongori* agrupa 22 sorotipos e as subespécies de *S. enterica* agrupam mais de 2400 sorotipos.

Para a nomenclatura do gênero, espécie, subespécie e sorovar, considera-se o esquema proposto pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), dos Estados Unidos, em que o gênero, a espécie e a subespécie são escritos com letras em itálico e o sorovar em letras romanas, como descrito a seguir: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Minnesota. Como apenas os sorotipos da subespécie *enterica* recebem nome, como forma de abreviar a escrita, o nome da espécie e subespécie não precisam ser indicados. Assim, a designação *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Minnesota, pode ser somente descrita como *Salmonella* Minnesota. Sorotipos de outras subespécies de *Salmonella enterica* e

aqueles de *Salmonella bongori* são designados somente por seus perfis antigênicos (CDC, 2011).

1.2 *Salmonella* na cadeia produtiva do frango de corte

De acordo com a UBABEF (2014), a produção brasileira da carne de frango em 2013 foi de 12,3 milhões de toneladas, sendo 68,4% da produção destinada ao mercado interno e 31,6% para exportação, colocando o país na posição de terceiro maior produtor mundial, perdendo apenas dos Estados Unidos com 16,9 milhões de toneladas e China com 13,5 milhões de toneladas. Quanto à exportação mundial da carne de frango, o Brasil ocupa o primeiro lugar, seguido dos Estados Unidos e União Européia. Os inúmeros avanços tecnológicos das indústrias avícolas permitiram o crescimento do setor, colocando o país em posição de destaque tanto como produtor quanto exportador da carne de frango. No entanto, mesmo com esta modernização e os cuidados aplicados para obtenção de um produto de alta qualidade, a carne de frango ainda é passível de contaminação, principalmente por micro-organismos do gênero *Salmonella*.

Os frangos de corte estão entre os principais reservatórios de *Salmonella* e são um importante meio de transmissão da bactéria (TABO et al., 2013). As aves infectadas com a bactéria excretam cerca de 10^8 células por grama de fezes, e com isso, podem infectar um lote inteiro, podendo alcançar lotes vizinhos sem que as aves apresentem qualquer sintomatologia da doença (BRYAN; DOYLE, 1995; PEREIRA; SILVA; LEMOS, 1999).

Dentro do processo de produção industrial da carne de frango de corte existem diferentes fatores que podem contribuir para uma maior prevalência de *Salmonella*. Cardoso e Tessari (2008) citam como fontes de transmissão horizontal de *Salmonella* sp. no sistema atual de integração das aves, os seguintes fatores: aquisição de aves infectadas, presença de roedores, pássaros e aves silvestres no ambiente de criação, falhas na biossegurança, manejo inadequado, instalações e equipamentos indevidamente higienizados. De acordo com Reiter et al. (2007), os frangos são colonizados predominantemente no ceco por bactérias presentes na água de bebida, ração ou pelo contato com o solo contaminado. Como as rações são consideradas fontes importantes de infecção dos plantéis por salmonelas, as

indústrias não utilizam para plantéis de matrizes e avós rações com produtos de origem animal, visto que as farinhas de carnes e ossos tem se mostrado fontes comuns de *Salmonella* (BACK, 2006).

Também podem ser citados como fatores de risco, a densidade de animais, a taxa de mortalidade, o tipo de terreno e o acesso de outros animais ao ambiente de criação de frangos (ELGROUD et al., 2009). A transmissão vertical de *Salmonella* das matrizes para os pintainhos também tem sido documentada (LILJEBJELKE et al., 2005).

Devido à existência de diversas fontes potenciais de contaminação, como as descritas anteriormente, como o ambiente, transporte, equipamentos, cama, vetores, água e a ração, o controle de *Salmonella* em aviários se constitui em uma complexa tarefa (FAO-WHO, 2009).

Segundo Nicholson, Groves e Chambers (2005), a contaminação de carcaças com *Salmonella* parece estar principalmente ligada à infecção das aves durante a criação e/ou transporte para o abate. Aves portadoras podem infectar outras aves durante o processo de transporte e no tempo de espera para o abate. A contaminação fecal das carcaças durante o processo de abate é inevitável, e o grau de contaminação depende das técnicas de abate aplicadas e manipulação das carcaças (CARDINALE et al., 2004).

Uma vez que a contaminação por *Salmonella* já esteja instalada dentro da indústria de processamento, a remoção do micro-organismo é dificultada devido à sua capacidade em formar biofilme, tornando o ambiente de abate uma fonte importante de disseminação do patógeno (JOSEPH; OTTA; KARUNASAGAR, 2001).

Um estudo desenvolvido por Arsenault et al. (2007), em abatedouros do Canadá, revelou que *Salmonella* estava presente em 21,2% das carcaças analisadas, sendo o principal fator de risco, a presença da bactéria no intestino da ave.

Na União Européia, em 2013, o nível de prevalência de frangos de corte positivos para *Salmonella* spp. foi de 3,7%, em comparação com 3,1% em 2012 (EFSA, 2015a).

Hu, Wang e Li (2015) avaliaram a contaminação por *Salmonella* em carcaças de frango distribuídas no comércio em Pequim, e encontraram que 57,6% das amostras foram positivas. Um estudo desenvolvido por Donado-Godoy et al. (2014)

na Colômbia, revelou que houve diferença significativa nos níveis de *Salmonella* em relação a temperatura de armazenamento (congelada, resfriada, a temperatura ambiente) e a empresa avícola (frango produzido por sistema de integração ou não). Os resultados demonstraram que frangos congelados e produzidos por empresas integradoras tiveram índices mais baixo de *Salmonella*.

Em um estudo realizado no sul do Brasil, Reiter et al. (2007) encontraram 16,7% de positividade para *Salmonella* nas amostras de gaiolas de transporte e na água de escaldagem, 6,7% na água de *chiller* e nas carcaças antes da evisceração, 3,3% nas carcaças após o *chiller* e no peito fresco, 10% na coxa fresca, 13,3% na asa congelada e coxa congelada, 6,7% no intestino, 10% na pele do peito e da coxa e 6,7% na pele do pescoço.

Freitas (2011), em um estudo aplicando a técnica de ribotipagem para identificação de cepas de *Salmonella* isoladas de frangos de corte no Brasil, demonstrou que de 2004 a 2008, os sorovares mais prevalentes foram Enteritidis, Typhimurium e Agona. Já no período de 2009 a 2010, os sorovares Enteritidis e Agona continuaram no topo da lista, juntamente com *S. Minnesota*, que ocupou o segundo lugar dentre os mais isolados em amostras de origem avícola, demonstrando que este sorovar vem ocupando espaço dentre os principais sorovares de *Salmonella* isoladas de aves no Brasil.

O aumento na ocorrência de *S. Minnesota* também foi observado na Bélgica, de 2% em 2009 para 17,6% em 2012, quando se tornou o segundo sorotipo mais comumente isolado de frango de corte no país (CODA-CERVA, 2014).

Em uma tentativa de garantir a saúde do lote e a inocuidade dos produtos avícolas no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) implementou o Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que inclui iniciativas de controle de *Salmonella* na indústria avícola do país. Os procedimentos aplicados para granjas de matrizes visam controlar a transmissão de *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* baseado em medidas que incluem como, por exemplo, a utilização de vacinação (BRASIL, 2003). O MAPA também implementou a vigilância regular dos lotes para detectar *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *Salmonella* spp. em frangos de corte antes do abate (BRASIL, 2009a). No entanto, a epidemiologia da *Salmonella* é complexa e outros sorotipos também são capazes de colonizar o trato intestinal de frangos de corte e contaminar

as carcaças durante o abate e processamento, assim como, podem circular na cadeia de produção de frangos de corte, o que representa um desafio extra para minimizar os riscos para os consumidores (VOSS-RECH et al., 2015).

1.3 Salmonelose e saúde pública

A demanda por produtos avícolas é considerada alta, podendo ser atribuída ao baixo custo deste produto, e pelo fato dos consumidores buscarem opções alimentares mais saudáveis, como a ingestão de carne branca (ANDERSON, 2008). No entanto, o consumo da carne de frango é considerado um fator de risco para infecções por *Salmonella* em humanos (FAO-WHO, 2009).

Estima-se que, anualmente, aproximadamente 1,2 milhões de pessoas adoeçam e ocorram 450 mortes devido a *Salmonella* não tifóide nos Estados Unidos (SCALLAN et al., 2011). O CDC relata que a incidência anual de infecção por *Salmonella* nos EUA foi de 15,2 doentes por 100.000 pessoas. Comparado aos anos de 2010 a 2012, a incidência da doença foi 9% menor no ano de 2013 (CDC, 2014).

Em 2012, na União Européia, *Salmonella* spp. foi a causa mais frequentemente reportada de surtos de origem alimentar (28,6%), com a carne suína, carne de frango, carne bovina sendo responsáveis por, respectivamente, 5,8%, 3,7% e 2,0% dos surtos causados por este patógeno (EFSA; ECDC, 2014).

Dados do Ministério da Saúde mostram que o agente etiológico mais associado a surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, de 2000 a 2014, foi *Salmonella* spp., representando 38,2% do total de agentes notificados (BRASIL, 2014).

De acordo com Jay (2005) e FDA e CFSAN (2008), a presença de *Salmonella* sp. no alimento não significa necessariamente o desencadeamento de doença no homem. Para que ocorra a doença, vários fatores estão associados, entre eles, a concentração da bactéria, que deve ser superior à dose infectante e a virulência do sorovar envolvido. Já entre os fatores ligados ao hospedeiro, destacam-se a espécie, raça, idade, condições imunológicas e nutricionais. A dose infectante capaz de provocar a doença pode variar desde uma célula, como ocorre com *S. Typhi*, ou de milhões de células, como por exemplo, 10^5 a 10^6 para *S. Bareilly* e *S. Newport* e 10^9 a 10^{10} para *S. Pullorum*.

É necessária a busca de procedimentos de controle do patógeno, principalmente na indústria avícola, visando a redução dos níveis de contaminação de carcaças de frango e, conseqüentemente, reduzindo o risco potencial de transferência do micro-organismo para humanos, pelo consumo de alimentos contaminados. Tais procedimentos incluem o esforço tanto da indústria com a implantação de programas cada vez mais eficientes e rígidos de análise de risco e controle de pontos críticos, envolvendo desde a criação do animal, o processamento na planta industrial até o preparo do alimento pelo consumidor (SANTOS et al., 2013).

Desde 1940, tem-se registrado um rápido aumento de salmonelas não específicas de humanos e animais, particularmente *S. Typhimurium*. Mais recentemente, *S. Enteritidis* passou a ser um dos sorovares mais isolados em casos de toxinfecções alimentares em humanos, devido a sua alta capacidade de transmissão vertical e horizontal (CARDOSO; TESSARI, 2008). Desta forma, no Brasil e no mundo, a ocorrência de casos de salmonelose continua a ser um grande desafio para a saúde pública.

1.4 Resistência antimicrobiana em *Salmonella* sp.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, resistência antimicrobiana é a capacidade do micro-organismo de interromper a ação de um determinado agente antimicrobiano ou de atuar sobre ele, resultando em tratamentos ineficazes, infecções/contaminações persistentes e a possibilidade de transmitir essa característica a outros micro-organismos (WHO, 2012).

O setor avícola enfrenta novas situações de emergência relacionada com a resistência antimicrobiana de patógenos em toda a cadeia de produção de aves (GELINSKI et al., 2014).

Um aspecto importante a cerca da transmissão de *Salmonella* ao homem pelo consumo de alimentos de origem animal está associado à disseminação de cepas resistentes aos antimicrobianos. A utilização abusiva de antimicrobianos na medicina humana e veterinária, como agentes terapêuticos ou profiláticos, e também como promotores de crescimento na produção animal, promove a pressão de seleção, favorecendo o surgimento de cepas resistentes e estreitando a escolha de

medicamentos eficazes disponíveis para a terapêutica (LAI et al., 2014; MUHAMMAD et al., 2010).

Outro fato importante relacionado à resistência aos antimicrobianos é o alerta da Organização Mundial de Saúde para a emergência de um grande número de *Salmonella* multi resistentes a antibióticos, já que muitas cepas têm incorporado essa característica em seu material genético. Como resultado há uma limitação severa das possibilidades de tratamento efetivo de infecções em seres humanos (WHO, 2005). Outro problema comum associado com a resistência antimicrobiana inclui a morbidade, mortalidade, e os custos associados ao tratamento e a doença na população humana (LIMA; ANDREATTI-FILHO; PINTO, 2009; MUHAMMAD et al., 2010), o que representa um grande problema de saúde pública.

De acordo com Ungemach, Müller-Bahrtdt e Abraham (2006), bactérias de caráter multi resistentes isoladas em humanos são, pelo menos em parte, de origem animal e podem ter adquirido seus genes de resistência ainda durante a criação, antes mesmo de ser transmitida ao homem pelo consumo de alimento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005), estima-se que, do total de antibióticos produzidos no mundo, metade é utilizada em rações animais, sendo que na Europa verificou-se que aproximadamente 100 miligramas de antimicrobiano são usados em animais para a produção de um quilograma de carne para consumo humano.

Essa possível transferência de cepas de *Salmonella* resistentes aos antimicrobianos em produtos de origem animal para a população humana, tem gerado a preocupação de órgãos internacionais como WHO, OIE e *Codex Alimentarius*. Em uma reunião organizada pela FAO/WHO/OIE na Itália, em 2007, foram apresentadas duas listas elaboradas pela WHO e a OIE referentes, respectivamente, aos antibióticos de uso criticamente importante para a saúde humana e animal (OIE, 2007; WHO, 2007). Esta reunião buscou identificar os antimicrobianos pertencentes às duas listas e, tanto quanto possível, analisar o risco desse fato para a saúde humana. Segundo este estudo, três classes de antimicrobianos foram consideradas como prioritárias para o desenvolvimento de medidas e estratégias para manejo da resistência bacteriana, pois apareciam em ambas as listas, sendo eles: cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, as quinolonas (incluindo as fluorquinolonas) e os macrolídeos.

Entre os anos de 2004 a 2006, no Brasil, foi implementado pelo Ministério da Saúde o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango, conhecido como PREBAF, como parte das estratégias de ação definidas pela ANVISA para a área de alimentos. Este estudo foi realizado com base nas recomendações do *Codex Alimentarius* para programas de vigilância e controle sobre a resistência microbiana em micro-organismos zoonóticos transmitidos por alimentos. O programa permitiu o conhecimento de dados de pesquisa em vigilância sanitária até então inexistentes no país, e seus resultados demonstraram os maiores percentuais de resistência de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango para as drogas: estreptomicina (89,3%), sulfonamida (72,4%), florfenicol (59,2%), ampicilina (44,8%), ácido nalidixico (44,0%), ceftiofur (22,8%), aztreonam (20,4%), enrofloxacina (18,4%), cefoxitina (17,3%) e cefalotina (12,4%). As cepas analisadas apresentaram resistência a uma ou mais drogas, tendo sido reconhecidos 98 perfis de multirresistência (>2 classes de antimicrobianos) em 192 (76,8%) cepas (BRASIL, 2008).

Visando evitar a propagação da resistência aos antimicrobianos em bactérias zoonóticas no Brasil, foi implementada a Instrução Normativa nº 26 (BRASIL, 2009b), determinando que os antibióticos pertencentes às classes dos anfenícois, tetraciclina, beta lactâmicos subclasse dos benzilpenicilâmicos, beta-lactâmicos subclasse das cefalosporinas, quinolonas e sulfonamidas sistêmicas são de uso exclusivo veterinário em terapêutica, sendo vedada a sua utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais.

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de avaliar o perfil de resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de aves e seus produtos frente a agentes antimicrobianos. Nesse sentido, destacam-se estudos em que foram encontrados isolados de *Salmonella* spp. com elevadas taxas de resistência no Brasil (CAMPIONI; ZOLDAN; FALCÃO, 2014; MEDEIROS et al., 2011; PANDINI et al., 2014; VOSS-RECH et al., 2015), assim como na Espanha (CARRAMIÑANA et al., 2004), Lituânia (RUZAUSKAS; VIRGAILIS; ŠPAKAUSKAS, 2005), Estados Unidos (ALALI et al., 2010), África (TABO et al., 2013), União Europeia (EFSA, 2015b) e Grécia (SAKARIDIS et al., 2011).

Estudos tem demonstrado que diferenças significativas no perfil de resistência varia de acordo com os diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. (CARRAMIÑANA et al., 2004; MÜRMANN; SANTOS; CARDOSO, 2008). Todos os sorotipos de *Salmonella* podem ser considerados patogênicos ao homem, porém, alguns fatores de virulência parecem estar presentes em um número limitado deles. Desta forma, a sorotipagem e a avaliação do perfil de resistência antimicrobiana constituem importantes ferramentas para investigações epidemiológicas e para o estabelecimento de estratégias eficientes para o uso adequado dos antibióticos (TESSMANN et al., 2008).

Baseado nos dados apresentados, observa-se a importância do uso controlado de antimicrobianos na produção animal, assim como o monitoramento constante de *Salmonella* na cadeia avícola, como formas de contribuir com a saúde pública e com a redução da pressão de seleção. Estas são formas adequadas para evitar a emergência e a disseminação de sorotipos resistentes, garantindo também a eficácia clínica na utilização dos antimicrobianos (PANDINI et al., 2014).

1.5 Genes de resistência aos antimicrobianos

As populações bacterianas sensíveis à ação de drogas podem se tornar resistentes basicamente por dois processos. Primeiro, por mutação espontânea e seleção, onde as bactérias sofrem mutação em seu material genético capaz de conferir resistência e sobrevivem ao uso da droga e, no segundo caso, as bactérias sensíveis são eliminadas. As células resistentes transferem essa característica às células-filhas, caracterizando a transmissão vertical. Outro processo de desenvolvimento de resistência é a aquisição de genes transportados por bactérias que são resistentes, caracterizando a transferência horizontal (TENOVER, 2006).

Vários são os genes associados à resistência aos antibióticos pertencentes às mais variadas classes de antimicrobianos. O grupo dos β -lactâmicos (subclasse das cefalosporinas de 3ª geração) destaca-se por agrupar antimicrobianos muito utilizados na medicina humana e animal no tratamento de infecções causadas por enterobactérias, e por isso são de interesse para estudo de genes associados à resistência. Dentre estes genes, muitos estudos citam o gene *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} por seu

envolvimento em quadros de resistência aos β -lactâmicos (AHMED et al., 2014; CARATTOLI et al., 2003; GELINSKI et al., 2014; POUGET et al., 2013).

Os β -lactâmicos consistem em quatro grandes grupos, incluindo penicilina, cefalosporinas, monobactams e carbapenêmicos. Estes quatro grupos principais têm em comum um anel β -lactâmico, que pode ser hidrolisado pelas enzimas β -lactamases resultando na inativação do antibiótico (GUPTA, 2007). Em gram-negativos, a produção de β -lactamases continua a ser o mais importante fator que contribui para a resistência aos β -lactâmicos (MEDEIROS, 1997). Até agora, centenas de β -lactamases foram descobertas e caracterizadas (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005).

De acordo com o esquema de classificação de Ambler, as β -lactamases podem ser divididas em quatro classes: A, B, C, e D. As classes A, C e D atuam sobre muitas penicilinas, cefalosporinas e monobactams. Proteínas da classe B agem em penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (GUPTA, 2007). AmpC, uma enzima indutível de origem cromossômica encontrada em muitas espécies de *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa* é o protótipo da enzima referente à classe C (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005).

A exposição persistente de estirpes de bactérias a uma multiplicidade de β -lactâmicos levou a superprodução e mutação das β -lactamases. Algumas β -lactamases são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e monobactams e são chamadas beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs - *Extended Spectrum β -lactamases*) (BUSH, 2001).

Inicialmente as ESBLs foram relatadas nas espécies de *E. coli* e *Klebsiella*. Porém, atualmente elas também vêm sendo encontradas em outras espécies bacterianas, incluindo *Salmonella enterica*, e em diversos ambientes, sugerindo uma expansão global dessas enzimas (BURKE et al., 2014; GELINSKI et al., 2014; LU et al., 2014; PATERSON; BONOMO, 2005).

A maioria das ESBLs podem ser divididas em três grupos: TEM, SHV e CTX-M (PATERSON; BONOMO, 2005).

A enzima TEM-1 foi originalmente descoberta em *E. coli* isoladas de uma paciente chamada Temoniera, daí a designação TEM (GUPTA, 2007). Poucos anos depois, foi isolada pela primeira vez a porção plasmidial em bactérias gram-

negativas, que é responsável por codificar a β -lactamase TEM-1, a qual se espalhou pelo mundo e para muitas espécies bacterianas (PFALLER; SEGRETI, 2006).

O progenitor da classe de enzimas SHV, SHV-1 é universalmente encontrado em *K. pneumoniae*. SHV-1 confere resistência às penicilinas de largo espectro, tais como ampicilina, ticarcilina e piperacilina, mas não para cefalosporinas (LIVERMORE, 1995). Em 1983, SHV-2 de origem plasmidial, derivado de uma mutação em SHV-1, foi isolado a partir de três *K. pneumoniae* que demonstraram resistência à cefotaxima, bem como para outras cefalosporinas (KNOTHE et al., 1983). Existem mais de 50 tipos de β -lactamases SHV descritas na literatura (BRADFORD, 2001).

As enzimas do tipo CTX-M, grupo mais recente das ESBLs estão se espalhando rapidamente entre as bactérias pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* em todo o mundo. CTX-M ESBLs exibem forte atividade contra cefotaxima e ceftriaxona, mas geralmente não contra ceftazidima (ROSSOLINI; D'ANDREA; MUGNAIOLI, 2008). Mais de 50 diferentes tipos de CTX-M β -lactamases tem sido descritos e classificados com base na composição e conformação de aminoácidos (ROSSOLINI; D'ANDREA; MUGNAIOLI, 2008). Os micro-organismos produtores dessas enzimas tornaram-se mais prevalentes nos últimos 10 anos, em especial nos países europeus e da América do Sul (CANTON; COQUE, 2006).

Alguns estudos realizados em diferentes partes do mundo mostraram a presença de genes de ESBLs em cepas de *Salmonella* não-tifóides isoladas de humanos hospitalizados na América do Sul, África do Norte e Europa Oriental (BONNET, 2004). Também foi observada a presença de genes associados às ESBLs SHV-1 e TEM-1 em *E. coli* e *Salmonella* spp. isoladas de animais e alimentos de origem animal na Espanha, Alemanha, EUA e Reino Unido. TEM-1 é normalmente a variante mais comum detectada entre os isolados (CARATTOLI, 2008).

O estudo de micro-organismos produtores de ESBLs pode gerar informações relevantes a respeito da transferência de genes de resistência e sobre a necessidade de medidas de controle para o uso de antibióticos na alimentação animal. A elevada ocorrência de transferência de genes associados às ESBLs promoveu a disseminação desse caráter para diferentes agentes patogênicos

entéricos. Isso promoveu aumento da resistência à ampicilina e, mais recentemente, da resistência à cefalosporina, mesmo na ausência de pressão seletiva de agentes antimicrobianos (MO et al., 2014).

1.6 Genes de virulência

Salmonella é identificada como um dos principais patógenos causador de doenças transmitidas por alimentos, e um dos mais prevalentes em uma escala global, consequentemente, está diretamente envolvida com o aumento dos problemas relacionados à segurança alimentar. Assim, tornou-se indispensável a maior exploração das características de virulência desse patógeno (ZHANG, 2013).

O processo de invasão do hospedeiro é desafiador para *Salmonella*, visto que a passagem através do trato gastrointestinal (TGI) apresenta ambientes hostis. Dessa maneira *Salmonella* precisa regular constantemente sua expressão gênica para sobreviver às condições adversas e atravessar a mucosa intestinal, a fim de ter acesso ao epitélio subjacente. Para isso, esse agente utiliza diferentes mecanismos específicos para a síntese de proteínas que auxiliam na proteção contra ambientes estressantes, incluindo o ambiente ácido do estômago, o ambiente anaeróbico no TGI, as respostas imunes inatas, as defesas antimicrobianas, além da competição contra outras bactérias por nutrientes, sítios de ligação e outros recursos (ZHANG, 2013).

Ao todo já foram descritas 17 ilhas de patogenicidade em *Salmonella*, porém o processo completo de invasão ocorre, principalmente, usando duas ilhas de patogenicidade *Salmonella* específicas: IPS-1 e IPS-2. O Sistema de Secreção Tipo III (T3SS) está presente nas IPS-1 e IPS-2 e é essencial para a patogênese e colonização, por meio da transferência de proteínas de virulência do citoplasma da célula bacteriana para a célula hospedeira (HARAGA; OHLSON; MILLER, 2008).

Na IPS-1 estão localizados genes necessários para invasão, característica importante para virulência de *Salmonella enterica* (SCHMIDT; HENSEL, 2004). IPS-1 apresenta tamanho de 40kb e mais de 31 genes envolvidos direta ou indiretamente no processo de invasão. Em IPS-2, foram identificados 44 tipos de estruturas funcionais, com tamanho de 25 kb. As porções dos genes responsáveis pelo desenvolvimento de infecções sistêmicas no hospedeiro são semelhantes nas

IPS-1 e IPS-2. T3SS atua também no sistema flagelar e na segregação de proteínas associadas à translocação de substâncias efetoras que interagem com as células hospedeiras. Os genes relacionados ao T3SS são denominados *inv* e *spa*, sendo responsáveis pela síntese de proteínas que compõem a estrutura deste sistema de secreção (OCHOA; RODRIGUES, 2005).

O T3SS é um mecanismo de virulência comum a muitas bactérias Gram-negativas, que consiste em uma estrutura molecular semelhante a uma agulha que atravessa a membrana da célula hospedeira, permitindo que proteínas efetoras sejam deslocadas do citoplasma bacteriano para o interior da célula eucariótica (TEMME et al., 2008). Uma vez no interior da célula, as proteínas efetoras interagem com domínios de proteínas e por meio da fosforilação ou transferência de resíduos, promovem uma série de reações, levando a modificações no citoesqueleto de actina da célula hospedeira, possibilitando sua entrada, escape do sistema de defesa no interior de fagossomos, morte e outras alterações celulares permitindo a proliferação intracelular de *Salmonella* sp. (VIEIRA, 2009).

O operon *Inv* (*invasibility*) é composto de sete genes *invABCDEFGH*. O gene *invA* é o primeiro no operon, desempenhando função importante na invasão de células epiteliais. Sorotipos de *Salmonella enterica* que não possuem o gene *invA* são incapazes de expressar os genes *invABC*, o que impossibilita estas cepas de invadir células de mamíferos (PORTER; CURTISS, 1997).

O gene *invA* parece ser bastante conservado em todos os sorovares de *Salmonella*. Rahn et al. (1992) ao estudarem 630 isolados de *Salmonella* spp. pertencentes a 100 sorovares diferentes, detectaram o gene em todas as amostras (100%). Salehi, Mahzounieh e Saeedzadeh (2005), detectaram o gene em todas as 192 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango provenientes da província de Shiraz no Iran. Em uma outra análise, Okamoto et al. (2009) ao pesquisarem o gene *invA* em isolados de *Salmonella* Enteritidis provenientes de fígado, ceco, saco da gema, ovário, suabes de cloaca e em carcaças de frangos, encontraram 97% de positividade. Zou et al. (2012), em um estudo realizado na Carolina do Norte (EUA), no período de junho de 2009 a setembro de 2010, observaram que 99,3% das cepas de *Salmonella* Enteritidis, isoladas de surtos de salmonelose em humanos, apresentavam o gene. Rowlands et al. (2014) detectaram

a presença do gene em 100% das 237 cepas de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos no Brasil.

A fixação da bactéria à célula do hospedeiro é essencial à sua patogenicidade. Antes de invadir qualquer tipo de célula, as enterobactérias necessitam entrar em contato, aderir e se fixar a um ou mais tipos celulares encontrados no tecido intestinal (GIBSON et al., 2007).

A fímbria longa polar, codificada pelo gene *lpfA*, é mais longa do que as demais fímbrias e está polarmente localizada na célula bacteriana. O operon *lpfABCDE*, que apresenta cinco genes, foi identificado pela primeira vez em uma cepa de *S. Typhimurium*, estando relacionado com a adesão às células M do intestino. Em estudos com ratos, foi demonstrado que a fímbria longa polar é relacionada ao tropismo pelas placas de *Peyer* do intestino, primeiro sítio de infecção desta bactéria. Desta forma, ela é importante no início da infecção, após a ingestão, juntamente com outros genes relacionados à invasibilidade. Outra função que pode estar relacionada a esta fímbria é a de conferir imunidade cruzada entre os diferentes sorovares de *Salmonella*. O operon *lpf* não é conservado entre os sorovares, provavelmente devido à seleção entre bactérias com e sem o gene em diferentes hospedeiros (OCHOA; RODRÍGUES, 2005; NORRIS; BÄUMLER, 1999).

O operon *agf*, codifica a fímbria Tafi (*Thin Aggregative Fimbriae*), um polímero multifuncional conservado na maioria dos sorovares de *Salmonella*. O gene *agfA* codifica a subunidade AgfA da fímbria agregativa, cuja principal função é promover a interação inicial da bactéria com o intestino do hospedeiro. Estudos têm demonstrado que esta fímbria se liga a várias proteínas do hospedeiro, entre elas a fibronectina, facilitando a sobrevivência da bactéria e a sua associação com o epitélio intestinal. Também está relacionada com a auto-agregação da *Salmonella* spp., que é importante para aumentar sua sobrevivência frente aos ácidos estomacais do hospedeiro, de surfactantes e de outros agentes bactericidas, uma vez que a formação de biofilmes reduz a superfície de contato (GIBSON et al., 2007; WHITE et al., 2003).

O operon *sef* contém quatro genes (*sefABCD*) necessários para a translocação e formação da fímbria SEF14, uma das principais do gênero *Salmonella*. O gene *sefA* codifica a maior subunidade da proteína SefA, que compõe a fímbria SEF14. O *sefB* codifica uma proteína da membrana externa, *sefC* codifica

o maior componente da fímbria, e *sefD* uma adesina. Esta fímbria está relacionada com as etapas de infecção posteriores a colonização do epitélio cecal do hospedeiro, tornando-se de extrema importância para a aderência ou sobrevivência da bactéria dentro dos macrófagos (MIRMOMENI; KIANI; SISAKHTNEZHAD, 2008).

O estudo desenvolvido na Carolina do Norte por Zou et al. (2012) determinou 99,3% de positividade para o gene *sefA* em cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de salmonelose em humanos. Para Libby et al. (2004), apesar de o papel dos *operons* fimbriais na virulência da infecção por *Salmonella* em aves não estar completamente estabelecida, devido ao grande número de *operons* fimbriais, pode-se sugerir que a bactéria apresenta diferentes mecanismos de aderência quando em diferentes hospedeiros.

Estudos foram realizados para avaliar a virulência em cepas de diferentes sorovares de *Salmonella* oriundas de países da Europa e dos Estados Unidos, os quais descreveram diferenças consideráveis em sua capacidade invasiva *in vitro* (SUEZ et al., 2013), bem como em sua capacidade de causar doença em ratos (SWEARINGEN et al., 2012).

Análises genômicas comparativas em *Salmonella enterica* revelaram que existem variações em elementos de virulência em todos os sorovares (JACOBSEN et al., 2011), porém, esses dados ainda não são plenamente conhecidos. Esta variabilidade sugere que sorovares com baixa virulência são menos eficientes tanto na capacidade de invasão quanto na de replicação no interior do hospedeiro, limitando o perfil de patogenicidade (MCWHORTER; CHOUSALKAR, 2015).

1.7 Tipagem molecular por RAPD-PCR

O sucesso dos estudos de vigilância epidemiológica de *Salmonella* está relacionado com os procedimentos de tipagem aplicados para diferenciar os genótipos. Vários métodos de tipagem para *Salmonella* têm sido descritos para fins epidemiológicos e filogenéticos (ARAQUE, 2009; NATH; MAURYA; GULATI, 2010). Esses métodos de tipagem baseados na análise do DNA estão se tornando cada vez mais úteis para a realização de levantamentos epidemiológicos de bactérias patogênicas (REZK et al., 2012).

O RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*) é caracterizado como uma técnica que se baseia na amplificação, por meio de PCR, de porções do genoma bacteriano que permitem a ligação com os iniciadores com sequências arbitrárias a uma baixa temperatura de anelamento. Para garantir maior poder discriminatório da técnica é essencial a utilização de mais de um *primer* na análise final do dendrograma. A técnica de RAPD-PCR, entre outros procedimentos de tipagem genéticas, é considerada uma ferramenta útil para o rastreamento epidemiológico de *Salmonella* e para distinguir estirpes de *Salmonella* a partir de diferentes origens geográficas. Também representa uma metodologia importante para a classificação filogenética de cepas isoladas de surtos humanos e de origem avícola, além de complementar métodos de sorotipagem e de fagotipagem (DE CESARE et al., 2001; LIM et al., 2005; QUINTAES et al., 2004; SMITH et al., 2011; SOTO et al., 1999, 2000).

Trata-se de uma técnica rápida que permite detectar polimorfismos genômicos, por meio de iniciadores de sequência curta. A PCR é realizada sob condições de baixa temperatura para gerar um conjunto reprodutível com produtos específicos que são subsequentemente analisados por eletroforese em gel de agarose. A eficácia, rapidez e flexibilidade do método de tipagem por RAPD permite sua ampla utilização em estudos epidemiológicos moleculares (SOTO et al., 1999).

O padrão ouro para diferenciar cepas epidemiologicamente relacionados de *S. enterica* é a análise de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) (FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2009). No entanto, a análise de porções do DNA repetitivas também tem mostrado resultados bem sucedidos, e mesmo tão ou mais eficazes do que o PFGE (DE OLIVEIRA et al., 2007; TURKI et al., 2012). Além disso, foi relatado que a utilização das sequências polimórficas do DNA amplificadas ao acaso (RAPD) combinadas com outras técnicas de tipagem são úteis para monitorar surtos e casos clínicos de gastroenterite causada por sorotipos de *S. enterica* (BETANCOR et al., 2009).

Contrariamente às vantagens da técnica de RAPD-PCR, existem críticas referentes à sua falta de reprodutibilidade em laboratórios (PEREIRA; CARNEIRO; AMORIM, 2008). Esta desvantagem torna-se irrelevante quando se estuda cepas já caracterizadas dentro do espaço e tempo limitado, em que as comparações com cepas independentes oriundas de outras localidades são desnecessárias. Por

consequente, essa metodologia permanece como uma ferramenta de análise válida para epidemiologistas, sendo particularmente útil em países com recursos limitados de saúde pública (VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS et al., 2014).

Um estudo realizado por Turki et al. (2014) avaliou cinco diferentes técnicas de análise filogenética de 57 cepas de *Salmonella enterica* de diferentes origens pertencentes ao mesmo sorovar (Kentucky) provenientes da África, Ásia e Europa. Os ensaios foram realizados por meio de comparação entre PFGE, RAPD, ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), ribotipagem e perfil plasmidial (*plasmid profiling*). Os resultados mostraram um maior poder discriminatório para as técnicas de RAPD e ERIC, ambas com valores equivalentes ($D > 0,9$). Logo, os autores constataram que a rapidez, combinada com a simplicidade do processo e aliado ao sucesso na rotina laboratorial referente ao elevado grau discriminatório, fazem essas metodologias adequadas para a detecção de novas cepas, para a investigação epidemiológica e para a análise de diversidade genética.

CAPÍTULO 2 - S. Minnesota DE ORIGEM AVÍCOLA APRESENTAM FATORES DE VIRULÊNCIA E RISCO POTENCIAL AOS HUMANOS

Autores: Adilson Ribeiro Resende, Eliane Pereira Mendonça, Roberta Torres de Melo, Priscila Christen Nalevaiko, Daise Aparecida Rossi

Periódico: Pesquisa Veterinária Brasileira

S. Minnesota de origem avícola apresentam fatores de virulência e risco potencial aos humanos¹

Adilson R. Resende^{2*}, Eliane P. Mendonça², Roberta T. Melo², Priscila C. Nalevaiko², Guilherme P. Monteiro², Daise A. Rossi²

ABSTRACT.- Resende A.R., Mendonça, E.P., Melo R.T., Nalevaiko P.C. Monteiro, G.P. & Rossi D.A. 2015. [S. Minnesota poultry origin have virulence factors and potential risk to human] S. Minnesota de origem avícola apresentam fatores de virulência e risco potencial aos humanos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Ceará s/n, Bairro Umuarama, Bloco 2D, sala 43, Uberlândia, MG 38405-303, Brazil. E-mail: adilresende@yahoo.com.br

It aimed to evaluate virulence characteristics, antimicrobial resistance profile and the pattern of genetic similarity of 71 strains of *S. Minnesota* isolated in the production chain of broilers. The strains were isolated in the 2009-2010 period into two units of a company (A and B). Isolates were serotyped and submitted to antimicrobial susceptibility by disk diffusion test. Later, using PCR, were evaluated the presence of genes *invA* (invasion), *lpfA* (pili-adhesion), *agfA* (pili-biofilm) and *sefA* (pili-adhesion) and the genes conferring resistance to beta-lactam (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* and *bla_{CTX-M}*). The phylogenetic relationship was determined by RAPD-PCR method. Among the drugs tested, the highest percentages of resistance were to tetracycline and sulfonamide, with 93.8% in unit A and 89.7% in unit B. Were recognized eight antimicrobial resistance profiles (A1 to A8) among strains isolated at industry A. Of the 39 strains from industry B, 11 profiles have been identified (B1 to B11), being 35 (89.7%) resistant strains or with intermediate resistance to at least one drug. Of all strains of both industries, 100% were positive for the *invA* gene, 98.6% to *agfA* gene, 49.3% for *lpfA* gene, and no strain showed the *sefA* gene. As to the resistance genes studied, only three strains were positive for the gene *bla_{TEM}* (4.2%), 11 (15.5%) for the *bla_{CTX-M}* gene. Phylogenetic evaluation showed the presence of seven clusters with similarity greater than 80% and three distinct profiles. Based on the dendrogram we observed the spread with similar profiles in both companies, the feed as a possible source of contamination and the persistence of the agent for long periods in the environment. The presence of virulence genes and the profile of antimicrobial resistance observed in *S. Minnesota* strains demonstrate the need for constant monitoring in the poultry production chain to minimize contamination hazard of the final product and for the consumer.

INDEX TERMS: Molecular Epidemiology, Pathogenicity Factors, Antimicrobial Resistance, Salmonellosis.

RESUMO. - Objetivou-se avaliar características de virulência, o perfil de resistência antimicrobiana e o padrão de similaridade genética de 71 cepas de *S. Minnesota* isoladas na cadeia produtiva de frangos de corte. As cepas foram isoladas no período de 2009 a 2010 em duas unidades de uma empresa (A e B). Os isolados foram sorotipificados e submetidos ao teste de susceptibilidade antimicrobiana pelo teste de difusão em disco. Após, utilizando PCR, foi avaliada a presença dos genes *invA* (invasão), *lpfA* (fímbria-adesão), *agfA* (fímbria-biofilme) e *sefA* (fímbria-adesão) e os genes de resistência aos beta-lactâmicos (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*). A relação filogenética foi determinada por método de RAPD-PCR. Dentre as drogas testadas, os maiores percentuais de resistência foram para tetraciclina e sulfonamida, com 93,8% na unidade A e 89,7% na unidade B. Foram reconhecidos oito perfis de resistência aos antimicrobianos (A1 a A8) dentre as cepas isoladas na indústria A. Das 39 cepas provenientes da indústria B, 11 perfis foram identificados (B1 a B11), sendo 35 (89,7%) cepas resistentes ou com resistência intermediária a pelo menos uma droga. Do total de cepas das duas indústrias, 100% foram positivas para o gene *invA*, 98,6% para o gene *agfA*, 49,3% para o gene *lpfA* e nenhuma cepa apresentou o gene *sefA*. Quanto aos genes de resistência estudados, apenas três cepas foram positivas para o gene *bla_{TEM}* (4,2%), 11 (15,5%) para o gene *bla_{CTX-M}*. A avaliação filogenética demonstrou a presença de sete clusters com similaridade superior a 80% e três perfis distintos. Com base no dendrograma observou-se a disseminação de um mesmo perfil em ambas as empresas, a ração como possível fonte de contaminação e a persistência do

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Av. Ceará s/n, Bairro Umuarama, Bloco 2D, Sala 43, Uberlândia, MG 38405-303, Brasil. *Autor para correspondência: adilresende@yahoo.com.br

agente por longos períodos no ambiente. A presença dos genes de virulência e o perfil de resistência aos antimicrobianos observados nas cepas de *S. Minnesota* demonstram a necessidade de um constante monitoramento na cadeia de produção avícola para minimizar os perigos de contaminação do produto final e para o consumidor.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Epidemiologia molecular, fatores de patogenicidade, resistência antimicrobiana, salmonelose.

INTRODUÇÃO

A salmonelose é uma das zoonoses mais complexas que afetam a saúde pública mundial. O patógeno é encontrado em uma ampla variedade de reservatórios animais, principalmente em frangos de corte, em diversos ambientes, o que explica seu alto potencial de disseminação. O consumo da carne de frango é considerado um importante fator de risco para ocorrência da doença em humanos (EFSA 2015).

Outro aspecto importante é a dispersão de cepas resistentes aos antimicrobianos. O uso desses agentes na medicina humana e veterinária promove pressão seletiva, favorecendo o surgimento de cepas resistentes e estreitando a escolha de medicamentos terapeuticamente eficazes (Lai et al. 2014). Os problemas mais comuns relacionados com a resistência antimicrobiana incluem morbidade, mortalidade e os custos associados com doenças (Muhammad et al. 2010).

Devido à existência de várias fontes potenciais de infecção e contaminação, como o ambiente, transporte, equipamentos, cama, vetores, água e ração, o controle de *Salmonella* é bastante complexo (FAO-WHO 2009). Somado a isto, vários sorotipos são capazes de colonizar o trato intestinal de frangos de corte e contaminar as carcaças durante o abate e processamento, permanecendo circulantes na cadeia de produção de frangos de corte, o que representa um desafio extra para minimizar os riscos para os consumidores finais (Voss-Rech et al. 2015).

Um dos instrumentos de intervenção para garantir a inocuidade dos alimentos é o *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF), um portal da Comissão Européia, que tem por finalidade garantir que os produtos de origem alimentar sejam livres de patógenos e toxinas. No ano de 2013 houve um aumento significativo das notificações por meio do RASFF ao produto de origem brasileira (UBABEF 2013). Os sorovares mais prevalentes identificados na carne de frango brasileira foram Enteritidis seguido de Minnesota (Freitas 2011, RASFF 2012).

Estudos para rastrear o patógeno ao longo da cadeia produtiva podem ser úteis na prevenção e na implantação de programas mais eficazes de controle. Nas últimas décadas, métodos de tipagem molecular de *Salmonella* estão sendo utilizados para determinar a relação filogenética entre as cepas. Entre estes, o *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) é considerado o padrão ouro para o subtipagem molecular de *Salmonella* (Favier et al. 2013, Yang et al. 2013). Porém, a técnica de RAPD-PCR vem garantindo alto poder discriminatório e é amplamente utilizado em estudos epidemiológicos em vários países (Vázquez-Garcidueñas et al. 2014, Turki et al. 2014).

No Brasil, existem poucos trabalhos publicados sobre sorotipos de *Salmonella* não-tifóide, especialmente sobre *Salmonella Minnesota*, já que o maior foco é aplicado aos sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* devido a questões de saúde pública (Vaz et al. 2010). *S. Minnesota* foi considerado o sorotipo mais prevalente em poedeiras no Chad, África Central (Tabo et al. 2013) e também em granjas de frangos na Bélgica (CODA-CERVA 2014). No entanto, até o momento, raramente é responsável por surtos de salmonelose humana no mundo (CDC 2013, EFSA 2014).

Considerando o aumento no número de isolamentos de *S. Minnesota* em produtos avícolas, objetivou-se avaliar a resistência aos antimicrobianos e a presença de genes de virulência, assim como, compreender o padrão de distribuição e disseminação desse sorovar no processo produtivo de frangos, e os possíveis riscos que possa acarretar na saúde humana.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com 71 cepas de *Salmonella Minnesota* isoladas em duas unidades de abate de frangos de corte, com ciclo completo de produção e sistema de integração, localizadas nos estados de São Paulo (Indústria A) e Mato Grosso do Sul (Indústria B), Brasil, durante o período de 2009 a 2010. As plantas de abate possuíam serviço de inspeção federal e a carne de frango produzida era comercializada em todo o território nacional e exportada. As amostras foram colhidas em todo o ciclo de produção, desde granjas de frangos de corte até o produto final industrializado pronto para o comércio.

Foram analisadas 31 cepas provenientes dos aviários de frango de corte, isoladas a partir de amostras de suabes de arrasto do galpão (3) e de equipamentos (5) e suabes de cloaca (2), suabe de

arrasto com propé (15) e propé (6), quando os frangos estavam com aproximadamente 30 dias. As 39 amostras provenientes do abatedouro foram colhidas nos pontos exigidos no Programa de Redução de Patógenos - PRP (BRASIL, 2003) e, adicionalmente, outros pontos que apresentavam maior frequência de isolamento de *Salmonella* na rotina das indústrias estudadas, incluindo amostras de cortes cárneos (17), carcaça inteira (16), miúdos (2), carne mecanicamente separada (2), água de escaldagem (1) e água de *chiller* (1). Também foi analisada uma amostra proveniente da fábrica de ração, de suabe do caminhão. A tipificação antigênica foi realizada pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz no Estado do Rio de Janeiro (FIOCRUZ).

A susceptibilidade das cepas aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco difusão, utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Os testes foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO/UFU).

O critério de escolha dos antimicrobianos baseou-se na utilização dessas drogas na medicina veterinária e humana e ocorrência de resistência em ambas as áreas. Os antimicrobianos e as concentrações em microgramas testados foram: amoxicilina (10µg) (β-lactâmico/penicilina), norfloxacin (10µg) (fluorquinolona), neomicina (30µg) (aminoglicosídeo), gentamicina (10µg) (aminoglicosídeo), trimetopim (5µg) (pirimidínicos), ceftazidima (30µg) (β-lactâmico/cefalosporina), cloranfenicol (30µg) (fenicol), imipenem (10µg) (β-lactâmico/carbapenem), tetraciclina (30µg) (tetraciclina), sulfonamida (300µg) (sulfonamida) (LABORCLIN®). As zonas de inibição foram medidas e classificadas como sensível, sensibilidade intermediária e resistente de acordo com recomendações do CLSI (2013). Isolados de *Salmonella* resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos foram definidos como multiresistentes (BRASIL, 2008). A cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como cepa controle da qualidade dos testes de sensibilidade.

Foram pesquisados quatro genes de virulência em *Salmonella* Minnesota, relacionados com as fases de adesão, invasão e consequente lesão em células intestinais (Quadro 1).

O DNA foi extraído por lise térmica de um volume de 5mL de um cultivo de 24 horas em BHI (Difco®) centrifugado a 12.000g por dois minutos; o sobrenadante foi desprezado. Ao *pellet*, foi adicionado 800µL de água ultrapura e centrifugado novamente a 12.000g por dois minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 200µL de água ultrapura e aquecido a 95°C por 10 minutos com auxílio de bloco aquecedor, resfriado e, por fim, congelado para posterior utilização. A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro (Femto 750®) com comprimento de onda de 260 nm.

Para a realização das análises de PCR para a pesquisa dos genes de virulência foi utilizado como controle positivo a cepa de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. As reações de PCR foram realizadas a partir de um volume final de 25µL com 1µL de DNA da amostra, 2,5 µL de tampão 10X, 0,75 µL de 50 mM MgCl₂, 1,25 µL de 10 pmol/µL da sequência *forward* e *reverse* de cada primer (Invitrogen®), 0,25 µL de 20 mM do *mix* de dNTPs (Invitrogen®), 0,25 µL de Taq (5U/µL) (Invitrogen®) e 17,75 µL de H₂O ultrapura.

As amostras foram submetidas aos ciclos de temperatura em termociclador (Eppendorf®), sendo desnaturadas inicialmente a 94°C por 5 minutos, amplificadas em 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos (*invA*); 50°C por 30 segundos (*sefA* e *lpfA*), 66°C por 30 segundos (*agfA*); extensão a 72°C por 90 segundos, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Cada gene foi avaliado separadamente.

As cepas também foram avaliadas quanto à presença de genes de resistência aos antibióticos do grupo dos β-lactâmicos. Para a realização das análises de PCR foi utilizado como controle positivo uma cepa de campo de *Klebsiella pneumoniae*, previamente testada para a presença dos três genes estudados. O preparo do *mix* para as reações de PCR foi o mesmo descrito para os genes de virulência. Os genes estudados foram avaliados separadamente e estão descritos no Quadro 2.

As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 45 segundos (*bla_{TEM}*), 56°C por 45 segundos (*bla_{SHV}*) e 58°C por 1 minuto (*bla_{CTX-M}*), extensão a 72°C por 90 segundos, seguido de uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os isolados foram submetidos à análise gênica por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) utilizando o protocolo descrito por Oliveira et al. (2007).

As reações de RAPD-PCR foram realizadas com dois iniciadores, individualmente, os quais foram descritos por Lin et al. (1996): 23L (5' - CCGAAGCTGC - 3') e P1254 (5' - CCGCAGCCAA - 3'). Como controle positivo foi utilizada a cepa ATCC 13076 de *Salmonella* Enteritidis.

A técnica de RAPD-PCR foi realizada a partir de um volume final de 25µL contendo 1µL de DNA da amostra a 50 ng, 2,5 µL de tampão 10X, 0,75 µL de 50 mM MgCl₂, 1,25 µL de 10 pmol/µL da sequência *forward* e *reverse* de cada primer (Invitrogen®), 0,25 µL de 20 mM do *mix* de dNTPs (Invitrogen®), 0,25

μL de Taq (5U/μL) (Invitrogen®) e 17,75 μL de H₂O ultrapura. A concentração utilizada para os iniciadores foi de 50 pmol para P1254 e 30 pmol para 23L. A reação PCR foi conduzida dentro das seguintes condições: um ciclo de 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Todas as reações de PCR foram realizadas no termociclador (Eppendorf) e os produtos amplificados separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 120 minutos. O gel foi corado com Syber Safe (Invitrogen®) e visualizado em transluminador UV (Loccus Biotecnologia).

Os resultados obtidos foram tabulados e submetidos à análise por meio da estatística descritiva, com cálculo das porcentagens de resistência antimicrobiana e de presença de genes de virulência nos isolados de *S. Minnesota*. Para a análise de similaridade genética entre as cepas utilizou-se análise computacional pelo Programa GelCompar II (*Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns*), versão 1.5, Applied Maths Korthrijk, Belgium. Os perfis de bandas obtidos no gel captados pelo programa foram considerados na análise e a matriz de similaridade foi obtida por comparação entre pares de cepas usando o coeficiente de similaridade de Dice, adotando-se 1% de tolerância para cada *primer* separadamente. A análise final foi baseada na média de experimentos (*average from experiments*). Para a análise de todas as cepas estudadas, foi utilizado o método UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) para construção do dendograma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 demonstra os percentuais de resistência obtidos para os 10 antimicrobianos avaliados nos isolados de *S. Minnesota* das duas unidades industriais. Os percentuais demonstrados no gráfico referem-se à somatória dos isolados classificados como resistente e intermediário pelo teste de disco difusão. Pode-se observar que houve maior índice de resistência nas duas indústrias para tetraciclina e sulfonamida, com 93,8% na indústria A, e 89,7% na indústria B, os quais tiveram seu uso banido no Brasil como promotores de crescimento (BRASIL, 2009). Todas as cepas caracterizadas foram sensíveis a norfloxacin e ao imipenem.

Diferentes níveis de resistência antimicrobiana têm sido identificados em *Salmonella* spp. isolada de frango no mundo todo. No Brasil, estes níveis variam entre 56% e 100% (Oliveira et al. 2005, Cardoso et al. 2006, Duarte et al. 2009, Vaz et al. 2010). Um estudo, nos Estados Unidos, registrou que 74,1% das cepas foram resistentes (USDA, 2012). Outros estudos demonstraram que cepas de *Salmonella* isoladas de frango apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano variando de 70,4% a 99,1% na China (Yang et al. 2013, Lai et al. 2014), 100% na Argentina (Favier et al. 2013) e Espanha (Álvarez-Fernández et al. 2012). Entretanto, estes resultados devem ser comparados com cuidado devido ao efeito de fatores como metodologia, teste antimicrobiano, e a origem das cepas (Schwarz et al. 2010).

O elevado percentual de resistência à tetraciclina era esperado, pelo fato deste antimicrobiano ser de primeira escolha na terapêutica para produção de frangos de corte (Muhammad et al. 2010). Altos níveis de resistência à tetraciclina foram observados em *Salmonella* spp. isolada de carne de frango amostrado em plantas de processamento no Brasil, variando de 80% (Ribeiro et al. 2007) a 100% (Cardoso et al. 2006). Nos Estados Unidos, há registros de resistência de 65,8% para este antibiótico (USDA 2012).

Embora as tetraciclinas terem sido proibidas como aditivos na alimentação animal no Brasil desde 1998, elas ainda são utilizadas terapeuticamente e, portanto, pode exercer uma pressão seletiva sobre os micro-organismos (Voss-Rech et al. 2015).

O elevado percentual de isolados resistentes a sulfonamida observado neste estudo (93,8% na indústria A e 89,7% na indústria B) também foi verificado pelo Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF). Esta pesquisa foi realizada no Brasil, em carcaças de frango congeladas, provenientes de quinze cidades brasileiras, entre os anos de 2004 e 2006, e demonstrou 72,4% de cepas resistentes (Medeiros et al. 2011).

A emergência de bactérias resistentes a cefalosporinas e fluoroquinolonas também levanta preocupações. Ambas as classes de agentes antimicrobianos são utilizados para tratar infecções humanas graves, e a resistência a estas drogas pode causar sérias complicações no tratamento (Hur, Jawale & Lee 2012, Kilonzo-Nthenge, Rotich & Nahashon 2013, Lai et al. 2014). No presente estudo, apenas 6,2% das cepas na indústria A apresentaram resistência a ceftazidima, uma cefalosporina de terceira geração. Por outro lado, todas as estirpes de *Salmonella* foram sensíveis à norfloxacin, uma fluoroquinolona.

No Brasil, embora as classes antimicrobianas liberadas para uso terapêutico em animais produtores de alimentos sejam definidas em normas específicas (Brasil 2009), a opção entre o uso das drogas permitidas é definida com base em critérios como custo, disponibilidade e opção do médico

veterinário. Houve diferenças nos percentuais de resistência entre as duas empresas, principalmente para neomicina, com 51,3% de cepas resistentes na indústria B e nenhuma resistente na indústria A. Assim, diferentes fatores podem ter influenciado nos fenótipos de suscetibilidade ou resistência dessas populações microbianas. De qualquer forma, a administração cuidadosa de agentes antimicrobianos e vigilância contínua são iniciativas importantes que ajudam a definir o melhor tratamento e inibem ou dificultam a seleção e propagação de cepas resistentes entre os lotes (Voss-Rech et al. 2015).

Nos Quadros 3 e 4 estão apresentados os perfis de resistência de *S. Minnesota* nas indústrias A e B, respectivamente. Foram considerados multiresistentes os isolados que apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos, conforme adotado por Brasil (2008).

Das cepas avaliadas na indústria A, 93,8%, apresentaram resistência a dois ou mais agentes antimicrobianos estudados.

Foram reconhecidos oito perfis de resistência aos antimicrobianos (A1 a A8) dentre as cepas isoladas na indústria A (Quadro 3), sendo os perfis mais frequentes o A1 e o A4, sendo A1 agrupando isolados resistentes a sulfonamida e tetraciclina (50,0%) e A4 com resistência associada a sulfonamida, tetraciclina e amoxicilina (21,9%). O teste de susceptibilidade revelou que 30 (93,8%) isolados de *S. Minnesota* na indústria A apresentaram resistência ou resistência intermediária a pelo menos um antibiótico. Destes, 16 (53,3%) foram resistentes a dois antimicrobianos (A1) e 14 (46,7%) foram consideradas multiresistentes, pois apresentaram resistência a três ou mais classes de antibióticos (A2 a A7). Apenas duas cepas foram sensíveis a todos antibióticos testados.

Entre as 39 cepas de *S. Minnesota* analisadas na indústria B, 11 perfis foram identificados (B1 a B11), sendo os perfis B1 e B2 os mais frequentes, com 25,6% cada, sendo B1, agrupando cepas resistentes à sulfonamida e tetraciclina e B2, à sulfonamida, tetraciclina e neomicina. Com exceção do perfil B11, cujas cepas foram sensíveis a todos antimicrobianos testados (4/39 - 10,3%), os demais perfis agruparam 35 (89,7%) cepas resistentes ou com resistência intermediária a pelo menos uma droga. Dentre estas 35 cepas, 10 (28,6%) foram resistentes a dois antibióticos (B1), e 25 (71,4%) foram consideradas multiresistentes (B2 a B10), com destaque para uma cepa que apresentou resistência a seis classes de antibióticos (B10). Esta cepa foi isolada de carne mecanicamente separada na indústria B.

Um estudo desenvolvido por Tabo et al. (2013) em Chad, na África Central, com 15 (18%) isolados de *S. Minnesota* provenientes de granjas poedeiras, revelou que as cepas apresentaram resistência a cinco diferentes classes de antimicrobianos. As cepas estudadas apresentaram padrão de multiresistência aos seguintes antibióticos, ampicilina, cloranfenicol, sulfonamida, trimetoprim, estreptomicina e tetraciclina.

Acredita-se que o uso incorreto ou ilegal de antimicrobianos na avicultura industrial acabou por selecionar cepas do sorovar *Minnesota* de caráter multiresistente, melhor adaptadas às condições de pressão, que acabaram se disseminando no ambiente. Associado a esta hipótese, pode ter ocorrido a disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos. A PREBAF (BRASIL, 2008) enfatiza a importância de caracterizar os clones multiresistentes quanto a sua capacidade de albergar e disseminar genes de resistência a antimicrobianos.

Ainda de acordo com o PREBAF (BRASIL, 2008), a proibição a utilização de antimicrobianos em baixas concentrações em rações de animais de produção, tem origem na preocupação com o desenvolvimento de resistência aos antibióticos pelas bactérias presentes nos animais e sua possível transferência para a população humana por meio da cadeia alimentar. Por isso, usa ocorrência de cepas de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos em produtos de origem animal, alerta para uma condição de risco à saúde pública.

Quanto aos genes de resistência estudados, apenas três cepas apresentaram o gene *bla*_{TEM} (4,2%) e 11 (15,5%) o gene *bla*_{CTX-M}, não havendo positividade para o gene *bla*_{SHV}, todos relacionados a resistência aos antibióticos da classe dos β-lactâmicos.

O percentual de resistência observado nas indústrias A e B foi considerado baixo para a cefalosporina de 3ª geração ceftazidima (2,8%) e aos carbapenêmicos (imipenem - 0%). Já para o β-lactâmicos, do grupo das penicilinas (amoxicilina) houve um percentual de 31% de cepas resistentes.

Desde o ano 2000, em medicina humana, as enzimas CTX-M são as mais relevantes tanto em nível hospitalar quanto na comunidade para identificar resistência do tipo ESBL, suplantando as enzimas pertencentes às famílias TEM e SHV (Bonnet, 2004).

Neste estudo, 10 cepas de *Salmonella* apresentaram característica de resistência ou resistência intermediária, pelo teste de disco difusão, apenas ao β-lactâmico amoxicilina, e duas foram resistentes a amoxicilina e também a ceftazidima, um β-lactâmico do grupo das cefalosporinas de 3ª geração. Embora fenotipicamente tenham apresentado resistência aos β-lactâmicos, estes isolados não apresentaram a presença de nenhum dos genes avaliados, indicando que a resistência pode estar associada à presença de outras β-lactamases, que não foram avaliadas neste estudo, e/ou de outros mecanismos de resistência aos antibióticos β-lactâmicos, tais como: bombas de efluxo, perda na expressão de porina, alterações nas

proteínas de ligação à penicilina (PLPs), produção de determinadas carbapenemases, presença de múltiplas, ou mesmo de novas β -lactamases (Babic, Hujer & Bonomo 2006, Nikaido, Yamaguchi & Nishino 2008, Jacoby 2009).

Verificou-se que do total das cepas de *S. Minnesota* isoladas nas duas indústrias, 100% foram positivas para o gene *invA* e nenhuma apresentou o gene *sefA*. O gene *agfA* foi identificado em 98,6% (70/71) das cepas e o *lpfA* em 49,3% (35/71). Houve 52,1% de positividade para dois genes concomitantemente, e 47,9% para três dos genes avaliados (Fig. 2).

A positividade para o gene *invA* para todas as cepas era esperada e concorda com estudos anteriores (Hur et al. 2011, Rowlands et al. 2014). Esse gene é bastante conservado entre alguns sorotipos de *Salmonella* e pode ser utilizado como um marcador útil, mas não único, para a detecção molecular deste patógeno por PCR (D'Souza, Critzer & Golden 2009). Além disso, a presença desse gene é fundamental na expressão da capacidade de invasão dos tecidos do hospedeiro pelo micro-organismo (Amini et al. 2010).

A ausência do gene *sefA* é condizente com a literatura, uma vez que a fímbria SefA não está presente em todos os sorovares, sendo restrita ao grupo D das *Salmonellas*, nos sorotipos Enteritidis, Dublin, Moscow e Blegdon (Amini et al. 2010).

Uma característica observada foi a distribuição heterogênea dos fatores de virulência entre as cepas, o que sugere a existência de origens distintas. Trabalhos anteriores também reportaram esse fato (Bolton, O'Neill & Fanning 2012, Zou, Keelara & Thakur 2012), e inferiram a ocorrência de aquisições ou deleções de genes, que podem promover diferentes níveis de adaptação ao hospedeiro ou ao ambiente (Moussa et al. 2013, Suez et al. 2013).

A identificação comum dos genes *invA*, *lpfA* e *agfA* em 47,9% (34/71) das cepas, indica que além da capacidade de invasão, estas cepas também são eficientes no processo de adesão e na formação de biofilmes. Assim, seu isolamento em amostras ambientais, de carcaças e de miúdos pode indicar uma fonte de contaminação persistente nas unidades de produção. Borges et al. (2013) e Yoo et al. (2013) também observaram esse padrão em *Salmonella* provenientes do Brasil e da Coreia, respectivamente. Além disso, a presença dessas fímbrias (gene *agfA* e *lpfA*) é de extrema importância no processo de infecção. É possível que haja efeitos aditivos das adesinas Lpf e Agf na colonização do intestino e expressão de virulência no hospedeiro, que indicam potencial risco após infecção. Esses achados foram semelhantes a outros dados obtidos em trabalhos anteriores que estudaram diferentes sorotipos de *Salmonella* (Borsoi et al. 2009, Cesco 2010, Borges et al. 2013).

Os resultados mostram que esse sorovar pode ser considerado como potencialmente patogênico e que genes de virulência e resistência devem ser monitorados para compreender e acompanhar o processo de adaptação de *S. Minnesota* ao longo da produção e, consequentemente, no hospedeiro humano, por meio da aquisição e da perda desses genes.

A análise de similaridade de *S. Minnesota* pelo dendrograma demonstrou elevada proximidade genética entre as cepas (Fig. 3). Não foram detectados clones com 100% de homologia. Porém o estudo permitiu identificar os genótipos distintos e *clusters* com homologia superior a 80%, que foram comparados considerando o local de isolamento, a data da coleta, o perfil de resistência antimicrobiana e a presença dos genes *invA*, *lpfA* e *agfA*.

Foram identificados sete *clusters* e três isolados que apresentaram perfil distinto de forma que não puderam ser agrupados com as demais cepas pelo fato da proximidade genética ser inferior a 80%.

O *cluster* A agrupou 11 cepas com homologia de 82,5%, todas oriundas do abatedouro de frangos da unidade B. Esse perfil esteve presente por um período dois meses nas amostras de alimentos (carcaças, miúdos e cortes) e em uma amostra de água de *chiller* das carcaças. A água de *chiller* é considerada um fator importante na disseminação de *Salmonella* no abatedouro, já que um grande número de carcaças passam no mesmo tanque de água, o que aumenta as chances de contaminação cruzada (Mead et al. 2000).

A presença comum dos genes *lpfA* e *agfA* em 72,7% dessas cepas (8/11) mostra que possuem potencial para se fixar em superfícies e produzir biofilmes caso haja expressão das características genéticas identificadas. Esse fato, aliado a não detecção deste perfil no ambiente da granja, permite inferir que a contaminação do produto no abatedouro não esteja relacionada à infecção prévia dos animais, mas sim, seja devido a contaminação cruzada com os utensílios ou o próprio ambiente do abatedouro.

Foram agrupadas 19 cepas no *cluster* B com similaridade de 84,7%, provenientes tanto do aviário de frangos de corte quanto do abatedouro da unidade B. Esse genótipo foi identificado por quatro meses na empresa, em amostras ambientais do aviário e em alimentos já processados no abatedouro. O extenso período de permanência sugere que houve infecção em lotes sucessivos de animais associada à manutenção do micro-organismo no ambiente do aviário, e consequente contaminação do produto no abatedouro, o que indica que a contaminação cruzada parece ser importante na disseminação desse genótipo ao longo da cadeia de produção. Logo, a presença desse perfil em amostras de suaves de gaiola,

do caminhão de transporte e do ambiente pré-abate sugere a negligência às normas de biossegurança na unidade de produção.

De acordo com Carrasco, Morales-Rueda & García-Gimeno (2012) a contaminação cruzada de *Salmonella* na indústria de produção está diretamente relacionada às más práticas de saneamento dentro do ambiente e ao controle deficiente. E devido à dificuldade de erradicação desse evento, os autores sugerem a necessidade de reforçar as medidas de controle preventivo da indústria, tais como sanitização adequada e padronizada, além de programas de avaliação e rastreamento do agente ao longo do processo produtivo.

A presença do gene *agfA* em todas as cepas do *cluster* B indica que provavelmente esse genótipo se mantém devido a formação de agregados de culturas sésseis. Também foram identificados dois perfis de resistência em comum nesse grupo, B1 e B2 (Quadro 4), presente em 14/19 (73,7%) cepas.

As superfícies da indústria de processamento de alimentos, tais como máquinas, utensílios e bancadas quando apresentam formação de biofilmes bacterianos caracterizam importantes fontes de contaminação. Essas estruturas permitem o crescimento e a sobrevivência de *Salmonella* em condições ambientais de estresse. E uma vez instalado, o biofilme torna-se uma fonte de contaminação constante e uma séria preocupação para a indústria alimentar. Todavia, a aplicação de boas práticas e eficiente higiene e desinfecção permitem a prevenção da sua formação ou a remoção dessas estruturas (Stepanovic et al. 2004, Reuter et al. 2010).

No *cluster* C, 16 cepas apresentaram similaridade equivalente a 81,4% estando presentes em ambas as empresas tanto no aviário quanto no abatedouro. Esse fato implica na provável disseminação desse perfil nas duas unidades de produção.

A permanência desse genótipo variou entre os meses de agosto de 2009 a abril de 2010 no abatedouro da unidade A. A persistência do agente pode ter relação com a presença do gene *agfA* detectado em todas as cepas. Porém, é provável que a alternância nos períodos em que o genótipo foi encontrado seja devido a algum processo de injúria, que reduziu sua presença em números não detectáveis na metodologia tradicional.

De maneira distinta, na unidade B esse perfil se manteve somente por um mês no aviário e não foi detectado no ambiente do abatedouro ou no alimento, o que indica um controle mais eficiente, que impediu sua permanência naquele ambiente e a positividade nas amostras de abatedouro.

O *cluster* D apresentou proximidade genética de 83% entre as nove cepas oriundas do abatedouro e uma cepa da fábrica de ração da unidade A. Possivelmente a ração foi a fonte primária de infecção dos animais na granja que gerou a contaminação das amostras do abatedouro, uma vez que houve coincidência nos períodos em que esse genótipo foi detectado (maio de 2009). A presença dos genes *invA*, *lpfA* e *agfA* foi comum nesse grupo, além do perfil de resistência A1 (Quadro 3) encontrado em 60% (6/10) das cepas.

A ração recebe grande atenção na indústria como uma fonte de *Salmonella*, devido à variedade de ingredientes potencialmente contaminados utilizados na fabricação (Ricke 2005). Alguns estudos demonstram a presença desse agente na ração sendo o causador do problema na indústria avícola (Wasyk et al. 2006, Bucher et al. 2007). Uma das formas de controlar esta variável é a implantação de sistemas de peletização da ração, a qual destrói praticamente todas as formas viáveis de *Salmonella* (Back, Beltrão & Leão 2006).

Sete cepas do aviário da unidade A foram agrupadas no *cluster* F, com homologia de 85,7%. Todas são cepas providas do ambiente da granja com persistência alternada entre os meses de julho de 2009 e janeiro de 2010, justificável pela provável formação de biofilmes, resultante da expressão dos genes *lpfA* e *agfA* identificados nesse genótipo.

Devido ao baixo número de cepas agrupadas nos *clusters* E e G, duas e três, respectivamente, não é possível realizar uma análise fidedigna dos dados encontrados.

CONCLUSÃO

Nas duas unidades produtivas avaliadas (A e B), 93,8% e 89,7% dos isolados de *S. Minnesota*, respectivamente, apresentaram resistência a dois ou mais antibióticos avaliados, com destaque a tetraciclina e sulfonamida. Dentre estes, 46,7% cepas na indústria A e 71,4% na indústria B, foram consideradas multiresistentes. Todos os isolados foram sensíveis a norfloxacin e imipenem.

Houve baixo índice de isolados resistentes aos β -lactâmicos imipenem e ceftazidima, com 0% e 2,8%, respectivamente. Já para amoxicilina o percentual foi de 31%. A ocorrência desta característica fenotípica não pôde ser correlacionada com a presença dos genes de resistência estudados, indicando que outros fatores de resistência podem estar envolvidos.

A elevada positividade para os genes de virulência estudados mostram o potencial patogênico dos isolados e a possibilidade do sorovar Minnesota em causar doença clínica em humanos. A análise filogenética demonstrou a persistência dos genótipos no ambiente e consequente contaminação do alimento produzido reforçada pela presença dos genes *invA*, *lpfA* e *agfA* na maioria dos isolados, que conferem capacidade potencial de formar biofilmes.

Estes resultados revelam a necessidade de vigilância contínua e estudos de caracterização genética das cepas como ferramenta auxiliar nas estratégias de controle de *Salmonella* em frangos de corte, e também para um melhor entendimento das cepas emergentes e circulantes no Brasil, devido à importância que representam em saúde pública mundial.

REFERÊNCIAS

- Álvarez-Fernández E., Alonso-Calleja C., García-Fernández C. & Capita R. 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *Int. J. Food Microbiol.* 153:28–287.
- Amini K., Salehi T.Z., Nikbakhht G., Ranjbar R., Amini J. & Ashrafganjooei S.B. 2010. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from human and animals in Iran. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4(21):2202–2210.
- Babic M., Hujer A. M. & Bonomo R. A. 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases. *Drug Resist. Update.* 9:142–156.
- Back A., Beltrão N. & Leão J. A. 2006. Monitoria e controle de *Salmonella*: aspectos práticos. Anais do VII Simpósio Brasil Sul de Avicultura, Chapecó, SC, p.95–103 (Resumo).
- Bolton D.J., O'Neill C.J. & Fanning S. 2012. A preliminary study of *Salmonella*, verocytotoxigenic *Escherichia coli*/*Escherichia coli* O157 and *Campylobacter* on four mixed farms. *Zoonoses Pub. Health.* 59:217–28.
- Bonnet R. 2004. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1–14.
- Borges K.A., Furian T.Q., Borsoi A., Moraes H.L.S., Salle C.T.P. & Nascimento V.P. 2013. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in Southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(12):1416–1422.
- Borsoi A., Santin E., Santos L.R., Salle C.T.P., Moraes H.L.S. & Nascimento V.P. 2009. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profile, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis pattern to intestinal changes evaluation. *Poult. Sci.* 88:750–758.
- BRASIL (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa Nº 70, de 06 de outubro de 2003. Institui o Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em carcaças de Frangos e Perus. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 out. 2003. Seção 1, p.9.
- BRASIL (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa Nº 26, de 09 de julho de 2009. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jul. 2009, seção 1, p. 14.
- BRASIL (Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária) - Anvisa. Relatório do Monitoramento da Prevalência e do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos em Enterococos e Salmonelas Isolados de Carcaças de Frango Congeladas Comercializadas no Brasil. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF). Brasília, jan. 2008. 186p.
- Bucher O., Holley R.A., Ahmed R., Tabor H., Nadon C., Ng L.K. & D'Aoust J.Y. 2007. Occurrence and characterization of *Salmonella* from chicken nuggets, strips, and pelleted broiler feed. *J. Food Prot.* 70:2251–2258.
- Cardoso M., Ribeiro A.R., Santos L.R., Pilotto F., Moraes H.L.S., Salle C.T.P., Rocha S.L.S. & Nascimento V.P. 2006. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. *Braz. J. Microbiol.* 37:299–302.
- Carrasco E., Morales-Rueda A. & García-Gimeno R.M. 2012. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food. Res. Int.* 45:545–556.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2013. National Salmonella Surveillance Annual Report, 2011. US Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, GA.

- Cesco M.A.O. 2010. Pesquisa de Fatores Associados à Virulência de *Salmonella* Hadar através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 84p.
- Chen S., Zhao S., White D.G., Schroeder C.M., Lu R., Yang H., McDermott P.F., Ayers S. & Meng J. 2004. Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Meats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(1):1-7.
- CLSI. (Clinical And Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement. CLSI M100-S23, Wayne, 2013.
- CODA-CERVA (Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie, Centre d'Etude et des Recherches Vétérinaires et Agrochimiques). 2014. *Salmonella* Serotypes Analysed at the CODA-CERVA in 2013. Federal Public Service Health, Food Chain Security and Environment, Brussels, Belgium.
- Collinson K., Doig P.C., Doran J.L., Clouthier S., Trust T.J. & Kay W.W. 1993. Thin aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella* Enteritidis to fibronectin. *J. Bacteriol.* 175(1):12-18.
- D'Souza D.H., Critzer F.J. & Golden D.A. 2009. Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction for the rapid detection of *Salmonella* using *invA* primers. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:1097-106.
- Duarte D.A.M., Ribeiro A.R., Vasconcelos A.M.M., Santos S.B., Silva J.V.D., Andrade P.L.A. & Falcão L.S.P.C.A. 2009. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Braz. J. Microbiol.* 40:569-573.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2014. Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J.* 12:3547.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015, 13:3991, 162 pp.
- FAO-WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2009. *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat: Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series 19.
- Favier G.I., Estrada C.S.M.L., Otero V.L. & Escudero M.E. 2013. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* spp. isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina. *Food Control.* 29:49-54.
- Freitas J. 2011. Evolução de sorovares Modelo de Banco de Cepas. Anais do Seminário Internacional de Salmonellose Aviária. Rio de Janeiro, RJ. (Resumo).
- Heuzenroeder M.W., Murray C.J. & Dalcin R.M. 2000. Molecular basis of benign colonization of *Salmonella* Sofia in chickens. *Rural Industries R&D Corporation*, 1:106.
- Hur J., Choi Y.Y., Park J.H., Jeon B.W., Lee H.S., Kim A.R. & Lee J.H. 2011. Antimicrobial resistance, virulence-associated genes, and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from piglets with diarrhea in Korea. *Can. J. Vet. Res.* 75:49-56.
- Hur J., Jawale C. & Lee J.H. 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Res. Int.* 45:819-830.
- Jacoby G.A. 2009. AmpC β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:161-182.
- Kilonzo-Nthenge A., Rotich E. & Nahashon S.N. 2013. Evaluation of drug-resistant Enterobacteriaceae in retail poultry and beef. *Poult. Sci.* 92:1098-1107.
- Lai J., Wu Co., Wu Ch., Qi J., Wang Y., Wang H., Liu Y. & Shen J. 2014. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. *Int. J. Food Microbiol.* 180:30-38.
- Lin A.W., Usera A.M., Barret T.J. & Goldsby R.A. 1996. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella* Enteritidis. *J. Clin. Microbiol.* 34:870-876.
- Mead G.C., Allen V.M., Burton C.H. & Corry J.E.L. 2000. Microbial crosscontamination during air chilling of poultry. *Brit. Poultry Sci.* 41:158-162.
- Medeiros M.A.N., Oliveira D.C.N., Rodrigues D.P. & Freitas D.R.C. 2011. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Rev. Panam. Salud. Publica.* 30(6):555-60.
- Monstein H.J., Östholm-Balkhed Å., Nilsson N.V., Nilsson M., Dornbusch K. & Nilsson L.E. 2007. Multiplex PCR amplification assay for rapid detection of *blaSHV*, *blaTEM* and *blaCTX-M* genes in Enterobacteriaceae. *APMIS.* 115:1400-1408.

- Moussa I.M., Aleslamboly Y.S., Al-Arfaj A.A., Hessain A.M., Gouda A.S. & Kamal R.M. 2013. Molecular characterization of *Salmonella* virulence genes isolated from different sources relevant to human health. *J. Food Agric. Environ.* 11(2):197-201.
- Muhammad M., Muhammad L. U., Ambali A. G., Mani A. U., Azard S. & Barco L. 2010. Prevalence of *Salmonella* associated with chick mortality at hatching and their susceptibility to antimicrobial agents. *Vet. Microbiol.* 140:131-135.
- Nikaido E., Yamaguchi A. & Nishino K. 2008. AcrAB Multidrug Efflux Pump Regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in Response to Environmental Signals. *J. Biol. Chem.* 283(35):24245-24253.
- Oliveira F.A., Frazzon A.P.G.; Brandelli A. & Tondo E.C. 2007. Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. *J. Infect. Dev. Ctries.* 1:170-176.
- Oliveira S.D., Flores F.S., Santos L.R. & Brandelli A. 2005. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *Int. J. Food Microbiol.* 97:297-305.
- Oliveira S.D., Rodenbusch C.R., Michael G.B., Cardoso M.I.R., Canal C.W. & Brandelli A. 2003. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. *Braz. J. Microbiol.* 34(1):123-124.
- RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). 2012. The rapid alert system for food and feed. Annual Report of European Commission. 60p. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff_annual_report_2012_en.pdf/. Acesso em: 18/05/2015.
- Reuter M., Mallet A., Bruce M. P. & van Vliet A.H.M. 2010. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microb.* 76:2122-2128.
- Ribeiro A.R., Kellermann A., Santos L.R., Bessa M.C. & Nascimento V.P. 2007. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: Occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. *Braz. J. Microbiol.* 38:296-299.
- Ricke S.C. 2005. Ensuring the safety of poultry feed. p. 174-194. In: Mead G.C. (Ed.), Food safety control in the poultry industry. Cambridge, Woodhead Publishing.
- Rowlands R.E.G., Ristori C.A., Ikuno A.A., Barbosa M.L., Jakabi M. & Franco B.D.G.M. 2014. Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 56(6):461-467.
- Schwarz S., Silley P., Simjee S., Woodford N., Duijkeren E.V., Johnson A.P. & Gaastra W. 2010. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet. Microbiol.* 141:1-4.
- Stepanovic S., Circovik I. C., Ranin L. & Svabic-Vlahovic M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:428-432.
- Suez J., Porwollik S., Dagan A., Marzel A., Schorr Y.I., Desai P.T., Agmon V., McClelland M., Rahav G. & Gal-Mor O. 2013. Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. *PLoS ONE.* 8(3):e58449.
- Tabo D., Diguimbaye C.D., Granier S.A., Moury F., Brisabois A., Elgroud R. & Millemann Y. 2013. Prevalence and antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* serotypes isolated from laying hens and broiler chicken farms in N'Djamena, Chad. *Vet. Microbiol.* 166:293-298.
- Turki Y., Mehri I., Fhoula I., Hassen A. & Ouzari H. 2014. Comparison of five molecular subtyping methods for differentiation of *Salmonella* Kentucky isolates in Tunisia. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30:87-98.
- UBABEF (União Brasileira de Avicultura). 2013. Relatório Anual 2012/2013 SP. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiababef.php?notcodigo=2761>. Acesso em: 20/05/2015.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2012. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). Retail Meat Report 2011.
- Vaz C.S.L., Streck A.F., Michael G.B., Marks F.S., Rodrigues D.P., dos Reis E.M., Cardoso M.R. & Canal C.W. 2010. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. *Poult. Sci.* 89:1530-1536.
- Vázquez-Garcidueñas Ma. S., Romero-Pérez N.L., Figueroa-Aguilar G.A., Jaime-Sánchez J.L. & Vázquez-Marrufo G. 2014. Investigation of a food-borne *Salmonella* Oranienburg outbreak in a Mexican prison. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8(2):143-153.
- Voss-Rech D., Vaz C.S.L., Alves L., Coldebella A., Leão J.A., Rodrigues D.P. & Back A. 2015. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. *Poult. Sci.* 94:433-441.

- Wasył D., Sandvang D., Skov M.N. & Baggesen D.L. 2006. Epidemiological characteristics of *Salmonella* Typhimurium isolated from animals and feed in Poland. *Epidemiol. Infect.* 134:179–185.
- Yang B., Qiao L., Zhang X., Cui Y., Xia X., Cui S., Wang X., Meng X., Ge W., Shi X., Wang D. & Meng J. 2013. Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulsed field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in Henan Province, China. *Food Control.* 32:228–235.
- Yoo A.Y., Yu J.E., Yoo H., Lee T.H., Lee W.H., Oha J.I. & Kang H.Y. 2013. Role of sigma factor E in regulation of *Salmonella* Agf expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430:131–136.
- Zou M., Keelara S. & Thakur S. 2012. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from humans by antimicrobial resistance, virulence genes, and pulsed-field gel electrophoresis. *Foodborne Pathog. Dis.* 9:232–238.

Legendas das Figuras

Fig. 1: Percentual de resistência aos antimicrobianos em cepas de *S. Minnesota* isoladas em duas indústrias com ciclo completo de produção de frangos de corte (Indústria A e Indústria B). AMO: amoxicilina (10µg); NOR: norfloxacino (10µg); NEO: neomicina (30µg); GEN: gentamicina (10µg); TRI: trimetoprima (5µg); CAZ: ceftazidima (30µg); CLO: cloranfenicol (30µg); IMP: imipenem (10µg); TET: tetraciclina (30µg); SUL: sulfonamida (300µg).

Fig. 2: Gel de PCR demonstrando a presença dos genes de virulência *invA* (a), *agfA* (b), e *lpfA* (c) nas cepas de *S. Minnesota* de origem avícola. M (marcador de peso molecular de 100pb); C+ (controle positivo - *S. Enteritidis* ATCC 13076); C- (controle negativo, composto de água ultrapura em substituição ao DNA); 1-4 (cepas de *S. Minnesota* utilizadas no estudo positivas para os três genes). As setas indicam o peso molecular para cada gene em pb.

Fig. 3: Dendrograma comparativo de *S. Minnesota* utilizando coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 0,80%. Perfis A ao G – diferentes grupos clonais, com homologia superior a 80%.

Os Quadros

Quadro 1. Genes de virulência, sequência, tamanho de amplicom (pb) e referência bibliográfica

GENE	PRIMERS	PESO MOLECULAR	REFERÊNCIA
<i>invA</i>	F: 5'GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA3' R: 5'TCATCGCACCGTCAAAGGAACC3'	284 pb	Oliveira et al. (2003)
<i>sefA</i>	F: 5'GATACTGCTGAACGTAGAAGG3' R: 5'GCGTAAATCAGGATCTGCAGTAGC3'	488 pb	Oliveira et al. (2003)
<i>agfA</i>	F: 5'TCCACAATGGGGCGGGCGGCG3' R: 5'CCTGACGCACCATACGCTG3'	350 pb	Collinson et al. (1993)
<i>lpfA</i>	F: 5'CTTTCGCTGCTGAATCTGGT3' R: 5'CAGTGTTAACAGAAACCAGT3'	250 pb	Heuizenroeder et al. (2000)

pb: pares de bases

Quadro 2. Genes de resistência, sequência, peso molecular (pb) e referência bibliográfica

GENE	PRIMERS	PESO MOLECULAR	REFERÊNCIA
<i>bla_{TEM}</i>	F: 5'CAGCGGTAAGATCCTTGAGA3' R: 5'ACTCCCGTCGTGTAGATAA3'	643 pb	Chen et al. (2004)
<i>bla_{SHV}</i>	F: 5' GGCCGCGTAGGCATGATAGA3' R: 5' CCCGGCGATTTGCTGATTTC3'	714 pb	Chen et al. (2004)
<i>bla_{CTX-M}</i>	F: 5' ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC3' R: 5'TGGGTTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG3'	593 pb	Monstein et al., (2007)

Quadro 3. Perfis de resistência de 32 cepas de *S. Minnesota* isoladas em uma cadeia de produção avícola localizada no Estado de São Paulo (Indústria A).

PERFIS	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA*	NÚMERO DE CLASSES ¹	NÚMERO DE CEPAS (%)
A1	SUL TET	2	16 (50,0)
A2	SUL TET (AMO)	3	1 (3,1)
A3	SUL TET GEN	3	2 (6,2)
A4	SUL TET AMO	3	7 (21,9)
A5	SUL TET AMO (CAZ)	3	1 (3,1)
A6	SUL TET TRI (AMO)	4	2 (6,2)
A7	SUL TET AMO CAZ	3	1 (3,1)
A8	Multisensíveis	-	2 (6,2)
TOTAL			32 (100,0)

* Perfis entre parênteses: cepas com resistência intermediária aos antimicrobianos. AMO: amoxicilina; GEN: gentamicina; TRI: trimetoprima; CAZ: ceftazidima; TET: tetraciclina; SUL: sulfonamida.

¹ Número de classes de antimicrobianos aos quais os isolados apresentaram resistência.**Quadro 4.** Perfis de resistência de 39 cepas de *S. Minnesota* isoladas em uma cadeia de produção avícola localizada no Estado de Mato Grosso do Sul (Indústria B).

PERFIS	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA*	NÚMERO DE CLASSES ¹	NÚMERO DE CEPAS (%)
B1	SUL TET	2	10 (25,6)
B2	SUL TET (NEO)	3	10 (25,6)
B3	SUL TET (AMO)	3	1 (2,6)
B4	SUL TET (AMO) (NEO)	4	2 (5,1)
B5	SUL TET TRI	3	2 (5,1)
B6	SUL TET TRI (NEO)	4	3 (7,6)
B7	SUL TET TRI (AMO)	4	1 (2,6)
B8	SUL TET AMO	3	1 (2,6)
B9	SUL TET AMO (NEO)	4	4 (10,3)
B10	SUL TET TRI CLO (AMO) (NEO)	6	1 (2,6)
B11	Multisensíveis	-	4 (10,3)
TOTAL			39 (100,0)

*Perfis entre parênteses: cepas com resistência intermediária aos antimicrobianos. AMO: amoxicilina; NEO: neomicina; TRI: trimetoprima; CLO: cloranfenicol; TET: tetraciclina; SUL: sulfonamida.

¹ Número de classes de antimicrobianos aos quais os isolados apresentaram resistência.

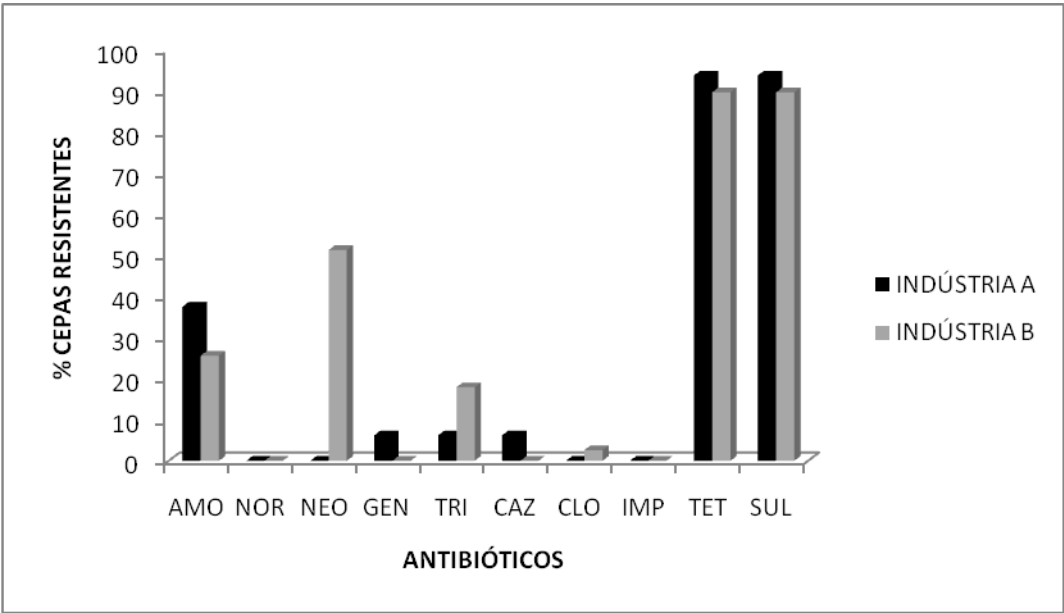


Figura 1

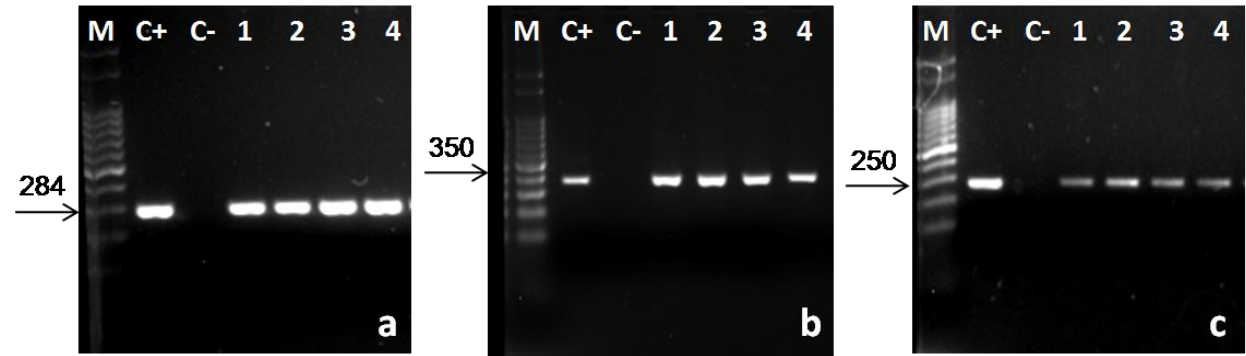


Figura 2

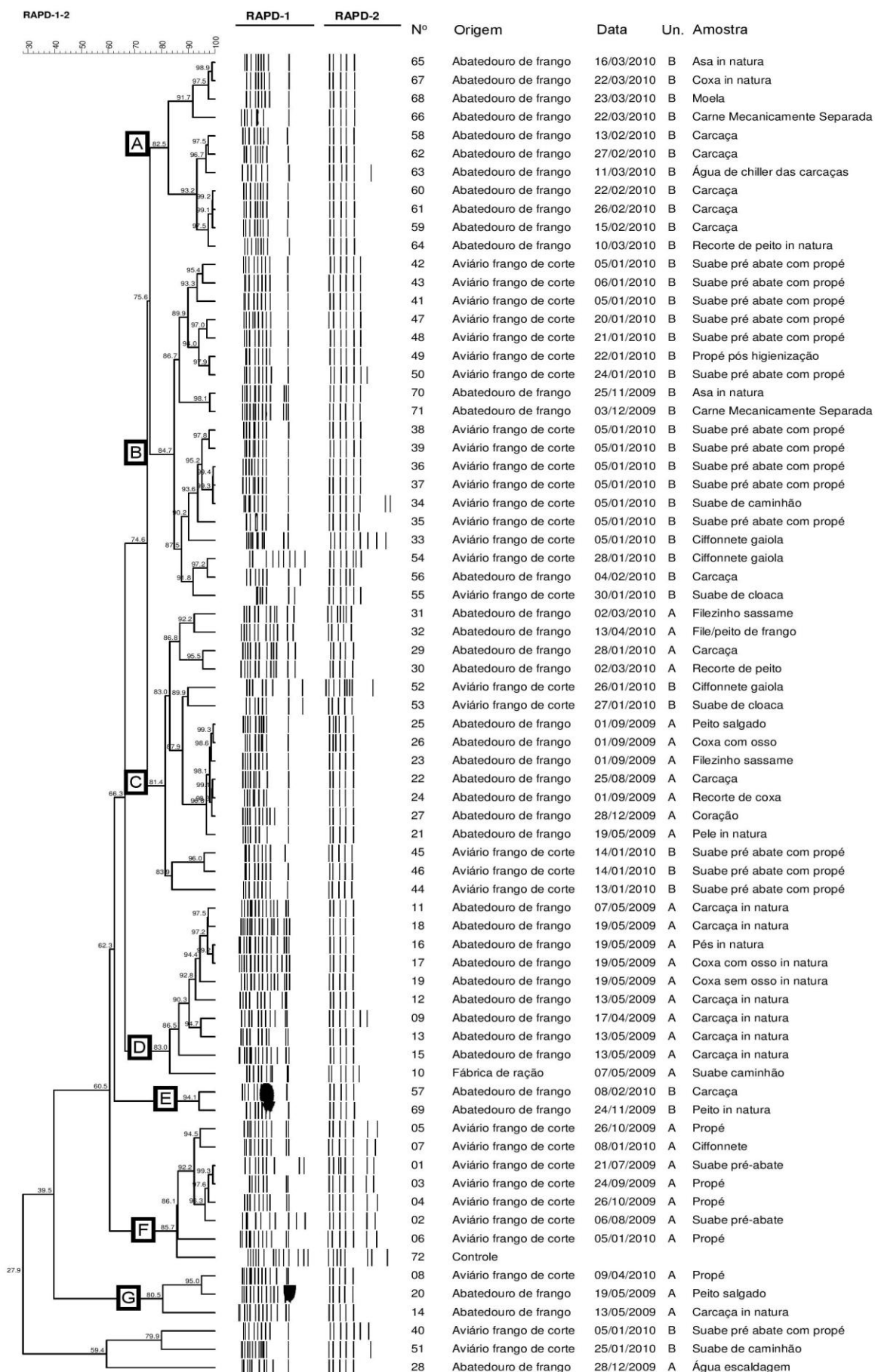


Figura 3

REFERÊNCIAS

- AHMED, D. et al. Emergence of *bla*_{TEM} Type Extended-Spectrum β -Lactamase Producing *Salmonella* spp. in the Urban Area of Bangladesh. **International Scholarly Research Notices - ISRN Microbiology**, v. 2014, Article ID 715310, 3 p. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/715310>>. Acesso em: 2 fev. 2015.
- ALALI, W.Q. et al. Prevalence and distribution of *Salmonella* in organic and conventional broiler poultry farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n.11, p.1363-1371, 2010.
- ANDERSON, P. N. **The use of pcr-based methodologies to characterize *Salmonella* serotypes of poultry origin**. 2008. Dissertation - Texas A&M University. 124 f. 2008.
- ARAQUE, M. Nontyphoid *Salmonella* gastroenteritis in pediatric patients from urban areas in the city of Merida, Venezuela. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n. 1, p. 28–34, 2009.
- ARSENAULT, J. et al. Prevalence and risk factors for *Salmonella* and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 8, p. 1820-1828, 2007.
- BACK, A. Biosseguridade na avicultura brasileira. **Avicultura Industrial**, v. 98, n. 10, p. 22-24, 2006.
- BACK, A.; ISHIZUKA, M. M. **Principais doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal**. In: *Salmonelose aviária*. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, p. 120-189, 2010.
- BETANCOR, L. et al. Genomic and phenotypic variation in epidemic-spanning *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 237, 2009.
- BONNET, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1-14. 2004.
- BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n.4, p. 933-951, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa da SDA nº 78, de 03 de novembro de 2003. Normas técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de *S. Gallinarum* e de *S. Pullorum* e livres ou controlados para *S. Enteritidis* e para *S. Typhimurium*. 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 nov. 2003, seção 1, página 3.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ofício circular conjunto DSA /DIPOA nº 01/2009, de 15 de Janeiro de 2009. **Procedimentos para**

monitoramento de estabelecimentos de frangos de corte e perus para salmoneloses aviárias. 2009a. 4 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 26, de 09 de julho de 2009. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jul. 2009b, seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. **Relatório do Monitoramento da Prevalência e do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos em Enterococos e Salmonelas Isolados de Carcaças de Frango Congeladas Comercializadas no Brasil. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF).** Brasília, jan. 2008. 186p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. (MS/SVS/DEVIT). **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE – DTA.** São Paulo, 2014. Disponível em:
<http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf> Acesso em: 24 março 2015.

BRYAN, F. L.; DOYLE, M. P. Healthy risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 3, p. 326-344, 1995.

BURKE, L. et al. Resistance to third-generation cephalosporins in human non-typhoidal *Salmonella enterica* isolates from England and Wales, 2010–12. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 977–981, 2014.

BUSH, K. New beta-lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 7, p. 1085-1089, 2001.

CANTON, R.; COQUE, T. M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 466–475, 2006.

CARATTOLI, A. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 117-123, 2008. Supplement 1.

CARATTOLI, A. Plasmid-mediated and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 5, n. 4, p. 113-122, 2003.

CARDINALE, E. et al. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* infection in senegalese broiler-chicken flocks. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, n. 3-4, p. 151-161, 2004.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Divulgação técnica - Salmonela na

segurança dos alimentos. **Biológico**, v. 70, n. 1, p. 11-13, 2008.

CARRAMIÑANA, J. J. et al. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Veterinary Microbiology**, v.104, n. 1-2, p.133-139. 2004.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 63, n. 15, p. 328-332, 2014.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL. **National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Surveillance Overview**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveillOverview_508.pdf>. Acesso em: 28 mai 2015.

CODA-CERVA - Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie, Centre d'Etude et des Recherches Vétérinaires et Agrochimiques. ***Salmonella* serotypes analysed at the CODA-CERVA in 2013**. Federal Public Service Health, Food Chain Security and Environment, Brussels, Belgium. 2014.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. (Ed). **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, 2007.

DE CESARE, A. et al. Automated ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular typing of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Italy. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 780–785, 2001.

DE OLIVEIRA, S. D. et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 38, p. 720-728, 2007.

DONADO-GODOY, P. et al. Counts, serovars, and antimicrobial resistance phenotypes of *Salmonella* on raw chicken meat at retail in Colombia. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 2, p. 227-35, 2014.

EFSA - European Food Safety Authority. Scientific Report of EFSA and ECDC: 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. 3991, 2015a, 162 pp.

EFSA - European Food Safety Authority. Scientific Report of EFSA and ECDC - EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. **EFSA Journal**, v. 13, n. 2, p. 4036, 2015b. 178 pp.

EFSA, ECDC. European Food Safety Authority. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources

of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. **EFSA Journal**, v. 12, n. 2, p. 3547, 2014. 312 pp. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3547.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

ELGROUD, R. et al. Characteristics of *Salmonella* Contamination of Broilers and Slaughterhouses in the Region of Constantine (Algeria). **Zoonoses and Public Health**, v. 56, n. 2, p. 84-93, 2009.

CAMPIONI, F.; ZOLDAN, M. M.; FALCÃO, J. P. Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry and farm environments in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 7, p. 1403-1410, 2014.

FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat: Meeting report. **Microbiological Risk Assessment**, Series n. 19, Rome, 2009. 56 pp.

FDA / CFSAN. Food and Drug Administration - Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook**. *Salmonella* species. 2 ed. p. 9-13, 2008.

FINSTAD, S. et al. *Salmonella* and broiler production in the United States: relationship to foodborne salmonellosis. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 789-794, 2012.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M.; NAYAK, R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 430-440, 2009.

FREITAS, J. Evolução de sorovares Modelo de banco de cepas. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE SALMONELOSES AVIÁRIAS, 2011, Rio de Janeiro, RJ. **Anais...** Campinas: UBABEF, 2011.

GAST, R. K. *Salmonella* Infections. In: SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**. Ames, Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 567-614.

GELINSKI, J. M. L. N. et al. Resistance to Extended-Spectrum β -Lactamases in *Salmonella* from a Broiler Supply Chain. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 11, p. 11718-11726, 2014.

GIBSON, D.L. et al. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. **Microbiology Sgm**, v.153, pt 4, p.1131-1140, 2007.

GUPTA, V. An update on newer β -lactamases. **Indian Journal of Medical Research**, v. 126, n. 5, p. 417-27, 2007.

HALL G, et al. Estimating Community Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter*, Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 10, p. 1601-9, 2008.

HARAGA, A.; OHLSON, M. B.; MILLER, S. I. Salmonellae interplay with host cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 53-66, 2008.

HOLT, J. G. et al. Genus *Salmonella*. In: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Baltimore, MD: WILLIAMS & WILKINS, 1994. p. 175-289.

HU, Y.; WANG, Y.; LI, F. Study on simultaneous contamination of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Beijing. **Wei Sheng Yan Jiu, Journal of Hygiene Research**, v. 44, n. 1, p. 68-72, 2015.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microrganisms in Foods 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens**. London: Blackie Academic and Professional, 1996. 514 p.

JACOBSEN, A. et al. The *Salmonella enterica* pan-genome. **Microbial Ecology**, v. 62, n. 3, p. 487-504, 2011.

JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. The new beta-lactamases. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 4, p. 380-391, 2005.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6 ed. Maryland: Aspen, 2005. 679 p.

JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 367-372, mar. 2001.

KNOTHE, H et al. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315-317, 1983.

LAI, J. et al. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. **International Journal of Food Microbiology**, v. 180, p. 30-38, 2014.

LEE, K. et al. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. **Food Control**, v. 47, p. 264-276, 2015.

LIBBY, S. J. et al. *Salmonella*. In: GYLES, C. L. et al. (Ed.) **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 3 ed. USA: Blackwell Publishing, 2004.

LILJEBJELKE, K. A. et al. Vertical and horizontal transmission of *Salmonella* within integrated broiler production system. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, n. 1, p. 90-102, 2005.

LIM, H. et al. (2005) Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 3, p. 411-418, 2005.

- LIMA, E. T.; ANDREATTI-FILHO, R. L.; PINTO, J. P. A. N. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* isolados de produtos avícolas. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.2, p.394-400, 2009.
- LIVERMORE, D. M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.
- LU, Y. et al. Characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella* enterica Serovars Indiana and Enteritidis from Chickens in Eastern China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, e96050, 2014.
- MAJOWICZ, S. E. et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 882-889, 2010.
- MCWHORTER, A. R.; CHOUSALKAR, K. K. Comparative phenotypic and genotypic virulence of *Salmonella* strains isolated from Australian layer farms. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1-14, 2015.
- MEDEIROS, M. A. N. et al. 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.
- MEDEIROS, A. A. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. S19-45, 1997. Supplement 1.
- MIRMOMENI, M.H.; KIANI, S.; SISAKHTNEZHAD, S. Rapid detection of *Salmonella* Dublin by PCR amplification of the *sopE* gene and its cloning. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.11, n.11, p.1497-1501, 2008.
- MO, S. S. et al. Emergence of AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production chain in a country with a low antimicrobial usage profile. **Veterinary Microbiology**, v. 171, n. 3-4, p. 315–320, 2014.
- MUHAMMAD, M. et al. Prevalence of *Salmonella* associated with chick mortality at hatching and their susceptibility to antimicrobial agents. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 1-2, p. 131–135, 2010.
- MUNIZ, E. C. **Salmonelas paratíficas em aves: avaliação da resposta imunológica e controle por meio de probióticos**. 2014. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Patologia veterinária. Curitiba. 98 f. 2014.
- MÜRMANN L.; SANTOS, M.C.; CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, v.20, p.191-195, 2008.
- NATH, G.; MAURYA, P.; GULATI, A. K. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of *Salmonella* Typhi strains isolated over a period of two decades. **Infection Genetics and Evolution**, v. 10, n. 4, p. 530-536, 2010.

NAWAR, E. M.; KHEDR, A. M. Molecular Studies on *Salmonella* species isolated from chicken. **Alexandria Journal Veterinary Science**, v. 43, n. 1, p. 58-64, 2014.

NICHOLSON, F. A.; GROVES, S. J.; CHAMBERS, B. J. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 2, p. 135-143, jan. 2005.

NORRIS, T.L.; BÄUMLER, A.J. Phase variation of the *lpf* operon is a mechanism to evade cross-immunity between *Salmonella* serotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.96, n.23, p. 13393-13398, 1999.

NYACHUBA, D. G. Foodborne illness: is it on the rise? **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 5, p. 257-269, 2010.

OCHOA, I.M.F.; RODRIGUEZ, A.V. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. **Revista Latino Americana de Microbiología**, v.47, n.1-2, p.25-42, 2005.

OKAMOTO, A. S. et al. Relation between SpvC and InvA virulence genes and resistance of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolated from avian material. **International Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 6, p. 579-582, 2009.

PANDINI, J. A. et al. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.XX, n.X, p. 1-6, 2014.

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

PEREIRA, F.; CARNEIRO, J.; AMORIM, A. Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. **Recent Patents on DNA and Gene Sequences**, v. 2, p. 187-200, 2008.

PEREIRA, V. L. A.; SILVA, G. M.; LEMOS, M. Presença de *Salmonella* em frangos de corte aparentemente sadios em unidades de criação industrial na região de São José do Vale do Rio Preto – RJ. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 6, n. 3, p. 156-161, 1999.

PFALLER, M. A.; SEGRETÍ, J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. S153-63, 2006. Supplement 4.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (nº 46) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 7, p. 568–570, sep. 2004.

PORTER, S.B.; CURTISS, R. Effect of inv mutations on *Salmonella* virulence and colonization in 1-day-old White Leghorn chicks. **Avian Diseases**, v.41, n.1, p.45-57, 1997.

POUGET, J. G. et al. Characterization of *bla*_{SHV} Genes on Plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Isolates from Canadian Food Animals (2006-2007). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3864-3866, 2013.

QUINTAES, B. R. et al. Optimization of randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction for molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 2, p. 143–147, 2004.

RAHN, K. et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v.6, n.4, p.271-279, 1992.

REITER, M. G. et al. Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 7, p. 1723-1725, 2007.

REZK, N. A. et al. Typing of *Salmonella* Typhi strains isolated from Egypt by RAPD PCR. **3 Biotech**, v. 2, n. 1, p. 17-25, 2012.

ROSSOLINI, G. M.; D'ANDREA, M. M.; MUGNAIOLI, C. (2008) The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 33-41, 2008. Supplement 1.

ROWLANDS, R.E.G. et al. Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 6, p. 461-567, 2014.

RUZAUSKAS, M.; VIRGAILIS, M.; ŠPAKAUSKAS, V. Serological diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from different sources in Lithuania. **Veterinarski Arhiv**, v.75, n.3, p.211–221, 2005.

SAKARIDIS, I. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars from chicken carcasses in Northern Greece. **Journal of Food Safety**, v.31, n. 2, p. 203-210, 2011.

SALEHI, T. Z.; MAHZOUNIEH, M.; SAEEDZADEH, A. Detection of *invA* gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method. **International Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 8, p. 557-559, 2005.

SALYERS, A.; WHITT, D. **Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach**. 2 ed. Washington, D.C.: ASM Press. 2002. 539 pp.

SANTOS, J. R. et al. A importância do controle da *Salmonella* na cadeia produtiva de frango de corte. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 3, p.167-174, 2013.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p.14-56, 2004.

SMITH, S. I. et al. Molecular typing of *Salmonella* spp. isolated from food handlers and animals in Nigeria. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v. 2, n. 1, p. 73–77, 2011.

SOTO, S. M. et al. Potential of three-way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4830-4836, 1999.

SOTO, S. M. et al. Usefulness of genetic typing methods to trace epidemiologically *Salmonella* serotype Ohio. **Epidemiology and Infection**, v. 125, n. 3, p. 481–489, 2000.

SUEZ, J. et al. Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. **PLoS ONE**, v. 8, e58449, 2013.

SWEARINGEN, M. C. et al. (2012). Virulence of 32 *Salmonella* Strains in Mice. **PLoS ONE**, v. 7, e36043, 2012.

TABO, D. C. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* serotypes isolated from laying hens and broiler chicken farms in N'Djamena, Chad. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 1-2, p. 293-298. 2013.

TEMME, K. et al. Induction and Relaxation Dynamics of the Regulatory Network Controlling the Type III Secretion System Encoded with in *Salmonella* Pathogenicity Island 1. **Journal of Molecular Biology**, n. 377, n. 1, p. 47–61, 2008.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n.5, p. 3-10, 2006. Supplement 1.

TESSMANN, C. et al. Ocorrência e perfil de sensibilidade a antibióticos de *Salmonella* spp. isolada em cortes de carne suína comercializados em feiras-livres de Pelotas (RS). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.26, n.2, p.307-313, 2008.

TURKI Y. et al. Epidemiology and antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates from Tunisia: the new emergent multi-drug resistant serotype. *Food Research International*, v. 45, n. 2, p. 925-930, 2012.

TURKI, Y. et al. Comparison of five molecular subtyping methods for differentiation of *Salmonella* Kentucky isolates in Tunisia. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 87–98, 2014.

UNGEMACH, F. R.; MÜLLER-BAHRDT, D.; ABRAHAM, G. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 33-38, 2006. Supplement 41.

UBABEF - União Brasileira de Avicultura. **Relatório anual 2014**. São Paulo, 2014. 55 p. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>>. Acesso em: 20 abril 2015.

VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS, M. S. Investigation of a food-borne *Salmonella* Oranienburg outbreak in a Mexican prison. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 8, n. 2, p. 143-153, 2014.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v.33, n.4, p.406-414, 2009.

VOSS-RECH, D. et al. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 433-441, 2015.

WHITE, A. P. et al. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Journa of Bacteriology**, v. 185, n. 18, p. 5398-5407, 2003..

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Critically important antimicrobials for human medicine. Categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use. **Report of the 2nd WHO Expert Meeting held in Copenhagen**. Geneva, Switzerland, mai. 2007, 34 p.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Drug-resistance Salmonella**. 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/print.html>>. Acesso em: 11 set. 2010.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 10 Facts on Antimicrobial resistance. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/facts/en/index.html>. Acesso em: 11 mar. 2015.

OIE - WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. List of antimicrobials of veterinary importance. **Report of the 75th general session (Resolution n° XXVIII)**. Paris, France, 2007, 25 p.

ZHANG, N. **A Comparison of *Salmonella enterica* Serovars: Are Prevalence, Virulence and Responses to Environmental Conditions Serovar or Strain Dependent?**. 2013. Thesis - University of Tennessee. 2013.

ZOU, M.; KEELARA, S.; THAKUR, S. Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Isolates from Humans by Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.9, n.3, p.232-238, 2012.

ANEXO

INSTRUÇÕES AOS AUTORES **Pesquisa Veterinária Brasileira**

INSTRUÇÕES AOS AUTORES - PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões

serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso)**;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”**; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica**. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. **Nesse caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho**.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto**. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro**; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.