

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ELIANE PEREIRA MENDONÇA**

**CARACTERÍSTICAS DE VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA E  
DIVERSIDADE GENÉTICA DE SOROVARES DE *Salmonella* COM  
IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA, ISOLADOS DE FRANGOS DE  
CORTE NO BRASIL**

**UBERLÂNDIA  
2016**

ELIANE PEREIRA MENDONÇA

CARACTERÍSTICAS DE VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA E DIVERSIDADE  
GENÉTICA DE SOROVARES DE *Salmonella* COM IMPACTO NA SAÚDE  
PÚBLICA, ISOLADOS DE FRANGOS DE CORTE NO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daise Aparecida Rossi

UBERLÂNDIA

2016

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

---

M539c  
2016

Mendonça, Eliane Pereira, 1985

Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil / Eliane Pereira Mendonça. - 2016.

131 f. : il.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

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

CARACTERÍSTICAS DE VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA E DIVERSIDADE  
GENÉTICA DE SOROVARES DE *Salmonella* COM IMPACTO NA SAÚDE  
PÚBLICA, ISOLADOS DE FRANGOS DE CORTE NO BRASIL

Tese aprovada para a obtenção do título  
de Doutora no Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias, da  
Universidade Federal de Uberlândia,  
pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 04 de maio de 2016.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daise Aparecida Rossi (Orientadora) – FAMEV/UFU

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Belchiolina Beatriz Fonseca – FAMEV/UFU

---

Prof. Deivid William da Fonseca Batistão – FAMED/UFU

---

Profa. Dra. Aline Teodoro de Paula – UNITRI

---

Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior - UNIUBE

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**ELIANE PEREIRA MENDONÇA** - Nascida em Uberlândia, Estado de Minas Gerais, em 28 de junho de 1985, filha de Abadio José Mendonça e Maria Pereira Fernandes Mendonça. Médica Veterinária, graduada em 19 de julho de 2008 pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Durante a graduação foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas do Ensino de Graduação (PIBEG) no período de junho de 2005 a fevereiro de 2007 e, posteriormente, foi bolsista do Programa de Bolsas Institucionais de Iniciação Científica (FAPEMIG) de março de 2007 à fevereiro de 2008. Em 2009 iniciou o mestrado no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Saúde Animal, no qual foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), de março de 2009 a fevereiro de 2011. Em 2012 iniciou o doutorado na mesma instituição, na qual também foi bolsista durante o período de março de 2012 a março de 2016 pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Tem experiência nas seguintes áreas: microbiologia, biologia molecular, *Salmonella*, *Campylobacter*.

"Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão."

"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível."

São Francisco de Assis

Aos meus pais que sempre me apoiaram e  
incentivaram nos meus estudos. Meu pai, Abadio, por  
seus ensinamentos, e a memória de minha mãe, Maria,  
um grande exemplo de força e fé.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Utilizar tão poucas páginas para agradecer a tantas pessoas que fizeram parte da minha trajetória durante estes quatro anos de doutorado não é uma tarefa fácil. Desde já peço desculpas caso eu esqueça de citar algum nome, e deixo aqui minha enorme gratidão e reconhecimento especial a cada um que com um simples gesto colaborou para a conclusão deste trabalho.

Agradeço a Deus, pela vida, e por me agraciar com uma família linda e com tantos bons amigos que tive a oportunidade de fazer durante a minha vida. Por me dar força para superar momentos de dificuldade, e por todas as oportunidades concedidas.

Aos meus pais, Abadio e Maria (sei que de alguma forma ela está comigo, e compartilha dessa realização), pelo amor, carinho e, sobretudo, pela educação que me deram. Por serem meu porto seguro e permitirem que eu escolhesse o meu caminho, vivendo e apoiando as minhas escolhas. Gratidão e amor eterno.

À minha orientadora, Daise, pelas inúmeras funções que dedicou a mim em todos esses anos de convivência. Mais que uma orientadora, foi amiga, conselheira, professora, psicóloga e mãe. Agradeço pela atenção, paciência e pelos infinitos ensinamentos. Você é um grande exemplo pra mim. Muito obrigada por ter me acolhido tão bem, e permitir que eu pudesse fazer parte da família LABIO.

À minha irmã, Elisângela, pela paciência que teve comigo durante as fases de estresse e mau humor, que não foram poucas. Por muitas vezes me escutar, sem ao menos fazer ideia dos assuntos da pesquisa que eu contava. Obrigada pelo companheirismo, carinho e incentivo.

À minha afilhada, Clara, que trouxe mais cor, doçura e encanto para minha vida.

À minha avó Luzia, tão preocupada e atenciosa em tudo. Sempre disposta a me ajudar.

Ao meu namorado, amigo e companheiro, Lúcio, pela paciência, carinho, apoio, pelo exemplo de força e determinação, por me incentivar nas horas de desânimo, e me acalmar nas horas de desespero. Por estar ao meu lado e por entender as minhas ausências e meus atrasos. Afinal, Deus permitiu que você fizesse parte da minha vida num momento meio tumultuado, último ano de doutorado. Mas tenho certeza que tudo aconteceu na hora certa, porque sem você

perto de mim durante essa etapa, tudo seria mais difícil. Obrigada por tornar meus dias mais felizes, meu amor.

À Roberta, amiga que tanto me ajudou nos momentos de sufoco. Pelas muitas vezes que me fez companhia até altas horas da noite, sempre com sua doçura e calma. Sua amizade é muito especial e desejo que se estenda muito além da vida acadêmica. Obrigada por tudo “Branquinha”.

À grande amiga Bia, pelas conversas, conselhos, por me escutar tantas vezes. Sua amizade foi e é muito importante pra mim. Obrigada por estar sempre ao meu lado quando preciso, por me divertir. Você é a minha amiga doidinha preferida.

Ao Gui, por toda ajuda prestada nas inúmeras vezes que precisei, especialmente nos momentos em que tive que ausentar das atividades do LABIO. Não posso esquecer aqui das não raras vezes que me esperou pacientemente nas horas de almoço, esperando eu finalizar alguma etapa das análises. Obrigada por tudo amigo.

Aos meus amigos de graduação, Marília, Pablo e Carol, que também optaram por seguir o caminho da pós-graduação, e compartilharam comigo das dificuldades e das alegrias vividas durante estes quatro anos de doutorado.

Ao Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO-UFU) por disponibilizar o espaço físico e condições para que o projeto pudesse ser executado.

À família LABIO, Francesca, Marcelo, Eduardo, Mariana Ferreira, Mariana Siqueira, Edson, Marcela, Jocasta, Bruna, Silvia, Renata, Clara, Lucas, Phelipe, Luisa, Ricardo, Newton, Hélida, Isis, e tantos outros que passaram pelo laboratório e deixaram um pouco da sua contribuição. Seja desde a ajuda preparando um meio de cultura, lavando material, até as boas risadas que me proporcionaram. E também pelos finais de semana que alguns se disponibilizaram a ajudar com a execução das análises. Obrigada a todos, especialmente por criarem um ambiente tão bom de trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), representado pela Josinete Barros de Freitas e pelo Amaury dos Santos, que gentilmente cederam as cepas de *Salmonella* para serem estudadas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG),  
pela bolsa de estudo concedida e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento de  
toda a pesquisa.

Aos professores que aceitaram compor esta banca de defesa, Bia, Deivid,  
Aline e Álvaro. Obrigada por se disponibilizarem a realizar a leitura, correções e  
avaliação deste trabalho.

Muito obrigada a todos.

## RESUMO

*Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* e *S. Infantis* estão frequentemente associados a casos de infecções humanas no mundo todo, sendo transmitidas pelo consumo de alimentos contaminados, principalmente aqueles de origem animal, com destaque para a carne de frango. A tese foi fracionada em três capítulos, sendo o primeiro referente às considerações gerais dos tópicos abordados nos demais capítulos. O segundo capítulo objetivou avaliar características de virulência, resistência antimicrobiana e a similaridade genética de 51 cepas de *S. Infantis* isoladas em amostras de origem avícola, provenientes de uma empresa localizada no Estado de São Paulo, Brasil, durante o período de 2009 a 2010. O terceiro capítulo teve por objetivo analisar 111 cepas de *S. Enteritidis*, 45 de *Salmonella* *Typhimurium* e 31 de *Salmonella* *Typhimurium* variante monofásica I 4,[5],12:i:-, isoladas de carcaças de frango em diferentes frigoríficos brasileiros de 2009 a 2011, e estimar o risco que representam para a saúde humana, baseado na presença de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos, e além de correlacionar os perfis de patogenicidade (resistência antimicrobiana e presença de genes de virulência e resistência) com o perfil genético (ribogrupo) dos isolados. Para avaliação da sensibilidade antimicrobiana foi realizado o teste de disco difusão para todos os sorovares de *Salmonella* e, apenas para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, foi também verificada a concentração inibitória mínima para os antibióticos ciprofloxacina e ceftazidima. Foi avaliada a presença dos genes de virulência *invA* (invasão), *lpfA* (fímbria-adesão), *agfA* (fímbria-biofilme) e *sefA* (fímbria-adesão) pela técnica de PCR. As cepas que apresentaram resistência aos antibióticos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos foram avaliadas quanto a presença dos genes de resistência *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M* e *blaAmpC*. Para as cepas resistentes aos antibióticos da classe das quinolonas e fluoroquinolonas foram pesquisados os genes *qnrA* e *qnrS*. A relação filogenética entre os isolados foi determinada pelo método de RAPD para cepas de *S. Infantis*, e pela técnica de ribotipagem para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

**Palavras-chave:** RAPD. Ribotipagem. *S. Enteritidis*. *S. Infantis*. *S. Typhimurium*.

## ABSTRACT

*Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* and *S. Infantis* are often associated with cases of human infections worldwide and is transmitted through consumption of contaminated food, particularly those of animal origin, especially chicken meat. This thesis was fractionated into three chapters, the first one relating to general considerations about the topics discussed in the following chapters. The second chapter aimed to evaluate virulence characteristics, antimicrobial resistance and the genetic similarity of 51 strains of *S. Infantis* isolated in samples of poultry origin from an industry located in the state of São Paulo, Brazil, during the 2009 to 2010 period. The third chapter aimed to analyze 111 strains of *S. Enteritidis*, 45 of *Salmonella* Typhimurium and 31 of *Salmonella* Typhimurium monophasic variant I 4, [5], 12:i:- isolated from chicken carcasses in different brazilian slaughterhouses from 2009 to 2011, and to estimate the risk to human health, based on the presence of virulence genes and antimicrobial resistance, correlating to the pathogenicity profiles (antimicrobial resistance and presence of virulence and resistance genes) with the genetic profile (ribogroup) of the isolates. To evaluate the antimicrobial susceptibility was performed the disk diffusion test for all serotypes of *Salmonella*, and exclusively to *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*, was also verified the minimum inhibitory concentration for ciprofloxacin and ceftazidime antibiotics. The presence of virulence genes *invA* (invasion), *lpfA* (fimbriae-adhesion), *agfA* (fimbriae-biofilm) and *sefA* (fimbriae-adhesion) were evaluated by PCR. The strains that showed resistance to antibiotics of  $\beta$ -lactams class were evaluated for the presence of resistance genes *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M* and *blaAmpC*. For resistant strains to quinolones and fluoroquinolones antibiotics classes were searched the *qnrA* and *qnrS* genes. The phylogenetic relationship among the isolates was determined by RAPD method for *S. Infantis* strains, and by ribotyping technique to *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*.

**Keywords:** RAPD. Ribotyping. *S. Enteritidis*. *S. Infantis*. *S. Typhimurium*.

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Esquema abreviado de Kauffmann & White.

26

### CAPÍTULO 2

<b>Quadro 1.</b> Genes de virulência, sequência dos <i>primers</i> e tamanho de amplicom (pb).	83
<b>Quadro 2.</b> Genes de resistência, sequência dos <i>primers</i> e tamanho de amplicom (pb).	83
<b>Quadro 3.</b> Perfis de resistência de 51 cepas de <i>S. Infantis</i> isoladas em uma cadeia de produção avícola localizada no Estado de São Paulo, Brasil.	83
<b>Quadro 4.</b> Relação entre perfis de resistência e ocorrência dos genes de resistência entre 18 cepas de <i>S. Infantis</i> resistentes aos antimicrobianos da classe dos β-lactâmicos, isoladas em uma cadeia de produção avícola localizada no Estado de São Paulo, Brasil.	84

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1.</b> Sequência dos <i>primers</i> e peso molecular (pb) dos genes de virulência e resistência avaliados no estudo.	107
<b>Tabela 2.</b> Resistência aos antimicrobianos de <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> e <i>S. Typhimurium</i> variante monofásica I 4,[5],12:i:- isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 a 2011.	107

<b>Tabela 3.</b> Percentual de resistência entre os sorovares de <i>Salmonella</i> isolados de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.	108
<b>Tabela 4.</b> Perfis de resistência aos antimicrobianos e presença dos genes de resistência aos $\beta$ -lactâmicos em 111 cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.	108
<b>Tabela 5.</b> Perfis de resistência aos antimicrobianos e presença dos genes de resistência aos $\beta$ -lactâmicos em 45 cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.	109
<b>Tabela 6.</b> Perfis de resistência aos antimicrobianos e presença dos genes de resistência aos $\beta$ -lactâmicos em 31 cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium variante monofásica I 4,[5],12:i:- isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.	110
<b>Tabela 7.</b> Genes de virulência e perfil genético de sorovares de <i>Salmonella</i> isolados de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.	110
<b>Tabela 8.</b> Ribogrupos, ano, local, características de virulência e resistência de 111 cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.	111
<b>Tabela 9.</b> Ribogrupos, ano, local, características de virulência e resistência de 45 cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.	113
<b>Tabela 10.</b> Ribogrupos, ano, local, características de virulência e resistência de 31 cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium variante monofásica I 4,[5],12:i:- isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.	114

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.** Mecanismo de ação de algumas classes de antimicrobianos.

39

### CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Frequência (%) de resistência antimicrobiana em *Salmonella* Infantis 85

isoladas em uma cadeia de produção avícola localizada no Estado de São Paulo, Brasil. AMO: amoxacilina (10 $\mu$ g); SUL: sulfonamida (300 $\mu$ g); TET: tetraciclina (30 $\mu$ g); CAZ: ceftazidima (30 $\mu$ g); NOR: norfloxacino (10 $\mu$ g); NEO: neomicina (30 $\mu$ g); GEN: gentamicina (10 $\mu$ g); TRI: trimetoprima (5 $\mu$ g); CLO: cloranfenicol (30 $\mu$ g); IMP: imipenem (10 $\mu$ g).

**Figura 2.** Dendrograma comparativo de *S. Infantis* utilizando coeficiente de 86

similaridade de Dice com tolerância de 1% e método UPGMA com otimização de 0,80%. Perfis A ao E – diferentes *clusters*, com homologia superior a 80%. Perfis B<sub>1</sub> ao B<sub>6</sub> – grupos clonais, com homologia superior a 99%.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA: Associação Brasileira de Proteína Animal

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: *American Type Culture Collection*

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*

CMS: Carne Mecanicamente Separada

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos

EFSA: *European Food Safety Authority*

ERIC: *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*

ESBL:  $\beta$ -Lactamase de Espectro Ampliado

EUA: Estados Unidos da América

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FIOCRUZ: Fundação Instituto Oswaldo Cruz

H<sub>2</sub>S: Sulfeto de Hidrogênio

ICMSF: *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*

IP: Ilhas de Patogenicidade

IPS: Ilhas de Patogenicidade em *Salmonella*

Kb: Kilobase

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MBL: metalo- $\beta$ -lactamases

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de Magnésio

mm: Milímetro

mM: Milimolar

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

OIE: *World Organisation for Animal Health*

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

pH: Potencial Hidrogeniônico

PLP: Proteínas Ligadoras de Penicilinas

pmol: Picomol

PREBAF: Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência  
Bacteriana em Frango

PRP: Programa de Redução de Patógenos

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

RNA: Ácido Ribonucléico

RNAr: RNA ribossomal

U: Unidade

UE: União Européia

UPGMA: *Unweighted Pair Group Method With Arighmetic Mean*

UV: Radiação Ultravioleta

WHO: *World Health Organization*

µg: Micrograma

µl: Microlitro

µm: Micrômetro

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	18
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 Caracterização do gênero <i>Salmonella</i>	23
3.2 Nomenclatura do gênero <i>Salmonella</i>	24
3.3 Características epidemiológicas gerais de <i>Salmonella</i> sp.	26
3.4 <i>Salmonella</i> na cadeia produtiva brasileira do frango de corte	28
3.5 S. Enteritidis, S. Typhimurium e S. Infantis no frango de corte e riscos para a saúde pública	33
3.6 <i>Salmonella</i> e resistência aos antimicrobianos	36
3.6.1 Resistência às quinolonas e fluoroquinolonas	39
3.6.2 Resistência aos β-lactâmicos	41
3.6.3 Resistência aos aminoglicosídeos	45
3.6.4 Resistência às tetraciclínas	46
3.6.5 Resistência aos fenicóis	47
3.6.6 Resistência às sulfonamidas e à diamino-pirimidina	48
3.6.7 Resistência às polimixinas	49
3.6.8 Resistência à fosfomicina	50
3.6.9 Perfilis de multirresistência em <i>Salmonella</i>	50
3.6.10 Avaliação da susceptibilidade antimicrobiana em <i>Salmonella</i>	52
3.7 Características de virulência em <i>Salmonella</i>	53
3.8 Métodos de tipagem molecular de <i>Salmonella</i>	56
3.8.1 <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> (RAPD)	57
3.8.2 Ribotipagem automatizada	59
CAPÍTULO 2 – <i>Salmonella</i> Infantis isolada na cadeia produtiva brasileira do frango de corte representa perigo para a saúde humana	63
CAPÍTULO 3 - Diversidade, virulência e resistência antimicrobiana de <i>Salmonella</i> Enteritidis e S. Typhimurium isoladas de carcaças de frango no	87

Brasil	
CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
REFERÊNCIAS	117

## **CAPÍTULO 1**

### **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## 1 INTRODUÇÃO

Salmonelose é uma das doenças de origem alimentar mais comuns, considerada uma zoonose complexa que afeta a saúde pública mundial. *Salmonella* é reconhecida como causa primária dos surtos em que há identificação do agente etiológico, tanto no Brasil (BRASIL, 2014), como também na União Européia (UE) (EFSA, 2014a). Nos Estados Unidos (EUA), este patógeno também é citado como o agente mais frequentemente isolado de doenças transmitidas por alimentos (DTA), representando 40% dos casos registrados no ano de 2012, seguido por *Campylobacter*, com 35% (CDC, 2014c).

Os gastos gerados em decorrência da doença são muito elevados e, por isso, a prioridade dos órgãos de saúde é sempre na prevenção, evitando assim maiores despesas com o tratamento (LEE et al., 2015). A autoridade europeia em segurança alimentar (EFSA) estima que o prejuízo econômico gerado pela ocorrência de salmonelose humana ultrapassa três bilhões de euros por ano (EFSA, 2014a).

O trato intestinal de uma ampla variedade de animais é reservatório de *Salmonella*, a qual ainda pode sobreviver em ambientes diversos, o que explica seu alto potencial de disseminação. O frango de corte se destaca como reservatório desta bactéria, sendo alta a frequência de contaminação do produto final no matadouro (EFSA, 2014b; EFSA, 2015). Assim, a carne de frango e seus derivados estão entre os produtos de origem animal mais incriminados na transmissão de *Salmonella* ao homem e, por isso, são considerados fatores de risco para infecção humana (FAO / WHO, 2009; EFSA, 2015).

Dentre os inúmeros sorovares de *Salmonella*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Infantis* são os mais comumente identificados pelo envolvimento em casos de doenças alimentares no homem, e também os mais frequentemente isolados tanto na ave viva quanto na carne de frango (CDC, 2014c; EFSA, 2015). Sendo assim, um melhor entendimento das características de virulência, resistência às drogas e da variabilidade genética de cepas pertencentes a estes sorovares, e circulantes no país, subsidia o entendimento do risco que representam quando infectam humanos, do perfil de disseminação e, além disso, pode auxiliar autoridades na implementação de programas de monitoramento e controle.

Os mecanismos pelos quais *Salmonella* spp. interage com o seu hospedeiro para causar doenças são complexos e dependem de vários fatores que ainda

não foram completamente elucidados. Genes associados à virulência, resistência a antimicrobianos e adaptação ao meio em que vivem são considerados fatores de virulência em todas as bactérias. O resultado das infecções por *Salmonella* spp. é determinado pelo *status* do hospedeiro e o *status* da bactéria. Assim, enquanto idade e genética podem determinar a susceptibilidade do hospedeiro, o *status* das bactérias é determinado pelos fatores de virulência. Dentre estes fatores podem ser citados em *Salmonella*, a presença de fímbrias, flagelos, mobilidade, habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais, resistência ou multiresistência a antimicrobianos, entre outros (VIEIRA, 2009).

A utilização a longo prazo de antibióticos na criação de animais exerce pressão de seleção sobre as bactérias, favorecendo assim a sobrevivência de cepas de *Salmonella* resistentes, as quais podem ser transferidas para o homem pelo consumo de alimentos contaminados, podendo levar ao fracasso da antibioticoterapia (LAI et al., 2014). A dinâmica da transmissão da resistência e a evolução de populações de bactérias resistentes são difíceis de elucidar e estão associadas à transferência genética dos chamados genes de resistência (ALEKSHUN; LEVY, 2007). Várias autoridades internacionais em saúde consideram a ocorrência de resistência antimicrobiana em micro-organismos zoonóticos como um dos principais problemas emergentes de importância para a saúde pública (MOORE et al., 2006).

A avaliação da disseminação de patógenos ao longo da cadeia produtiva de alimentos é de grande importância para que as indústrias possam atuar na prevenção e na implantação de programas mais eficazes de controle. A utilização de métodos moleculares de subtipagem para a caracterização e agrupamento de micro-organismos baseados em suas características genotípicas tem se tornado comum em laboratórios de saúde pública. A ribotipagem tem como princípio avaliar o polimorfismo do DNA bacteriano na região onde se localiza o operon *rrn*, composto pelos genes 16S e 23S, que codificam o RNAr bacteriano. Estes genes aparecem em várias cópias diferentes, em sítios diversos no genoma, com diferentes regiões de flanqueamento; havendo uma grande variabilidade entre os genes do RNAr 16S e 23S, além da variabilidade das regiões entre os genes 16S e 23S. A ribotipagem permite que os perfis de bandas resultantes possam ser comparados para determinar sua relação filogenética e evolucionária (MARTINEZ; TADDEI, 2008).

Outro método de tipagem molecular muito utilizado para *Salmonella* é a técnica do DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), que garante alto poder discriminatório e é amplamente utilizado em estudos epidemiológicos em vários países (TURKI et al., 2014; VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS et al., 2014).

Diante do exposto, observa-se a necessidade de um melhor conhecimento das características de resistência e dos fatores de virulência em *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Infantis* isoladas de produtos de origem avícola. O agrupamento destes isolados em perfis de patogenicidade permite verificar se estão associados a determinados perfis genéticos, sejam aqueles obtidos por RAPD ou ribotipagem, fornecendo dados importantes que permitem associar determinada cepa ao tipo de alimento em que foi isolado, região do país e período de isolamento. Estas informações são importantes para o entendimento da epidemiologia do patógeno e para o estabelecimento de parâmetros para avaliar os riscos que representam para a saúde pública. Além disto, podem subsidiar os órgãos institucionais competentes sobre as políticas de qualidade necessárias para o gerenciamento destes riscos e, consequentemente, no controle do patógeno no país. Estes fatores podem ser monitorados, e assim, contribuir na garantia da segurança do alimento produzido, podendo inclusive, ser utilizado no futuro, como marcador das estirpes circulantes no país, o que ajuda a entender problemas relacionados à sua origem ou às variações na sua patogenicidade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O estudo teve como objetivo geral estimar o perigo que *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Infantis*, isoladas em amostras de origem avícola no Brasil, representam para a saúde humana, baseado na presença de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos. E também avaliar o perfil das cepas circulantes no país, baseado na análise da similaridade genética entre os isolados.

### 2.2 Objetivos específicos

- Analisar a resistência antimicrobiana em cepas de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Infantis*, e verificar os perfis de resistência mais frequentes.
- Determinar nos isolados de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* a concentração inibitória mínima (CIM) para as drogas ciprofloxacina e ceftazidima, as quais são muito utilizadas no tratamento humano e animal.
- Avaliar nos isolados resistentes aos β-lactâmicos, a presença dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>AmpC</sub>.
- Avaliar nos isolados de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* resistentes às quinolonas e fluoroquinolonas, a presença dos genes *qnrA* e *qnrS*.
- Verificar a presença dos genes de virulência *invA*, *sefA*, *agfA* e *lpfA* utilizando a técnica de PCR.
- Criar perfis de patogenicidade associando os dados encontrados para resistência aos antimicrobianos e presença dos genes de virulência e resistência.
- Correlacionar os perfis de patogenicidade com o perfil genético dos isolados.
- Verificar se há diferença na distribuição dos perfis de patogenicidade entre os isolados, durante aos anos de 2009 a 2011, e entre os locais onde foram coletadas as amostras.
- Avaliar a similaridade genética entre as cepas de *S. Infantis* utilizando a técnica de RAPD.
- Avaliar a similaridade genética de estirpes de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* utilizando-se da técnica de ribotipagem.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Caracterização do gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* foi nomeado em homenagem ao cientista americano Daniel Salmon, microbiologista veterinário do Departamento de Agricultura dos EUA, e tem sido reconhecido como agente da doença há mais de 125 anos (GAST, 2003; CDC, 2015d).

*Salmonella* é um gênero pertencente à família Enterobacteriaceae, definido como bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. As bactérias deste gênero possuem a forma de bacilos curtos, com largura de 0,7 a 1,5 µm e comprimento de 2,0 a 5,0 µm. A temperatura de crescimento varia de 5 a 45°C, com temperatura ótima de 37°C. O pH varia entre 4 e 9, com pH ideal de 7. A atividade de água mínima para crescimento é de 0,94 (D'AOUST; MAURER, 2007; ICMSF, 1996).

São catalase positiva, normalmente, reduzem nitrato a nitrito e são vermelho de metila positiva. A maioria dos sorotipos fermenta a glicose com produção de ácido e gás, não fermentam a lactose e a sacarose, produzem H<sub>2</sub>S, não produzem urease e indol, descarboxilam lisina e ornitina, fermentam o dulcitol e utilizam o citrato (D'AOUST; MAURER, 2007; SILVA et al., 2007).

A bactéria é sensível a elevadas temperaturas e é, geralmente, destruída por aquecimento a 60°C, por 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).

Estas bactérias possuem em sua estrutura lipopolissacarídeos, flagelos, fímbrias, e algumas proteínas da membrana externa que atuam na adesão e/ou invasão do epitélio do trato intestinal (BERNDT et al., 2007). A maioria exibe numerosas fímbrias para aumentar a capacidade de fixação a vários substratos (WILSON et al., 2000).

São na maioria móveis pela presença de flagelos peritríquios (HOLT et al., 1994), com exceção dos sorotipos Pullorum e Gallinarum, que são isentos de flagelos e, portanto, imóveis (GERMANO; GERMANO, 2008). São micro-organismos

intracelulares facultativos, podem sobreviver no interior de fagóцитos e multiplicar intracelularmente (HANSEN-WESTER; HENSEL, 2001).

### **3.2 Nomenclatura do gênero *Salmonella***

A uniformidade da nomenclatura do gênero *Salmonella* é de grande importância e necessária para melhorar a comunicação entre cientistas, autoridades de saúde e ao público. No entanto, a sua classificação é complexa, e por vários anos foram utilizados diferentes sistemas para referênciação desse gênero, sendo que apenas em 1970 se alcançou considerável progresso na uniformização da nomenclatura (GERMANO; GERMANO, 2008).

A classificação de *Salmonella* em espécies é pouco usada nos estudos epidemiológicos, sendo mais conhecida e utilizada a nomenclatura relacionada com a sorotipagem. O esquema utilizado na divisão em sorotipos é o de Kauffmann-White, baseado nas diferenças encontradas em certas estruturas antigênicas superficiais das células. Essas estruturas são o envelope celular ou cápsula (antígeno capsular "Vi"), a parede celular (antígenos somáticos "O") e os flagelos (antígenos flagelares "H") (BRENNER et al., 2000; POPOFF; LE MINOR, 2005). Os antígenos O são distinguidos pela sua composição química diferente e os antígenos H distinguem-se pela composição protéica dos flagelos. Cada antígeno O e H tem um código numérico único, assim, os sorotipos são determinados baseado na combinação distinta destes antígenos (CDC, 2015d).

O esquema de Kauffmann-White identifica os sorotipos de *Salmonella* por meio de uma fórmula composta de números e letras, que definem o(s) antígeno(s) "O", "Vi" e "H" presentes. Os antígenos O são designados por números arábicos e caracterizam os sorogrupos de *Salmonella*. Existe apenas um tipo sorológico de antígeno Vi, o qual é encontrado em três sorotipos de *Salmonella* (S. Typhi, S. Paratyphi e S. Dublin). Os antígenos flagelares de natureza proteica podem ocorrer em duas fases, denominadas 1 e 2. Isto significa que *Salmonella*, portadora de determinado antígeno flagelar, ao proliferar, pode dar origem a um clone que expressa outro antígeno flagelar. Por esta razão, em uma cultura de *Salmonella* que tenha proliferado por tempo suficiente, parte das células apresenta-se com flagelos de fase 1 e parte com flagelos de fase 2, quer a cultura tenha se iniciado na fase 1 ou fase 2. Os antígenos flagelares são designados pelas letras minúsculas do

alfabeto (fase 1) e por números arábicos (fase 2). Algumas salmonelas não possuem flagelo (imóveis), outras possuem flagelos de uma só fase (monofásica). A maioria das salmonelas possui flagelos de fase 1 e fase 2 (bifásicas). Como o número de抗ígenos flagelares é superior ao número de letras do alfabeto, a letra z é utilizada com subscritos numéricos ( $z_1, z_2, z_3$  etc) (FERREIRA; CAMPOS, 2008). A sequência é a seguinte: primeiro, os抗ígenos somáticos; segundo, o抗ígeno Vi, se presente e, entre colchetes se a presença não for constante naquele sorotipo; terceiro, os抗ígenos flagelares da fase um e, quarto, os抗ígenos flagelares da fase dois, se presentes. Assim, por exemplo, quando é descrito o sorotipo **9,12,[Vi]:d:-** significa que o fator somático maior é **O:9**, menor **O:12**, **Vi** pode estar presente ou não (entre colchetes), o抗ígeno flagelar da fase um é **d**, e não apresenta抗ígeno flagelar da fase dois (monofásico) (POPOFF; LE MINOR, 2005; SILVA et al., 2007).

Mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella* já foram descritos, no entanto, menos de 100 sorotipos estão envolvidos em casos de infecções humanas (CDC, 2015d). O gênero *Salmonella* é constituído por duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, sendo a primeira dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizona*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Cada subespécie (ou espécie, no caso de *S. bongori*) ainda é subdividida em função de seu perfil antigênico. A espécie *S. bongori* agrupa 22 sorotipos e as subespécies de *S. enterica* agrupam mais de 2400 sorotipos (POPOFF; LE MINOR, 2005).

As cepas mais frequentemente envolvidas nas doenças humanas são as de *S. enterica* subsp. *enterica*, que tem por habitat os animais de sangue quente e respondem por 99% das salmoneloses humanas. *S. enterica* subsp. *salamae*, subsp. *arizona* e subsp. *diarizonae* são frequentemente isoladas do conteúdo intestinal de animais de sangue frio e raramente de humanos ou animais de sangue quente. *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. bongori* são predominantemente isoladas do ambiente e raramente são patogênicas para humanos (POPOFF; LE MINOR, 2005).

Os sorotipos pertencentes à subespécie *S. enterica* subsp. *enterica* são designados por um nome, geralmente relacionado ao local geográfico onde ele foi isolado pela primeira vez. Este nome não deve ser grafado em itálico e a primeira letra deve ser maiúscula. Na prática, o nome da subespécie não precisa ser indicado, uma vez que somente os sorotipos da subespécie *enterica* têm nome. Assim, as designações: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo *Typhimurium* ou *Salmonella* *Typhimurium* podem ser usadas. Sorotipos de outras

subespécies de *Salmonella enterica* e aqueles de *Salmonella bongori* são designados somente por suas fórmulas antigênicas (POPOFF; LE MINOR, 2005). Na tabela 1 há um esquema abreviado de Kauffmann & White, contendo os sorotipos de maior significado clínico.

**Tabela 1.** Esquema abreviado de Kauffmann & White.

SOROVAR	GRUPO	FÓRMULA ANTIGÊNICA		
		ANTÍGENO O	ANTÍGENO H FASE 1	ANTÍGENO H FASE 2
<i>S. Paratyphi A</i>	<i>O:2 (A)</i>	1,2,12	a	[1,5]*
<i>S. Paratyphi B</i>	<i>O:4 (B)</i>	1,4,[5],12	b	1,2
<i>S. Typhimurium</i>		1,4,[5],12	i	1,2
<i>S. Agona</i>		1,4,12	f,g,s	[1,2]
<i>S. Derby</i>		1,4,[5],12	f,g	[1,2]
<i>S. Saintpaul</i>		1,4,[5],12	e,h	1,2
<i>S. Choleraesuis</i>	<i>O:7 (C<sub>1</sub>)</i>	6,7	c	1,5
<i>S. Oranienburg</i>		6,7,14	m,t	[z <sub>57</sub> ]
<i>S. Infantis</i>		6,7,14	r	1,5
<i>S. Newport</i>	<i>O:8 (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)</i>	6,8,20	e,h	1,2
<i>S. Typhi</i>	<i>O:9 (D<sub>1</sub>)</i>	9,12,[VI]	d	-
<i>S. Enteritidis</i>		1,9,12	g,m	-
<i>S. Anatum</i>	<i>O:3,10 (E<sub>1</sub>)</i>	3,10,[15],15,34	e,h	1,6

\* [ ] = pode ou não ocorrer

Fonte: FERREIRA e CAMPOS (2008).

Mesmo com toda essa padronização da nomenclatura do gênero, observa-se que há muitos equívocos na identificação dos sorotipos. Por exemplo, devido à variabilidade na nomenclatura usada para relatar *Salmonella* sorotipo I 4,[5],12:i:-, ele foi por muito tempo erroneamente nomeado apenas como "Grupo B" ou "Subspécie I" e alguns isolados sendo relatados incorretamente como sorotipo *Typhimurium* (CDC, 2011).

A fim de padronizar a nomenclatura, neste estudo, o sorotipo I 4,[5],12:i:- será denominado de *S. Typhimurium* variante monofásica I 4,[5],12:i:-, conforme a nomenclatura adotada pela EFSA (2015).

### 3.3 Características epidemiológicas gerais de *Salmonella* sp.

Salmonelas são bastante difundidas geograficamente em todo o mundo. A constituição genética desta bactéria permite sua adaptação a uma variedade de ambientes e animais, incluindo hospedeiros mamíferos e não-mamíferos

(SÁNCHEZ-VARGAS; ABU-EL-HAIJA; GÓMEZ-DUARTE, 2011), sendo o seu principal habitat o trato intestinal de humanos e animais. Pode-se citar como as principais fontes de *Salmonella* no ambiente, a água, o solo, as fezes de animais, os insetos e ratos, e as superfícies de equipamentos e utensílios de fábricas e cozinhas. Esta variedade de reservatórios e fontes de transmissão contribuem para a alta prevalência da infecção humana (SCALLAN et al., 2011).

A maioria dos sorovares não possui um hospedeiro específico, podendo acometer várias espécies distintas e, tipicamente, provocam gastroenterites sem complicações e sem a necessidade de tratamento. No entanto, alguns poucos sorotipos apresentam preferência por um hospedeiro, as chamadas cepas espécie-espécificas, ou seja, bactérias que causam doença preferencialmente em uma espécie. Essa especificidade de alguns sorovares por determinados hospedeiros ocorre devido às contínuas mutações e seleções naturais, fazendo com que algumas cepas adquiram traços particulares de infecção em um hospedeiro específico. De acordo com Helm et al. (2004), a medida que essa evolução em direção a especificidade do hospedeiro acontece, mais rearranjos genômicos são observados. Assim, pode-se citar como sorovares espécie-espécificos, *S. Typhi* e *S. Paratyphi A* que acometem os humanos, *S. Abortusovis* os ovinos, *S. Abortusequi* os equinos, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* as aves, *S. Dublin* os bovinos e *S. Choleraesuis* os suínos. Quando estes sorotipos específicos causam doença em humanos, o processo é geralmente invasivo e muitas vezes pode ser fatal (KUMAR et al., 2009; SILVA et al., 2007; WHO, 2015).

*Salmonella* é uma bactéria predominante em animais de produção, podendo ser comumente encontrada no intestino de aves, suínos, bovinos, mas é também isolada em animais domésticos, incluindo cães, gatos, aves e répteis. Por ser normalmente encontrada no ambiente de produção animal é, consequentemente, muito isolada em alimentos de origem animal e, por isso, relacionada a grandes problemas de saúde pública, pelo seu envolvimento com doenças de origem alimentar no mundo todo. Portanto, trata-se de uma doença zoonótica que pode ser transmitida diretamente ou indiretamente entre os animais e os seres humanos. Dentre os alimentos mais incriminados em casos de salmonelose podem-se citar os ovos, as carnes de aves e bovina e o leite (EFSA, 2014a; WHO, 2015).

A maioria das pessoas infectadas por *Salmonella* desenvolvem diarréia, febre, náuseas, às vezes acompanhada de vômitos, e cólicas abdominais. O início dos

sintomas da doença ocorre entre 6 e 72 horas, com média entre 12 e 36 horas após a infecção, podendo durar de 2 a 7 dias. Os sintomas da salmonelose são relativamente leves e grande parte das pessoas acometidas normalmente se recuperam da doença sem necessidade de tratamento específico. No entanto, em alguns casos, a diarréia pode ser tão grave, levando a desidratação, que o paciente deve ser hospitalizado. Nesses casos, a infecção pode se espalhar dos intestinos para a corrente sanguínea, e posteriormente para outros órgãos do corpo, podendo levar a morte, a menos que a pessoa seja tratada rapidamente com uso de antibióticos. Um pequeno número de pessoas infectadas com *Salmonella* desenvolvem dor nas articulações, conhecida como artrite reativa, que pode durar meses ou anos e pode levar à artrite crônica, a qual é de difícil tratamento (CDC, 2014b; CDC, 2015d; EFSA, 2014a).

A duração da doença é variável, podendo prolongar-se dependendo do hospedeiro, da dose ingerida e da cepa de *Salmonella* envolvida. Alguns grupos de pessoas, tais como idosos, crianças com menos de cinco anos e pessoas com comprometimento do sistema imunológico, são mais propensos a desenvolver uma doença grave, podendo resultar em problemas de saúde a longo prazo ou morte (BRADEN, 2012; SILVA et al., 2007).

Para a prevenção da doença são necessárias medidas de controle em todas as etapas da produção de alimentos, desde a produção agrícola ou ambiente de criação de animais de produção, processamento do alimento na indústria, preparação nos estabelecimentos comerciais e também nas residências e cozinhas industriais. O manuseio seguro da carne crua, bom cozimento e boa higiene na cozinha podem prevenir ou reduzir o risco representado pelos alimentos contaminados (EFSA, 2014a; WHO, 2015).

### **3.4 *Salmonella* na cadeia produtiva brasileira do frango de corte**

O Brasil ocupa atualmente a posição de terceiro maior produtor de carne de frango no mundo, sendo que aproximadamente 32% de toda a produção são destinadas ao mercado externo. Desde o ano de 2008, o país conquistou a colocação de maior exportador do produto, sustentando esta posição de destaque até os dias atuais, seguido dos EUA e UE. Os principais países importadores da

carne de frango brasileira são Japão, Arábia Saudita, Iraque, México e UE (ABPA, 2015).

O intenso crescimento do setor avícola brasileiro se deve aos inúmeros avanços tecnológicos adotados pelas indústrias. Contudo, ao mesmo tempo em que a avicultura expandiu no mundo inteiro, aumentou, exponencialmente, a quantidade de aves alojadas, o que favoreceu a instalação, multiplicação e disseminação de agentes patogênicos. Assim, aliado a esta intensa modernização, também se fez necessário adotar inúmeros cuidados para obtenção de um produto de alta qualidade, tornando-se cada vez mais importante a prevenção e o controle de patógenos dentro da cadeia produtiva, visando evitar as enfermidades avícolas e a ave como fonte de infecção para os seres humanos e, principalmente, atender os requisitos dos países importadores.

Sabe-se que *Salmonella* é facilmente disseminada no ambiente de criação animal, sendo importante para o controle da salmonelose, identificar e eliminar os fatores que favoreçam a multiplicação deste micro-organismo. Dentro da cadeia de produção e processamento do frango de corte, desde a criação até a mesa do consumidor, a transmissão de *Salmonella* pode ocorrer de diferentes formas e, portanto, sua epidemiologia é bastante complexa, sendo difícil determinar a forma com que o lote de aves foi infectado ou como ocorreu a disseminação do patógeno no aviário.

A complexa epidemiologia da *Salmonella* na cadeia de produção de aves envolve a transmissão vertical, desencadeando a eclosão de pintinhos infectados, os quais poderão ou não desenvolver a doença (STERZO; VARZONE; FERRARI, 2008). A patogenicidade da bactéria no frango irá depender do sorotipo e da cepa envolvida, além da susceptibilidade e da idade da ave (DERACHE et al., 2009).

A bactéria pode ser transmitida verticalmente por via transovariana, onde a penetração do patógeno no ovo ocorre ainda durante a formação deste no oviduto (MICHAELIDIS; THEODORIDIS; AVDI, 2011; OLORUNSOLA et al., 2012). Outra via proposta é a penetração da bactéria através da casca, quando o ovo formado se contamina com as fezes das aves ao passar pela cloaca (GANTOIS et al., 2009; HOWARD et al., 2012). Como no ovo contaminado geralmente não ocorre morte embrionária, há eclosão do pintinho, que se constitui em uma importante fonte de infecção e contaminação no aviário (EXCLUSÃO..., 2005).

Após a postura, os ovos incubáveis podem se tornar contaminados por *Salmonella* de diferentes maneiras, seja ainda nos ninhos, nos galpões de matrizes, nos caminhões e no próprio incubatório, caracterizando a transmissão horizontal do micro-organismo. Nas incubadoras e nascedouros, as condições de temperatura e umidade podem promover a proliferação da bactéria (COX; BERRANG; CASON, 2000).

A transmissão horizontal de *Salmonella* na ave ocorre geralmente por via oral-fecal, sendo que o consumo de água e ração contaminadas com fezes constitui-se nos principais veículos de infecção da ave (BONI; CARRIJO; FASCINA, 2011).

As rações contaminadas e suas matérias-primas, principalmente as de origem animal, frequentemente apresentam altas taxas de contaminação por *Salmonella* e por isso são consideradas as principais fontes de introdução do patógeno nos plantéis (ÖZBEY et al., 2008).

A alta frequência de roedores constitui-se num fator de risco significativo para o aumento da ocorrência de *Salmonella* em granjas. Isto se deve ao fácil acesso que os roedores têm ao local de armazenamento das rações, podendo contaminar pelas fezes o alimento fornecido para os animais de criação, que se infectam ao consumir a ração contaminada (TU et al., 2015).

A alta prevalência de *Salmonella* em amostras ambientais provenientes do aviário, como poeira, cama e fezes, foi observado por Suresh et al. (2011) e Marin et al. (2011).

Os insetos atuam na disseminação de agentes patogênicos, pois albergam diversas bactérias e estão em contato direto com as fezes das aves. Podem ser citados como principais vetores mecânicos de *Salmonella* no aviário, as moscas (HOLT et al., 2007) e o cascudinho (*Alphitobius diaperinus*), presente na cama do aviário (CHERNAKI-LEFFER et al., 2002).

De acordo com Moro et al. (2009), os ácaros também podem atuar como vetores de *Salmonella* para as aves, pois esses parasitos (*Dermanyssus gallinae*) podem adquirir o patógeno ao picar a ave, e uma vez infectados, podem ser ingeridos por outras aves, infectando-as.

As aves selvagens e migratórias servem como reservatórios ou vetores mecânicos de diversos agentes infecciosos (HERNANDEZ et al., 2003; TSIODRAS et al., 2008), representando um risco para a indústria avícola, um vez que estas aves

vivem, se alimentam e defecam próximo as instalações avícolas (SOUSA; WERTHER; BERCHIERI JÚNIOR, 2010).

Outra importante fonte de infecção do frango ocorre durante a reposição das aves, pela introdução de pintainhos infectados (PERDONCINI et al., 2011).

Um estudo desenvolvido por Namata et al. (2009) demonstrou que um dos principais fatores envolvidos na persistência de *Salmonella* em granjas avícolas estava relacionado à interação das pessoas que lidavam diretamente com o manejo das aves, devido o contato que tinham com outras aves, tanto domésticas como silvestres.

Bersot (2006), ao avaliar a ocorrência de *Salmonella* em abatedouros de aves no Brasil, verificou que a etapa de criação tem um papel epidemiologicamente importante na disseminação de *Salmonella* e, consequentemente, pode dar origem a um produto contaminado. No abate, as etapas tecnológicas de obtenção de carcaças também estão diretamente relacionadas com o aumento da prevalência do produto contaminado. Porém, avaliando as etapas críticas do processo de produção há um consenso de que o abate, no máximo, pode contribuir para a manutenção da prevalência do patógeno. Com isso, fica claro observar que quanto maior a prevalência nos animais vivos, maior será o percentual de contaminação nas carcaças abatidas.

Durante as etapas de transporte, abate e processamento dos frangos, pode haver contaminação da carne, derivados e subprodutos, devido à presença de *Salmonella* nos intestinos, pele e penas das aves, ou mesmo devido a outras fontes como utensílios utilizados durante estes processos ou a mão dos manipuladores. Estudos demonstram que períodos prolongados de jejum podem afetar o pH do intestino da ave, favorecendo a proliferação de micro-organismos patogênicos, incluindo a *Salmonella*, o que aumenta o risco de contaminação da carcaça no abate, caso haja rompimento dos intestinos (MENDES, 2001). Estudo realizado por Cortez et al. (2006), em abatedouros de frango, verificou a presença de *Salmonella* em amostras de fezes, penas, vísceras, água de escaldagem, de *chiller* e de lavagem, sendo os sorovares *Enteritidis* e *Typhimurium* os mais prevalentes.

Em um estudo sobre a incidência de *Salmonella* em diferentes etapas do processamento de frangos em um abatedouro no Brasil, a bactéria foi detectada em 5,4% (33/615) amostras analisadas. As maiores contaminações foram observadas nas caixas de transporte dos animais e na água de escaldagem, com índice de

16,7% em cada caso, seguido dos isolamentos na asa e na coxa congelada (13,3%), e na pele de peito e de coxa (10%). Em amostras de intestino, a porcentagem de positividade de *Salmonella* foi de 6,7%, demonstrando que a contaminação cruzada dentro do abatedouro pode ocorrer (REITER et al., 2007).

As etapas de resfriamento das carcaças, embora estejam associadas com uma redução na carga bacteriana, podem atuar de maneira inversa levando a contaminação das carcaças devido à elevada velocidade nas linhas de abate, equipamentos desregulados, desuniformidade no tamanho das aves, temperaturas inadequadas no *pré-chiller* e *chiller* e cloração deficiente da água (LOPES et al., 2007).

Os utensílios e equipamentos utilizados no abatedouro podem levar à contaminação cruzada, atuando como veículos de propagação do patógeno na indústria. A higiene pessoal dos manipuladores também tem relação direta com a contaminação da carcaça (VÖN RÜCKERT et al., 2009), sendo a antisepsia de mãos e a desinfecção de utensílios, fundamentais para a prevenção da contaminação (MORETRO et al., 2012).

Um estudo desenvolvido em diferentes cidades brasileiras, com intuito de avaliar a prevalência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango congeladas, resultou em 2,7% de positividade, com maior prevalência na cidade de São Paulo. Dezoito sorotipos foram identificados sendo os mais comuns Enteritidis (48,8%), Infantis (7,6%), Typhimurium (7,2%) e Heidelberg (6,4%) (MEDEIROS et al., 2011). Do ponto de vista da região geográfica política atual no Brasil, o maior número de isolamento de *Salmonella*, a partir de amostras de carcaça de frango, ocorre na região sudeste (50,4%), sendo S. Enteritidis o sorovar mais incidente (47,6%). Este sorovar se apresenta disseminado em todas as regiões, enquanto S. Infantis apenas na região sudeste, S. Typhimurium, no sudeste, norte e centro-oeste, S. Mbandaka, no norte e nordeste e S. Heidelberg no sudeste (BRASIL, 2012).

Apesar de todos os cuidados visando garantir a produção da carne de frango com qualidade microbiológica adequada e dos inúmeros avanços tecnológicos adotados no setor avícola brasileiro, observa-se que *Salmonella* ainda está presente ao longo da cadeia de produção do frango de corte. Desta forma, são necessárias medidas conjuntas, adotando cuidados específicos com as aves no ambiente de criação, como o controle microbiológico das rações oferecidas aos animais, adoção de práticas higiênicas na criação, até medidas higiênico-sanitárias rigorosas durante

o abate, no manuseio e processamento da carne de frango. Este rigoroso programa de limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos, e a prevenção de contaminações cruzadas, são medidas importantes que contribuem para a redução dos níveis de contaminação das carcaças.

### **3.5 S. Enteritidis, S. Typhimurium e S. Infantis no frango de corte e riscos para a saúde pública**

Salmonelose aviária refere-se aos diversos tipos de doenças em aves ocasionadas pelos variados sorovares de *Salmonella*, sendo todas estas enfermidades de grande importância para a avicultura mundial. O paratifo aviário é uma enfermidade causada por qualquer sorotipo de *Salmonella* que não seja a *Pullorum* ou *Gallinarum*, as quais são causadoras, respectivamente, da pulrose e do tifo aviário. Entre as salmonelas que causam o paratifo aviário, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são os sorovares que mais tem se destacado, inclusive pelo envolvimento em surtos de infecções alimentares. Porém, outros sorovares, como *S. Infantis*, *S. Agona*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg* também têm sido identificados como agente etiológico da doença. As aves jovens são mais susceptíveis e quando a enfermidade se desenvolve, o quadro é passível de confusão com a pulrose (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Porém, em relação à saúde pública, preocupação maior está relacionada à disseminação do patógeno para os seres humanos (KABIR, 2010). A salmonelose é a segunda zoonose mais comum em humanos na UE, perdendo apenas para os casos de campilobacteriose, gerando gastos estimados de mais de três bilhões de euros em decorrência da doença (EFSA, 2014a). Em 2013, registrou-se um total de 82.694 casos da doença na UE, com uma taxa de notificação de 20,4 casos por 100.000 habitantes. Os sorovares mais frequentemente notificados foram *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, representando 39,5% e 20,2%, respectivamente, de todos os sorovares relatados em casos de infecção humana. *S. Typhimurium* variante monofásica I,4,[5],12:i:- foi a terceira causa mais comum da doença, enquanto *S. Infantis* ocupou a posição de quarto sorotipo mais frequente na UE neste mesmo ano (EFSA, 2015).

Ainda na UE, em 2013, *S. Infantis* foi identificado como o sorovar mais comumente isolado na ave viva, com 22,7%. Na carne de frango os sorotipos mais

comuns foram *S. Infantis* (37,4%) e *S. Enteritidis* (37,6%). Já os sorotipos *S. Senftenberg* (19,5%) e *S. Typhimurium* (17,1%) foram mais comumente isolados da reação fornecida para a ave (EFSA, 2015).

Mesmo com as inúmeras medidas de biossegurança preconizadas no intuito de assegurar a sanidade dos plantéis avícolas, são registrados inúmeros surtos de salmonelose no Brasil. Entre os anos de 2000 e 2014, dentre os agentes etiológicos relacionados aos casos de DTAs no país, 38,2% dos surtos foram em decorrência de *Salmonella* spp., sendo este patógeno o principal envolvido em casos de DTA no Brasil (BRASIL, 2014).

Em um estudo desenvolvido por Medeiros et al. (2011), no Brasil, verificou-se que os sorovares mais comumente isolados de carcaças de frango foram *S. Enteritidis*, *S. Infantis* e *S. Typhimurium*, os quais são os principais associados com a doença em humanos.

Por muitos anos, e em todo o mundo, os sorotipos mais importantes na transmissão de salmonelas de animais para humanos foram *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Juntamente a estes sorovares, atualmente, o sorovar *Infantis* também tem sido bastante incriminado pelo envolvimento em casos de infecção alimentar (CDC, 2014c; EFSA, 2015; WHO, 2015).

Estudos utilizando a técnica de fagotipagem tem demonstrado a estrita relação de isolados de origem avícola com aqueles envolvidos em casos de salmonelose humana. Ribeiro et al. (2007) encontrou uma alta frequência do fagotipo PT4, presente em 95,2% das cepas de *S. Enteritidis* isoladas de cortes de frangos na região sudeste do Brasil no período de setembro a dezembro de 1996. Segundo os autores, a elevada frequência em carcaças de frango e o predomínio deste fagotipo na salmonelose humana, sugerem particular associação entre reservatórios aviários e os surtos de infecção alimentar no Brasil durante o período de estudo. A infecção humana causada por *S. Typhimurium* fagotipo DT104 veiculada por alimentos é apontada como um problema para a saúde pública em todo o mundo. No Brasil, Ghilardi, Tavechio e Fernandes (2006) relataram a identificação deste fagotipo a partir de pacientes hospitalizados em São Paulo.

Um relatório do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), abrangendo os anos de 1968 a 2011, demonstrou que dentre as inúmeras fontes possíveis de *S. Enteritidis*, o frango ocupou o topo da lista, sendo o principal veiculador deste patógeno, o qual foi isolado em 50,2% de amostras provenientes de

animais apresentando sinais clínicos da doença (amostras clínicas), e em 82,5% em amostras provenientes do ambiente de criação da ave, incluindo ração e também carcaça (amostras não clínicas). Para *S. Typhimurium*, o frango foi a terceira maior fonte entre amostras clínicas (9,9%), perdendo apenas para bovino, isolado em 33,7%, e suíno, em 13%, enquanto que para amostras não clínicas, a carcaça de frango foi a principal fonte de *S. Typhimurium*, isolado em 29,2%. Já para *S. Typhimurium* variante monofásica I,4,[5],12:i:-, o frango ocupou o quinto lugar dentre as principais fontes clínicas deste sorovar, o qual foi isolado em 35,8% de bovino, 23,3% de equino, 15,7% de suíno, 14,4% de aves e animais silvestres e em 4% de frango. Porém, dentre as fontes não clínicas, o frango também foi o principal veiculador de *S. Typhimurium* variante monofásica I,4,[5],12:i:-, isolado em 71,8% (CDC, 2013).

Em outubro de 2015, o CDC notificou um surto de infecções por *S. Enteritidis* em Minnesota, nos EUA, e após investigação epidemiológica, identificaram como possível fonte o consumo da carne de frango (CDC, 2015c).

Outra grande preocupação em saúde pública com relação às salmonelas paratípicas diz respeito a sua capacidade em formação de biofilmes nos frigoríficos. O primeiro passo para a formação de biofilmes consiste na fixação das bactérias às superfícies de processamento, e é reconhecida como uma das causas da contínua contaminação de alimentos (LEWIS, 2001). De acordo com Steenackers et al. (2012), *Salmonella* é capaz de formar biofilmes de maneira significativa e em diferentes tipos de superfícies, sejam elas abióticas (plástico, borracha, vidro e aço inoxidável), ou bióticas (plantas, células epiteliais, cálculos biliares). Estudos demonstram que tanto *S. Enteritidis* (AUSTIN et al., 1998) como *S. Typhimurium* (O'LEARY et al., 2013) podem persistir no ambiente devido a sua capacidade em formar biofilmes em superfícies inertes (NGWAI et al., 2006), podendo esses biofilmes serem compostos por uma única espécie bacteriana ou de uma comunidade derivada de várias espécies (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

O ambiente de abate pode ser uma fonte importante na disseminação de *Salmonella*, pois uma vez instalada a contaminação pelo micro-organismo na indústria, a remoção é dificultada devido à sua capacidade em formar biofilmes (JOSEPH; OTTA; KARUNASAGAR, 2001), e de se multiplicar em baixas temperaturas (D'AOUST, 1991). Uma pesquisa desenvolvida por Fuzihara, Fernandes e Franco (2000) em 60 pequenos abatedouros da cidade de Mauá (SP)

comprova este fato, pois verificaram a presença de *Salmonella* spp. em utensílios (23,1%) e superfícies de refrigeradores e congeladores (71,4%). Desta forma, biofilmes formados por *Salmonella* spp. em equipamentos e superfícies de processamento de alimentos servem como um reservatório persistente de contaminação, comprometendo a segurança alimentar e a saúde humana (VAN HOUDT; MICHELS, 2010).

Diante das evidências de que alimentos de origem avícola são as principais fontes de *Salmonella* para os seres humanos, sugere-se que maiores esforços devam ser direcionados para controle do paratípico aviário nos plantéis avícolas nacionais, além de cuidados constantes no processamento da carne de frango, evitando a contaminação do produto final.

### **3.6 *Salmonella* e resistência aos antimicrobianos**

A resistência microbiana caracteriza-se como sendo a habilidade de um micro-organismo continuar a multiplicar-se ou persistir na presença de níveis terapêuticos de determinado agente antimicrobiano. Dentre os mecanismos principais que levam as bactérias a apresentar resistência podem-se citar, a inativação enzimática da molécula do antimicrobiano, a alteração do alvo celular deste agente e a redução do nível intracelular do antimicrobiano (ALEKSHUN; LEVY, 2007; ALTERTHUM, 2008a). A resistência pode ser classificada como natural ou adquirida, sendo a primeira corresponde a uma característica intrínseca da espécie bacteriana e todas as amostras desta espécie têm esta propriedade, enquanto que na segunda, somente parte das amostras é resistente (ALTERTHUM, 2008a).

Os antimicrobianos são medicamentos que atuam causando a morte (bactericida) ou a inibição do crescimento de micro-organismos (bacteriostático), podendo atuar na célula bacteriana em nível da parede (estrutura e biossíntese), membrana citoplasmática (estrutura e função), síntese de proteínas e síntese de ácidos nucleicos. Estes compostos são utilizados na produção animal para a profilaxia, controle e tratamento de doenças infecciosas, bem como para a promoção do crescimento, visando melhorar o desempenho zootécnico dos animais. Uma consequência indesejável de seu uso é o potencial desenvolvimento de resistência

antimicrobiana em patógenos de origem alimentar e subsequente transmissão ao homem, através dos alimentos (MELO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2008).

Atualmente, a resistência bacteriana aos antimicrobianos é algo que tem preocupado a comunidade científica nacional e internacional, principalmente na UE, tanto na área de saúde humana quanto veterinária, devido ao risco de que as moléculas antimicrobianas percam sua eficácia diante de bactérias resistentes. Isto afetou diretamente o setor produtivo animal, visto que a UE, grande importador do produto, baniu o uso dos antimicrobianos como aditivos na alimentação animal, por acreditar que a ocorrência de resistência a determinadas drogas na medicina humana, possivelmente, estava ocorrendo devido à resistência cruzada com antibióticos de uso veterinário, pertencentes ao mesmo grupo farmacológico (PALERMO NETO, 2014).

De acordo com Aarestrup (2004), os níveis e extensão da resistência são influenciados pelas práticas de uso destes fármacos no homem e em animais, e variam com a região geográfica. Nos países desenvolvidos, por exemplo, estes fenótipos observados em *Salmonella* têm sido associados com o uso de antimicrobianos em animais, onde os perfis de resistência geralmente refletem o tempo que uma droga está em uso, e a reversão desta característica, associada ao seu desuso.

Drogas como o cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprim, ampicilina ou amoxacilina têm sido substituídas, atualmente, pelas cefalosporinas de terceira geração e as fluoroquinolonas. Entretanto, a resistência a estas duas drogas também tem emergido em surtos e em casos endêmicos (FERREIRA; CAMPOS, 2008). Tal condição vem trazendo preocupações quanto às perspectivas no tratamento de infecções por diferentes espécies bacterianas, incluindo *Salmonella* spp. (BRASIL, 2012).

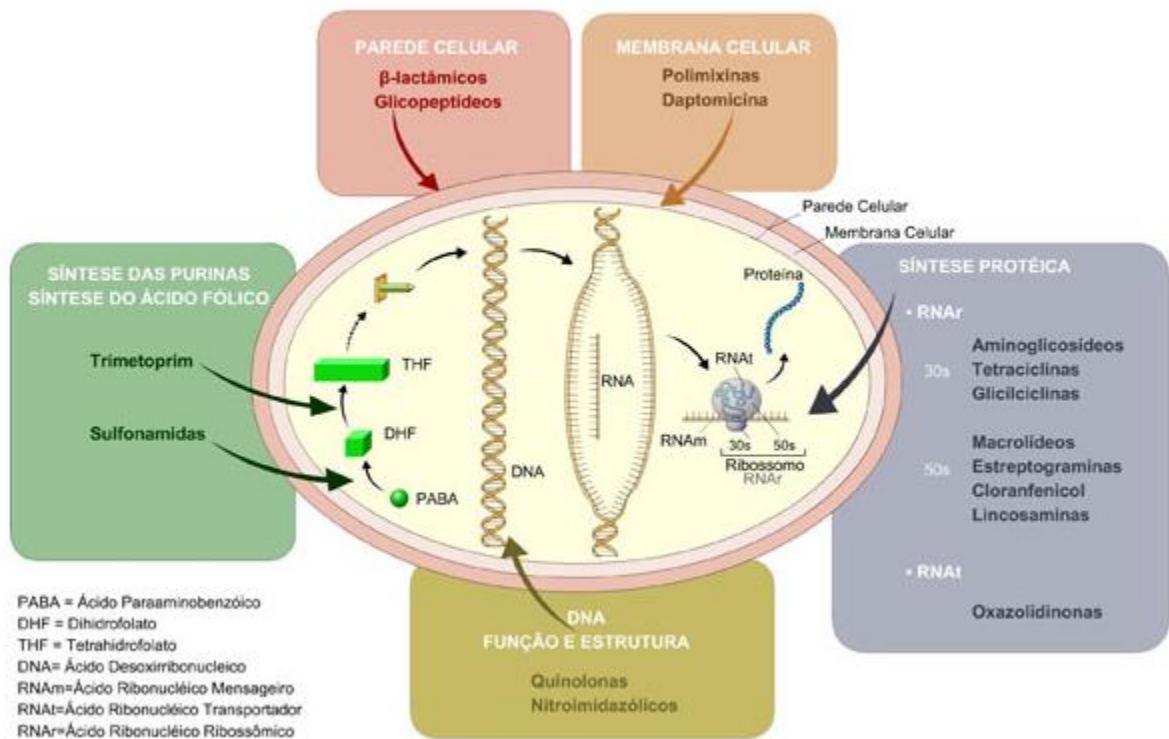
A seleção de cepas resistentes devido ao uso veterinário de antibióticos tem sido objeto de atenção da comunidade científica, que vem discutindo soluções globais para o problema. Em uma reunião realizada pela FAO/WHO/OIE em Roma, na Itália, no final de 2007, foram apresentadas duas listas elaboradas pela WHO e a OIE referentes, respectivamente, aos antibióticos de uso criticamente importante para a saúde humana e animal (OIE, 2007; WHO, 2007). São chamadas de criticamente importantes por ser a primeira escolha em tratamento de infecções humanas e veterinárias. 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 elas: cefalosporinas de terceira e quarta gerações, as quinolonas (incluindo as fluorquinolonas) e os macrolídeos. O Brasil, atendendo a esta recomendação, retirou estas moléculas de uso como aditivos, estando liberadas apenas para aplicação terapêutica, na qual se utiliza dose maior por um tempo menor e, portanto, reduzindo a possibilidade de desenvolver resistência (PALERMO NETO, 2014).

Relatório elaborado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) demonstrou que os maiores percentuais de resistência obtidos para cepas de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango no Brasil foram para estreptomicina (89,3%), sulfonamidas (72,4%), florfenicol (59,2%), ampicilina (44,8%), ácido nalidíxico (44,0%), ceftiofur (22,8%), aztreonam (20,4%), enrofloxacina (18,4%), cefoxitina (17,3%), cefalotina (12,4%) e tetraciclina (11,2%) (BRASIL, 2012).

A fiscalização de produtos de uso veterinário está prevista na legislação brasileira desde o final da década de 60 e regulamentada no que diz respeito à utilização, fabricação e comercialização. De acordo com a Instrução Normativa nº 26, os antibióticos pertencentes às classes dos anfenicóis, tetraciclinas, beta lactâmicos das subclasses dos benzilpenicilâmicos e das cefalosporinas, quinolonas e sulfonamidas sistêmicas são na veterinária, de uso exclusivo em terapêutica, sendo vedada a sua utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009).

Abaixo estão descritos os mecanismos de ação das principais classes de antimicrobianos (Figura 1).



**Figura 1.** Mecanismo de ação de algumas classes de antimicrobianos.

Fonte: BRASIL, 2007.

### 3.6.1 Resistência às quinolonas e fluoroquinolonas

O mecanismo de ação dos derivados quinolônicos é a interferência na síntese de DNA do micro-organismo, inibindo a ação da DNA girase. Esta enzima é responsável por promover e enrolamento e desenrolamento da molécula de DNA, para que ocupe o menor espaço dentro da célula, essenciais à sobrevivência bacteriana (ALTERTHUM, 2008a). A DNA girase torna a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres iniciam a síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias (BRASIL, 2007).

A resistência às quinolonas é determinada por mecanismos mediados por alterações no cromossomo, seja devido a mutações que alteram os sítios de ligação da DNA girase, que passa a não sofrer ação do antimicrobiano, ou por mutações que alteram a permeabilidade à droga pela membrana celular bacteriana (porinas). Outro determinante de resistência ocorre pela diminuição no acúmulo do agente no interior da bactéria, por um mecanismo que aumenta a retirada da droga do interior

da célula, conhecido como bomba de efluxo (ALTERTHUM, 2008a; BRASIL, 2007; PIDDOCK, 2002; RUIZ, 2003).

Inicialmente, a resistência era considerada somente a partir de mutações, no entanto, atualmente sabe-se que plasmídeos albergando genes de resistência às quinolonas também já foram descritos. Elementos móveis que carreiam o gene *qnr* também têm sido descritos como responsáveis por conferir resistência às quinolonas, sendo que estes apresentam o agravante de serem potencialmente transferidos de forma horizontal (ALTERTHUM, 2008a; RUIZ, 2003). A distribuição do gene *qnr* é importante na disseminação de resistência às quinolonas entre amostras de *Salmonella* spp. Sabe-se que o gene *qnr* codifica a proteína Qnr que protege a DNA girase da ação da ciprofloxacina (GAY et al., 2006). Desde o primeiro relato de resistência às quinolonas mediada por plasmídeo, originalmente reportado em *Klebsiella pneumoniae* em 1998, plasmídeos carreadores do gene *qnr* (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*) tem sido relatados no gênero *Salmonella* em diversos países como França (CATTOIR et al., 2007), Holanda (VELDMAN; VAN PELT; MEVIUS, 2008) e Dinamarca (TORPDAHL et al., 2009).

Considerando estes aspectos, estudos desenvolvidos na Inglaterra de Espanha demonstram a ocorrência de cepas multirresistentes, que apresentam perfis de resistência às fluoroquinolonas como enrofloxacina e ciprofloxacina, representam um quadro preocupante, pois comprovam que pode ocorrer aumento gradativo de *Salmonella* spp. resistentes a esta classe de drogas (THRELFALL et al., 2000; MARIMÓN et al., 2004).

No Brasil, foi demonstrada uma baixa porcentagem de resistência à ciprofloxacina em cepas de *Salmonella* isoladas de carcaça de frango (0,4%) (BRASIL, 2012). Ângulo et al. (2000) relataram níveis um pouco mais elevados em países do hemisfério norte, em torno de 1%, apontando ainda, a emergência de cepas de salmonelas paratípicas resistentes à classe das fluoroquinolonas. Embora estes percentuais sejam reduzidos, deve-se sempre monitorar a susceptibilidade das cepas frente às quinolonas e fluoroquinolonas, já que são amplamente utilizadas como opção terapêutica, podendo o aumento gradativo de resistência representar um elevado risco em curto e médio prazo (BRASIL, 2012). Esta monitorização permite conhecer o impacto do uso, por exemplo, da enrofloxacina na produção avícola, no aumento ou redução de cepas resistentes ao ácido nalidíxico, tendo em vista a possibilidade de resistência cruzada com drogas de uso humano

pertencentes à mesma classe de antimicrobiano, como foi apontado por López e Olvera (2000).

### **3.6.2 Resistência aos $\beta$ -lactâmicos**

Os  $\beta$ -lactâmicos são a classe mais variada e mais amplamente utilizada de antimicrobianos. Neste grupo estão incluídas as penicilinas e seus derivados, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenêmicos, além dos inibidores de  $\beta$ -lactamases. Todos estes possuem em comum, no seu núcleo estrutural, o anel  $\beta$ -lactâmico, que é composto de três átomos de carbono e um de nitrogênio, o qual confere atividade bactericida (ALTERTHUM, 2008b; BRASIL, 2007; TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008).

Antibióticos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos atuam na parede celular bacteriana, interferindo na síntese da camada de peptideoglicano por meio de inúmeros mecanismos, impedindo a união das cadeias peptídicas, que ocorre externamente à membrana citoplasmática. Sua atividade se dá exclusivamente contra bactérias que estejam em atividade biossintética da parede celular, ou seja, em fase de crescimento e/ou reprodução. Assim, bloqueiam a etapa final da síntese da camada de peptideoglicano, o que quase sempre resulta na morte da bactéria, quando esta se encontra na fase de divisão. O mecanismo de ação deste grupo é a fixação às proteínas ligadoras de penicilinas (PLP), que são proteínas existentes na parte externa da membrana citoplasmática, que também participam da etapa de síntese da camada de peptideoglicano, e possuem a capacidade de se fixar tanto às penicilinas quanto às cefalosporinas (ALTERTHUM, 2008a; CARATTOLI, 2008).

São descritas três formas principais pelas quais as bactérias apresentam resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. O mecanismo mais importante e a forma mais eficiente e comum de resistência aos betalactâmicos é a produção de enzimas específicas pela bactéria, conhecidas como  $\beta$ -lactamases, dotadas da capacidade de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico, transformando os antibióticos correspondentes em produtos inativados.  $\beta$ -lactamases são produzidas por vários tipos de bactérias tornando-as resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos. Outros mecanismos de resistência consistem em modificações estruturais das PLP, e também pela diminuição da permeabilidade bacteriana ao antimicrobiano, através de mutações e

modificações nas porinas, proteínas que permitem a entrada de nutrientes e outros elementos para o interior da célula (BRASIL, 2007; CARATTOLI, 2008).

Estudos têm investigado a ocorrência de diferentes  $\beta$ -lactamases em bactérias Gram-negativas isoladas a partir de infecções clínicas no homem. Por outro lado, há um limitado número de estudos sobre a ocorrência de  $\beta$ -lactamases em isolados de animais e seus produtos (CARATTOLI, 2008). Devido à dificuldade na detecção ou mesmo na subnotificação sobre micro-organismos produtores de  $\beta$ -lactamases, sua real prevalência é desconhecida, sabendo-se que são distribuídos mundialmente e que sua prevalência vem ascendendo vertiginosamente (GUPTA, 2007). Apesar disso, mais de 340  $\beta$ -lactamases tem sido descritas e muitas vêm sendo identificadas em *Salmonella*, gerando grande preocupação devido ao emprego destas drogas no tratamento da salmonelose (BUSH, 2001).

Em bactérias Gram-negativas, já foi possível detectar mais de 30 tipos diferentes de  $\beta$ -lactamases codificadas e transferidas através de plasmídeos. As  $\beta$ -lactamases detectadas em *Salmonella* spp. constituem um diverso grupo de enzimas codificadas por um considerável número de genes. Pelo menos 10 diferentes subgrupos de genes das  $\beta$ -lactamases *bla* são descritos: TEM, SHV, PSE, OXA, PER, CTX-M, CMY, ACC, DHA ou KPC, destacando-se os genes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX</sub>*, e *bla<sub>CMY</sub>* por codificar enzimas  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs) (MICHAEL et al., 2006). A disseminação dessas  $\beta$ -lactamases pode ser cromossomal ou mediada por plasmídeos, podendo ser alguns destes genes carreados através de transposons ou integrons. Em alguns casos, os marcadores de resistência as  $\beta$ -lactamases representam parte do integron, que possui elementos genéticos móveis que incluem comumente um gene de resistência a antimicrobianos, que também o codifica para outras classes de antibióticos, tais como aminoglicosídeos, trimetoprim, sulfonamidas, tetraciclinas e cloranfenicol, e consequentemente, as cepas produtoras de ESBL são geralmente multirresistentes (AARESTRUP, 2004; ALTERTHUM, 2008a; ZHAO et al., 2006).

Em um estudo realizado no Brasil com cepas de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango identificou-se o gene *bla<sub>TEM</sub>* em duas cepas de *S. Enteritidis*, o qual foi ausente nos demais sorovares. Ao correlacionarem a ausência dos genes *bla* com o fenótipo de resistência apresentado por este sorovar foi possível evidenciar sua natureza extracromossômica, pois quando os genes estão localizados em elementos móveis, podem ser facilmente perdidos (BRASIL, 2012).

ESBL é uma enzima que permite que as bactérias se tornem resistentes a uma grande variedade de penicilinas e cefalosporinas. *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL são resistentes a fortes antibióticos incluindo cefalosporinas de espectro estendido. Nos EUA estima-se que aproximadamente 26.000 infecções ocorram anualmente em decorrência de ESBL, resultando em cerca de 1.700 mortes, gerando grandes despesas hospitalares no país (CDC, 2014a). Desta forma, a disseminação de *Salmonella* spp. carreando ESBL tem emergido mundialmente durante as últimas décadas, causando preocupação pelo fato de que as cefalosporinas são drogas de escolha para o tratamento da salmonelose (WHO, 2003).

As ESBL constituem um grupo de enzimas derivadas das  $\beta$ -lactamases clássicas, todas já caracterizadas em *Salmonella* spp., representadas atualmente por diferentes famílias: TEM com mais de 130 tipos, SHV com mais de 50, a família CTX-M que preferencialmente hidrolisa cefotaxima. Particularmente TEM-1, TEM-2 e SHV-1, de maior frequência, conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro, penicilinas e monobactâmicos (aztreonam), permanecendo a sensibilidade às cefamicinas e carbapenêmicos. Outra característica fenotípica importante é de que estas enzimas são sensíveis à ação dos inibidores de betalactamases (BRASIL 2012).

Os inibidores de  $\beta$ -lactamases são um grupo capaz de destruir estas enzimas bacterianas, ao mesmo tempo em que é destruído pela ação destas. Por este motivo, estes inibidores são chamados de suicidas. São compostos que possuem o anel  $\beta$ -lactâmico bastante estável, baixa atividade antibacteriana, porém, possuem alta afinidade pelas lactamases. Como estas substâncias não têm atividade antimicrobiana, para serem úteis do ponto de vista terapêutico, devem ser associadas a antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, protegendo-os da ação das  $\beta$ -lactamases. Assim, quando em associação com antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, os inibidores de  $\beta$ -lactamases, ligam-se às  $\beta$ -lactamases e, desta forma, evitam a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico da droga associada e potencializam sua atividade. Desta forma, bactérias resistentes ao antimicrobiano passam a ser sensíveis, pela presença do inibidor. Os inibidores utilizados em terapêutica são o ácido clavulânico, o tazobactam e o sulbactam sódico. Uma associação muito conhecida é da amoxacilina com ácido clavulânico (ALTERTHUM, 2008a; TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008).

O teste de triagem para detecção da produção de ESBL em enterobactérias é realizado pelo uso de discos de ceftazidima (30 µg) e cefotaxima (30 µg). Se o diâmetro do halo de sensibilidade for, respectivamente, menor ou igual a 22 mm e 27 mm, deve ser realizado um teste fenotípico confirmatório. Este teste é realizado usando discos da cefalosporina isoladamente e da cefalosporina com inibidor de  $\beta$ -lactamases. Assim, utilizam-se os seguintes discos, ceftazidima e ceftazidima associada com ácido clavulânico, e cefotaxima e cefotaxima associada com ácido clavulânico. Se o halo de inibição produzido ao redor do antibiótico com o inibidor de  $\beta$ -lactamases for maior em cinco milímetros ou mais do que o antibiótico sozinho, esta cepa muito provavelmente é produtora de ESBL (CLSI, 2013).

As drogas ampicilina e amoxacilina são penicilinas de amplo espectro de ação, e se caracterizam por apresentar estabilidade em meio ácido e ter efeito sobre cocos e bacilos Gram-negativos. Porém, são inativadas por ação das enzimas  $\beta$ -lactamases, razão pela qual grande parte dos patógenos atualmente apresenta resistência a estes antimicrobianos (TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008).

De acordo com a atividade antimicrobiana e características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, e a época em que foram introduzidas na terapêutica, as cefalosporinas foram divididas em quatro grupos. As cefalosporinas de primeira geração são ativas contra bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas. Fazem parte deste grupo: cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefadroxil, cefradina. Já as cefalosporinas de segunda geração são mais resistentes à ação das  $\beta$ -lactamases produzidas pelas bactérias Gram-negativas. Compõem este grupo: cefoxitina, cefamandol, cefaclor e cefuroxima. As cefalosporinas de terceira geração, ceftriaxona, cefotaxima, cefoperazona, ceftazidima, cefpodoxima e cefixima são ainda mais eficazes à inativação pelas  $\beta$ -lactamases das bactérias Gram-negativas. Por isso, os antimicrobianos pertencentes a este grupo são indicados no tratamento das infecções provocadas por bactérias Gram-negativas resistentes a outros antimicrobianos. Dentro deste grupo ainda pode-se citar o ceftiofur, uma cefalosporina de terceira geração amplamente utilizada na medicina veterinária. Já as cefalosporinas de quarta geração, cefepima e cefpiroma, apresentam o mesmo espectro de ação das anteriores, além de agir sobre alguns cocos Gram-positivos e bactérias anaeróbias. São ainda eficazes à ação das  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, produzidas por enterobactérias capazes de inativar antimicrobianos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos (BRASIL, 2007; TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008).

O aumento da resistência às cefalosporinas está provavelmente associado com a disseminação da  $\beta$ -lactamase AmpC, a qual é codificada pelo gene *bla<sub>CMY</sub>*. Este e outros genes de resistência estão associados com plasmídeos transmissíveis, os quais são importantes para a resistência às cefalosporinas (AARESTRUP, 2004; WINOKUR et al., 2000).

O aumento da prevalência de cepas de *Salmonella* spp. resistentes à ceftriaxona tem sido relatado em animais de produção, e pode estar relacionado ao uso veterinário de ceftiofur, uma cefalosporina de espectro estendido de uso exclusivo em medicina veterinária (CARATTOLI et al., 2002).

Os monobactâmicos são antimicrobianos que possuem somente o anel  $\beta$ -lactâmico associado a extensas cadeias laterais, sendo caracterizados por um anel monocíclico em sua estrutura. No Brasil, o aztreonam é a única droga disponível deste grupo, de utilização na prática clínica, com boa atividade sobre bactérias Gram-negativas aeróbias (BRASIL, 2007; TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008). Possuem como característica principal sua resistência à ação das penicilinases e cefalosporinases, além do amplo espectro de ação (ALTERTHUM, 2008b).

Os carbapenêmicos são antibacterianos que também possuem um amplo espectro de ação e uma grande estabilidade à maioria das  $\beta$ -lactamases (BRASIL, 2007; TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008). Atualmente, existem três antimicrobianos deste grupo disponíveis: imipinem, meropenem e ertapenem. Estas drogas têm atividade contra a maioria dos cocos Gram-positivos e negativos e em bacilos Gram-positivos e negativos, aeróbios e anaeróbios (TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008). Assim, por serem drogas de amplo espectro e com penetração na maioria dos sítios de infecção, os carbapenêmicos podem ser utilizados no tratamento de infecções em que existe uma forte suspeita de microbiota aeróbia e anaeróbia ou infecções causadas por organismos multirresistentes. Por este motivo, esta droga não deve ser utilizada como primeira escolha no tratamento de infecções (BRASIL, 2007).

### 3.6.3 Resistência aos aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são drogas bactericidas, cujo mecanismo de ação consiste na alteração da função dos ribossomos bacterianos, pela ligação à fração 30S dos ribossomos, inibindo a síntese protéica ou produzindo proteínas

defeituosas. São ativos contra bactérias Gram-negativas aeróbias e contra alguns estafilococos. Alguns dos representantes deste grupo são gentamicina, neomicina, espechinomicina, estreptomicina, tobramicina e amicacina (BRASIL, 2007; TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008).

São conhecidos três mecanismos químicos de resistência aos aminoglicosídeos: diminuição de permeabilidade celular à droga, alteração dos sítios de ligação no ribossomo e, em sua maioria, está mediada pela produção de enzimas inativantes dos aminoglicolídeos, que bloqueiam a atividade antibacteriana da droga (modificação enzimática do antibiótico). Os dois primeiros são mediados por mutação e o último por plasmídeo. A resistência mediada por plasmídeos é, em geral, a principal forma de resistência aos aminoglicosídeos, tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas (ALTERTHUM, 2008a). São conhecidos três tipos de enzimas inativantes: O-adeniltransferases, N-acetiltransferases e O-fosfotransferases. Em *Salmonella* spp., os genes O-adeniltransferases mais comuns são do tipo *aadA* e *aadB*. O primeiro media resistência à estreptomicina e espechinomicina, enquanto o segundo confere resistência à gentamicina, kanamicina e tobramicina. Dos quatro tipos de genes de N-acetiltransferase, a literatura vem apontando em *Salmonella* somente *aac(3)* e *aac(6')*. Os mais comuns são *aac(3)*, que median resistência a gentamicina e foram encontrados em diferentes sorovares como *Enteritidis*, *Typhimurium*, *Typhi*, *Agona* e *Choleraesuis* (MICHAEL et al., 2006).

### **3.6.4 Resistência às tetraciclinas**

A característica do grupo das tetraciclinas, produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces*, é o tetra anel, e as diferenças entre as drogas residem nos grupos químicos ligados a ele (ALTERTHUM, 2008b). As tetraciclinas possuem amplo espectro de ação, geralmente bacteriostáticos, embora a resistência adquirida a este grupo de antimicrobianos entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas seja um fato muito frequente.

A principal característica desta droga é a capacidade de difundir ao interior das células do hospedeiro, o que permite sua utilização no tratamento de patógenos intracelulares. As tetraciclinas entram na célula por difusão, em um processo dependente de gasto de energia. Ligam-se, de maneira reversível, à porção 30S do

ribossomo, bloqueando a ligação do RNA transportador, impedindo a síntese proteica (BRASIL, 2007; TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008).

O principal mecanismo de resistência microbiana é por diminuição da acumulação da droga no interior da célula. A resistência pode ser cromossômica ou, mais frequentemente, mediada por plasmídeos ou transposons (BRASIL, 2007).

De modo geral, as bactérias tornam-se resistentes às tetraciclinas por aquisição de plasmídeos de resistência. A resistência ocorre devido a proteínas denominadas Tet (Tet A, B, C e D) que, uma vez formadas, localizam-se na membrana citoplasmática, provocando a saída quase que imediata do antibiótico da célula. Não há evidências de inativação da droga ou modificação do alvo (ribossomo). Há, entretanto, algumas observações de proteínas citoplasmáticas cuja função é proteger o ribossomo do ataque do antibiótico (ALTERTHUM, 2008a).

São descritos mais de 35 diferentes genes que codificam resistência a tetraciclina, relacionados a bombas de efluxo associadas à membrana, capazes de exportar tetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina, enquanto *tetB*, além destes, é capaz de exportar também a minociclina. Os genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* e *tetG* têm sido encontrados em *Salmonella*, sendo *tetA* e *tetB* com elevada frequência e em um grande número de sorovares, enquanto *tetC* e *tetD* são encontrados raramente (FRECH; SCHWARZ, 2000; MICHAEL et al., 2006).

### **3.6.5 Resistência aos fenicóis**

O cloranfenicol é um antibacteriano de largo espectro de ação, que se liga à subunidade 50S do ribossomo, inibindo a síntese proteica da bactéria, tendo, assim, ação bacteriostática, para o qual existem elevadas taxas de cepas resistentes tanto de bactérias Gram-positivas como Gram-negativas. No entanto, ainda hoje continua sendo a droga de primeira escolha para o tratamento da febre tifóide, devido às raras ocorrências de *Salmonella Typhi* resistentes ao cloranfenicol em humanos (BRASIL, 2007; TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008).

O cloranfenicol foi considerado a droga de escolha para o tratamento da salmonelose, tanto no homem como no caso da doença em animais, durante um longo período de tempo, o que levou a seleção de cepas cloranfenicol-resistentes. Esta resistência é mediada principalmente por genes localizados em plasmídeos que codificam a produção de enzimas, denominadas cloranfenicol-acetiltransferases, que

inativam o composto. Esta enzima ao acetilar a droga, faz com que ela perca a afinidade pelo seu alvo (ALTERTHUM, 2008a; BRASIL, 2007).

Outros mecanismos de resistência identificados em micro-organismos Gram-negativos são de natureza não enzimática, sendo eles, a perda de permeabilidade da membrana e a bomba de efluxo da droga. A expulsão ativa do cloranfenicol/florfenicol em *Salmonella* se processa mediante dois tipos de proteínas transportadoras específicas de fenicóis, Cml e Flo. A proteína Cml é codificada pelo gene *cmlA*, e é responsável pelo transporte de cloranfenicol, e a proteína Flo, é capaz de mobilizar tanto o cloranfenicol como o florfenicol, sendo codificada por genes *flo* em diferentes sorovares (DOUBLET et al., 2004; MEUNIER et al., 2002). A ocorrência de expressão fenotípica de resistência a estas drogas, e não detecção do gene associado sugere a presença de outra classe de genes. Além deste, outros fatores podem estar implicados como, super-expressão de bombas de efluxo de multirresistência as drogas ou então modificação do alvo de ligação da droga levando a ineficiência do antimicrobiano (ALTERTHUM, 2008a; BRASIL, 2012; DEPARDIEU et al., 2007; NISHINO; NIKAIDO; YAMAGUCHI, 2007).

Desde o ano de 2003, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) proibiu o uso do cloranfenicol em animais (BRASIL, 2003). Porém, seu análogo sintético fluorado, o florfenicol, foi aprovado para tratamento veterinário. Estudo desenvolvido no Brasil, avaliando a resistência antimicrobiana em cepas de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango, tem demonstrado fenótipo de sensibilidade ao cloranfenicol e resistência ao florfenicol, o que reflete a ausência da pressão seletiva exercida pelo cloranfenicol tendo em vista a proibição de seu uso pelo MAPA (BRASIL, 2012).

### **3.6.6 Resistência às sulfonamidas e à diamino-pirimidina**

As sulfonamidas são drogas bacteriostáticas de largo espectro de ação, derivados da sulfanilamida. Atualmente, seu uso clínico é bastante limitado devido à disponibilidade de antimicrobianos mais eficazes. As drogas deste grupo de maior importância clínica são sulfadiazina e sulfametoxazol (BRASIL, 2007; TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008).

O sulfametoxazol é comumente empregado em associação com o trimetoprim, uma diamino-pirimidina, associação mais conhecida como cotrimoxazol,

tendo as duas drogas efeito sinérgico e amplo espectro de ação. Ambas atuam na biossíntese do ácido fólico, necessário para a síntese do ácido nucleico, interferindo assim na síntese do DNA (ALTERTHUM, 2008a).

A resistência às sulfas pode ocorrer por aquisição de plasmídeos que codificam enzimas com pouca afinidade ou determinam diminuição de permeabilidade da bactéria. Já a resistência ao trimetoprim pode ocorrer por alteração da permeabilidade celular, por perda da capacidade da bactéria de ligação à droga por modificação na enzima diidrofálato redutase. Esta resistência pode ser conferida cromossomicamente, através de plasmídeos ou por transposons (BRASIL, 2007).

O uso das sulfonamidas, tanto na medicina humana quanto na veterinária, tem levado à emergência de resistência a estes compostos em amostras de *Salmonella* spp. A resistência a esta droga ocorre geralmente pela aquisição de dois genes denominados *sul1* e *sul2*, que codificam uma enzima necessária durante a síntese do ácido fólico, precursor do RNA e DNA, as quais não são inibidas pela droga. Outro gene de resistência às sulfonamidas carreado por plasmídeo foi descrito, denominado *sul3* (LYNNE et al., 2008; RANDALL et al., 2004).

### **3.6.7 Resistência às polimixinas**

As polimixinas são antimicrobianos polipeptídeos com mecanismo de ação distinto dos demais antimicrobianos utilizados atualmente, atuando em nível da membrana citoplasmática. Esta droga interage com a molécula de polissacarídeo da membrana externa das bactérias Gram-negativas, e esta intercalação das moléculas do antibiótico na membrana provoca sua desorganização, retirando cálcio e magnésio, necessários para a estabilidade da molécula de polissacarídeo. Esse processo é independente da entrada do antimicrobiano na célula bacteriana e resulta em aumento de permeabilidade da membrana com rápida perda de conteúdo celular e, consequentemente, provoca a morte da bactéria (ALTERTHUM, 2008a; BRASIL, 2007).

A possibilidade de resistência cruzada com outros antimicrobianos é muito rara, permitindo que as polimixinas sejam ativas contra muitas espécies de bactérias multirresistentes. Há duas polimixinas disponíveis comercialmente, colistina e polimixina B. Além de potente atividade bactericida, as polimixinas também

apresentam atividade antiendotoxina. O lipídeo A da molécula de lipossacarídeo, que representa a endotoxina da bactéria Gram-negativa, é neutralizado pelas polimixinas (BRASIL, 2007).

A resistência a polimixina entre os Gram-negativos pode ocorrer por diminuição na ligação da droga à membrana celular (BRASIL, 2007).

### **3.6.8 Resistência à fosfomicina**

A ação da fosfomicina sobre a célula bacteriana, assim como os  $\beta$ -lactâmicos, também se dá em nível de parede celular. Este antimicrobiano atua impedindo a ligação de componentes da camada de peptideoglicano, por inibição da enzima piruvil-transferase, responsável por esta ligação (ALTERTHUM, 2008a).

O mecanismo de resistência a esta droga foi avaliado por Lin e Chen (2015), que detectaram o primeiro gene de resistência a fosfomicina, o gene *fosA3*, originado de um plasmídeo conjugativo, em *Salmonella* isolada de alimentos. Neste estudo verificou-se que este plasmídeo carreava os genes *blaCTX-M-55* e *fosA3*, e sugeriu a possibilidade que o mesmo possa circular entre membros da família *Enterobacteriaceae*. A associação dos gene *fosA3* com *blaCTX-M* pode eliminar a possibilidade de uso da fosfomicina como uma alternativa de tratamento, a qual pode ser eficaz para tratamento da infecção por *Salmonella* multirresistente.

### **3.6.9 Perfis de multirresistência em *Salmonella***

Além do envolvimento em doenças de transmissão alimentar, *Salmonella* assume significante importância mundial na saúde pública. A relevância é decorrente da existência de cepas multirresistentes aos antimicrobianos, e suas possíveis implicações no tratamento de quadros clínicos graves de salmonelose, que estão muitas vezes associados a surtos de DTA em vários países, incluindo o Brasil (BRASIL, 2012).

Um estudo da monitoria da prevalência e do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em *Salmonella*, isoladas de carcaças congeladas no Brasil, revelou que 76,8% das cepas foram classificadas como multirresistentes, por apresentarem resistência a três ou mais classes de antimicrobianos, tendo sido reconhecidos 98 perfis de multirresistência. Quando distribuídos por classes de antimicrobianos,

aponta-se um quadro preocupante especialmente em relação a *S. Enteritidis*, com 31,1% das cepas multirresistentes a  $\geq 5$  classes, e *S. Typhimurium*, com 27,7%. Um aspecto mais preocupante ainda se refere à evidenciação em uma cepa de *S. Enteritidis* com resistência a seis classes de antimicrobianos, envolvendo resistência a 16 antimicrobianos, entre as quais se encontram incluídas drogas de última geração, empregadas no tratamento da salmonelose humana. Quando esta cepa de *S. Enteritidis* foi avaliada por reação em cadeia da polimerase (PCR) para evidenciação de diferentes genes, mostrou resultados negativos, indicando a possível localização extracromossomal e consequente perda (BRASIL, 2012).

No Brasil, um estudo realizado por Ribeiro et al. (2008) com cepas de *S. Enteritidis* isoladas de amostras de origem avícola, verificou que 82,3% (65/79) das amostras foram resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos utilizados, apresentando 19 perfis de resistência. Dentre as 65 amostras de *S. Enteritidis* resistentes, 43 (66,1%) apresentaram resistência a dois ou mais agentes antimicrobianos e 22 (33,8%) a somente um, havendo maior número de cepas resistentes à tetraciclina (67,1%).

*Salmonella* não-tifóide causa aproximadamente 1,2 milhões de doentes, 23.000 hospitalizações e 450 mortes nos Estados Unidos, gerando custos médicos diretos estimados em \$365 milhões anualmente. Ao avaliar estes isolados, o CDC tem observado resistência à ceftriaxona em cerca de 3% das cepas e um nível de resistência à ciprofloxacina de aproximadamente 3%. Cerca de 5% de *Salmonella* não tifóide testada pelo CDC são resistentes a cinco ou mais tipos de fármacos (CDC, 2014a).

Nos EUA foi registrado um surto de infecções por *Salmonella* 1 4,[5],12:i:-, cuja fonte provável foi a carne suína contaminada. Neste surto, 10 isolados deste sorovar foram submetidos ao teste de resistência antimicrobiana e todos apresentaram perfis de multirresistência para as drogas ampicilina, estreptomicina, sulfisoxazol e tetraciclina (CDC, 2015b).

Outro surto, ocorrido em diferentes Estados dos EUA no ano de 2015, teve como agente etiológico *S. Enteritidis*, e a possível fonte de infecção identificada foi a carne de frango. Todas as cepas testadas apresentaram resistência à ampicilina e tetraciclina (CDC, 2015a).

A determinação do perfil de resistência das cepas de *Salmonella* é importante para o estabelecimento de suas características tanto dentro da cadeia produtiva do

frango, como também na medicina humana, a qual utiliza destes agentes antimicrobianos para tratamento de infecções mais graves de salmonelose. A partir destes resultados é possível fazer uma correlação do uso dessas drogas em ambas as áreas baseado nas características de resistência obtidas. Além disto, a construção destes perfis de resistência aos antimicrobianos tem ainda importante aplicação para a tipagem de *Salmonella*, tendo maior valor em clones multirresistentes, e sempre em combinação com métodos moleculares (HELMUTH et al., 1985). A caracterização genotípica e o monitoramento da resistência, representam valiosas ferramentas na epidemiologia de *Salmonella* sp, permitindo o conhecimento quanto a fonte de disseminação em sorovares de importância em saúde pública (BRASIL, 2012).

### **3.6.10 Avaliação da susceptibilidade antimicrobiana em *Salmonella***

Entre os testes de sensibilidade antimicrobiana mais utilizados, pode-se citar os métodos da difusão com disco de antibiótico e a concentração inibitória mínima. A difusão com disco ou antibiograma é o método mais comumente utilizado nos laboratórios, pois oferece um resultado qualitativo com baixo custo e relativa rapidez. Porém, cada vez mais, as metodologias com resultados quantitativos, que determinam a concentração inibitória mínima (CIM), têm sido escolhidas como complementares ou substitutas do método qualitativo (MIMICA; MENDES; MIMICA, 2008). A utilização do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão permite fazer um monitoramento geral da resistência, e pela determinação da concentração inibitória mínima obtém-se resultados mais precisos quanto às doses mínimas da droga capaz de impedir o crescimento dos micro-organismos. Estes dois métodos associados atuam como ferramentas de grande importância para caracterização das cepas circulantes (BRASIL, 2012).

O método de disco difusão tem como vantagem a sua grande flexibilidade na escolha dos antimicrobianos, seu baixo custo, sua constante padronização metodológica pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) e sua fácil interpretação. Sua maior limitação são os resultados qualitativos, ou seja, o micro-organismo é avaliado como sensível, intermediário ou resistente aos diversos antimicrobianos testados. A vantagem das outras metodologias é o resultado

quantitativo, ou seja, a informação da CIM dos agentes antimicrobianos diante do micro-organismo testado (MIMICA; MENDES; MIMICA, 2008).

O *Etest®* é um novo conceito para testes quantitativos de sensibilidade, baseado em um gradiente predefinido do antimicrobiano incorporado em uma fita plástica, usado para determinar a CIM (MIMICA; MENDES; MIMICA, 2008).

O monitoramento periódico e cuidadoso da resistência bacteriana por meio de estudos epidemiológicos em uma determinada região é muito importante para estabelecer o início do tratamento, assim como também para a vigilância de eventual emergência de resistência. Atenção especial para resultados não habituais de perfil de resistência também é fundamental para a detecção precoce de eventuais novos mecanismos de resistência bacteriana (MIMICA; MENDES; MIMICA, 2008).

O monitoramento contínuo da resistência antimicrobiana, pela utilização dessas ferramentas, é extremamente importante e necessário para a indústria avícola, para avaliação do uso responsável dos agentes antimicrobianos, baseado na compreensão da ecologia da resistência, da transmissão de bactéria resistente e de genes de resistência, além de possibilitar a avaliação da relação entre o uso do antimicrobiano e o aumento da resistência (TURNIDGE, 2004).

### **3.7 Características de virulência em *Salmonella***

As bactérias patogênicas se diferenciam de outras não patogênicas devido à presença e expressão de genes que codificam os fatores de virulência, que possibilitam ao patógeno a habilidade em causar a doença no hospedeiro. Estes fatores são reconhecidos por propiciar ao micro-organismo a invasão e colonização das células do hospedeiro, determinando uma série de eventos que desencadeiam a doença (VIEIRA, 2009).

Ao longo do processo de infecção, a *Salmonella* encontra diversos ambientes hostis no hospedeiro, necessitando ainda sobreviver às defesas do sistema imune. Para adaptar a estas condições, o patógeno precisa de um grande número de genes responsáveis pela adaptação da bactéria à célula e para que ela supere os mecanismos de defesa do hospedeiro (HACKER; CARNIEL, 2001). 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 (ZHANG, 2013).

Os genes de virulência das salmonelas podem ser cromossômicos e plasmideais. A maioria destes genes está localizada em grandes regiões do cromossomo, denominadas ilhas de patogenicidade em *Salmonella* (IPS). São conhecidas cinco IPS (IPS-1, IPS-2, IPS-3, IPS-4 e IPS-5), sendo a IPS-1 a mais bem estudada (FERREIRA; CAMPOS, 2008). Acredita-se que esses genes foram adquiridos ao longo do tempo, por meio da incorporação de material genético de outras bactérias (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Uma das primeiras etapas relacionada à patogenicidade da *Salmonella* spp. é sua capacidade de aderir às células do hospedeiro, na qual as fímbrias exercem um papel extremamente importante. A partir desta adesão haverá invasão e colonização das células intestinais, além de ser responsável pela persistência ambiental e formação de biofilmes (BISHOP; DOUGAN; BAKER, 2006; GIBSON et al., 2007).

Existem diferentes tipos de fímbrias, dentre elas, as fímbrias do tipo I (Fim), fímbrias codificadas por plasmídeos (*Plasmid Encoded Fimbriae* – PEF), fímbria polar longa (*Long Polar Fimbriae* – LPF) e fímbrias agregativas (*Aggregative fimbriae* – AGF), sendo que cada uma destas possui tropismo por diferentes tipos de células em diferentes hospedeiros. Os sorovares de *Salmonella* pertencentes ao grupo D<sub>1</sub>, incluindo *S. Enteritidis*, ainda possuem a fímbria *Salmonella Enteritidis* (*Salmonella Enteritidis Fimbriae* – SEF) (DARWIN; MILLER, 1999).

A fímbria polar longa é a maior das fímbrias descritas, está localizada polarmente na célula bacteriana, e é codificada pelo gene *lpfA*. O operon *lpfABCDE* é constituído de cinco genes, e foi identificado pela primeira vez em *S. Typhimurium*, sendo exclusivamente identificado no gênero *Salmonella*, e ausente nas demais enterobactérias. No entanto, o operon *lpf* não é conservado em todos os sorovares de *Salmonella*, provavelmente devido à seleção entre bactérias com e sem o gene em diferentes hospedeiros. Este operon está relacionado com a capacidade de adesão da *Salmonella* às células M do intestino. Além disto, esta fímbria pode conferir imunidade cruzada entre os diferentes sorovares de *Salmonella* (BÄUMLER; HEFFRON, 1995; BÄUMLER et al., 1997; NORRIS; BÄUMLER, 1999).

O operon *agf* é descrito por codificar a fímbria SEF17 ou Tafi (*Thin Aggregative Fimbriae*), a qual é conservada na maioria dos sorovares de *Salmonella*. O gene *agfA* é responsável por codificar a subunidade AgfA da fímbria agregativa, cuja função principal é promover a interação inicial da bactéria com o intestino do hospedeiro (SUKUPOLVI et al., 1997). Esta fímbria também está

relacionada com a autoagregação da *Salmonella* spp., mecanismo que permite aumentar a sobrevivência da bactéria frente aos ácidos estomacais do hospedeiro, e de outros agentes bactericidas, uma vez que a agregação reduz a superfície de contato do patógeno (COLLINSON et al., 1993). Outra importante função desta fímbria está relacionada com a formação de biofilmes por facilitar a adesão da bactéria à superfície (WHITE et al., 2003).

O operon *sef* é composto por quatro genes (*sefABCD*) responsáveis pela translocação e formação da fímbria SEF14, uma das principais do gênero *Salmonella*, cuja função está relacionada com as etapas de infecção posteriores a colonização do epitélio intestinal do hospedeiro, sendo considerada essencial para a aderência ou sobrevivência da bactéria em macrófagos (EDWARDS; SCHIFFERLI; MALOY, 2000). Esta fímbria contém quatro subunidades protéicas denominadas SefA, SefB, SefC e SefD. O gene *sefA* codifica a maior subunidade da proteína SefA (MIRMOMENI; KIANI; SISAKHTNEZHAD, 2008). Além de estar associado com a produção de fímbria, o gene *sefA* também está envolvido com a adesão do micro-organismo à certas regiões do aparelho gastrointestinal do hospedeiro, mais especificamente à região da placa de *Peyer* no intestino delgado (LIU et al., 2011). Este gene está restrito aos sorovares de *Salmonella* pertencentes ao grupo D<sub>1</sub>, no qual está contido *S. Enteritidis* (TURCOTTE; WOODWARD, 1993).

Para dar início ao processo de invasão da célula do hospedeiro é necessária que anteriormente aconteça a adesão, sendo estas etapas primordiais para a patogenicidade de *Salmonella* spp.

Na IPS-1 estão localizados os genes necessários para invasão, chamados de *inv* (*invasive*), que são responsáveis pela formação de ondulações na superfície da membrana da célula eucariótica, denominada *ruffles*, as quais acabam levando a internalização da bactéria pela célula do hospedeiro, característica importante para virulência de *Salmonella* (FERREIRA; CAMPOS, 2008). Estudos demonstram ainda, que micro-organismos que contém este gene também são capazes de induzir apoptose em macrófagos infectados (GROISMAN; OCHMAN, 1997). A IPS-1 está presente em *S. bongori* e em todos os sorovares de *S. enterica* subsp. *enterica* (HENSEL, 2004). A IPS-1 e IPS-2 são as mais importantes para a virulência de *S. Enteritidis* em galinhas, associadas a um aumento significativo na colonização do fígado e baço por este sorovar (RYCHLIK et al., 2009).

No operon *invABCD* está localizado o gene *invA*, o qual codifica a proteína InvA da membrana interna da bactéria, sendo essencial para a invasão das células epiteliais do hospedeiro. Este gene foi descrito por muito tempo como sendo conservado dentre os sorovares de *Salmonella*, e por ser considerado específico deste gênero, foi utilizado como gene alvo para sua detecção pelo uso da técnica de PCR (OLIVEIRA et al., 2003; SALEHI; MAHZOUNIEH; SAEEDZADEH, 2005).

Em um estudo desenvolvido com cepas de *S. Enteritidis* provenientes de diferentes amostras avícolas, o gene *invA* foi identificado em 97% (OKAMOTO et al., 2009). Rowlands et al. (2014) detectaram a presença do gene em 100% das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos no Brasil.

Borges et al. (2013), ao analisarem cepas de *S. Enteritidis* isoladas de diferentes amostras provenientes de aves no sul do Brasil, identificaram os genes *invA* e *sefA* em 100% dos isolados, *lpfA* em 99% e *agfA* em 96%. Verificaram ainda que todas as cepas tinham pelo menos dois genes fimbriais, destacando a importância da fímbria no processo de infecção.

Apesar de todos os sorotipos de *Salmonella* spp. serem considerados como potencialmente patogênico, existem algumas diferenças na sua virulência (KARASOVA et al., 2009). Isso porque a bactéria pode perder e adquirir novos fatores de virulência ao longo do tempo, a fim de adaptar-se a novos hospedeiros ou ao ambiente (BÄUMLER et al., 1997; SUEZ et al., 2013). O conhecimento destas características permite uma melhor abordagem no estudo da virulência de *Salmonella*. Pesquisas sobre a participação de cada gene na patogênese desta bactéria torna possível estabelecer critérios para prever a virulência deste micro-organismo (BORGES et al., 2013).

### **3.8 Métodos de tipagem molecular de *Salmonella***

Métodos de tipagem molecular têm sido amplamente utilizados com o objetivo de realizar a caracterização bacteriana, permitindo a análise de diferenças e similaridades entre amostras bacterianas, ou ainda, para se verificar a origem e disseminação das cepas. Com os dados obtidos a partir destas análises, pode-se construir dendogramas que mostram a similaridade existente entre amostras filogeneticamente próximas. A utilização destas ferramentas de tipagem permite o rastreamento de determinado micro-organismo em investigações epidemiológicas,

fornecendo informações importantes sobre a característica do patógeno. Alguns destes métodos estão descritos abaixo.

### **3.8.1 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)**

Esta técnica é também conhecida por amplificação randômica de DNA polimórfico. Sua metodologia consiste na amplificação do DNA utilizando sequências de iniciadores ou *primers* escolhidos aleatoriamente, com baixa relação de complementariedade ao DNA alvo. A reação ocorre em condições de baixa estringência, permitindo aos *primers* se anelarem em vários locais das duas fitas do DNA, obtendo assim inúmeros fragmentos amplificados, revelando assim a diversidade genética entre os micro-organismos (MARTINEZ; TADDEI, 2008; QUINTAES et al., 2002).

Desta forma, no RAPD, um ou mais *primers* de sequência curta (10-25 bases) se ligam a múltiplos locais ao longo do genoma, a baixas temperaturas, sem a necessidade de nenhum conhecimento prévio da sequência de DNA que se pretende analisar, e produzem um perfil de produtos amplificados de tamanhos variados, característicos do DNA molde de uma determinada amostra (HILTON; BANKS; PENN, 1997; LIN et al., 1996; MEUNIER; GRIMONT, 1993).

Um inconveniente desta técnica é a ocorrência de eventos genéticos randômicos, incluindo pontos de mutação, inserções e deleções do DNA, o que pode alterar o padrão de tipagem do RAPD (QUINTAES et al., 2002).

RAPD, entre outros procedimentos de tipagem genética, tem se mostrado uma ferramenta útil para rastrear epidemiologicamente *Salmonella* e distinguir cepas de diferentes origens geográficas. Também representa uma metodologia importante para avaliação filogenética de cepas isoladas de surtos em humanos e de origem avícola (SMITH et al., 2011). Por isso, tem sido bastante aplicado para análise genética deste patógeno, sendo recomendado como alternativa a outros métodos de tipificação (JOHNSON et al., 2001).

Lin et al. (1996) aplicaram a técnica de RAPD para tipagem de amostra de *S. Enteritidis* isoladas de diferentes fontes. Os resultados obtidos foram comparados frente à caracterização das mesmas amostras por fagotipificação, ribotipificação e PFGE. A partir dos resultados obtidos empregando as quatro técnicas, os autores concluíram que a RAPD emerge como uma técnica molecular particularmente

atrativa quando se considera seu poder discriminatório e facilidade de aplicação. Turki et al. (2014) também fizeram uso de cinco diferentes técnicas de análise filogenética (PFGE, RAPD, ERIC, ribotipagem e perfil plasmidial) para estudo de cepas de *Salmonella* enterica sorovar Kentucky, de diferentes origens provenientes da África, Ásia e Europa. Os resultados mostraram um maior poder discriminatório para as técnicas de RAPD e ERIC, e 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.

Betancor et al. (2004) afirmam que quando sequências iniciadoras adequadas são utilizadas, as análises por RAPD fornecem resultados rápidos e reproduzíveis, sendo considerada uma importante ferramenta na tipificação de *S. Enteritidis*.

Pelo fato desta técnica detectar diversidade na sequência do DNA total e não requerer qualquer conhecimento específico da sequência de DNA do micro-organismo alvo, é considerada uma ferramenta flexível que tem um grande poder e aplicabilidade geral. Além disso, o método é mais rápido e tecnicamente menos exigente que a maioria dos outros métodos de tipagem molecular (REZK et al., 2012). A eficácia, rapidez e flexibilidade deste método permite então sua ampla utilização em estudos epidemiológicos moleculares (SOTO et al., 1999).

Rezk et al. (2012), ao fazerem o uso do método para a tipagem de *Salmonella* Typhi no Egito, sugeriram que RAPD tem bom poder discriminatório, é fácil de interpretar e constitui num método de baixo custo para tipagem das cepas avaliadas.

O resultado da combinação do uso da tipagem por RAPD com testes de susceptibilidade aos antibióticos foi uma abordagem discriminatória confiável para diferenciar *Salmonella* para fins epidemiológicos no Irã (MADADGAR et al., 2008). A associação das duas técnicas é apropriada na rotina devido a sua simplicidade e alta velocidade, para confirmar em um pequeno período se um grupo de isolados estão relacionados, permitindo, portanto, implantação de medidas de saúde pública necessária para controlar processos infecciosos, sendo um complemento às técnicas tradicionais, já que estas não são suficientemente discriminatórias no controle de surtos alimentares produzidos por micro-organismos (RUIZ et al., 2003).

A reproduzibilidade é a principal desvantagem do RAPD, podendo este problema ser resolvido trabalhando-se sob as mesmas condições para amplificar e

detectar cepas (RUIZ et al., 2003). Esta desvantagem torna-se irrelevante quando se estuda cepas já caracterizadas dentro de espaço e tempo limitado, em que as comparações com cepas independentes oriundas de outras localidades são desnecessárias. Por conseguinte, 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).

### **3.8.2 Ribotipagem automatizada**

No DNA das bactérias, cada *operon* do RNA ribossômico consiste de três genes que codificam a molécula estrutural do RNA ribossomal (RNAr), sendo eles 16S, 23S e 5S. Estes genes contêm sequências altamente conservadas dentro dos gêneros ou famílias bacterianas. O gene 16S é o mais conservado dos três genes RNAr, é encontrado em todas as bactérias e tornou-se o padrão universal para a identificação e classificação taxonômica de espécies bacterianas (BOUCHET; HUOT; GOLDSTEIN, 2008). Entre as espécies bacterianas, o comprimento médio dos genes RNAr estruturais é 1522 pb, 2971 pb e 120 pb, para 16S, 23S e 5S, respectivamente (GUTELL; NOLLER; WOESE, 1986). Os RNAr encontram-se associados ao longo de todo o DNA bacteriano. Desta forma, é possível obter perfis de bandas quando o cromossomo é clivado por enzimas de restrição. A detecção deste polimorfismo é feita com a hibridização dos fragmentos obtidos com o uso de uma sonda específica de RNAr. Esta técnica é conhecida por ribotipagem e possui algumas vantagens quando comparada com a tipagem de DNA, como por exemplo: os genes de RNAr aparecem em várias cópias diferentes em sítios diferentes no genoma, com diferentes regiões de flanqueamento; há uma grande variabilidade entre os genes do RNAr 16S e 23S, além da variabilidade das regiões entre os genes 16S e 23S. A ribotipagem permite que os perfis de bandas resultantes possam ser comparados para determinar sua relação filogenética e evolucionária (MARTINEZ; TADDEI, 2008).

O conhecimento da conservação intra-espécies da sequência do gene 16S RNAr e a estrutura do operon ribossomal 16S-23S-5S levou Grimont e Grimont (1986) para os primeiros conhecimentos da utilidade do desenvolvimento da ribotipagem para a classificação bacteriana. Esta técnica tem como princípio avaliar

o polimorfismo do DNA bacteriano na região onde se localiza o operon *rrn*, composto pelos genes 16S e 23S, que codificam o RNAr bacteriano. Como estes genes são altamente conservados nas espécies bacterianas permite que esta técnica seja aplicada com sucesso para diferenciar cepas bacterianas (GRIMONT; GRIMONT, 1986).

Baseado nestes conhecimentos fundamentais, buscou-se elucidar a base genética molecular da ribotipagem, a qual consiste na extração e purificação do DNA total da bactéria, seguido da sua clivagem pela endonuclease de restrição (digestão do DNA com enzimas de restrição) e separação eletroforética dos fragmentos. Após, é realizada a transferência do DNA para uma membrana (“*Southern blot*”), e hibridização dos fragmentos de DNA transferidos com uma sonda operon ribossomal radiomarcada. Estas sondas são derivadas das sequências altamente conservadas dos genes que codificam o RNAr para tipificação de bactérias, e permitem a caracterização das cepas com base na localização e número de cópias de seus genes RNAr (GRIMONT; GRIMONT, 1986; MARTINETTI; ALTWEGG, 1990; RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2007). Por fim é realizada a autoradiografia, ou revelação do padrão de bandas (DARINI; MAGALHÃES; CROTT, 1998).

Após autoradiografia, apenas as bandas contendo uma porção do operon ribossomal são visualizadas. O número de fragmentos gerados pela ribotipagem é um reflexo da multiplicidade de operons RNAr presentes em uma espécie bacteriana. Os números de cópias de operons ribossomais RNAr em espécies bacterianas variam de 1 a 15 e é normalmente constante dentro da espécie (KLAPPENBACH et al., 2001).

Dentre as aplicações da técnica de ribotipagem pode-se citar, a classificação taxonômica (GRIMONT; GRIMONT, 1986), monitoramento epidemiológico, distribuição geográfica, biologia e filogenia da população (HOLMES et al., 1999; SUN et al., 1995).

A técnica de ribotipagem apresenta grandes vantagens quando comparada a outros métodos que utilizam sondas genéticas. São elas: 1) todas as bactérias possuem o operon *rrn* e dessa forma codificam o RNAr, que é altamente conservado entre as espécies, permitindo assim que uma única sonda genética seja utilizada para todas as espécies bacterianas (sonda universal); 2) pelo fato da maioria das espécies bacterianas possuírem múltiplos operons *rrn*, um número razoável de bandas é obtido com a hibridização (BINGEN; DENAMUR; ELION, 1994).

Aproveitando todas as vantagens da técnica de ribotipagem, uma empresa americana (Qualicon, Wilmington, DE, EUA) desenvolveu um equipamento que realiza a ribotipagem de forma automatizada, denominado *RiboPrinter® Microbial Characterization System*. Ele foi desenvolvido inicialmente para atender as necessidades da indústria alimentícia, e nos últimos anos vem sendo utilizado também com êxito na identificação e caracterização de bactérias relacionadas às doenças humanas (BRUCE, 1996).

Métodos baseados na restrição do DNA têm sido frequentemente adotados para monitoria da disseminação de *Salmonella* dentro da cadeia produtiva de alimentos, podendo identificar cepas envolvidas na infecção humana e dar informações epidemiológicas sobre as relações genéticas entre sorotipos. Desta forma, a ribotipagem tem sido empregada pelos laboratórios de referência mundial, como um método molecular imprescindível para investigação epidemiológica, pela detecção da fonte de infecção (MARTINS et al., 2006).

Devido à importância da precisão e do tempo na caracterização, identificação e eventual eliminação de micro-organismos indesejáveis para a indústria de alimentos, o sistema automatizado *RiboPrinter®* foi desenvolvido para reduzir o tempo envolvido em cada etapa de análise, sendo necessárias apenas oito horas para a obtenção de resultados precisos e confiáveis (BRUCE, 1996).

Estudos demonstram que *Salmonela* pode ser bem caracterizada pela ribotipagem automatizada utilizando tanto a enzima de restrição *EcoRI* (HILTON; PENN, 1998; OSCAR, 1998) quanto *Pvull* (BAILEY et al., 2002; FRITSCHEL, 2001). No entanto, Decesare et al. (2001) afirmam que a enzima *Pvull* proporcionou melhor discriminação quando se estudou *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

A ribotipagem tem sido descrita por ter um menor poder discriminatório que a técnica de PFGE (LIEBANA et al., 2001), no entanto, pode fornecer a informação que identifica associações reais não detectadas por análise exclusiva de PFGE, particularmente, quando os dados epidemiológicos são limitados (QUALE et al., 2001).

Este sistema permite realizar a rastreabilidade completa do micro-organismo em questão, identificando a fonte e causa da contaminação de maneira direta e indubitável, pois fornece um perfil genético de cada uma das bactérias implicadas, permitindo que as bactérias com o ribogrupo coincidente sejam identificadas e a causa do problema prevenida e/ou eliminada. Este sistema consiste em um avanço

tecnológico com relação à comodidade, reproduzibilidade e velocidade de realização (BOUCHET; HUOT; GOLDSTEIN, 2008).

## CAPÍTULO 2

***Salmonella* Infantis isolada na cadeia produtiva brasileira do frango de corte  
representa perigo para a saúde humana**

Artigo a ser publicado no periódico  
**Pesquisa Veterinária Brasileira**

# Salmonella Infantis isolada na cadeia produtiva brasileira do frango de corte representa perigo para a saúde humana<sup>1</sup>

Eliane P. Mendonça<sup>2</sup>, Roberta T. Melo<sup>2</sup>, Milene R. M. Oliveira<sup>2</sup>, Daise A. Rossi<sup>2</sup>

**ABSTRACT** - Mendonça E.P., Melo R.T., Oliveira M.R.M., Rossi D.A. 2015. **[Salmonella Infantis isolated in the brazilian productive chain of broiler indicates harm to human health]** *Salmonella* Infantis isolada na cadeia produtiva brasileira do frango de corte representa perigo para a saúde humana. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Ceará s/n, Bloco 2D, sala 43, Bairro Umuarama, Uberlândia, MG, 38402-018, Brasil. E-mail: [eliane\\_vet@yahoo.com.br](mailto:eliane_vet@yahoo.com.br)

*Salmonella* Infantis is frequently associated with human infections worldwide and is transmitted by consumption of contaminated foods, particularly those of animal origin, especially the chicken meat. It was aimed to evaluate virulence characteristics, antimicrobial resistance and the genetic similarity of 51 strains of *S. Infantis* isolated from poultry origin samples. The strains were isolated from 2009 to 2010 in a company with full cycle of broiler's production in the state of São Paulo, Brazil. It was performed the antimicrobial susceptibility test and, by PCR, we evaluated the presence of *invA* (invasion), *lpfA* (hem-adhesion), *agfA* (hem-biofilm) and *sefA* (hem-adhesion) and resistance genes to beta-lactams (*blatem*, *blashv*, *blactx-M* and *blaAmpC*). The phylogenetic relationship was determined by RAPD-PCR method. Among the drugs tested, the highest percentages of resistance were to amoxicillin (35.3%) and to sulfonamide (15.7%). Eleven antimicrobial resistance patterns were identified (A1 to A11), 27 (52.9%) were resistant or with intermediately resistant strains to one or two drugs, there being no isolates with multiresistant profile ( $\geq 3$  antimicrobials classes). There was 100% positivity for the *invA* and *agfA* genes, 92.2% for the *lpfA* gene, and no strain presented the *sefA* gene, considering that 92.2% of the strains were positive to *invA*, *agfA* and *lpfA* genes concurrently, and 7.8% to *invA* and *agfA*. Of the 18 (35.3%) strains resistant to

<sup>1</sup> Recebido em .....

Aceito para publicação em .....

<sup>2</sup> Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Av. Ceará s/n, Bloco 2D, Sala 43, Bairro Umuarama, Uberlândia, MG 38402-018, Brasil.

\*Autor para correspondência: [eliane\\_vet@yahoo.com.br](mailto:eliane_vet@yahoo.com.br)

antimicrobials of the  $\beta$ -lactam class, 10 (55.5%) were positive to *blaAmpC* gene, five (27.8%) for *blactx-M*, two (11.1%) to *blasHV* and no strain presented the *blaTEM* gene. The phylogenetic evaluation has shown the presence of five clusters (A, B, C, D and E) with similarity greater than 80%, and three distinct strains **que não foram agrupadas em nenhum dos clusters**. Cluster B grouped 33 strains, all positive for *invA*, *lpfA* and *agfA* genes, from both, the aviary and the slaughterhouse, persistent throughout all the study period. This cluster also grouped 18 strains clones with genetic similarity greater than 99%, all isolated in the slaughterhouse. The presence of virulence genes associated with persistent clones strains for a long period, warns to the *S. Infantis* ability to form biofilm, and should be constantly monitored in broilers' production chain, in order to minimize contamination of the final product and the risks to public health.

INDEX TERMS: Resistance genes, Virulence genes, RAPD-PCR, Antimicrobial Resistance, Salmonellosis.

**RESUMO** - *Salmonella* Infantis é frequentemente associada a infecções humanas no mundo todo, sendo transmitida pelo consumo de alimentos contaminados, principalmente aqueles de origem animal, com destaque para a carne de frango. Objetivou-se avaliar características de virulência, resistência antimicrobiana e a similaridade genética de 51 cepas de *S. Infantis* isoladas em amostras de origem avícola. As cepas foram isoladas no período de 2009 a 2010 em uma empresa com ciclo completo de produção de frango de corte, localizada no Estado de São Paulo, Brasil. Foi realizado o teste de susceptibilidade antimicrobiana e, pela técnica de 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 (*blaTEM*, *blasHV*, *blactx-M* e *blaAmpC*). A relação filogenética foi determinada pelo método de RAPD-PCR. Dentre as drogas testadas, os maiores percentuais de resistência foram para amoxacilina com 35,3% e sulfonamida com 15,7%. Onze perfis de resistência aos antimicrobianos foram identificados (A1 a A11), sendo 27 (52,9%) cepas resistentes ou com resistência intermediária a uma ou duas drogas, não havendo isolados com perfil de multirresistência ( $\geq 3$  classes de antimicrobianos). Houve 100% de positividade para os genes *invA* e *agfA*, e 92,2% para o gene *lpfA* e nenhuma cepa apresentou o gene *sefA*, sendo que 92,2% das cepas foram positivas para os genes *invA*, *agfA* e *lpfA*.

concomitantemente, e 7,8% para *invA* e *agfA*. Das 18 (35,3%) cepas resistentes aos antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, 10 (55,5%) foram positivas para o gene *bla<sub>AmpC</sub>*, cinco (27,8%) para *bla<sub>CTX-M</sub>*, duas (11,1%) para *bla<sub>SHV</sub>* e nenhuma cepa apresentou o gene *bla<sub>TEM</sub>*. A avaliação filogenética demonstrou a presença de cinco *clusters* (A, B, C, D e E) com similaridade superior a 80%, e três cepas distintas, que não foram agrupadas em nenhum dos *clusters*. O *cluster* B agrupou 33 cepas, todas positivas para os genes *invA*, *lpfA* e *agfA*, provenientes tanto do aviário quanto do matadouro frigorífico, persistentes durante todo o período do estudo. Este *cluster* ainda agrupou 18 cepas clones com similaridade genética superior a 99%, todas isoladas no matadouro frigorífico. A presença dos genes de virulência, associada à persistência das cepas clones durante um longo período do estudo, alertam para a capacidade de *S. Infantis* em formar biofilme, devendo ser constantemente monitorada na cadeia de produção avícola, especialmente no ambiente de abate, de modo a minimizar a contaminação do produto final e os riscos para a saúde pública.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Genes de resistência, Genes de virulência, RAPD-PCR, Resistência antimicrobiana, Salmonelose.

## INTRODUÇÃO

Salmonelose é uma das mais comuns doenças de origem alimentar, considerada uma zoonose complexa que afeta a saúde pública mundial, sendo no Brasil, a causa primária dos surtos em que há identificação do agente etiológico (BRASIL 2014). O trato intestinal de uma ampla variedade de animais é reservatório da bactéria, a qual ainda pode sobreviver em ambientes diversos, o que explica seu alto potencial de disseminação. O frango de corte é um dos principais reservatórios deste patógeno, sendo alta a frequência de contaminação do produto final no matadouro frigorífico (EFSA 2014, EFSA 2015). Assim, o consumo da carne de frango é considerado um fator de risco para infecção humana por *Salmonella* (FAO-WHO 2009).

São conhecidos mais de 2.600 sorotipos de *Salmonella*, porém, um número limitado está associado com a maioria das doenças humanas, podendo a prevalência de diferentes sorovares mudar ao longo do tempo (EFSA 2014). Desde o final da década de 70, o sorovar *Infantis* tem sido cada vez mais registrado em países como Argentina, Austrália, Brasil, Holanda, Finlândia, Canadá, Hungria, Japão, Nova Zelândia e Rússia

(Miller et al. 2010). Juntamente com *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, *S. Infantis* vem sendo reportado pelo envolvimento em casos humanos da doença, e por ser o mais frequentemente isolado tanto na ave viva quanto na carne de frango (EFSA 2015). No Brasil, este sorovar também está entre aqueles mais isolados em amostras oriundas de granjas produtoras de frango de corte (Medeiros et al. 2011, Voss-Rech et al. 2015).

A utilização em longo prazo de antimicrobianos na criação de animais exerce pressão de seleção sobre as bactérias, favorecendo assim a sobrevivência de cepas de *Salmonella* resistentes, as quais podem ser transferidas para o homem pelo consumo de alimentos contaminados, podendo levar ao fracasso da antibioticoterapia (Lai et al. 2014). A dinâmica da transmissão da resistência e a evolução de populações de bactérias resistentes são difíceis de elucidar e estão associadas à transferência genética dos chamados genes de resistência (Alekshun & Levy 2007). Várias autoridades internacionais em saúde consideram a ocorrência de resistência antimicrobiana em micro-organismos zoonóticos como um dos principais problemas emergentes de importância para a saúde pública (Moore et al. 2006).

Os mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade de *Salmonella* sp. também são complexos e, investigações sobre fatores de virulência, mostraram que estirpes patogênicas distinguem-se daquelas não patogênicas pela presença de genes específicos de patogenicidade, os quais estão localizados nas chamadas Ilhas de Patogenicidade (IP) (Kaur & Jain 2012). Além disto, sabe-se que há uma diferenciação genética em isolados do mesmo sorotipo, determinando variações para a virulência em diferentes cepas (Borges et al. 2013). Estes genes propiciam ao micro-organismo a adesão, invasão, colonização, sobrevivência e multiplicação nas células do hospedeiro, determinando uma série de eventos que desencadeiam a doença (Suzuki 1994, Vieira 2009). O gene *invA* codifica a produção de proteínas do sistema de secreção do tipo III, relacionadas com a invasão de *Salmonella* na célula do hospedeiro (Valdez et al. 2009). Há muitos tipos de fímbrias que mediam a adesão intestinal de *Salmonella* incluindo a fímbria polar longa (Lpf), fímbria agregativa (Agf), cujo operon é altamente conservado entre os isolados deste patógeno, e a fímbria *Salmonella* Enteritidis (Sef), identificada apenas nos sorotipos do grupo D (Bäumler et al. 1997).

A avaliação da disseminação de patógenos ao longo da cadeia produtiva de alimentos é de grande importância para que as indústrias possam atuar na prevenção e na implantação de programas mais eficazes de controle. Métodos de tipagem molecular

de *Salmonella* vêm sendo amplamente utilizados a fim de estabelecer a relação filogenética entre isolados bacterianos e fornecem importantes dados para o entendimento da epidemiologia. Neste sentido, a técnica de *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD-PCR) se destaca por ser uma ferramenta muito utilizada para estudos epidemiológicos em vários países por seu alto poder discriminatório (Turki et al. 2014, Vázquez-Garcidueñas et al. 2014).

Objetivou-se nesse estudo avaliar as características de resistência e virulência em cepas de *S. Infantis* isoladas de amostras de origem avícola, desde o ambiente de criação do frango de corte até o matadouro frigorífico, além de avaliar sua disseminação dentro da cadeia produtiva, visando estimar o perigo que estas representam para a saúde humana.

## MATERIAL E MÉTODOS

As cepas de *S. Infantis* eram provenientes de um estudo prévio que monitorou *Salmonella* spp. em duas unidades de uma mesma empresa, com ciclo completo de produção do frango de corte e sistema de integração, localizadas no Estado de São Paulo (SP) e Mato Grosso do Sul (MS), durante o período de 2009 a 2010. O matadouro era fiscalizado pelo serviço de inspeção federal e a carne de frango produzida era comercializada em todo o território nacional e exportada. As amostras foram colhidas em todas as etapas do ciclo de produção, desde o ambiente de criação das aves até o produto final industrializado, pronto para o comércio, incluindo amostras do ambiente de abate.

Do total de 239 cepas, 187 foram isoladas em SP e 52 em MS. *S. Infantis* não foi identificada na unidade de MS, porém, em SP, foi o sorovar mais prevalente, representando 27,27% (51/187) dos isolados.

Dentre as 51 cepas de *S. Infantis* utilizadas neste estudo, 14 foram isoladas no ambiente dos aviários de frango de corte (amostras de propé e suabe de arrasto do galpão quando os frangos estavam com aproximadamente 30 dias). Trinta e sete amostras foram provenientes do matadouro frigorífico e colhidas nos pontos exigidos pelo Programa de Redução de Patógenos - PRP (BRASIL 2003) e, adicionalmente, outros pontos que apresentavam maior frequência de isolamento de *Salmonela* na rotina das indústrias estudadas, incluindo amostras de cortes cárneos (21), carcaça inteira (3),

miúdo (1), carne mecanicamente separada (CMS) (10), água de escaldagem (1) e água dos tanques de pré-resfriamento (*chiller*) (1).

A tipificação antigênica foi realizada pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no Estado do Rio de Janeiro.

A susceptibilidade das cepas aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco difusão, utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2013). 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: amoxacilina (10 $\mu$ g) ( $\beta$ -lactâmico/penicilina), norfloxacino (10 $\mu$ g) (fluorquinolona), neomicina (30 $\mu$ g) (aminoglicosídeo), gentamicina (10 $\mu$ g) (aminoglicosídeo), trimetropim (5 $\mu$ g) (pirimidínicos), ceftazidima (30 $\mu$ g) ( $\beta$ -lactâmico/cefalosporina), cloranfenicol (30 $\mu$ g) (fenicol), imipenem (10 $\mu$ g) ( $\beta$ -lactâmico/carbapenem), tetraciclina (30 $\mu$ g) (tetraciclina), sulfonamida (300 $\mu$ g) (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 multirresistentes (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 *S. Infantis*, relacionados com as fases de adesão, invasão e consequente lesão em células intestinais (Quadro 1).

A extração do DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit comercial DNA Purification Kit (Promega®) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro (Femto 750®) com comprimento de onda de 260 nm.

Para a realização das análises de reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa dos genes de virulência foi utilizado como controle positivo a cepa de *S. Enteritidis* ATCC 13076. As reações de PCR foram realizadas a partir de um volume final de 25 $\mu$ L contendo 1 $\mu$ L de DNA da amostra, 2,5  $\mu$ L de tampão 10X, 0,75  $\mu$ L de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25  $\mu$ L de 10 pmol/ $\mu$ L da sequência *forward* e *reverse* de cada *primer* (Invitrogen®), 0,25  $\mu$ L de 20 mM do *mix* de dNTPs (Invitrogen®), 0,25  $\mu$ L de Taq (5U/ $\mu$ L) (Invitrogen®) e 17,75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultrapura. As amostras foram submetidas aos seguintes ciclos de amplificação: 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 à 72°C por 90 segundos, com extensão final a 72°C por 10 minutos.

As cepas que apresentaram resistência aos antimicrobianos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos também foram avaliadas quanto à presença de genes de resistência descritos no Quadro 2. 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 quatro genes estudados, fornecida pelo Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia. O preparo do *mix* para as reações de PCR foi o mesmo descrito para os genes de virulência.

As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 45 segundos, anelamento à 50°C por 45 segundos (*blaTEM*), 56°C por 45 segundos (*blaSHV*), 58°C por 1 minuto (*blaCTX-M*) e 54°C por 1 minuto (*blaAmpC*), extensão à 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-PCR utilizando o protocolo descrito por Oliveira et al. (2007). Como controle positivo foi utilizado a cepa ATCC 13076 de *S. Enteritidis*.

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').

A técnica de RAPD-PCR foi realizada a partir de um volume final de 25 $\mu$ L contendo 1 $\mu$ L de DNA da amostra à 50 ng/ $\mu$ L, 2,5  $\mu$ L de tampão 10X, 0,75  $\mu$ L de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25  $\mu$ L de 20 mM do *mix* de dNTPs (Invitrogen®), 0,25  $\mu$ L de Taq (5U/ $\mu$ L) (Invitrogen®) e 17,75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultrapura. A concentração dos *primers* foi de 50 pmol para P1254 e 30 pmol para 23L (Invitrogen®). 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 minuto, 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. Para a análise de similaridade genética entre as cepas utilizou-se análise computacional pelo Programa GelCompar II (*Comparative Analysis of Electrophoresis Paattems*), 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 Arithmetical Mean*) para construção do dendograma, em que os isolados foram agrupados em *clusters* quando apresentaram homologia superior a 80% ou em genótipos distintos quando inferior a 80%. As cepas foram comparadas considerando local de isolamento, data de coleta, perfil de resistência antimicrobiana e presença dos genes de virulência e resistência aos  $\beta$ -lactâmicos. Grupos com homologia superior a 99% foram classificados como clones.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 estão apresentados os resultados dos percentuais de resistência para os antimicrobianos testados nas 51 cepas de *S. Infantis*, sendo estes percentuais referentes ao somatório dos isolados classificados como resistente e intermediário pelo teste de disco difusão. Os maiores índices de resistência foram para amoxacilina (classe dos  $\beta$ -lactâmicos/penicilina), com 35,3% (18/51), e para sulfonamida (classe das sulfonamidas), com 15,7% (8/51). Percentuais menores de resistência foram encontrados para tetraciclina (9,8% - 5/51) (classe das tetraciclinas) e ceftazidima (5,9% - 3/51) (classe dos  $\beta$ -lactâmico/cefalosporina de 3<sup>a</sup> geração). Todos estes antimicrobianos são pertencentes às classes de uso veterinário exclusivo em terapêutica, sendo vedada a sua utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais, de acordo com a Instrução Normativa nº 26 (BRASIL 2009). Todos os isolados foram sensíveis ao norfloxacino, neomicina, gentamicina, trimetoprim, cloranfenicol e imipenem.

Elevados níveis de resistência às penicilinas também foram observado por Medeiros et al. (2011), em um estudo com *Salmonella* isolada de carcaças congeladas no

Brasil, em que encontraram 44,8% das cepas resistentes a ampicilina. O alto número de cepas resistentes às penicilinas, amoxacilina e ampicilina, alerta para um grande problema de saúde pública, visto que estas drogas são consideradas de primeira escolha para tratamento de doenças na medicina humana (WHO 2011). O grave problema de saúde pública se deve ao fato da possível transferência de cepas resistentes para o homem, via alimento contaminado, principalmente aqueles de origem avícola, o que poderia levar à ineficácia da terapia pelo uso destas drogas.

Menor percentual de resistência à sulfonamida, ao encontrado neste estudo, foi identificado por Rowlands et al. (2014), ao avaliarem cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos no Brasil, em que encontraram 2,1% de cepas resistentes a esta droga. Este resultado não era esperado, visto que estudos anteriores realizados no Brasil, relataram uma alta frequência de resistência a este antimicrobiano em *Salmonella* (Bessa et al. 2007, Ghilardi et al. 2006, Medeiros et al. 2011).

No Brasil, as tetraciclinas são proibidas como aditivos na alimentação animal desde 1998, porém, ainda são utilizadas terapeuticamente e, portanto, podem exercer uma pressão seletiva sobre os micro-organismos (BRASIL 2009, Voss-Rech et al. 2015). Embora os níveis de resistência para tetraciclina, ceftazidima e sulfonamida não sejam considerados alarmantes, é criterioso avaliar constantemente a susceptibilidade dos isolados frente a essas drogas, e assim verificar as características de resistência de *Salmonella*, para inferir se as drogas administradas nas aves estão sendo devidamente utilizadas na produção animal. A administração cuidadosa de agentes antimicrobianos e a 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).

Um estudo desenvolvido por Asgharpour et al. (2014), com cepas de *S. Infantis* isoladas de frango de corte no Irã, encontrou níveis de resistência mais elevados aos encontrados neste estudo, com 70% para amoxacilina, 66% para trimetoprimsulfametoxazol, 100% para tetraciclina, 28% para ceftazidima e 64% ao cloranfenicol. De acordo com Lai et al. (2014), o aumento da resistência à sulfonamida e tetraciclina se deve, provavelmente, à utilização destes antimicrobianos na alimentação animal, em níveis sub-terapêuticos ou terapêuticos, para prevenir doenças ou para promover o crescimento do animal.

A emergência de bactérias resistentes às classes de antimicrobianos das cefalosporinas e fluoroquinolonas é preocupante, pelo fato de ambas serem utilizadas para tratar infecções humanas graves, podendo a resistência a estas drogas causar sérias complicações no tratamento (Hur et al. 2012, Kilonzo-Nthenge et al. 2013, Lai et al. 2014). Resultados positivos foram encontrados no presente estudo, sendo que apenas 5,9% das cepas apresentaram resistência a ceftazidima, uma cefalosporina de terceira geração, enquanto que todas as estirpes de *Salmonella* foram sensíveis à norfloxacina, uma fluoroquinolona.

Onze perfis de resistência aos antimicrobianos foram identificados (A1 a A11), sendo 27 (53%) cepas resistentes ou com resistência intermediária a uma ou duas drogas, não havendo isolados com perfil de multirresistência ( $\geq 3$  classes de antimicrobianos) (Quadro 3). Os perfis mais frequentes foram A11 (47%), com cepas sensíveis a todos antimicrobianos testados, e A2 (19,6%), apresentando cepas com resistência intermediária a amoxacilina. Voss-Rech et al. (2015), em um estudo com cepas de *Salmonella* sp. isoladas de frango de corte no Brasil, também não encontraram perfis de multirresistência para *S. Infantis*, o qual foi o segundo sorovar mais isolado no estudo, com 14,63%. Em outro estudo realizado em diferentes cidades brasileiras, *S. Infantis* também foi o segundo sorovar mais isolado em carcaças de frango com 7,6%, sendo que destes, 57,8% foram resistentes a um ou dois antimicrobianos, enquanto 42,1% exibiram perfis de multirresistência, com maior índice de resistência para sulfonamida com 94,7% (Medeiros et al. 2011). Por outro lado, um estudo desenvolvido por Thai et al. (2012) no Vietnã do Norte, encontrou que 78,2% das cepas de *S. Infantis* isoladas tanto da carne de frango quanto carne suína, apresentaram resistência de quatro até 13 antimicrobianos, demonstrando a prevalência da característica de multirresistência para este sorovar neste país.

A ocorrência de cepas de caráter multirresistente pode estar associada, além da utilização inadequada de antimicrobianos na avicultura industrial, à disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos. O PREBAF, programa de monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em *Salmonella* spp isoladas de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil, enfatiza a importância de caracterizar os clones multirresistentes quanto a sua capacidade de albergar e disseminar genes de resistência a antimicrobianos (BRASIL 2008).

A  $\beta$ -lactamase de espectro estendido é uma enzima que permite que as bactérias se tornem resistentes a uma grande variedade de penicilinas e cefalosporinas, sendo que as bactérias que contêm esta enzima são resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos penicilinas, cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração e monobactâmicos, permanecendo sensíveis aos carbapenêmicos, cefamicinas (cefalosporinas de 2<sup>a</sup> geração) e inibidores de  $\beta$ -lactamases. Nos EUA estima-se que aproximadamente 26.000 infecções ocorram anualmente em decorrência de bactérias produtoras de ESBLs, resultando em cerca de 1.700 mortes, gerando grandes despesas hospitalares no país (CDC 2014).

Entre os genes de resistência que codificam ESBL estão *bla<sub>AmpC</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>*, os quais têm sido detectados em *Salmonella* isoladas de produtos de origem animal em vários países (Rodriguez et al. 2009; Tamang et al. 2011). De 18 (35,3%) cepas resistentes aos antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos (amoxacilina e ceftazidima), 11 (61,1%) albergavam um ou mais genes de resistência avaliados, sendo que 10 (55,5%) foram positivas para o gene *bla<sub>AmpC</sub>*, cinco (27,8%) para *bla<sub>CTX-M</sub>*, duas (11,1%) para *bla<sub>SHV</sub>* e nenhuma cepa apresentou o gene *bla<sub>TEM</sub>*. Duas cepas apresentaram os genes *bla<sub>AmpC</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>*, e outras duas os genes *bla<sub>AmpC</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>*, concomitantemente (Quadro 4).

Todas as 10 cepas que albergavam o gene *bla<sub>AmpC</sub>* apresentaram resistência ou sensibilidade intermediária a amoxacilina. A presença do gene AmpC em *S. Infantis* isolada de carne de frango é preocupação para os órgãos de saúde pública japonesa por este sorovar ser uma das principais causas de salmonelose humana, e pela carne de frango ser a principal fonte de infecção humana no país (Aviv et al. 2014; Noda et al. 2015).

Embora fenotipicamente tenham apresentado resistência aos antimicrobianos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, sete cepas não apresentaram a presença de nenhum dos genes avaliados (Quadro 4). Este resultado indica que a resistência pode estar associada à presença de outras  $\beta$ -lactamases, cujos genes não foram avaliados neste estudo, e/ou a outros mecanismos de resistência a estes antimicrobianos, tais como: bombas de efluxo, perda na expressão de porina, alterações nas proteínas de ligação à penicilina (PLPs), presença de múltiplas, ou mesmo de novas  $\beta$ -lactamases (Babic et al. 2006, Nikaido et al. 2008, Jacoby 2009).

Verificou-se que 100% das cepas foram positivas para os genes *invA* e *agfA*, e 92,2% (47/51) para o gene *lpfA* e nenhuma cepa apresentou o gene *sefA*. A presença do

gene *invA* em todas as cepas era esperada e este resultado concorda com Rowlands et al. (2014), que estudaram fatores de virulência em *Salmonella* sp. isoladas de alimentos associados ou não a surtos de salmonelose no Brasil, e também encontraram 100% de positividade para este gene. A presença desse gene é fundamental na expressão da capacidade de invasão dos tecidos do hospedeiro pelo micro-organismo (Amini et al. 2010).

A presença do gene *agfA* em todas as cepas estudadas demonstra a sua capacidade de adesão durante o processo de infecção, além de estar associado com a formação de biofilme (Yoo et al. 2013). A detecção deste gene em isolados de cortes cárneos, carcaças, água de *chiller* e de escaldagem, sugere que sua permanência durante o processamento possa ocorrer devido à produção de biofilme e, provavelmente, há um risco maior de contaminação do produto final nos matadouros frigoríficos.

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 da *Salmonella*, nos sorotipos Enteritidis, Dublin, Moscow e Blegdon (Amini et al. 2010). Porém, devido à possibilidade de recombinação gênica, sua presença deve ser investigada em outros sorovares de *Salmonella*, e por isso sua presença foi avaliada em *S. Infantis*.

A maioria dos isolados de *S. Infantis* (92,2% - 47/51) apresentaram semelhanças no potencial de virulência, pois foram positivos simultaneamente para três genes estudados, *invA*, *agfA* e *lpfA*, enquanto 7,8% (4/51) apresentaram apenas *invA* e *agfA*. Isto indica que somado à capacidade de invasão, estas cepas também podem ser eficientes no processo de adesão e na formação de biofilmes, o que está associado à presença dos genes *agfA* e *lpfA*. A presença de fímbrias, mediada por estes genes, 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).

As características de resistência e virulência em *S. Infantis* mostram que esse sorovar pode ser considerado como potencialmente patogênico e que genes relacionados a estas características devem ser constantemente monitorados para compreender e acompanhar o processo de adaptação destas cepas ao longo do processo produtivo do frango de corte e, consequentemente, no hospedeiro humano. Estas cepas

podem adquirir e perder genes de virulência ao longo do tempo, determinando assim a disseminação de diferentes perfis genéticos (Moussa et al. 2013; Suez et al. 2013).

A análise de similaridade genética de *S. Infantis* demonstrou elevada proximidade entre as cepas (Fig. 2), indicando que, provavelmente, há fontes comuns de contaminação.

Foram identificados cinco *clusters* e três isolados que apresentaram perfil distinto, que não puderam ser agrupados com as demais cepas devido à proximidade genética ser inferior a 80%.

O *cluster* A agrupou sete cepas com homologia de 80,4%, todas oriundas do aviário, de amostras de suabe ambiental. Esse perfil esteve presente por um período de cinco meses no ambiente do aviário. A identificação comum dos genes *invA*, *lpfA* e *agfA* mostra que possuem potencial para se fixar em superfícies e produzir biofilmes no ambiente do aviário, possibilitando sua manutenção no local por longos períodos. A identificação dos três genes de resistência estudados (SHV, CTX-M e AmpC) indica o risco da disseminação horizontal de genes de resistência entre as cepas que podem assim apresentar perfis multirresistência. Há, portanto, a necessidade de estabelecimento de medidas de higienização e biosseguridade mais eficientes e rigorosas para garantir o controle desse agente no ambiente do aviário. De acordo com Moura et al. (2014) a negligência às normas de biosseguridade dentro da indústria é um fator decisivo para a manutenção do micro-organismo no ambiente.

O *cluster* que agrupou o maior número de isolados foi o B, composto por 33 cepas com homologia de 83,7% e, portanto, considerado o principal problema desta indústria. Esse perfil foi isolado de suabe ambiental do aviário e das matrizes cárneas no matadouro frigorífico. Esse genótipo foi identificado ao longo dos dois anos de coleta das amostras (2009 e 2010). O longo 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 matadouro frigorífico, o que indica que a contaminação cruzada parece ser importante na disseminação desse genótipo ao longo da cadeia de produção. A presença desse perfil em amostras de suabes e propés do aviário, além das águas de escaldagem e de *chiller*, sugere a negligência às normas de biosseguridade na unidade de produção, que contribuíram para a contaminação das amostras de carcaças e cortes cárneos.

Alguns autores afirmam que há influência do ambiente na contaminação do produto final (Von Ruckert et al. 2009, Colla et al. 2012). A água de *chiller* e a água de

escaldagem são consideradas fatores importantes na disseminação de *Salmonella* no matadouro frigorífico, 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).

Os genes *invA*, *lpfA* e *agfA* também foram comuns no grupo B, e demonstram a virulência e a capacidade de produzir biofilmes pelas cepas, dificultando sua eliminação dentro da indústria.

Foram identificados seis sub-grupos clonais (>99% de similaridade) no *cluster* B (B1 a B6) composto por 18 cepas. O sub-grupo B1 possui cepas isoladas de coxa de frango, cartilagem e propé do aviário. Em B2 as cepas são todas de recorte de peito. O perfil B3 foi detectado em carcaças e pescoço. B4 contém cepas isoladas de água de *chiller*, de água de escaldagem e de cartilagem. Em B5 foram agrupadas cepas proveniente de coxa e peito de frango. Por fim, B6 é composto por cepas isoladas de CMS. De acordo com Chu et al. (2009) a detecção de clones em diferentes amostras demonstra a propagação de *Salmonella* na cadeia produtiva e o risco de transmissão ao homem.

O perfil C apresentou similaridade de 94,1%, composto por quatro cepas, todas de amostras de peito e pele de frango do matadouro frigorífico. Três dessas cepas foram isoladas no mesmo período (agosto de 2009), indicando que sua permanência foi temporária e que há possibilidade de maior facilidade no seu controle. Além disso, a presença somente dos genes *invA* e *agfA* nesse perfil, pode justificar o menor período de permanência, diferente do encontrado nos demais *clusters*. Esse fato, não elimina o potencial de formação de biofilme das cepas, porém, a ausência do gene *lpfA* pode ser o fator determinante para sua menor capacidade de persistir no ambiente. O gene *lpfA* está envolvido no processo de adesão às superfícies e às células epiteliais que caracteriza uma etapa essencial e anterior ao processo de formação de biofilmes (Gibson et al. 2007).

Devido à somente duas cepas formarem os *clusters* D e E, não foi possível realizar uma análise mais aprofundada dos dados encontrados.

## CONCLUSÕES

Este estudo revelou a ausência de perfis de multirresistência entre as cepas de *S. Infantis*, sendo encontrado um maior percentual de resistência para a amoxacilina. Este resultado alerta para uma condição de risco, tendo em vista que esta droga pertence à classe dos β-lactâmicos subclasse das penicilinas, a qual é usualmente empregada em medicina humana e veterinária, podendo ter implicações no tratamento de quadros

clínicos graves ocasionados por *Salmonella*. Para os demais antimicrobianos testados houve uma alta ou total sensibilidade das cepas, supondo assim uma adequada utilização dessas drogas na produção avícola.

A elevada positividade para os genes de virulência, associada à presença de genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em alguns isolados, demonstram o potencial patogênico de *S. Infantis*, pela possibilidade em causar doença clínica em humanos e pelas complicações que podem acarretar no tratamento dos casos graves de salmonelose.

A avaliação filogenética demonstrou que cepas provenientes do aviário eram bastante próximas geneticamente daquelas isoladas no matadouro frigorífico, e que persistiram durante todo o período do estudo. A presença dos genes *lpfA* e *agfA*, associado à persistência de cepas no ambiente, alertam para o potencial de *S. Infantis* em formar biofilme, devendo ser constantemente monitorada na cadeia de produção avícola, especialmente no ambiente de abate, de modo a minimizar a contaminação do produto final e os perigos para a saúde pública.

## REFERÊNCIAS

Alekshun M.N. & Levy S.B. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 128(6):1037-1050.

Amini K., Salehi T.Z., Nikbahkht 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.

Asgharpour F., Rajabnia R., Shahandashti E.F., Marashi M.A., Khalilian M. & Moulana Z. 2014. Investigation of Class I Integron in *Salmonella* Infantis and Its Association With Drug Resistance. *Jundishapur J Microbiol.* 7(5): e10019.

Aviv G., Tsyba K., Steck N., Salmon-Divon M., Cornelius A., Rahav G., Grassi G.A. & Gal-Mor O. 2014. A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain. *Environ. Microbiol.* 16(4):977-994.

Babic M., Hujer A.M. & Bonomo R.A. 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on  $\beta$ -lactamases. *Drug Resist. Updat.* 9(3):142-156.

Bäumler A.J., Gilde A.J., Tsolis R.M., Van Der Velden A.W., Ahmer B.M. & Heffron F. 1997. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. *J. Bacteriol.* 179(2):317-22.

Bessa M.C., Michael G.B., Canu N., Canal C.W., Cardoso M., Rabsch W. & Rubino S. 2007. Phenotypic and genetic characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. *Res. Vet. Sci.* 83(3):302-310.

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 South of 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(4):750-758.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. 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*, DF, 10 jul. 2009, Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. 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 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](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf)> Acesso em: 24 junho 2015.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. 2014. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Atlanta, USA. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>> Acesso em: 19 ago 2015.

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.

Chu C., Wong D.W., Wang M.H., Lin H.H., Chen Y.S., Tien N., Shih M.C., Chen T.H. & Chiu C.H. 2009. Genotyping, plasmid analysis, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from humans and chickens in central Taiwan. *J. Formos. Med. Assoc.* 108(10):765-771.

CLSI. - Clinical And Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement. CLSI M100-S23, Wayne, 2013.

Colla F.L., Rodrigues L.B., Borsoi A., Dickel E.L., Nascimento V.P. & Santos L.R. 2012. Isolamento de *Salmonella* Heidelberg em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte. Arq. Inst. Biol. 79(4):603-606.

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.

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 J. 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.

Gibson D.L., White A.P., Rajotte C.M. & Kay W.W. 2007. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. Microbiology. 153(4):1131-1140.

Ghilardi A.C., Tavechio A.T. & Fernandes S.A. 2006. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulsetypes of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 101(3):281-286.

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., Jawale C. & Lee J.H. 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. Food Res. Int. 45(2):819-830.

Jacoby G.A. 2009. AmpC  $\beta$ -Lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 22(1):161-182.

Kaur J. & Jain S.K. 2012. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. Microbiol. Res. 167(4):199-210.

Kilonzo-Nthenge A., Rotich E. & Nahashon S.N. 2013. Evaluation of drug-resistant Enterobacteriaceae in retail poultry and beef. Poult. Sci. 92(4):1098-1107.

Lai J., Wu C., Wu C., 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(4):870-876.

Mead G.C., Allen V.M., Burton C.H. & Corry J.E. 2000. Microbial cross-contamination during air chilling of poultry. Br. Poult. Sci. 41(2):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):555-560.

Miller T., Prager R., Rabsch W., Fehlhaber K. & Voss M. 2010. Epidemiological relationship between *Salmonella* Infantis isolates of human and broiler origin. Lohmann Information, 45(2):27-31.

Monstein H.J., Ostholm-Balkhed A., Nilsson M.V., Nilsson M., Dornbusch K. & Nilsson L.E. 2007. Multiplex PCR amplification assay for rapid detection of *bla*SHV, *bla*TEM and *bla*CTX-M genes in Enterobacteriaceae. APMIS. 115(12):1400-1408.

Moore J.E., Barton M.D., Blair I.S., Corcoran D., Dooley J.S.G., Fanning S., Kempf I., Lastovica A.J., Lowery C.J., Matsuda M., Mcdowell D.A., Mcmahon A., Millar B.C., Rao J.R., Rooney P.J., Seal B.S., Snelling W.J. & Tolba O. 2006. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect.* 8(7):1955-1966.

Moura M.S., Oliveira R.P., Melo R.T., Mendonça E.P., Fonseca B.B. & Rossi, D.A. 2014. Genes de virulência e diversidade genética em *Salmonella* spp. isoladas de amostras de origem suína. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 66(5):1367-1375.

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 Agrc. Environ.* 11(2):197-201.

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.

Noda T., Murakami K., Etoh Y., Okamoto F., Yatsuyanagi J., Sera N., Furuta M., Onozuka D., Oda T., Asai T. & Fujimoto S. 2015. Increase in resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Salmonella* isolated from retail chicken products in Japan. *PLoS One.* 10(2): e0116927.

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 foodborne outbreaks in Southern Brazil. *J Infect Develop Count.* 1:170-176.

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.

Rodriguez I., Barownick W., Helmuth R., Mendoza M.C., Rodicio M.R., Schroeter A. & Guerra B. 2009. Extended-spectrum  $\beta$ - lactamases and AmpC  $\beta$ -lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07. *J. Antimicrob. Chemother.* 64(2):301-309.

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.

Shahid M. 2010. *Citrobacter* spp. simultaneously harboring *bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*ampC, and insertion sequences IS26 and *orf*513: a evolutionary phenomenon of recent concern for antibiotic resistance. *J.Clin. Microbiol.*, 48(5):1833-1838.

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.

Suzuki S. 1994. Patogenicity of *Salmonella* Enteritidis in poultry. *Int. J. Food Microbiol.* 21(1-2):89-105.

Tamang M.D., Nam H.M., Kim T.S., Jang G.C., Jung S.C. & Lim S.K. 2011. Emergence of extended-spectrum  $\beta$ - lactamase (CTX-M-15 and CTX-M-14)-producing nontyphoid *Salmonella* with reduced susceptibility to ciprofloxacin among food animals and humans in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 49(7):2671-2675.

Thai T.H., Hirai T., Lan N.T. & Yamaguchi R. 2012. Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serovars isolated from retail pork and chicken meat in North Vietnam. *Int. J. Food Microbiol.* 156(2):147-151.

Turki Y., Mehri I., Fhouda 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(1):87-98.

Valdez Y., Ferreira R. B. & Finlay B. B. 2009. Molecular mechanisms of *Salmonella* virulence and host resistance. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 337:93-127.

Vázquez-Garcidueñas M.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.

Vieira M.A. 2009. Ilhas de patogenicidade. *O Mundo da Saúde*. 33(4):406-414.

Von Ruckert D.A.S., Pinto P.S.A., Santos B.M., Moreira M.A.S. & Rodrigues A.C.A. 2009. Pontos críticos de controle de *Salmonella* spp. no abate de frangos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(2):326-330.

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(3):433-441.

WHO – World Health Organization. 2011. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. 3<sup>rd</sup> rev. Geneva, Switzerland.

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(1):131-136.

### Legendas das Figuras

Fig. 1: Frequência (%) de resistência antimicrobiana em *Salmonella* Infantis isoladas em uma cadeia de produção avícola localizada no Estado de São Paulo, Brasil. AMO: amoxacilina (10 $\mu$ g); SUL: sulfonamida (300 $\mu$ g); TET: tetraciclina (30 $\mu$ g); CAZ: ceftazidima (30 $\mu$ g); NOR: norfloxacino (10 $\mu$ g); NEO: neomicina (30 $\mu$ g); GEN: gentamicina (10 $\mu$ g); TRI: trimetoprima (5 $\mu$ g); CLO: cloranfenicol (30 $\mu$ g); IMP: imipenem (10 $\mu$ g).

Fig. 2: Dendrograma comparativo de *S. Infantis* utilizando coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1% e método UPGMA com otimização de 0,80%. Perfis A ao E – diferentes *clusters*, com homologia superior a 80%. Perfis B<sub>1</sub> ao B<sub>6</sub> – grupos clonais, com homologia superior a 99%.

## Os Quadros

**Quadro 1.** Genes de virulência, sequência dos *primers* e tamanho de amplicom (pb).

GENE	PRIMERS	PESO MOLECULAR	REFERÊNCIA
<i>invA</i>	F:5'GTGAAATTATGCCACGTTGGGCAA3' 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'TCCACAATGGGGCGGCGGCG3' R:5'CCTGACGCACCATTACGCTG3'	350 pb	Collinson et al. (1993)
<i>lpfA</i>	F:5'CTTCGCTGCTGAATCTGGT3' R:5'CAGTGTAAACAGAAACAGT3'	250 pb	Heuzenroeder et al. (2000)

pb: pares de bases

**Quadro 2.** Genes de resistência, sequência dos *primers* e e tamanho de amplicom (pb).

GENE	PRIMERS	PESO MOLECULAR	REFERÊNCIA
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	F: 5'CAGCGGTAAGATCCTTGAGA3' R: 5'ACTCCCCGTCTGTAGATAA3'	643 pb	Chen et al. (2004)
<i>blasHV</i>	F: 5'GGCCGCGTAGGCATGATAGA3' R: 5'CCCGCGATTGCTGATTTTC3'	714 pb	Chen et al. (2004)
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	F: 5'ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC3' R: 5'TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG3'	593 pb	Monstein et al., (2007)
<i>bla<sub>AmpC</sub></i>	F: 5'CCCCGTTATAGAGCAACAA3' R: 5'TCAATGGTCGACTTCACACC3'	634 pb	Shahid (2010)

pb: pares de bases

**Quadro 3.** Perfis de resistência de 51 cepas de *S. Infantis* isoladas em uma cadeia de produção avícola localizada no Estado de São Paulo, Brasil.

PERFIS	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA*	NÚMERO DE CLASSE <sup>1</sup>	NÚMERO DE CEPAS (%)
A1	AMO	1	4 (7,8)
A2	(AMO)	1	10 (19,6)
A3	SUL	1	2 (3,9)
A4	(SUL)	1	2 (3,9)
A5	TET	1	1 (2,0)
A6	(TET)	1	1 (2,0)
A7	AMO CAZ	2	2 (3,9)
A8	AMO (CAZ)	2	1 (2,0)
A9	(AMO) SUL	2	1 (2,0)
A10	TET SUL	2	3 (5,9)
A11	Multi sensíveis	-	24 (47,0)
<b>TOTAL</b>			<b>51 (100,0)</b>

\* Perfis entre parênteses: cepas com resistência intermediária aos antimicrobianos. AMO: amoxacilina; CAZ: ceftazidima; TET: tetraciclina; SUL: sulfonamida.

<sup>1</sup> Número de classes de antimicrobianos aos quais os isolados apresentaram resistência.

**Quadro 4.** Relação dos perfis de resistência e ocorrência dos genes de resistência em 18 cepas de *S. Infantis* resistentes aos antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, isoladas em uma cadeia de produção avícola localizada no Estado de São Paulo, Brasil.

PERFIS DE RESISTÊNCIA*	GENES DE RESISTÊNCIA	NÚMERO DE CEPAS (%)
AMO	<i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	2 (11,1)
AMO	<i>bla</i> <sub>AmpC</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	2 (11,1)
(AMO)	<i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	4 (22,2)
(AMO)	<i>bla</i> <sub>AmpC</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	2 (11,1)
(AMO)	-	5 (27,7)
AMO CAZ	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	1 (5,6)
AMO CAZ	-	1 (5,6)
AMO (CAZ)	-	1 (5,6)
TOTAL		18 (100,0)

\* Perfis entre parênteses: cepas com resistência intermediária aos antimicrobianos. AMO: amoxacilina; CAZ: ceftazidima.

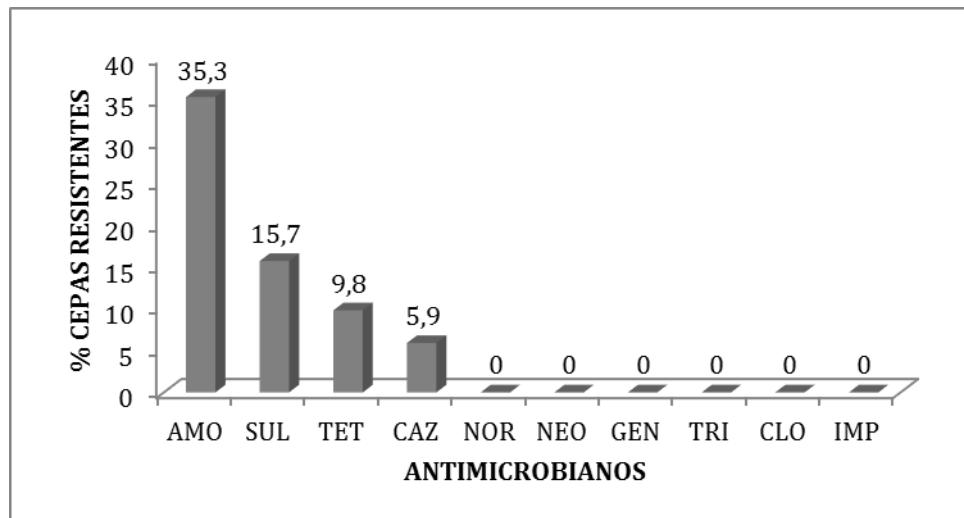


Figura 1

23L P1254

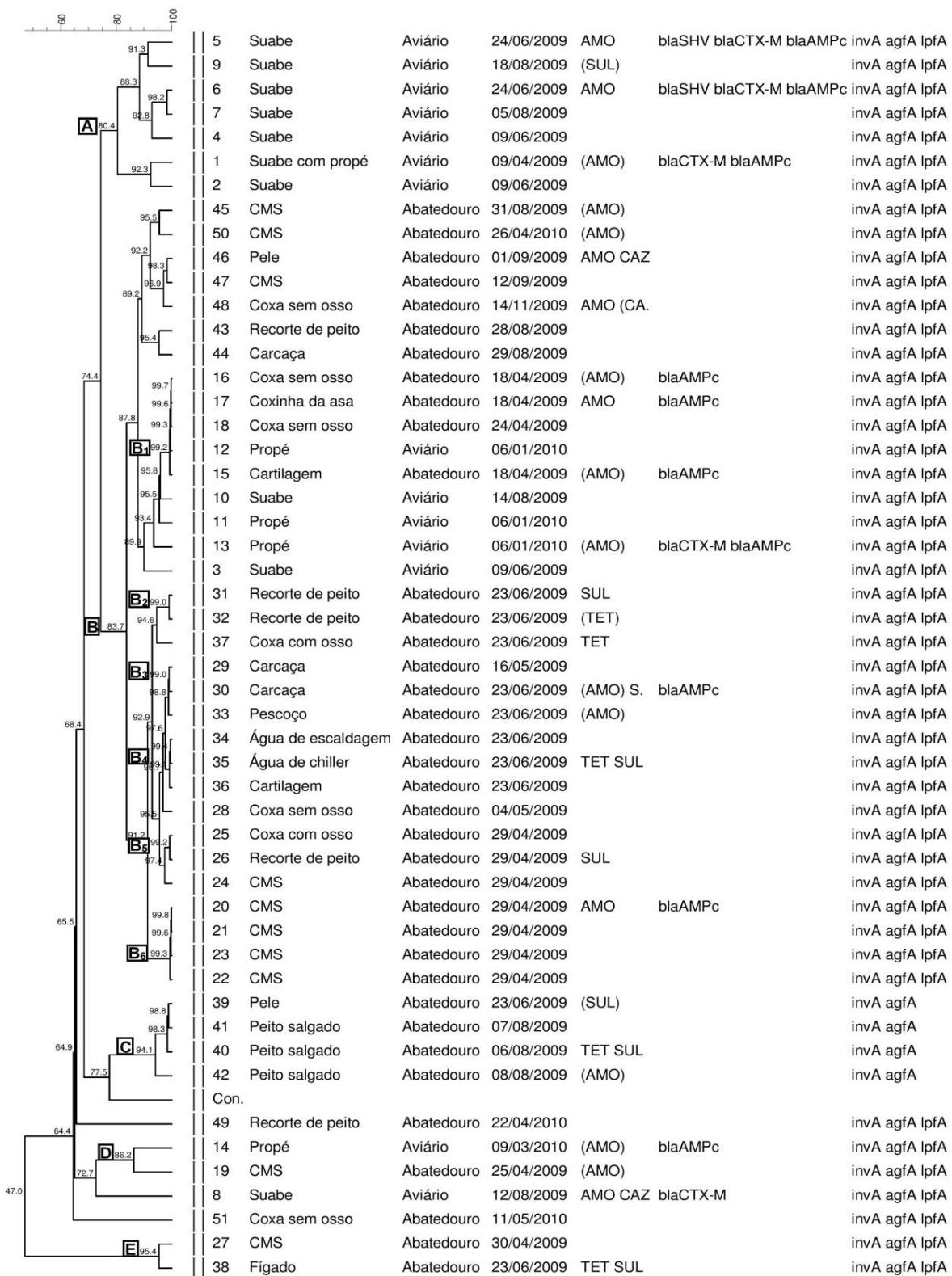


Figura 2

## CAPÍTULO 3

**Diversidade, virulência e resistência antimicrobiana de *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium* isoladas de carcaças de frango no Brasil**

Artigo a ser publicado no periódico

**Poultry Science**

## ***Salmonella* EM CARCAÇAS DE FRANGO NO BRASIL**

### **Diversidade, virulência e resistência antimicrobiana de *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium* isoladas de carcaças de frango no Brasil**

E. P. Mendonça<sup>3,4</sup>, R. T. Melo<sup>1</sup>, G. P. Monteiro<sup>1</sup>, B. B. Fonseca<sup>1</sup> and D. A. Rossi<sup>1</sup>

#### **RESUMO**

Avaliou-se 111 cepas de *S. Enteritidis*, 45 *S. Typhimurium* e 31 *S. Typhimurium* variante monofásica I4,[5],12:i:-, isoladas de carcaças de frango no Brasil, provenientes do Programa de Redução de Patógenos, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Estudou-se os perfis de resistência a 18 antimicrobianos, genes de virulência (*invA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA*) e resistência (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>AmpC</sub>, *qnrA*, *qnrS*), e a similaridade entre as cepas por ribotipagem. *S. Enteritidis* foi mais resistente a espectinomicina (96,4%), ácido nalidíxico (93,7%) e ciprofloxacina (89,2%). Uma cepa (2,8%), resistente a seis classes de antimicrobianos, apresentou o gene *bla*<sub>AmpC</sub>. Em *S. Typhimurium*, incluindo a variante monofásica, o maior percentual foi para espectinomicina com 95,6% e 100%, respectivamente. Dentre as cepas de *S. Typhimurium* resistentes aos β-lactâmicos, 55% apresentaram o gene *bla*<sub>AmpC</sub>, 35% *bla*<sub>TEM</sub> e 25% *bla*<sub>CTX-M</sub>, enquanto na variante I4,[5],12:i:-, 46,7% foram positivas para *bla*<sub>TEM</sub> e 6,7% para *bla*<sub>CTX-M</sub>. Foram identificados 18 perfis de multirresistência em *S. Enteritidis* agrupando 32,4% das cepas, 20 em *S. Typhimurium* com 46,7% e 10 em *S. Typhimurium* I4,[5],12:i:- com 32,3%. Nenhuma cepa apresentou os genes *bla*<sub>SHV</sub>, *qnrA* e *qnrS*. Observou-se associação entre a resistência aos β-lactâmicos e às quinolonas e aos aminoglicosídeos. Quanto aos genes de virulência, em *S. Enteritidis* houve predomínio do perfil P1 (92,8%), positivo para *invA*, *sefA*, *agfA*, *lpfA*. Em *S. Typhimurium* e variante I4,[5],12:i:-, o perfil P2 (*invA*, *agfA* e *lpfA*) foi o mais prevalente com 93,3% e 96,8% respectivamente. *S. Enteritidis* apresentou 15 ribogrupos, sendo R1<sub>SE</sub> predominante (48,6%) e amplamente distribuído pelo país, presente em todas regiões brasileiras. Em *S. Typhimurium* foram descritos 17 ribogrupos, sendo R1<sub>ST</sub> (31,1%) o mais prevalente. Em *S. Typhimurium* I4,[5],12:i:- foram descritos seis ribogrupos, com maior frequência de R1<sub>STvm</sub>

<sup>3</sup> Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

<sup>4</sup> Corresponding author. Eliane Pereira Mendonça. Mailing address: Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Universidade Federal de Uberlândia. R. Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 43, Umuarama, Uberlândia, MG, Brazil. Telefone: +55 (34)3213-2319. Email: eliane\_vet@yahoo.com.br

com 54,8%. Revelou-se alta resistência e virulência em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, e a ribotipagem demonstrou a existência de ribogrupos amplamente distribuídos no país, confirmando a endemicidade de determinados fenótipos e genótipos, e o perigo que representam para saúde pública.

**Palavras-chave:** Antimicrobiano. Gene de resistência. Gene de virulência. Salmonelose. Ribotipagem automatizada.

## INTRODUÇÃO

*Salmonella* é o principal agente causador de gastroenterite de origem alimentar, representando um grande problema de saúde pública mundial (BRASIL, 2014; CDC, 2014; EFSA, 2015). Dentre os inúmeros sorovares, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* estão entre os mais comumente identificados, tanto pelo envolvimento em casos humanos de doenças alimentares, como também por serem frequentemente isolados desde a ave viva até a carne de frango (EFSA, 2015). Apesar da implantação de inúmeras medidas de monitoria e controle na produção de frangos de corte, sua carne ainda é um importante veículo de infecções humanas por *Salmonella*.

A preocupação com este patógeno vem aumentando devido ao surgimento e disseminação de cepas resistentes aos antimicrobianos e potencialmente patogênicas. O uso de antimicrobianos em animais destinados a produção de alimentos tem contribuído para a seleção de cepas resistentes que podem ser transferidas ao homem via cadeia alimentar (EFSA, 2008; Lai et al., 2014). De acordo com Alekshun e Levy (2007) a dinâmica da transmissão da resistência aos antimicrobianos e a evolução de populações de bactérias resistentes está associada ainda à transferência genética de genes de resistência.

A capacidade de *Salmonella* causar doença pode ser atribuída a uma série de genes de virulência localizados no cromossomo ou em plasmídeos (Fluit, 2005). A região do DNA bacteriano responsável por codificar estes genes é designada de ilha de patogenicidade em *Salmonella* (IPS), e sua presença no genoma permite distinguir bactérias patogênicas daquelas não patogênicas, que são estreitamente relacionadas (Gal-Mor and Finlay, 2006; Suez et al., 2013). Estes genes propiciam ao micro-organismo a invasão e colonização das células do hospedeiro, determinando uma série de eventos que desencadeiam a doença (Vieira, 2009). O gene *invA* codifica a produção de proteínas do sistema de secreção do tipo III, relacionadas com a invasão de *Salmonella* na célula do hospedeiro (Valdez et al., 2009). Há muitos tipos de fímbrias que mediam a adesão intestinal de *Salmonella* incluindo a fímbria polar longa

(Lpf), fímbria agregativa (Agf), cujo operon é altamente conservado entre os isolados deste patógeno, e a fímbria *Salmonella* Enteritidis (Sef), identificada apenas nos sorotipos do grupo D (Bäumler et al., 1997).

O controle da disseminação da salmonelose constitui em um desafio para os epidemiologistas, sendo o emprego de técnicas moleculares imprescindível, por permitir a detecção da fonte de infecção. Dentre estas técnicas, destaca-se a ribotipagem, um método baseado na análise de restrição do DNA, que discrimina estirpes de *Salmonella* envolvidas em casos de infecção e fornece informações sobre a relação genética entre os sorotipos, sendo por isso, utilizada para estudos de investigação epidemiológica (Fernandes et al., 2003; Martins et al., 2006).

Objetivou-se caracterizar em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* isoladas de carcaças de frango de corte brasileiros: os fenótipos de resistência antimicrobiana, a presença dos genes *blatem*, *blashv*, *blactx-m* e *blaAmpC* associados à resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, os genes *qnrA* e *qnrS* relacionados à resistência as quinolonas e fluoroquinolonas, o potencial de virulência pela detecção dos genes *invA*, *agfA*, *sefA* e *lpfA*, os padrões de distribuição destes genes, e a relação filogenética pelo uso da ribotipagem automatizada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Isolados bacterianos e análises*

Foram utilizadas 111 cepas de *S. Enteritidis*, 45 de *S. Typhimurium* e 31 de *S. Typhimurium* variante monofásica I 4,[5],12:i:-, isoladas de carcaças de frango de corte em diferentes matadouros brasileiros fiscalizados pelo serviço de inspeção federal, durante o período de 2009 a 2011. Os espécimes eram provenientes do Programa de Redução de Patógenos (PRP), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e foram previamente identificados e ribotipados pelo Laboratório Nacional de Agricultura de Campinas, SP (LANAGRO-SP).

As cepas foram enviadas para o Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO-UFU), devidamente identificadas quanto a matriz alimentar, data, local de isolamento e o ribogrupo, onde foram realizadas as seguintes análises: resistência aos antimicrobianos pelo teste de disco difusão, avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) para os antimicrobianos ciprofloxacina (fluoroquinolona) e ceftazidima ( $\beta$ -lactâmicos), pesquisa dos genes de virulência e de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e fluoroquinolonas.

A ribotipagem automatizada foi realizada pelo sistema de caracterização microbiana *Riboprinter®* (Qualicon, Wilmington, DE), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando para a digestão a enzima *PvuII*. Os isolados que apresentaram coeficientes de similaridade iguais ou maiores que 0,93 (93%) foram classificados como do mesmo ribogrupo. Aqueles que apresentaram coeficientes de similaridade  $\leq$  0,92 foram considerados isolados diferentes com padrões de ribotipagem distintos (Bruce, 1996).

### ***Susceptibilidade antimicrobiana***

Utilizou-se o método de difusão com disco, segundo o protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Foi avaliada a sensibilidade das cepas frente a 18 antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulânico (30  $\mu$ g) ( $\beta$ -lactâmico – penicilina com inibidor de  $\beta$ -lactamases), ampicilina (10  $\mu$ g) ( $\beta$ -lactâmico – penicilina), cefalexina (30  $\mu$ g) ( $\beta$ -lactâmico – cefalosporina de 1<sup>a</sup> geração), ceftazidima (30  $\mu$ g) ( $\beta$ -lactâmico – cefalosporina de 3<sup>a</sup> geração), cefotaxima (30  $\mu$ g) ( $\beta$ -lactâmico – cefalosporina de 3<sup>a</sup> geração), ceftiofur (30  $\mu$ g) ( $\beta$ -lactâmico – cefalosporina de 3<sup>a</sup> geração), imipenem (10  $\mu$ g) ( $\beta$ -lactâmico – carbapenêmico), ácido nalidíxico (30  $\mu$ g) (quinolona), ciprofloxacina (5  $\mu$ g) (fluoroquinolona), norfloxacina (10  $\mu$ g) (fluoroquinolona), enrofloxacina (5  $\mu$ g) (fluoroquinolona), gentamicina (10  $\mu$ g) (aminoglicosídeo), neomicina (30  $\mu$ g) (aminoglicosídeo), espectinomicina (10  $\mu$ g) (aminoglicosídeo), tetraciclina (30  $\mu$ g) (tetraciclina), sulfato de colistina (10  $\mu$ g) (polimixina), sulfametoxazol/trimetoprim (25  $\mu$ g) (sulfonamida e diamino-pirimidina) e fosfomicina (50  $\mu$ g) (epóxido fosforado) (LABORCLIN®).

Isolados de *Salmonella* resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos foram definidos como multirresistentes, seguindo critérios estabelecidos por Magiorakos et al. (2012). A cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como cepa controle de qualidade dos testes de sensibilidade.

Para os antibióticos ciprofloxacina e ceftazidima, muito utilizados na medicina humana e animal para o tratamento de infecções por enterobactérias, foi realizada a análise da CIM. Para isto, foram utilizadas fitas *Etest* (BIOMÉRIEUX®), com diferentes gradientes do antimicrobiano, sendo os resultados interpretados conforme indicação do fabricante, e baseada em critérios do CLSI (2013).

A escolha dos antimicrobianos testados foi baseada na utilização destas drogas na medicina veterinária e humana, e também na ocorrência de resistência dentro da produção avícola brasileira e na medicina humana.

Para cada sorovar de *Salmonella* foram comparados os resultados do teste de disco difusão e CIM para os antimicrobianos ciprofloxacina e ceftazidima, utilizando-se o teste do Qui Quadrado de independência, e o cálculo do coeficiente de contingência para verificar a relação entre os testes. Foi utilizado o teste binomial para duas proporções para fazer comparação dos resultados obtidos para cada antimicrobiano testado pelo método de disco difusão entre os sorovares de *Salmonella*. Em todos os testes adotou-se um nível de significância de 95%.

### ***Pesquisa dos genes de virulência e resistência antimicrobiana***

Para extração do DNA bacteriano, para pesquisa dos genes de virulência e resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, utilizou-se o kit comercial DNA Purification Kit (Promega<sup>®</sup>), e para extração do DNA plasmidial, para análise dos genes de resistência às quinolonas e fluoroquinolonas, utilizou-se o kit comercial PureYield Plasmid Miniprep System (Promega<sup>®</sup>), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para avaliação da virulência das cepas foram pesquisados os genes *invA*, *agfA*, *sefA* e *lpfA*, relacionados com as fases de adesão, invasão e consequente lesão em células intestinais (Tabela 1). As reações de PCR foram realizadas a partir de um volume final de 25 $\mu$ L contendo 1  $\mu$ L de DNA da amostra, 2,5  $\mu$ L de tampão 10X, 0,75  $\mu$ L de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25  $\mu$ L de 10 pmol/ $\mu$ L da sequência *forward* e *reverse* de cada *primer* (Invitrogen<sup>®</sup>), 0,25  $\mu$ L de 20 mM do *mix* de DNTPs (Invitrogen<sup>®</sup>), 0,25  $\mu$ L de Taq (5U/ $\mu$ L) (Invitrogen<sup>®</sup>) e 17,75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultrapura. As amostras foram submetidas aos seguintes ciclos de amplificação: 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 à 72°C por 90 segundos, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Como controle positivo das reações foi utilizada a cepa de *S. Enteritidis* ATCC 13076.

Para os isolados resistentes aos antibióticos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos foi verificada a presença dos genes de resistência *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* e *bla<sub>AmpC</sub>*, descritos na Tabela 1. Para a realização das análises de PCR foi utilizado como controle positivo uma cepa de campo de *Klebsiella pneumoniae*. O preparo do *mix* para as reações de PCR foi o mesmo descrito para os genes de virulência. 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<sub>TEM</sub>*), 56°C por 45 segundos (*bla<sub>SHV</sub>*), 58°C por 1

minuto (*bla*<sub>CTX-M</sub>) e 54°C por 1 minuto (*bla*<sub>AmpC</sub>), extensão a 72°C por 90 segundos, seguido de uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

As cepas resistentes aos antimicrobianos da classe das quinolonas e fluoroquinolonas foram analisadas para a presença dos genes *qnrA* e *qnrS* (Tabela 1). Foi realizado PCR multiplex para pesquisa dos dois genes, sendo o volume final da reação de 25µL contendo 1µL de DNA plasmidial da amostra, 2,5 µL de tampão 10X, 0,75 µL de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 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®), 0,5 µL de Taq (5U/µL) (Invitrogen®) e 16 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura. As condições de amplificação foram de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 90 segundos, seguido de uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Todas as reações de PCR foram realizadas em 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 transiluminador UV (Loccus Biotecnologia®).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2 estão apresentados os percentuais de resistência obtidos para os 18 antimicrobianos. Dentre as 111 *S. Enteritidis* houve maior resistência para espectinomicina com 107 (96,4%) isolados, ao ácido nalidíxico com 104 (93,7%) e para ciprofloxacina com 99 (89,2%). De 2000 a 2004, um aumento da resistência ao ácido nalidíxico de 10% para 26%, em *S. Enteritidis* de origem humana, foi relatado por Meakins et al. (2008). Também para *S. Typhimurium*, incluindo a variante monofásica, o maior percentual de resistência foi para espectinomicina, com 95,6% e 100%, respectivamente.

Quando comparados os percentuais de resistência obtidos para cada antimicrobiano entre os sorovares de *Salmonella*, observa-se que houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre os sorovares *Enteritidis* e *Typhimurium* para ciprofloxacina, enrofloxacina e neomicina. Entre *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* variante monofásica I 4,[5],12:i:- diferença ( $p < 0,05$ ) no percentual de resistência foi encontrado para neomicina, enrofloxacina e tetraciclina, enquanto que para *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium* variante monofásica I 4,[5],12:i:- para amoxacilina/ácido clavulânico e ácido nalidíxico (Tabela 2).

A alta resistência encontrada para a espectinomicina, um aminoglicosídeo, pode ser explicada por ser de uso comum na avicultura, principalmente em pintainhos recém eclodidos, para controle de *Salmonella* (Spectinomycin, 2008). Em estudo desenvolvido no Brasil pela

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com cepas de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango, também foi relatado alto percentual de resistência para a classe dos aminoglicosídeos, com 89,3% para estreptomicina (BRASIL, 2012).

Drogas mais antigas e de grande uso no tratamento de infecções, como o cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprim, ampicilina e amoxacilina, têm sido substituídas atualmente pelas fluoroquinolonas (Souza et al., 2010). Com isso, o elevado percentual de resistência das cepas de *S. Enteritidis* ao ácido nalidíxico (quinolona) e ciprofloxacina (fluoroquinolona), possivelmente se deve ao fato de serem comumente utilizados hoje na medicina humana e veterinária (Tamang et al., 2011). Somado a este problema, muitos estudos correlacionam ainda o aumento na resistência às quinolonas em *Salmonella* na medicina humana à liberação dessas drogas para uso na produção animal (Mølbak et al., 2002; Marimón et al., 2004; Choi et al., 2005).

Para os  $\beta$ -lactâmicos avaliados, o maior índice de resistência foi para o ceftiofur em *S. Enteritidis*, com 30,6% (34/111) (Tabela 2). Acredita-se que o aumento da prevalência de resistência às cefalosporinas em *Salmonella*, tanto de origem humana como animal, pode estar relacionada com a utilização de ceftiofur em animais de produção. Este antimicrobiano é utilizado apenas em medicina veterinária, e seu uso na produção animal pode ter selecionado positivamente cepas de *Salmonella* carreando  $\beta$ -lactamases responsáveis por conferir resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (Carattoli et al., 2002). Como os  $\beta$ -lactâmicos são amplamente utilizados para tratar infecções por *Salmonella* tanto em animais como em humanos, consequentemente, a resistência generalizada a essas drogas tem emergido (Bradford, 2001).

A avaliação da CIM para ciprofloxacina demonstrou que a maioria dos isolados de *S. Enteritidis* apresentou inibição do crescimento entre 0,125 a 0,25  $\mu\text{g/mL}$  (resistência intermediária) com 92,8% (103/111) dos isolados, e entre 0,023 a 0,032  $\mu\text{g/mL}$  (sensível) para *S. Typhimurium* com 77,8% (35/45) dos isolados, incluindo a variante monofásica I 4,[5],12:i:- com 96,8% (30/31). Para ceftazidima, em todos os sorovares de *Salmonella*, a faixa de maior inibição de crescimento microbiano variou entre 0,38 e 0,75  $\mu\text{g/mL}$  (sensível), com 86,5% (96/111) para *S. Enteritidis*, 91,1% (41/45) para *S. Typhimurium* e 100% (31/31) para *S. Typhimurium* variante monofásica I 4,[5],12:i:-.

Quando comparados os resultados obtidos pelos testes de disco difusão e CIM para os antimicrobianos ciprofloxacina e ceftazidima, nota-se que há alta relação entre os testes ( $P < 0,05$ ), demonstrando a equivalência dos resultados obtidos. Isso indica que o teste de disco difusão, método relativamente barato em relação a CIM, pode ser seguramente aplicado na rotina para triagem da resistência das cepas circulantes. Já a CIM permite a obtenção de

resultados mais precisos quanto à monitorização da sensibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos, pois determina a exata dosagem a ser aplicada na terapêutica. Estes dois métodos associados atuam como ferramentas de grande importância para caracterização das cepas circulantes (BRASIL, 2012).

*S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* estão comumente envolvidos em casos humanos de doenças alimentares (EFSA, 2015), desta forma, os elevados percentuais de resistência encontrados neste estudo geram preocupações quanto às perspectivas no tratamento de infecções humanas. Isto se deve à possibilidade de cepas resistentes isoladas do frango de corte serem transferidas ao homem via alimento contaminado, as quais podem não responder adequadamente a terapia com uso de antimicrobianos (Lai et al., 2014).

Foi evidenciado neste estudo resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos nos diferentes sorovares de *Salmonella* avaliados, permitindo reconhecer inúmeros perfis de multirresistência, com 32,4% (36/111) para *S. Enteritidis*, 46,7% (21/45) em *S. Typhimurium* e 32,3% (10/31) em *S. Typhimurium* variante monofásica I 4,[5],12:i:-. Esses dados apontam para um quadro extremamente preocupante, especialmente pelo percentual de cepas que apresentaram resistência de cinco a sete classes, com 16,2% (18/111) em *S. Enteritidis* e 20% (9/45) em *S. Typhimurium* (Tabela 3).

A tabela 4 mostra os 33 perfis de resistência aos antimicrobianos identificados (A1 a A33) em *S. Enteritidis*, sendo que os perfis de A16 a A33 agruparam cepas de caráter multirresistente, correspondente a 32,4% (36/111). De 36 cepas resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos, apenas uma cepa (2,8%), pertencente ao perfil A32, apresentou o gene *bla<sub>AmpC</sub>*, a qual foi resistente a seis classes de antimicrobianos, incluindo quase todas as drogas testadas na classe dos  $\beta$ -lactâmicos. Micro-organismos que superexpressam as  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC são uma grande preocupação clínica, pois são geralmente resistentes a todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (Pérez-Pérez e Hanson, 2002).

Para *S. Typhimurium*, 30 perfis de resistência foram descritos (B1 a B30), sendo que os perfis de B10 a B29 agruparam 21/45 (46,7%) isolados multirresistentes. Destes, 20 isolados apresentaram resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, sendo que 75% (15/20) albergaram um ou dois dos genes de resistência estudados. Onze cepas apresentaram o gene *bla<sub>AmpC</sub>* (55%), sete (35%) o gene *bla<sub>TEM</sub>* e cinco (25%) o gene *bla<sub>CTX-M</sub>*. Seis isolados (30%) apresentaram concomitantemente os genes *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>AmpC</sub>*, e dois (10%) os genes *bla<sub>CTX-M</sub>* e *bla<sub>AmpC</sub>* (Tabela 5).

Na tabela 6 estão demonstrados 20 perfis de resistência (C1 a C20) obtidos para *S. Typhimurium* variante monofásica I 4,[5],12:i:-. Dez isolados (32,3%) foram classificados

como multirresistentes, e foram distribuídos dos perfis C11 a C20. Quinze cepas (48,4%) resistentes a um ou mais  $\beta$ -lactâmicos foram avaliadas para a presença de genes relacionados à resistência a estas drogas, sendo que destas, sete (46,7%) foram positivas para o gene *blatem*, uma (6,7%) para *blactx-m* e sete (46,7%) não apresentaram nenhum dos genes estudados.

Uma preocupação emergente nos últimos anos está relacionada com agentes patogênicos de origem alimentar que albergam genes de resistência aos antimicrobianos. A elevada presença dos genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos encontrados em *S. Typhimurium* em relação a *S. Enteritidis* é um dado importante encontrado neste estudo. Isto provavelmente se deve às mutações cromossômicas descritas para o sorovar *Typhimurium*, o qual tem sua resistência associada aos chamados integrons cromossômicos, que atuam como locais de inserção de genes de resistência ou grupo destes que podem ser encontrados tanto no DNA cromossômico como extracromossômico (Sandvang et al., 1998). A resistência antimicrobiana se tornou comum em *S. Typhimurium*, havendo diversos estudos que relatam um aumento significativo do número de cepas que apresentam resistência a inúmeras drogas, incluindo cefalosporinas de amplo espectro e quinolonas (Threlfall, 2002; Witte, 2004).

Nenhuma das 187 cepas estudadas apresentaram o gene *blas hv*, associado a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos. Este gene é comumente relatado em Enterobacteriaceae no mundo todo, no entanto, parece ser mais comumente encontrados em *Klebsiella* spp. (Paterson et al., 2003).

Estudos demonstram que a integração de genes *qnr* em diferentes plasmídeos tenham proporcionado uma rápida disseminação de mecanismos de resistência às quinolonas (Poirel et al., 2008), no entanto, os genes *qnrA* e *qnrS* não foram identificados em nenhuma cepa de *Salmonella*. Cheung et al. (2005) afirmam que a resistência às quinolonas mediada por plasmídeos em *Salmonella* são eventos raros de ocorrer.

Ao correlacionar a existência de fenótipos de resistência às quinolonas com a ausência dos genes estudados, sugere-se que outros genes estejam envolvidos na manifestação destes fenótipos, os quais não foram incluídos neste estudo, ou que pela localização plasmidial tenham sido perdidos durante repiques e manutenção na bacterioteca. Silva (2011) ao estudar mecanismos de resistência em cepas de *Salmonella* isoladas de aves e fontes relacionadas também não identificou genes do tipo *qnr* nas amostras resistentes às quinolonas. Outros mecanismos também podem estar envolvidos na resistência às quinolonas, como a perda de permeabilidade da membrana, perda na expressão de porinas, e a superexpressão de bombas de efluxo da droga (Nishino et al., 2007; Lunn et al., 2010).

Vale ressaltar que, com exceção do perfil B16 (Tabela 5), todos os demais perfis classificados como multirresistentes nos três sorovares de *Salmonella*, apresentaram resistência a uma ou mais drogas pertencentes à classe dos  $\beta$ -lactâmicos. Ao observar os diferentes perfis de multirresistência obtidos para os diferentes sorovares, observa-se que a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos está associada à resistência as drogas do grupo das quinolonas (NAL) e fluoroquinolonas (CIP, ENR), e também aos aminoglicosídeos (SH, NEO, GEN). Este resultado pode ser explicado pelo fato de cepas produtoras de enzimas ESBLs, responsáveis por conferir resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, geralmente exibirem co-resistência às quinolonas e aminoglicosídeos, sendo extremamente importante a realização de teste de susceptibilidade antimicrobiana para avaliação do uso adequado destes agentes (Uma et al., 2010). Tais fenótipos de multirresistência em *Salmonella* têm sido associados à presença de um plasmídeo que carreia genes de resistência a diversos antimicrobianos (Fernandes et al., 2009), ou ainda devido a presença de dois ou mais plasmídeos diferentes em uma mesma bactéria (Villa e Carattoli, 2005).

A ocorrência concomitante de mecanismos de resistência às quinolonas e  $\beta$ -lactâmicos têm sido relatada na literatura como um ponto de urgência epidemiológica, uma vez que as fluoroquinolonas constituem uma alternativa terapêutica à produtores de  $\beta$ -lactamases, restringindo assim as alternativas terapêuticas no tratamento de infecções por fenótipos resistentes (Damian et al., 2010). A resistência a um agente antibacteriano frequentemente resulta em resistência cruzada com outros agentes da mesma classe. Este tipo de resistência pode ser transferido rapidamente entre diferentes gêneros e espécies de bactérias, sendo comum entre os membros da família Enterobacteriaceae (Quinn, 2005).

Diante dos casos de resistência associada aos  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), quinolonas e aminoglicosídeos, somente algumas drogas pertencentes à classe dos carbapenêmicos, como o imipenem, conservam sua atividade frente às enterobactérias produtoras de ESBL (Pitout, 2010). Provavelmente, a ocorrência de resistência ao imipenem encontrada neste estudo, se deve a utilização dos carbapenêmicos no Brasil, como a mais recente alternativa terapêutica. A ocorrência de perfis que agruparam amostras resistentes ao imipenem (A18, A22 e A33 em *S. Enteritidis*, B13, B21 e B27 em *S. Typhimurium* e C7, C9 e C20 em *S. Typhimurium* variante monofásica I 4,[5],12:i:-) é um dado preocupante, visto que a maioria destes perfis foram compostos por isolados multirresistentes, limitando a utilização de drogas comumente aplicadas na antibioticoterapia (Tabelas 4, 5 e 6). Estes dados alertam para a necessidade do uso racional dos carbapenêmicos, visando prevenir a surgimento de novos micro-organismos multirresistentes.

As melato-β-lactamases (MBLs) são enzimas codificadas por genes encontrados numa variedade de elementos genéticos (cromossomo, plasmídeo, integrons, etc), descritas por conferir resistência aos carbapenêmicos, cefalosporinas e penicilinas, de modo que as bactérias que possuem esta enzima estão entre os fenótipos mais resistentes encontrados na clínica médica (Walsh, 2005). A presença de MBLs nas cepas estudadas podem explicar os fenótipos de multirresistência encontrados, no entanto, não foi avaliada a presença dos genes codificadores dessas enzimas neste estudo.

Ao relacionar a presença dos genes com os perfis de resistência antimicrobiana identificados, observa-se que os genes *bla*<sub>AmpC</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> estão associados à resistência às cefalosporinas e penicilinas, enquanto o gene *bla*<sub>TEM</sub> às penicilinas (Tabelas 4, 5 e 6), concordando com os relatos de Bush et al. (1995), Batchelor et al. (2005) e Babic et al. (2006). Isto se explica pelo fato de haver uma variação em especificidade de substrato entre as β-lactamases, sendo que algumas hidroxilam preferencialmente as penicilinas, enquanto outras têm afinidade pelas cefalosporinas, além de algumas enzimas inativarem ambas as classes de antibióticos (Sousa Jr. et al., 2004).

Quanto aos genes de virulência analisados, os isolados de *S. Enteritidis* foram agrupados em cinco perfis (P1 a P5), com predomínio do perfil P1 (*invA*, *sefA*, *agfA*, *lpfA*) com 92,8% (103/111), demonstrando que estes genes estão largamente distribuídos. Este dado demonstra o potencial patogênico deste sorovar, o qual é o principal associado à salmonelose humana no mundo (EFSA, 2015). Em *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium* variante monofásica I 4,[5],12:i:-, o perfil P2 (*invA*, *agfA* e *lpfA*) foi o mais prevalente com 93,3% (42/45) e 96,8% (30/31), respectivamente (Tabela 7). A alta frequência destes genes de virulência destaca o potencial de patogenicidade dos sorovares de *Salmonella* estudados, e sua capacidade em desencadear doença no homem e animais.

Verificou-se que todos isolados apresentaram pelo menos um dos genes fimbriais analisados neste estudo (*agfA*, *lpfA*, *sefA*), destacando a importância da fímbria no processo de infecção. É possível que haja efeitos aditivos das adesinas Lpf e Agf na colonização do intestino e na virulência sistêmica (Wagner e Hensel, 2011). Além de ser importante para a adesão durante o processo de infecção, o gene *agfA* também está associado com a formação de biofilme (Yoo et al. 2013). A presença deste gene em *Salmonella* isolada de carcaças, indicam perigo de contaminação nos matadouros, e consequente infecção humana pelo patógeno. O gene *sefA* foi detectado apenas em *S. Enteritidis* (94,6%) (Tabela 7), o que era esperado, já que os genes do operon *sef* (*sefABCD*) são restritos aos sorotipos do grupo D,

que incluem *S. Enteritidis* (Bäumler et al., 1997). Devido à especificidade do gene *sef*, ele tem sido utilizado para a identificação molecular da *S. Enteritidis* (Crăciunaş et al., 2012).

Em *S. Enteritidis* foram identificados 15 ribogrupos, denominados R1<sub>SE</sub> a R15<sub>SE</sub>. R1<sub>SE</sub> foi o mais prevalente, com 48,6% (54/111), isoladas no período analisado, de 2009 a 2011, amplamente distribuídas pelo país, com isolados provenientes das cinco regiões brasileiras, abrangendo os Estados de PE e BA na região nordeste, GO e MT na região Centro Oeste, PA na região Norte, SP, MG e ES na região sudeste, e PR, SC e RS na região sul. O ribogrupo R2<sub>SE</sub>, representou 18% (20/111) das cepas deste sorovar, também com ampla distribuição no Brasil, ausente apenas na região norte. R3<sub>SE</sub> agrupou 15,3% (17/111) dos isolados, todos do ano de 2011, presentes nas regiões centro oeste (GO e MS), sudeste (MG e SP) e sul (PR e RS). R4<sub>SE</sub> foi composto por 6,3% das cepas, isoladas em GO, SP e RS nos anos de 2010 e 2011. Os ribogrupos R5<sub>SE</sub> a R15<sub>SE</sub> agruparam de uma a duas cepas, não sendo possível uma análise mais detalhada destes perfis (Tabela 8). Vale ressaltar ainda, o elevado número de isolados de caráter multirresistente encontrados principalmente no RS em 2010, e em GO em 2010 e 2011. Goiás foi o único local no qual foi identificado o gene *bla*<sub>AmpC</sub> (A32), e também o único a agrupar isolados resistentes ao imipenem (A18, A22 e A33), incluindo um isolado resistente a sete classes de antimicrobianos, alertando para o possível uso indiscriminado destas drogas na produção avícola dessa região.

Outro dado importante encontrado no ribogrupo R1<sub>SE</sub> é o elevado número de cepas multirresistentes encontradas no ano de 2010, apresentando resistência a seis classes de antimicrobianos, incluindo drogas pertencentes às cefalosporinas, penicilinas, quinolonas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos (perfis A19, A23 a A31). Possivelmente estas cepas podem ter adquirido um plasmídeo, o que não foi avaliado neste estudo, o qual pode carrear genes de resistência as quinolonas (ácido nalidíxico - NAL), fluoroquinolonas (ciprofloxacina – CIP, enrofloxacina – ENR), aminoglicosídeos (espectinomicina- SH), penicilinas (amoxacilina/ácido clavulânico - AMC, ampicilina - AMP) e cefalosporinas (cefalexina - CFX, ceftazidima - CAZ, cefotaxima - CTX e ceftiofur - EFT), responsável pelo fenótipo de resistência aos antimicrobianos descritos nestes perfis. A clonalidade de cepas, em especial as que apresentam resistência múltipla a drogas antimicrobianas, é um assunto relevante em estudos epidemiológicos, já que a disseminação de clones multirresistentes provoca grandes danos à saúde pública, saúde animal e economia, devido às perdas ocasionadas pela doença, com hospitalização e gastos com medicamentos (Davies et al., 2002).

Para o sorovar *S. Typhimurium* foram descritos 17 ribogrupos (R1<sub>ST</sub> a R17<sub>ST</sub>), sendo R1<sub>ST</sub> e R2<sub>ST</sub> os mais prevalentes, com 31,1% (14/45) e 28,9% (13/45), respectivamente. R1<sub>ST</sub>

agrupou cepas provenientes das regiões centro oeste (GO e MS) e sul (PR e SC), com perfis de multirresistência reportados em Goiás, Paraná e Santa Catarina, nos quais também houve presença dos genes *blaTEM* e *blaAmpC*. O ribogrupo R2<sub>ST</sub> foi composto por cepas originárias dos Estados da BA, ES, MG, SP, MS, PR e SC, entre os anos de 2010 e 2011. Neste ribogrupo, cepas multirresistentes foram identificadas na BA e MS no ano de 2010, e no ES e MG em 2011, e os genes *blaTEM* e *blaAmpC* estiveram presentes nos isolados da BA, ES e MG, enquanto que *blaCTX-M* e *blaAmpC* foram verificados no MS. Os ribogrupos R3<sub>ST</sub> a R17<sub>ST</sub> agruparam de uma a três cepas, sendo que R4<sub>ST</sub>, R9<sub>ST</sub>, R10<sub>ST</sub>, R13<sub>ST</sub>, R14<sub>ST</sub>, R15<sub>ST</sub> e R16<sub>ST</sub> continham cepas de caráter multirresistentes. O gene *blaCTX-M* foi identificado no PR e em SP, o *blaAmpC* na BA, SP, SC e GO e *blaTEM* apenas em SC.

Em *S. Typhimurium* variante monofásica I 4,[5],12:i:- foram descritos seis ribogrupos (R1<sub>STvm</sub> a R6<sub>STvm</sub>), sendo R1<sub>STvm</sub> e R2<sub>STvm</sub> os mais prevalentes com 54,8% (17/31) e 32,2% (10/31), respectivamente. R1<sub>STvm</sub> agrupou cepas provenientes de MG, SP, PR, SC e MS, todas isoladas em 2011. Perfis de multirresistência foram identificados apenas nas cepas isoladas em MG, SC e MS, as quais apresentaram apenas o gene *blaTEM*. Já o ribogrupo R2<sub>STvm</sub> foi composto de cepas de MS, SP e PR de 2010, e uma cepa de GO de 2011, com apenas uma cepa multirresistente proveniente de MS. Os ribogrupos R3<sub>STvm</sub> a R6<sub>STvm</sub> agruparam cada um apenas uma cepa. Apenas R3<sub>STvm</sub> e R4<sub>STvm</sub> apresentaram cepas multirresistentes provenientes de SP e MG, respectivamente, sendo que a cepa de SP foi positiva para o gene *blaCTX-M*.

A alta resistência antimicrobiana e distribuição de genes de virulência, em cepas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* isoladas em carcaças de frango, demonstram o perigo referente à manipulação inadequada nas residências e consumo desse produto, e a necessidade de assegurar boas práticas de higiene desde o campo, no ambiente de criação das aves, até a mesa do consumidor, a fim de reduzir a propagação destes micro-organismos patogênicos do animal para o homem. Determinantes de virulência e resistência antimicrobiana podem estar presentes no mesmo elemento genético, o qual pode ser selecionado por pressão antimicrobiana (Mendoza et al., 2009), resultando no aumento de infecções sistêmicas e hospitalização de pacientes infectados com *Salmonella* resistente (Varma et al., 2005).

A ribotipagem automatizada não distinguiu isolados multirresistentes daqueles sensíveis. Portanto, não houve relação entre ribogrupo e resistência antimicrobiana, podendo cepas sensíveis e resistentes a vários antimicrobianos pertencerem ao mesmo ribogrupo, sugerindo que cepas indistinguíveis geneticamente pela ribotipagem podem ser recuperadas de diferentes locais, apresentando perfis de resistência e virulência característicos da região de

origem. Estes resultados permitem inferir que isolados das diferentes regiões brasileiras estão clonalmente relacionados, indicando a disseminação de cepas provenientes de uma fonte comum no país. No entanto, os perfis de resistência identificados mostram que os níveis e extensão da resistência são influenciados pelas diferentes práticas de uso destes fármacos, determinando a variação dos perfis de acordo com a região de isolamento da cepa, as quais podem ter incorporado ao seu material genético elementos móveis presentes no ambiente local.

Concluindo, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* isolados de carcaças de frango no Brasil apresentaram taxas relativamente altas de resistência aos antimicrobianos de uso humano e veterinário. Consideramos alarmante o elevado número de fenótipos multirresistentes, incluindo a co-resistência entre  $\beta$ -lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, o que provavelmente tem resultado em falhas na terapêutica, e ao maior uso dos carbapenêmicos, o que explicaria a ocorrência de casos de resistência ao imipenem dentre os sorovares.

A identificação de cepas de *Salmonella* clonalmente relacionadas, agrupando elevado número de isolados multirresistentes, confirma a endemicidade deste fenótipo, amplamente distribuído no Brasil, alarmando para o perigo que representa para a saúde pública. Além disto, grande parte das cepas albergaram quase todos os genes de virulência estudados, com destaque para o *agfA*, relacionado a capacidade de formação de biolfime, o que permite a adaptação e fixação deste patógeno no ambiente e, consequentemente, sua disseminação dentro do matadouro, contaminando carcaças e aumentando o perigo da infecção em humanos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Nacional de Agricultura de Campinas (LANAGRO-SP) por fornecer as cepas de *Salmonella* utilizadas neste estudo.

Ao Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia por ceder as cepas controle positivo para realização da técnica de PCR para pesquisa dos genes de resistência aos antimicrobianos.

## REFERÊNCIAS

Alekshun, M. N., and S. B. Levy. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 128:1037-1050.

Babic, M., A. M. Hujer, and R. A. Bonomo. 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist. Updat.* 9:142-156.

Batchelor, M., K. Hopkins, E. J. Threlfall, F. A. Clifton-Hadley, A. D. Stallwood, R. H. Davies, and Liebana, E. 2005. *blactX-M* genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1319-1322.

Bäumler, A. J., A. J. Gilde, R. M. Tsolis, A. W. Van Der Velden, B. M. Ahmer, and F. Heffron. 1997. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. *J. Bacteriol.* 179:317-22.

Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:933-51.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. 2012. Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos. Brasília. 171 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 12 janeiro 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica - MS/SVS/DEVIT. 2014. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE – DTA. São Paulo, SP. Disponível em: <[http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3\\_PAINEL\\_1\\_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto\\_2014\\_PDF.pdf](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf)> Acesso em: 24 junho 2015.

Bruce, J. L. 1996. Automated system rapidly identifies and characterises microorganisms in foods. *Food. Technol.* 50:77-81.

Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211-1233.

Carattoli, A., F. Tosini, W. P. Giles, M. E. Rupp, S. H. Hinrichs, F. J. Angulo, T. J. Barrett, and P. D. Fey. 2002. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* isolated in the United States between 1996 and 1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1269-1272.

Cattoir, V., L. Poirel, V. Rotimi, C. J. Soussy, and P. Nordmann. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 60:394-397.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. 2014. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC.

Chen, S., S. Zhao, D. G. White, C. M. Schroeder, R. Lu, H. Yang, P. F. McDermott, S. Ayers, and J. Meng. 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:1-7.

Cheung T. K., Y. W. Chu, M. Y. Chu, C. H. Ma, R. W. Yung, and K. M. Kam. 2005. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype enteritidis in Hong Kong. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:586-589.

Choi, S. H., J. H. Wood, J. E. Lee, S. J. Park, E. J. Choo, Y. G. Kwark, M. N. Kim, M. S. Choi, N. Y. Lee, B. K. Lee, N. J. Kim, J. Y. Jeong, J. Ryu, and Y. S. Kim. 2005. Increasing

incidence of quinolone resistance in human non-typhoid *Salmonella enteric* isolates in Korea and mechanisms involved in quinolone resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:1111-1114.

CLSI - Clinical And Laboratory Standards Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement. CLSI M100-S23, Wayne.

Collinson, K., P. C. Doig, J. L. Doran, S. Clouthier, T. J. Trust, and W. W. Kay. 1993. Thin aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella Enteritidis* to fibronectin. *J. Bacteriol.* 175:12-18.

Crăciunăș, C., A. L. Keul, M. Flonta, and M. Cristea. 2012. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting hilA, agfA, spvC and sef genes. *J. Environ. Manage.* 95:S15-8.

D'Souza, D. H., F. J. Critzer, and D. A. Golden. 2009. Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction for the rapid detection of *Salmonella* using invA primers. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:1097-106.

Damian, M., C. R. Usein, A. M. Palade, M. Baltoiu, M. Condei, S. Ciontea, and D. Tatu-Chitoiu. 2010. Bacterial enteric pathogens' resistance to fluoroquinolones and last generation cephalosporins. *Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol.* 55:121-129.

Davies, M. A., D. D. Hancock, and T. E. Besser. 2002. Multiresistant clones of *Salmonella enterica*: the importance of dissemination. *J. Lab. Clin. Med.* 140:135-141.

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 J.* 13:162 p.

EFSA - European Food Safety Authority. 2008. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *EFSA J.* 765:1-87.

Fernandes, S. A., D. L. Paterson, A. C. Ghilardi-Rodrigues, J. M. Adams-Haduch, A. T. Tavechio, and Y. Doi. 2009. CTX-M-2 producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. *Microb. Drug Resist.* 15:317-321.

Fernandes, S. A., A. C. R. Ghilardi, A. T. Tavechio, A. M. O. Machado, and A. C. C. Pignatari. 2003. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 45:59-63.

Fluit, A. C. 2005. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43:1-11.

Gal-Mor, O., and B. B. Finlay. 2006. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell. Microbiol.* 8:1707-1719.

Heuzenroeder, M. W., C. J. Murray, and R. M. Dalcin. 2000. Molecular basis of benign colonization of *Salmonella* Sofia in chickens. *RIRDC*, 1:106.

Lai, J., C. Wu, C. Wu, J. Qi, Y. Wang, H. Wang, Y. Liu, and J. Shen. 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.

Lunn, A. D., A. Fàbrega, J. Sánchez-Cespedes, and J. Vila. 2010. Prevalence of mechanisms decreasing quinolone-susceptibility among *Salmonella* spp. clinical isolates. *Int. Microbiol.* 13:15-20.

Magiorakos, A. P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, and D. L. Monnet. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:268-281.

Marimón, J. M., M. Gomaáriz, C. Zigorraga, G. Cilla, E. Pérez-Trallero. 2004. Increasing prevalence of quinolone resistance in human nontyphoid *Salmonella enterica* isolates obtained in Spain from 1981 to 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3789-3793.

Martins, C. H. G., V. R. Santos, F. A. Castro, S. A. Fernandes, and R. Martinez. 2006. Ribotyping of *Salmonella Enteritidis* strains reveals the spread of a single genotype in the Brazilian city of Ribeirão Preto. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 42:19-23.

Meakins, S., I. S. Fisher, C. Berghold, P. Gerner-Smidt, H. Tschäpe, M. Cormican, I. Luzzi, F. Schneider, W. Wannett, J. Coia, A. Echeita, and E. J. Threlfall. 2008. Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000-2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network. *Microb. Drug Resist.* 14:31-35.

Mendoza, M. del C., A. Herrero, and M. R. Rodicio. 2009. Ingeniería evolutiva en *Salmonella*: la emergencia de plásmidos de virulencia-resistencia a antimicrobianos en sorotipos no tifoideos. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 27:37-43.

Mølbak, K., P. Gerner-Smidt, and H. C. Wegenert. 2002. Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Emerg. Infect. Dis.* 8:514-515.

Monstein, H. J., Å. Östhholm-Balkhed, N. V. Nilsson, M. Nilsson, K. Dornbusch, and L. E. Nilsson. 2007. Multiplex PCR amplification assay for rapid detection of *blastv*, *blatem* and *blactx-m* genes in Enterobacteriaceae. *APMIS.* 115:1400-1408.

Nishino, K., E. Nikaido, and A. Yamaguchi. 2007. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 189:9066-9075.

Oliveira, S. D., C. R. Rodenbusch, G. B. Michael, M. I. R. Cardoso, C. W. Canal, and A. Brandelli. 2003. Detection of virulence genes in *Salmonella Enteritidis* isolates from different sources. *Braz. J. Microbiol.* 34:123-124.

Paterson, D. L., K. M. Hujer, and A. M. Hujer. 2003. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3554-3560.

Pérez-Pérez, F. J., and N. D. Hanson. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40:2153-2162.

Pitout, J. D. 2010. Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs.* 70:313-333.

Poirel, L., V. Cattoir, and P. Nordmann. 2008. Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? *Clin. Microbiol. Infect.* 14:295-297.

Quinn, P. J. 2005. Agentes Antimicrobianos. Pages 43-49 in *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. P. J. Quinn, B. K. Markey, M. E. Carter, W. J. Donnelly, and F. C. Leonard (Eds) . Artmed, Porto Alegre.

Sandvang, D., F. M. Aarestrup, and L. B. Jensen. 1998. Characterization of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Lett.* 160:37-41.

Shahid, M. 2010. *Citrobacter* spp. simultaneously harboring *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>ampC</sub>, and insertion sequences IS26 and *orf513*: an evolutionary phenomenon of recent concern for antibiotic resistance. *J. Clin. Microbiol.* 48:1833-1838.

Silva, K. C. 2011. Monitoramento dos mecanismos de resistência em *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de animais de produção agropecuária e alimentos derivados. Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sousa Jr., M. A., E. S. Ferreira, and G. C. Conceição. 2004. Betalactamases de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. *Newslab*, 63:152-174.

Souza, R. B., M. Magnani, and T. C. R. M. Oliveira. 2010. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. *Semina: Ciências Agrárias*, 31:413-428.

Spectinomycin (Veterinary-Systemic). The United States Pharmacopeial Convention. 2008. Disponível em: <<http://c.ymcdn.com/sites/www.aavpt.org/resource/resmgr/imported/spectinomycin.pdf>> Acesso em: 25 fev. 2016.

Suez, J., S. Porwollik, A. Dagan, A. Marzel, Y. I. Schorr, P. T. Desai, V. Agmon, M. McClelland, G. Rahav, and O. Gal-Mor. 2013. Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. *PLoS ONE*. 8:e58449.

Tamang, M. D., H. M. Nam, A. Kim, H. S. Lee, T. S. Kim, M. J. Kim, G. C. Jang, S. C. Jung, and S. K. Lim. 2011. Prevalence and mechanisms of quinolone resistance among selected nontyphoid *Salmonella* isolated from food animals and humans in Korea. *Foodborne Pathog. Dis.* 8:1199-1206.

Threlfall, E. J. 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:141-148.

Uma, B., K. Prabhakar, S. Rajendran, and Y. L. Sarayu. 2010. Prevalence of extended spectrum beta lactamases in *Salmonella* species isolated from patients with acute gastroenteritis. *Indian J. Gastroenterol.* 29:201-204.

Valdez, Y., R. B. Ferreira, and B. B. Finlay. 2009. Molecular mechanisms of *Salmonella* virulence and host resistance. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 337:93-127.

Varma, J. K., K. D. Greene, J. Ovitt, T. J. Barrett, F. Medalla, and F. J. Angulo. 2005. Hospitalization and antimicrobial resistance in *Salmonella* outbreaks, 1984-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 11:943-6.

Vieira, M. A. M. 2009. Ilhas de patogenicidade. *O mundo da saúde*, 33:406-414.

Villa, L., and A. Carattoli. 2005. Integrons and transposons on the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence plasmid. *Antimicrob. Agents Chemotherap.* 49:1194-1197.

Wagner, C., and M. Hensel. 2011. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. Pages 17-34 in *Bacterial Adhesion - Chemistry, Biology and Physics*. D. Linke, and A. Goldman. (Eds), Springer, New York.

Walsh, T. R. 2005. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 6:2-9.

Witte, W. 2004. International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. *Infect. Genet. Evol.* 4:187-191.

Yoo, A. Y., J. E. Yu, H. Yoo, T. H. Lee, W. H. Lee, J. I. Oha, and H. Y. Kang. 2013. Role of sigma factor E in regulation of *Salmonella* Agf expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430:131-136.

## TABELAS

**Tabela 1.** Sequência dos *primers* e peso molecular (pb) dos genes de virulência e resistência avaliados no estudo.

Gene	Primers	Peso Molecular	Referência
<i>invA</i>	F:5'GTGAAATTATGCCACGTTGGCAA3' R:5'TCATCGCACCGTCAAAGGAACC3'	284 pb	Oliveira et al. (2003)
<i>sefA</i>	F:5'GATACTGCTAACGTAGAAGG3' R:5'GCGTAAATCAGGATCTGCAGTAGC3'	488 pb	Oliveira et al. (2003)
<i>agfA</i>	F:5'TCCACAATGGGGCGCGCG3' R:5'CCTGACGCACCATTACGCTG3'	350 pb	Collinson et al. (1993)
<i>lpfA</i>	F:5'CTTCGCTGCTGAATCTGGT3' R:5'CAGTGTAAACAGAAACCAGT3'	250 pb	Heuzenroeder et al. (2000)
<i>blatem</i>	F: 5'CAGCGTAAGATCCTTGAGA3' R: 5'ACTCCCCTCGTAGATAA3'	643 pb	Chen et al. (2004)
<i>plashv</i>	F: 5'GCCGCGTAGGCATGATAGA3' R: 5'CCCGCGATTGCTGATTTC3'	714 pb	Chen et al. (2004)
<i>blactx-M</i>	F: 5'ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC3' R: 5'TGGGTRAARTARGTSACCAGAACGCG3'	593 pb	Monstein et al. (2007)
<i>blaAmpC</i>	F: 5'CCCCGTTATAGAGCAACAA3' R: 5'TCAATGGTCGACTTCACACC3'	634 pb	Shahid (2010)
<i>qnrA</i>	F: 5'AGAGGATTCTCACGCCAGG3' R: 5'TGCCAGGCACAGATCTTGAC3'	580 pb	Cattoir et al. (2007)
<i>qnrS</i>	F: 5'GCAAGTTCATGAAACAGGGT3' R: 5'TCTAACCGTCGAGTCGGCG3'	428 pb	Cattoir et al. (2007)

pb: pares de bases

**Tabela 2.** Resistência aos antimicrobianos de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium* variante monofásica I 4,[5],12:i:- isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 a 2011.

Antimicrobianos	Número de cepas (%)*		
	<i>S. Enteritidis</i> N = 111	<i>S. Typhimurium</i> N = 45	<i>S. Typhimurium</i> variante monofásica I 4,[5],12:i:- N = 31
Amoxacilina/Ácido Clavulânico	18 (16,2)	10 (22,2) E	1 (3,2) F
Ampicilina	19 (17,1)	13 (28,9)	9 (29,0)
Cefalexina	18 (16,2)	7 (15,5)	1 (3,2)
Ceftazidima	17 (15,3)	5 (11,1)	0 (0,0)
Cefotaxima	16 (14,4)	9 (20,0)	3 (9,7)
Ceftiofur	34 (30,6)	9 (20,0)	5 (16,1)
Imipenem	3 (2,7)	3 (6,6)	3 (9,7)
Ácido Nalidíxico	104 (93,7)	8 (17,8) E	1 (3,2) F
Ciprofloxacina	99 (89,2) A	17 (37,8) B	6 (19,3)
Norfloxacina	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)
Enrofloxacina	42 (37,8) AC	6 (13,3) B	1 (3,2) D
Gentamicina	1 (0,9)	10 (22,2)	7 (22,6)
Neomicina	4 (3,6) AC	9 (20,0) B	5 (16,1) D
Espectinomicina	107 (96,4)	43 (95,6)	31 (100,0)
Tetraciclina	1 (0,9) C	14 (31,1)	5 (16,1) D
Sulfato de Colistina	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)
Sulfametoxazol/Trimetoprim	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)
Fosfomicina	1 (0,9)	1 (2,2)	0 (0,0)

\* Os percentuais referem-se à soma das cepas classificadas como resistente e intermediária pelo teste de disco difusão.

Letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ). A e B: Comparação entre *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. C e D: Comparação entre *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* variante monofásica I 4,[5],12:i:-. E e F: Comparação entre *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium* variante monofásica I 4,[5],12:i:-.

**Tabela 3.** Percentual de resistência entre os sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.

Sorovares	Número de cepas (%) resistentes conforme o número de classes de antimicrobianos*				Total
	0	1-2	3-4	5-7	
<i>S. Enteritidis</i>	0 (0,0)	75 (67,6)	18 (16,2)	18 (16,2)	111 (100,0)
<i>S. Typhimurium</i>	2 (4,4)	22 (48,9)	12 (26,7)	9 (20,0)	45 (100,0)
<i>S. Typhimurium</i> variante monofásica I 4,[5],12:i:-	0 (0,0)	21 (67,7)	9 (29,0)	1 (3,3)	31 (100,0)

\* Os percentuais referem-se à soma das cepas classificadas como resistente e intermediária pelo teste de disco difusão.

**Tabela 4.** Perfis de resistência aos antimicrobianos e presença dos genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em 111 cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.

Perfis	Resistência a antimicrobianos <sup>1</sup>	Classes <sup>2</sup>	Genes <sup>3</sup>	N (%)
A1	SH	1	-	1 (0,9)
A2	(SH)	1	-	3 (2,7)
A3	NAL (CIP)	1	-	2 (1,8)
A4	NAL (CIP) (ENR)	1	-	1 (0,9)
A5	NAL (SH)	2	-	2 (1,8)
A6	SH (CIP)	2	-	2 (1,8)
A7	NAL (CIP) (SH)	2	-	28 (25,2)
A8	NAL SH (CIP)	2	-	15 (13,5)
A9	NAL (CIP) (SH) (ENR)	2	-	9 (8,1)
A10	NAL SH (CIP) (ENR)	2	-	7 (6,4)
A11	SH GEN NEO TET	2	-	1 (0,9)
A12	NAL SH CIP (ENR)	2	-	1 (0,9)
A13	NAL NEO (SH) (CIP)	2	-	1 (0,9)
A14	NAL FOS (CIP) (ENR)	2	-	1 (0,9)
A15	NAL NEO (CIP) (ENR) (SH)	2	-	1 (0,9)
<b>A16</b>	NAL (CIP) (SH) (EFT)	3	0	1 (0,9)
<b>A17</b>	NAL SH (CIP) (EFT)	3	0	1 (0,9)
<b>A18</b>	NAL <b>IPM</b> (SH) (CIP)	3	0	1 (0,9)
<b>A19</b>	NAL (SH) (CIP) (EFT) (ENR)	3	0	8 (7,2)
<b>A20</b>	NAL SH (CIP) (EFT) (ENR)	3	0	5 (4,5)
<b>A21</b>	NAL <b>AMP</b> (CIP) (EFT) (ENR) (SH)	4	0	1 (0,9)
<b>A22</b>	NAL (CIP) ( <b>IPM</b> ) (EFT) (ENR) (SH)	4	0	1 (0,9)
<b>A23</b>	NAL SH AMC AMP CFX (CIP) (CAZ)	6	0	1 (0,9)
<b>A24</b>	NAL SH AMC AMP CAZ CTX CFX EFT	6	0	3 (2,7)
<b>A25</b>	NAL SH AMC AMP CAZ CFX EFT (CTX)	6	0	1 (0,9)
<b>A26</b>	NAL SH AMP CFX EFT (AMC) (CTX) (ENR)	6	0	1 (0,9)
<b>A27</b>	NAL SH AMC AMP CFX (CAZ) (CIP) (EFT)	6	0	1 (0,9)
<b>A28</b>	NAL SH AMC AMP CAZ CTX CFX EFT (CIP)	6	0	2 (1,8)
<b>A29</b>	NAL AMC AMP CAZ CTX CFX EFT (SH) (CIP)	6	0	1 (0,9)
<b>A30</b>	NAL SH AMC AMP CTX CFX EFT (CAZ) (CIP) (ENR)	6	0	1 (0,9)
<b>A31</b>	NAL SH AMC AMP CAZ CTX CFX EFT (CIP) (ENR)	6	0	5 (4,5)
<b>A32</b>	NAL SH AMC AMP CAZ CTX CFX EFT (CIP) (NEO)	6	<i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	1 (0,9)
<b>A33</b>	NAL SH AMC AMP CAZ CTX CFX EFT (CIP) ( <b>IPM</b> )	7	0	1 (0,9)
<b>TOTAL</b>				<b>111 (100,0)</b>

<sup>1</sup> Perfis entre parênteses: cepas com resistência intermediária aos antimicrobianos. AMC: amoxicilina/ácido clavulânico (30  $\mu$ g); AMP: ampicilina (10  $\mu$ g); CAZ: ceftazidima (30  $\mu$ g); CIP: ciprofloxacina (5  $\mu$ g); GEN: gentamicina (10  $\mu$ g); CTX: cefotaxima (30  $\mu$ g); CFX: cefalexina (30  $\mu$ g); NEO: neomicina (30  $\mu$ g); IPM: imipenem (10  $\mu$ g); CT: sulfato de colistina (10  $\mu$ g); EFT: ceftiofur (30  $\mu$ g); ENR: enrofloxacina (5  $\mu$ g); FOS: fosfomicina (50  $\mu$ g); NOR: norfloxacina (10  $\mu$ g); NAL: ácido nalidixico (30  $\mu$ g); TET: tetraciclina (30  $\mu$ g); SXT: sulfametoxzazol/trimetoprim (25  $\mu$ g); SH: espectinomicina (10  $\mu$ g).

<sup>2</sup> Número de classes de antimicrobianos a que as cepas apresentaram resistência.

<sup>3</sup> Genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos avaliados: *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>AmpC</sub>.

Perfis em negrito agruparam cepas de caráter multirresistente (A16 a A33).

Antimicrobianos em negrito são pertencentes à classe dos  $\beta$ -lactâmicos, cujas cepas foram avaliadas quanto à presença dos genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos.

**Tabela 5.** Perfis de resistência aos antimicrobianos e presença dos genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em 45 cepas de *Salmonella* Typhimurium isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.

Perfis	Resistência a antimicrobianos <sup>1</sup>	Classes <sup>2</sup>	Genes <sup>3</sup>	N (%)
B1	SH	1	-	5 (11,2)
B2	(SH)	1	-	10 (22,4)
B3	SH TET	2	-	1 (2,2)
B4	SH (CIP)	2	-	1 (2,2)
B5	(SH) (CIP)	2	-	1 (2,2)
B6	(SH) (CT)	2	-	1 (2,2)
B7	NAL (SH) (CIP)	2	-	1 (2,2)
B8	NEO TET (SH)	2	-	1 (2,2)
B9	SH TET GEN	2	-	1 (2,2)
<b>B10</b>	<b>SH (CIP) (CFX)</b>	<b>3</b>	<i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	1 (2,2)
<b>B11</b>	<b>SH (CIP) (CTX)</b>	<b>3</b>	0	1 (2,2)
<b>B12</b>	<b>SH (CIP) (CTX) (EFT)</b>	<b>3</b>	<i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	1 (2,2)
<b>B13</b>	<b>SH (CIP) (IPM) (ENR)</b>	<b>3</b>	<i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	1(2,2)
<b>B14</b>	<b>SH CTX (CIP) (NEO)</b>	<b>3</b>	0	1 (2,2)
<b>B15</b>	<b>SH AMC NEO TET</b>	<b>3</b>	0	1 (2,2)
<b>B16</b>	<b>NAL SH TET (CIP) (ENR)</b>	<b>3</b>	-	1 (2,2)
<b>B17</b>	<b>SH AMP GEN TET (AMC)</b>	<b>4</b>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	1 (2,2)
<b>B18</b>	<b>SH AMP GEN NEO TET (AMC)</b>	<b>4</b>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (2), <i>bla</i> <sub>AmpC</sub> (2)	2 (4,6)
<b>B19</b>	<b>SH AMP CTX CFX EFT (NEO)</b>	<b>4</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	1 (2,2)
<b>B20</b>	<b>NAL SH CAZ CIP (NEO) (EFT) (FOS) (NOR)</b>	<b>4</b>	0	1 (2,2)
<b>B21</b>	<b>SH AMP CTX CFX EFT (IPM)</b>	<b>5</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	1 (2,2)
<b>B22</b>	<b>NAL SH AMP GEN TET (AMC) (CIP)</b>	<b>5</b>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	1 (2,2)
<b>B23</b>	<b>AMP GEN NEO TET (CIP) (EFT) (SH)</b>	<b>5</b>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	1 (2,2)
<b>B24</b>	<b>SH AMC AMP CAZ CTX CFX EFT</b>	<b>5</b>	0	1 (2,2)
<b>B25</b>	<b>NAL SH AMP GEN TET (AMC) (CIP) (ENR)</b>	<b>5</b>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	1 (2,2)
<b>B26</b>	<b>NAL SH AMP GEN NEO TET SXT (CIP) (ENR)</b>	<b>5</b>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	1 (2,2)
<b>B27</b>	<b>SH AMP CAZ CTX CFX IPM EFT (AMC) (CIP)</b>	<b>7</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	1 (2,2)
<b>B28</b>	<b>SH NAL AMP CAZ GEN CTX CFX EFT TET (AMC) (CIP) (ENR)</b>	<b>7</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	1 (2,2)
<b>B29</b>	<b>SH NAL AMP GEN CTX CFX EFT TET (AMC) (CAZ) (CIP) (ENR)</b>	<b>7</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	1 (2,2)
B30	Multissensível	-		2 (4,6)
<b>TOTAL</b>				<b>45 (100,0)</b>

<sup>1</sup> Perfis entre parênteses: cepas com resistência intermediária aos antimicrobianos. AMC: amoxicilina/ácido clavulânico (30  $\mu$ g); AMP: ampicilina (10  $\mu$ g); CAZ: ceftazidima (30  $\mu$ g); CIP: ciprofloxacina (5  $\mu$ g); GEN: gentamicina (10  $\mu$ g); CTX: cefotaxima (30  $\mu$ g); CFX: cefalexina (30  $\mu$ g); NEO: neomicina (30  $\mu$ g); IPM: imipenem (10  $\mu$ g); CT: sulfato de colistina (10  $\mu$ g); EFT: ceftiofur (30  $\mu$ g); ENR: enrofloxacina (5  $\mu$ g); FOS: fosfomicina (50  $\mu$ g); NOR: norfloxacina (10  $\mu$ g); NAL: ácido nalidíxico (30  $\mu$ g); TET: tetraciclina (30  $\mu$ g); SXT: sulfametoxazol/trimetoprim (25  $\mu$ g); SH: espectinomicina (10  $\mu$ g).

<sup>2</sup> Número de classes de antimicrobianos a que as cepas apresentaram resistência.

<sup>3</sup> Genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos avaliados: *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>AmpC</sub>. Valores entre parênteses nesta coluna referem-se ao número de cepas que apresentaram o gene analisado.

Perfis em negrito agruparam cepas de caráter multirresistente (B10 a B29).

Antimicrobianos em negrito são pertencentes à classe dos  $\beta$ -lactâmicos, cujas cepas foram avaliadas quanto à presença dos genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos.

**Tabela 6.** Perfis de resistência aos antimicrobianos e presença dos genes de resistência aos β-lactâmicos em 31 cepas de *Salmonella* Typhimurium variante monofásica I 4,[5],12:i:- isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.

Perfis	Resistência a antimicrobianos <sup>1</sup>	Classes <sup>2</sup>	Genes <sup>3</sup>	N (%)
C1	SH	1	-	4 (12,9)
C2	(SH)	1	-	8 (25,8)
C3	SH (NEO)	1	-	1 (3,2)
C4	SH NEO	1	-	1 (3,2)
C5	SH (CIP)	2	-	2 (6,5)
C6	SH (EFT)	2	0	1 (3,2)
C7	SH (IPM)	2	0	1 (3,2)
C8	EFT (SH)	2	0	1 (3,2)
C9	(SH) (IPM)	2	0	1 (3,2)
C10	SH AMP GEN	2	<i>blaTEM</i>	1 (3,2)
C11	SH (CIP) (CTX)	3	0	1 (3,2)
C12	AMP (CTX) (SH)	3	0	1 (3,2)
C13	(SH) (CIP) (EFT)	3	0	1 (3,2)
C14	SH AMP GEN TET	3	<i>blaTEM</i>	1 (3,2)
C15	AMP GEN NEO TET (SH)	3	<i>blaTEM</i>	1 (3,2)
C16	AMP GEN NEO TET SH	3	<i>blaTEM</i>	1 (3,2)
C17	SH AMP GEN (AMC) (CIP)	4	<i>blaTEM</i>	1 (3,2)
C18	AMP CTX CFX EFT (SH)	4	<i>blaCTX-M</i>	1 (3,2)
C19	AMP GEN NEO NAL TET (SH) (CIP) (ENR)	4	<i>blaTEM</i>	1 (3,2)
C20	SH AMP GEN IPM TET (EFT)	5	<i>blaTEM</i>	1 (3,2)
<b>TOTAL</b>				<b>31 (100,0)</b>

<sup>1</sup> Perfis entre parênteses: cepas com resistência intermediária aos antimicrobianos. AMC: amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg); AMP: ampicilina (10 µg); CAZ: ceftazidima (30 µg); CIP: ciprofloxacina (5 µg); GEN: gentamicina (10 µg); CTX: cefotaxima (30 µg); CFX: cefalexina (30 µg); NEO: neomicina (30 µg); IPM: imipenem (10 µg); CT: sulfato de colistina (10 µg); EFT: ceftiofur (30 µg); ENR: enrofloxacina (5 µg); FOS: fosfomicina (50 µg); NOR: norfloxacina (10 µg); NAL: ácido nalidíxico (30 µg); TET: tetraciclina (30 µg); SXT: sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg); SH: espectinomicina (10 µg).

<sup>2</sup> Número de classes de antimicrobianos a que as cepas apresentaram resistência.

<sup>3</sup> Genes de resistência aos β-lactâmicos avaliados: *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M* e *blaAmpC*.

Perfis em negrito agruparam cepas de caráter multirresistente (C11 a C20).

Antimicrobianos em negrito são pertencentes à classe dos β-lactâmicos, cujas cepas foram avaliadas quanto à presença dos genes de resistência aos β-lactâmicos.

**Tabela 7.** Genes de virulência e perfil genético de sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.

Sorovares	Genes de virulência	Perfil genético	N (%)	Total
<i>S. Enteritidis</i>	<i>invA</i> , <i>sefA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i>	P1	103 (92,8)	111
	<i>invA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i>	P2	5 (4,5)	
	<i>invA</i> , <i>sefA</i> , <i>lpfA</i>	P3	1 (0,9)	
	<i>sefA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i>	P4	1 (0,9)	
	<i>invA</i> , <i>agfA</i>	P5	1 (0,9)	
<i>S. Typhimurium</i>	<i>invA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i>	P2	42 (93,3)	45
	<i>invA</i> , <i>agfA</i>	P5	2 (4,5)	
	<i>agfA</i> , <i>lpfA</i>	P6	1 (2,2)	
<i>S. Typhimurium</i> variante monofásica I 4,[5],12:i:-	<i>invA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i>	P2	30 (96,8)	31
	<i>invA</i> , <i>agfA</i>	P5	1 (3,2)	

**Tabela 8.** Ribogrupos, ano, local, características de virulência e resistência de 111 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.

Ribogrupo	Ano	Local	Perfil de virulência <sup>1</sup>	Perfis de resistência <sup>2</sup>	Genes de resistência <sup>3</sup>	Total por local	Total por ribogrupo (%)
R1SE	2009	PE	P1	A3 (1), A7 (2), A9 (1)	- (4)	4	
			P2	A2 (1)	- (1)	1	
	2010	BA	P1	<b>A31</b> (1)	0 (1)	1	
		GO	P1	<b>A28</b> (1), <b>A29</b> (1)	0 (2)	2	
		MT	P1	<b>A30</b> (1), <b>A31</b> (1)	0 (2)	2	
		PA	P1	A7 (1)	- (1)	1	
		PR	P1	A7 (2), A9 (1), <b>A19</b> (1)	- (3), 0 (1)	4	
	2011	SC	P1	A7 (3)	- (3)	3	
		RS	P1	A5 (1), <b>A23</b> (1), <b>A24</b> (1), <b>A25</b> (1), <b>A26</b> (1), <b>A27</b> (1), <b>A31</b> (1)	0 (7)	7	
		SP	P3	<b>A28</b> (1)	0 (1)	1	54 (48,6%)
		SP	P1	A4 (1), A7 (3)	- (4)	4	
R2SE	2009	ES	P1	<b>A17</b> (1)	0 (1)	1	
		GO	P1	A7 (3), A8 (1), A9 (2), A10 (2), <b>A19</b> (1), <b>A24</b> (1)	- (8), 0 (2)	10	
	2010	GO	P2	A11 (1)	- (1)	1	
		MG	P1	A8 (1), <b>A20</b> (1)	- (1), 0 (1)	2	
		PR	P1	A8 (1)	- (1)	1	
		PR	P4	A7 (1)	- (1)	1	
		SP	P1	A7 (5), A8 (1), A9 (1), A10 (1)	- (8)	8	
	2011	PE	P1	A3 (1)	-	1	
		BA	P1	A13 (1)	- (1)	1	
		GO	P1	<b>A19</b> (1), <b>A33</b> (1)	0 (2)	2	
		MT	P1	A7 (1)	- (1)	1	
		PR	P1	A7 (1), <b>A19</b> (1)	- (1), 0 (1)	2	
		RS	P1	<b>A24</b> (1)	0 (1)	1	20 (18%)
R3SE	2011	SP	P2	A14 (1)	- (1)	1	
		GO	P1	A8 (2), <b>A31</b> (1), <b>A32</b> (1)	- (2), 0 (1), <i>blaAmpC</i> (1)	4	
		MG	P1	A8 (2), <b>A20</b> (1)	- (2), 0 (1)	3	
		SC	P1	A5 (1), A8 (2)	- (3)	3	
	2011	SP	P1	<b>A20</b> (1)	0 (1)	1	
		GO	P1	A7 (1), <b>A18</b> (1), <b>A31</b> (1)	- (1), 0 (2)	3	
		MG	P1	A2 (1), A8 (1), A12 (1), <b>A19</b> (1)	- (3), 0 (1)	4	
		MS	P1	A8 (1), A9 (1)	- (2)	2	17 (15,3%)
		PR	P1	<b>A20</b> (1)	0 (1)	1	
		RS	P1	A7 (1), A15 (1)	- (2)	2	
		SP	P1	A8 (1), A9 (1), A10 (3)	- (5)	5	

	GO	P1	A7 (1)	- (1)	1	
R4 <sub>SE</sub>	2010	RS	P1	<b>A20</b> (1)	0 (1)	1
		SP	P1	A9 (1)	- (1)	1
	2011	GO	P1	<b>A8 (1), A19 (2)</b>		- (1), 0 (2)
R5 <sub>SE</sub>		SP	P2	A6 (1)	- (1)	1
	2010	MG	P1	A7 (1)	- (1)	1
R6 <sub>SE</sub>	2011	PR	P1	<b>A21</b> (1)	0 (1)	1
		MG	P1	A9 (1)	- (1)	1
	SP	P1	<b>A16</b> (1)	0 (1)	1	2 (1,8%)
R7 <sub>SE</sub>	2010	PR	P2	A2 (1)	- (1)	1
R8 <sub>SE</sub>	2011	MG	P1	A6 (1)	- (1)	1
R9 <sub>SE</sub>	2011	MG	P1	A10 (1)	- (1)	1
R10 <sub>SE</sub>	2011	MG	P1	A8 (1)	- (1)	1
R11 <sub>SE</sub>	2011	GO	P1	A7 (1)	- (1)	1
R12 <sub>SE</sub>	2011	RS	P1	<b>A19</b> (1)	0 (1)	1
R13 <sub>SE</sub>	2011	GO	P1	<b>A22</b> (1)	0 (1)	1
R14 <sub>SE</sub>	2011	PR	P5	A1 (1)	- (1)	1
R15 <sub>SE</sub>	2011	GO	P1	A7 (1)	- (1)	1
<b>Total</b>					<b>111</b>	

<sup>1</sup> P1: *invA*, *sefA*, *agfA*, *lpfA*; P2: *invA*, *agfA*, *lpfA*; P3: *invA*, *sefA*, *lpfA*; P4: *sefA*, *agfA*, *lpfA*; P5: *invA*, *agfA*; P6: *agfA*, *lpfA*.

<sup>2</sup> Perfis em negrito agruparam cepas de caráter multirresistente (A16 a A33). Valores entre parênteses: número de cepas que apresentaram o perfil analisado.

<sup>3</sup> Genes de resistência aos β-lactâmicos avaliados: *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>AmpC</sub>. ( - ): genes não pesquisados nas cepas. ( 0 ): ausência dos genes pesquisados. Valores entre parênteses nesta coluna referem-se ao número de cepas que apresentaram ou não os genes analisados.

**Tabela 9.** Ribogrupos, ano, local, características de virulência e resistência de 45 cepas de *Salmonella* Typhimurium isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.

Ribogrupo	Ano	Local	Perfil de virulência <sup>1</sup>	Perfis de resistência <sup>2</sup>	Genes de resistência <sup>3</sup>	Total por local	Total por ribogrupo (%)
R1 <sub>ST</sub>	2011	GO	P2	B9 (1), <b>B25</b> (1)	- (1), <i>blatem</i> (1)	2	
			P5	<b>B15</b> (1)	0 (1)	1	
			P6	<b>B14</b> (1)	0 (1)	1	
		MS	P2	B1 (1)	- (1)	1	14 (31,1%)
		PR	P2	B2 (2), <b>B11</b> (1)	- (2), 0 (1)	3	
R2 <sub>ST</sub>	2010	SC	P2	B1 (1), B6 (1), <b>B16</b> (1), <b>B17</b> (1), <b>B18</b> (1), <b>B20</b> (1)	- (3), 0 (1), <i>blatem</i> (2), <i>blaAmpC</i> (2)	6	
			BA	P2	B2 (1), <b>B26</b> (1)	- (1), <i>blatem</i> (1), <i>blaAmpC</i> (1)	2
		MS	P2	<b>B28</b> (1), <b>B29</b> (1)	<i>blaCTX-M</i> (2), <i>blaAmpC</i> (2)	2	
		PR	P2	B2 (1), B30 (1)	- (2)	2	
		SP	P2	B2 (2)	- (2)	2	13 (28,9%)
R3 <sub>ST</sub>	2011	ES	P2	<b>B22</b> (1)	<i>blatem</i> (1), <i>blaAmpC</i> (1)	1	
		MG	P2	<b>B18</b> (1)	<i>blatem</i> (1), <i>blaAmpC</i> (1)	1	
		SC	P2	B2 (1), B4 (1), B7 (1)	- (3)	3	
	2010	BA	P2	B2 (1)	- (1)	1	
	RS	P2		B5 (1)	- (1)	1	3 (6,7%)
R4 <sub>ST</sub>	2011	GO	P2	<b>B24</b> (1)	0 (1)	1	
		PR	P2	<b>B21</b> (1)	<i>blaCTX-M</i> (1)	1	2 (4,4%)
R5 <sub>ST</sub>	2010	MG	P2	B3 (1)	- (1)	1	1 (2,2%)
R6 <sub>ST</sub>	2010	GO	P2	B30 (1)	- (1)	1	1 (2,2%)
R7 <sub>ST</sub>	2010	PR	P2	B1 (1)	- (1)	1	1 (2,2%)
R8 <sub>ST</sub>	2010	SC	P2	B2 (1)	- (1)	1	1 (2,2%)
R9 <sub>ST</sub>	2010	BA	P2	<b>B12</b> (1)	<i>blaAmpC</i> (1)	1	1 (2,2%)
R10 <sub>ST</sub>	2011	SP	P2	<b>B13</b> (1)	<i>blaAmpC</i> (1)	1	1 (2,2%)
R11 <sub>ST</sub>	2011	MG	P2	B2 (1)	- (1)	1	1 (2,2%)
R12 <sub>ST</sub>	2011	RS	P2	B1 (1)	- (1)	1	1 (2,2%)
R13 <sub>ST</sub>	2011	SC	P2	<b>B23</b> (1)	<i>blatem</i> (1), <i>blaAmpC</i> (1)	1	1 (2,2%)
R14 <sub>ST</sub>	2011	GO	P2	<b>B10</b> (1)	<i>blaAmpC</i> (1)	1	1 (2,2%)
R15 <sub>ST</sub>	2011	PR	P2	<b>B19</b> (1)	<i>blaCTX-M</i> (1)	1	1 (2,2%)
R16 <sub>ST</sub>	2011	SP	P2	<b>B27</b> (1)	<i>blaCTX-M</i> (1)	1	1 (2,2%)
R17 <sub>ST</sub>	2011	MS	P5	B8 (1)	- (1)	1	1 (2,2%)
<b>Total</b>						<b>45</b>	

<sup>1</sup> P1: *invA*, *sefA*, *agfA*, *lpfA*; P2: *invA*, *agfA*, *lpfA*; P3: *invA*, *sefA*, *lpfA*; P4: *sefA*, *agfA*, *lpfA*; P5: *invA*, *agfA*; P6: *agfA*, *lpfA*.

<sup>2</sup> Perfis em negrito agruparam cepas de caráter multirresistente (B10 a B29). Valores entre parênteses referem-se ao número de cepas que apresentaram o perfil analisado.

<sup>3</sup> Genes de resistência aos β-lactâmicos avaliados: *blatem*, *blashev*, *blaCTX-M* e *blaAmpC*. ( - ): genes não pesquisados nas cepas. ( 0 ): ausência dos genes pesquisados. Valores entre parênteses nesta coluna referem-se ao número de cepas que apresentaram ou não os genes analisados.

**Tabela 10.** Ribogrupos, ano, local, características de virulência e resistência de 31 cepas de *Salmonella* Typhimurium variante monofásica I 4,[5],12:i:- isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2009 e 2011.

Ribogrupo	Ano	Local	Perfil de virulência <sup>1</sup>	Perfis de resistência <sup>2</sup>	Genes de resistência <sup>3</sup>	Total por local	Total por ribogrupo (%)
R1 <sub>STvm</sub>	2011	MG	P2	<b>C17</b> (1)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (1)	1	
		MS	P2	<b>C20</b> (1)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (1)	1	
		PR	P2	C1 (1), C2 (1), C4 (1), C5 (1), C6 (1), C7 (1)	- (4), 0 (2)	6	17 (54,8%)
		SC	P2	C1 (1), C5 (1), C10 (1), <b>C11</b> (1), <b>C14</b> (1), <b>C15</b> (1), <b>C16</b> (1)	- (2), 0 (1), <i>bla</i> <sub>TEM</sub> (4)	7	
		SP	P5	<b>C19</b> (1)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (1)	1	
R2 <sub>STvm</sub>	2010	MS	P2	C2 (1)	- (1)	1	
		PR	P2	C8 (1), <b>C13</b> (1)	0 (2)	2	
		SP	P2	C1 (1), C2 (2)	- (3)	3	10 (32,2%)
R3 <sub>STvm</sub>	2010	GO	P2	C2 (3), C9 (1)	- (3), 0 (1)	4	
		GO	P2	C3 (1)	- (1)	1	
R4 <sub>STvm</sub>	2010	SP	P2	<b>C18</b> (1)	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> (1)	1	1 (3,2%)
R5 <sub>STvm</sub>	2010	MG	P2	<b>C12</b> (1)	0 (1)	1	1 (3,2%)
R6 <sub>STvm</sub>	2011	TO	P2	C2 (1)	- (1)	1	1 (3,2%)
		GO	P2	C1 (1)	- (1)	1	1 (3,2%)
<b>Total</b>						<b>31</b>	

<sup>1</sup> P1: *invA*, *sefA*, *agfA*, *lpfA*; P2: *invA*, *agfA*, *lpfA*; P3: *invA*, *sefA*, *lpfA*; P4: *sefA*, *agfA*, *lpfA*; P5: *invA*, *agfA*; P6: *agfA*, *lpfA*.

<sup>2</sup> Perfis em negrito agruparam cepas de caráter multirresistente (C11 a C20). Valores entre parênteses referem-se ao número de cepas que apresentaram o perfil analisado.

<sup>3</sup> Genes de resistência aos β-lactâmicos avaliados: *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>AmpC</sub>. (-): genes não pesquisados nas cepas. (0): ausência dos genes pesquisados. Valores entre parênteses nesta coluna referem-se ao número de cepas que apresentaram ou não os genes analisados.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido a importância que *S. Infantis*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* representam para a saúde pública mundial, os dados apresentados são relevantes, pois permitem uma caracterização geral desses isolados circulantes na cadeia avícola brasileira.

Fazendo uma análise geral dos resultados encontrados nos capítulos 2 e 3, observa-se características de patogenicidade tanto de *S. Infantis* como em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, os quais apresentaram quase que na totalidade os determinantes de virulência avaliados, demonstrando o potencial destes sorovares para desencadear a doença em humanos ou animais. A elevada presença do gene *agfA* nas cepas estudadas, associado a capacidade de adesão e formação de biofilme, aponta para o perigo que a presença destes isolados representam dentro do matadouro, pela maior possibilidade de se aderirem as superfícies dentro do ambiente de abate, tornando-se numa fonte contínua de contaminação das carcaças, aumentando o perigo deste patógeno chegar até o consumidor e provocar infecção.

Quanto aos perfis de resistência identificados, verificou-se que em *S. Infantis* não houve presença de cepas multirresistentes, diferente de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, em que foi encontrado grande número de isolados multirresistentes. Este dado aponta para as diferenças dos determinantes de resistência, variando de acordo com o sorovar de *Salmonella*. Isto destaca a importância que se faz dentro da indústria alimentícia de se realizar, além da resistência antimicrobiana, a sorotipificação das cepas de *Salmonella*, para assim poder fazer uma associação da ocorrência de perfis de multirresistência com determinados sorotipos. Estas informações dão aos órgãos de saúde pública um maior entendimento das características dos sorovares circulantes no Brasil. O conhecimento da relação sorovar vs perfis de multirresistência contribui para que estes órgãos possam adotar estratégias para reduzir a pressão de seleção e a evitar a emergência e a disseminação de sorotipos resistentes, mantendo o espectro de ação e a eficácia clínica dos antimicrobianos, principalmente aqueles de uso criticamente importante na área de saúde humana e animal.

O alto número de isolados positivos para a maioria dos genes de virulência estudados, e apresentando perfis de multirresistência aos antimicrobianos,

demonstra a rápida seleção dessas características em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* durante o processo evolutivo, e sua melhor capacidade de adaptação às condições adversas a que são submetidos. Para um melhor conhecimento dessas características, faz-se necessário a continuidade deste estudo para pesquisa de outros determinantes de virulência e resistência, e assim avaliar a real ameaça que este patógeno possa representar para saúde pública.

O tratamento de infecções causadas por *Salmonella* multirresistente, produtoras de enzimas do tipo ESBL e AmpC, e o controle da disseminação de genes de resistência na produção avícola, representa um desafio para os profissionais da área de saúde animal. Além de todas as implicações sanitárias e de saúde pública, deve-se considerar os prejuízos econômicos que este problema gera para o setor avícola. Diante da posição de destaque do Brasil, como terceiro maior produtor e maior exportador da carne de frango, tal situação pode prejudicar as exportações brasileiras frente a importadores cada vez mais exigentes, cuja legislação é rigorosa quanto ao uso de antimicrobianos na produção animal.

## REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 51, n. 8-9, p. 380-388, 2004.

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual ABPA 2015**. São Paulo, 2015. 248 p. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/c59411a243d6dab1da8e605be58348ac.pdf>>. Acesso em: 31 dez 2015.

AGASAN, A. et al. Profile of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (subspecies I) serotype 4,5,12:i:- strains causing food-borne infections in New York City. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1924-1929, 2002.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037-1050, 2007.

ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008a. p.79-85.

ALTERTHUM, F. Origem e natureza química dos principais agentes antibacterianos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008b. p.67-78.

ÂNGULO, F.J. et al. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in foods animals. **Microbial Drug Resistance**, v. 6, n. 1, p. 77-83, 2000.

AUSTIN, J. W. et al. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella* Enteritidis biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 162, n. 2, p. 295-301, 1998.

BAILEY, J. S. et al. Serotyping and ribotyping of *Salmonella* using restriction enzyme *Pvu*II. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 6, p. 1005-1007, jun. 2002.

BARRETT, T. J.; GERNER-SMIDT, P.; SWAMINATHAN, B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2006.

BÄUMLER, A. J. et al. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operon during evolution of *Salmonella* serotypes. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 2, p. 317-322, 1997.

BÄUMLER, A. J.; HEFFRON, F. Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 8, p. 2087-2097, 1995.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. et al. (Ed.). **Doenças das aves**. 2 ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. p. 435-454.

BERNDT, A. et al. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 12, p. 5993-6007, 2007.

BERSOT, L. S. *Salmonella* no Brasil: Sua importância no abate das aves. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, 5., 2006, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2006. p. 90-94.

BETANCOR, L. et al. Random Amplified Polymorphic DNA and Phenotyping Analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguai from 1995 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.3, p. 1155-1162, 2004.

BINGEN, E. H.; DENAMUR, E.; ELION, J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 3, p.311-327, 1994.

BISHOP, A. L.; DOUGAN, G.; BAKER, S. The *Salmonella* genome: a global review. In: MASTROENI, P.; MASKELL, D. (Ed.) **Salmonella infections**: Clinical, Immunological and Molecular Aspects, 1. Ed. New York: University Press, 2006. p. 117-145.

BONI, H. F. K.; CARRIJO, A. S.; FASCINA, V. B. Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 1, p. 84-95, 2011.

BORGES, K. A. et al. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1416-1422, 2013.

BOUCHET, V.; HUOT, H.; GOLDSTEIN, R. Molecular Genetic Basis of Ribotyping. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 262-273, 2008.

BRADEN, C.R. Suspecting foodborne illnesses in special populations: quick facts for providers. **Medscape**, 2012. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewarticle/775976>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos**. Brasília. 2012. 171 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 12 janeiro 2016.

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 Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N° 9, de 27 de junho de 2003.** Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 jun. 2003, seção 1, p. 4.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico.** Brasília, 2007. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaudre/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/conceitos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaudre/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm)>. Acesso em: 2 jan. 2016.

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, SP, 2014. Disponível em: <[http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3\\_PAINEL\\_1\\_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto\\_2014\\_PDF.pdf](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf)> Acesso em: 24 junho 2015.

BRENNER, F. W. et al. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

BRUCE J. Automated system rapidly identifies and characterises microorganisms in foods. **Food Technology**, v. 50, p. 77-81, 1996.

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.

CAMPS, N. et al. A foodborne outbreak of *Salmonella* infection due to overproduction of egg containing foods for a festival. **Epidemiology and Infection**, v. 133, n. 5, p. 817-822, 2005.

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

CARATTOLI, A. et al. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strain isolated in the United States between 1996 and 1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1269-1272, 2002.

CATTOIR, V. et al. Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 751-754, 2007.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **An Atlas of *Salmonella* in the United States, 1968-2011: Laboratory-based Enteric Disease Surveillance.** Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services,

CDC, 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/pdf/enteritidis-508c.pdf>> <<http://www.cdc.gov/salmonella/pdf/typhimurium-508c.pdf>> <<http://www.cdc.gov/salmonella/pdf/i4512i-508c.pdf>> Acesso em: 12 jan. 2016.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013.** Atlanta, USA. 2014a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2015.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Braenderup infections linked to nut butter: Clinical Features/ Signs and Symptoms.** Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2014b.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report).** Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2014c.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate Outbreak of Drug-Resistant *Salmonella* Enteritidis Infections Linked to Raw, Frozen, Stuffed Chicken Entrees Produced by Barber Foods (Final Update).** 2015a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/frozen-chicken-entrees-07-15/index.html>> Acesso em: 13 janeiro 2016.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate Outbreak of Multidrug-Resistant *Salmonella* I 4,[5],12:i:- and *Salmonella* Infantis Infections Linked to Pork (Final Update).** 2015b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/pork-08-15/index.html>> Acesso em: 13 janeiro 2016.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National *Salmonella* Surveillance Overview.** Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Outbreak of *Salmonella* Enteritidis Infections Linked to Raw, Frozen, Stuffed Chicken Entrees Produced by Aspen Foods (Final Update).** 2015c. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/frozen-chicken-entrees-part2-07-15/index.html>>. Acesso em: 13 janeiro 2016.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Salmonella* Litchfield outbreak associated with a hotel restaurant— Atlantic City, New Jersey, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 57, n. 28, p. 775–779, 2008.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Salmonella*. 2015d. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/index.html>>. Acesso em: 23 maio 2015.

CHERNAKI-LEFFER, A. M. et al. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, 2002.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement**. CLSI M100-S23, Wayne, 2013.

COLLINSON, K. et al. Thin aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella* Enteritidis to fibronectin. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 1, p. 12-18, 1993.

CORTEZ, A.L.L. et al. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 3, p. 340-344, 2006.

COX, N. A.; BERRANG, M. E.; CASON, J. A. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs – a review. **Poultry Science**, v.79, n.11, p.1571-1574, 2000.

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.

D'AOUST, J. Y. Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 207-215, jul. 1991.

DARINI, A. L. C.; MAGALHÃES, V. D.; CROTT, L. S. P. Aplicações da ribotipagem na epidemiologia molecular de infecções bacterianas. **Medicina**, v.30, n. 1, p.73-80, 1998.

DARWIN, K. H.; MILLER, V. L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 1023-1031, 1999.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DEPARDIEU, F. et al. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p.79-114, 2007.

DERACHE, C. et al. Differential modulation of beta-defensin gene expression by *Salmonella* Enteritidis in intestinal epithelial cells from resistant and susceptible chicken inbread lines. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, n. 9, p. 959-966, 2009.

DOUBLET, B. et al. Plasmid-mediated florfenicol and ceftriaxone resistance encoded by the *floR* and *blaCMY-2* genes in *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Newport isolated in the United States. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, n. 2, p. 301–305, 2004.

EDWARDS, R. A.; SCHIFFERLI, D. M.; MALOY, S. R. A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, n. 3, p. 1258-1262, 2000.

EFSA - European Food Safety Authority. **EFSA explains zoonotic diseases: *Salmonella***. 2014a. Disponível em:

<[http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate\\_publications/files/factsheetsaImonella.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetsaImonella.pdf)>. Acesso em: 26 dez 2015.

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 2012. **EFSA Journal**, v. 12, n. 2, 312 p., 2014b.

EFSA - European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v. 13, n. 1, 162 p., 2015.

EXCLUSÃO competitiva. **Ave World**, Paulínia: Animal World, 2005. Edição especial.

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 19, Rome, 56p., 2009.

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 329-338.

FONTANA, J. et al. Automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for rapid identification of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Newport. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 496-499, 2003.

FRECH, G.; SCHWRAZ, S. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 4, p. 633-641, 2000.

FRITSCHEL, S. J. Application of automated ribotyping to improve food safety and quality. In: WILSON, C. L.; DROBY, S. (Ed.). **Microbial Food Contamination**, Boca Raton: CRC Press, 2001.

FUZIHARA, T. O.; FERNANDES, S. A.; FRANCO, B. D. G. M. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 12, p. 1749-1753, dez. 2000.

GANTOIS, I. et al. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. 718-738, 2009.

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

GAY, K. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 3, p. 297-304, 2006.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Agentes Bacterianos de Toxinfecções. In: \_\_\_\_\_. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2008. p. 277-356.

GHILARDI, A. C.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDEES, S. A. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulsetypes of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 281-286, 2006.

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

GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. **Annales de l'Institut Pasteur. Microbiology**, v. 137, n. 2, p. 165-175, 1986.

GROISMAN, E. A.; OCHMAN, H. How *Salmonella* became a pathogen. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 343-349. 1997.

GUPTA, V. An update on newer beta-lactamases. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 126, n. 5, p. 417-427, 2007.

GUTELL, R. R.; NOLLER, H. F.; WOESE, C. R. Higher order structure in ribosomal RNA. **The EMBO Journal**, v. 5, n. 5, p. 1111-1113, 1986.

HACKER, J.; CARNIEL, E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity – A Darwinian view of the evolution of microbes. **European Molecular Biology Organization**, v. 2, n. 5, p. 376-381, 2001.

HANSEN-WESTER, I.; HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 7, p. 549-559, 2001.

HELM, R. A. et al. Pigeon-associated strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT2 have genomic rearrangements at rRNA operons. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 12, p. 7338-7341, 2004.

HELMUTH, R. et al. Epidemiology of virulence-associated plasmid and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. **Infection and Immunity**, v. 48, n. 1, p. 175-182, 1985.

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, n. 2-3, p. 95-102, 2004.

HERNANDEZ, J. et al. *Salmonella* in birds migrating through Sweden. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 6, p. 753, 2003.

HILTON, A. C.; BANKS, J. G.; PENN, C. W. Optimization of RAPD for fingerprinting *Salmonella*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 243-248, 1997.

HILTON, A. C.; PENN, C. W. Comparison of ribotyping and arbitrarily primed PCR for molecular typing of *Salmonella* Enterica and relationships between strains on the basis of these molecular markers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 6, p. 933-940, 1998.

HOLMES, A. et al. An epidemic of *Burkholderia cepacia* transmitted between patients with and without cystic fibrosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 5, p. 1197-1205, 1999.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. 787p.

HOLT, P. S. et al. Isolation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from houseflies (*Musca domestica*) found in rooms containing *Salmonella* serovar Enteritidis-challenged hens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 19, p. 6030-6035, 2007.

HOWARD, Z.R. et al. *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: current issues and prospects for control. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 755-764, 2012.

HUDSON, C. R. et al. Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in Southeastern United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1860-1865, 2000.

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

JOHNSON, J. R. et al. Molecular analysis of a hospital cafeteria-associated salmonellosis outbreak using modified repetitive element PCR fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3452-3460, 2001.

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

KABIR, S. M. L. Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 1, p. 89-114, 2010.

KARASOVA, D. et al. Deletion of sodCI and spvBC in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis reduced its virulence to the natural virulence of serovars Agona, Hadar and Infantis for mice but not for chickens early after infection. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 3-4, p. 304-309, 2009.

KLAPPENBACH, J. A. et al. rrndb: the ribosomal rna operon copy number database. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 1, p. 181–184, 2001.

KUMAR, Y. et al. Distribution trends of *Salmonella* serovars in India (2001–2005). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 390-394, 2009.

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.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.4, p.999-1007, 2001.

LIEBANA, E. et al. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3609-3616, 2001.

LIM, H. et al. 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.

LIN, A.W. et al. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 870-876, 1996.

LIN, D.; CHEN, S. First detection of conjugative plasmid-borne fosfomycin resistance gene *fosA3* in *Salmonella* isolates of food origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1381-1383, 2015.

LIU, B. et al. PCR identification of *Salmonella* serogroups based on specific targets obtained by comparative genomics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 511-518. 2011.

LOMONACO, S. et al. Real-time subtyping via PFGE reveals potential epidemiological relatedness among human salmonellosis cases in Northern Italy. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 227-234, 2008.

LOPES, M. et al. Pesquisa de *Salmonella* spp. e micro-organismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 3, p. 465-476, 2007.

LÓPEZ, H. S.; OLVERA, L. G. Problemática del uso de enrofloxacina em la aviculture en México. **Veterinaria México**, v. 31, n.2, p. 137-145, 2000.

LYNNE, A. M. et al. Antimicrobial resistance genes associated with *Salmonella enterica* sorovar newport isolates from food animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 353-356, 2008.

MADADGAR, O. et al. Evaluation of random amplified polymorphic DNA analysis and antibiotic susceptibility application in discrimination of *Salmonella* Typhimurium isolates in Iran. **The New Microbiologica**, v. 31, n. 2, p. 211-216, 2008.

MARIMÓN, J. M. et al. Increasing prevalence of quinolone resistance in human nontyphoid *Salmonella enterica* isolates obtained in Spain from 1981 to 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3789-3793, 2004.

MARIN, C. et al. Sources of *Salmonella* contamination during broiler production in Eastern Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, n. 1, p. 39-45, 2011.

MARTINETTI, G.; ALTWEGG, M. rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as a tool for typing *Salmonella* Enteritidis. **Research in Microbiology**, v. 141, n. 9, p. 1151-1162, nov./dez. 1990.

MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R. Métodos de diagnóstico. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.117-125.

MARTINS, C. H. G. et al. Ribotyping of *Salmonella* Enteritidis strains reveals the spread of a single genotype in the Brazilian city of Ribeirão Preto. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p. 19-23, fev. 2006.

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.

MELO, A.D.B. et al. O futuro dos antimicrobianos na produção animal. **Avicultura Industrial**, n. 07, ano 105, Edição 1235, p. 56-58, 2014.

MENDES, A. A. Jejum pré-abate em frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 3, p. 199-209, 2001.

MEUNIER, D. et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 antibiotic resistance genomic island 1 in serotype paratyphi B. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 430-433, 2002.

MEUNIER, J. R.; GRIMONT, P. A. D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Research in Microbiology**, v. 144, n. 5, p. 373-379, 1993.

MICHAEL, G. B. et al. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1898-1914, 2006.

MICHAILIDIS, G.; THEODORIDIS, A.; AVDI, M. Effects of sexual maturation and *Salmonella* infection on the expression of Toll-like receptors in the chicken vagina. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 3-4, p. 234-241, 2011.

MIMICA, L. M. J.; MENDES, C. M. F.; MIMICA, I. M. Controle laboratorial do tratamento das infecções bacterianas. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 93-99.

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.

MOORE J. E. et al. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1955-1966, 2006.

MORETRO, T. et al. Controlo of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 532-544, 2012.

MORO, C. V. et al. The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. **Experimental and Applied Acarology**, v. 48, n. 1-2, p. 93-104, 2009.

NAMATA, H. et al. Identification of risk factors for the prevalence and persistence of *Salmonella* in Belgian broiler chicken flocks. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 90, n. 3-4, p. 211-222, 2009.

NGWAI, Y. B. et al. Interaction of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis with polystyrene does not correlate with virulence in young chickens. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 11, p. 1122-1130, 2006.

NISHINO, K.; NIKAIDO, E.; YAMAGUCHI, A. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 24, p. 9066-9075. 2007.

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.

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

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.

O'LEARY, D. et al. Microbiological study of biofilm formation in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 & DT104b cultured from the modern pork chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 1-15, p. 36-43, 2013.

OLIVEIRA, S. D. et al. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 123-124, 2003.

OLORUNSOLA, R. A. et al. *Salmonella* organism transmission in hatching broiler eggs. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 2, n. 10, p. 13-16, 2012.

OLOYA, J.; DOETKOTT, D.; KHAITSA, M. L. Antimicrobial drug resistance and molecular characterization of *Salmonella* isolated from domestic animals, humans, and meat products. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 3, p. 273-284, 2009.

OSCAR, T. P. Identification and characterization of *Salmonella* isolates by automated ribotyping. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 5, p. 519-524, mai. 1998.

ÖZBEY, G. et al. Isolation of *Salmonella* spp. from faecal samples of cracked egg fed hens and Polymerase Chain Reaction (PCR) confirmation. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

PALERMO NETO, J. Os antimicrobianos e a resistência bacteriana. **Avicultura industrial**, n. 07, ano 105, Edição 1235, p. 26-33, 2014. Entrevista concedida a Humberto Luis Marques e Rodolfo Antunes. Disponível em: <[http://www.aviculturainustrial.com.br/noticia/os-antimicrobianos-e-a-resistencia-bacteriana-na-avicultura/20140909083737\\_Q\\_039](http://www.aviculturainustrial.com.br/noticia/os-antimicrobianos-e-a-resistencia-bacteriana-na-avicultura/20140909083737_Q_039)>. Acesso em: 23 junho 2015.

PERDONCINI, G. et al. Presença de *Salmonella* spp. em pintos de um dia, comercializados para produção não industrial em Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 1, n. 39, p. 950, 2011.

PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from human and food animals. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, n. 1, p.3-16, 2002.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. Genus *Salmonella*. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd Ed. Volume 2. New York: Springer Science + Business Media Inc., 2005. p. 764-799.

QUALE, J. M. et al. Comparison of automated ribotyping to pulsed-field gel electrophoresis from genetic fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. p. 4175-4177, 2001.

QUINTAES, B. R. et al. Conventional and molecular typing of *Salmonella* Typhi strains from Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 6, 2002.

RANDALL, L. P. et al. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 208-216, 2004.

REITER, M. G. R. 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.

RIBEIRO, A.R. et al. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n.5, p. 1259-1262, 2008.

RIBEIRO, A.R. et al. *Salmonella* spp. em cortes de frango: ocorrência, resistência antimicrobiana e fagotipificação dos isolados de *Salmonella* Enteritidis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 296-299, 2007.

RIDLEY, A. M.; THRELFALL, E. J.; ROWE, B. Genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 8, p. 2314-2321, 1998.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. et al. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 6, p. 306-319, 2007.

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.

RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, n. 5, p.1109-1117, 2003.

RUIZ, M. et al. Usefulness of different techniques in the study of the epidemiology of salmonellosis. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 111, n. 9, p. 848-856, 2003.

RYCHLIK, I. et al. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 268, p. 1-9, 2009.

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.

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

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

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3<sup>a</sup> Edição. São Paulo: Varella, 2007.

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.

SOUSA, E.; WERTHER, K.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Assessment of Newcastle and infectious bronchitis pathogens, and *Salmonella* spp. in wild birds captured near poultry facilities. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 1, p. 219-223, 2010.

STEENACKERS, H. et al. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v.45, n.2, p.502-531, 2012.

STERZO, E. V.; VARZONE, J. R. M.; FERRARI, R. Salmoneloses aviárias. **Ensaio e ciência: ciências biológicas, agrárias e da saúde**, v. 12, n.2, p. 129-138, 2008.

SUEZ, J. et al. Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58449. 2013.

SUKUPOLVI, S. et al. Expression of Thin Aggregative Fimbriae promotes interaction of *Salmonella* Typhimurium SR-11 with mouse small intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 12, p. 5320-5325, 1997.

SUN, L. et al. The emergence of a highly transmissible lineage of cbl+*Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* causing CF centre epidemics in North America and Britain. **Nature Medicine**, v. 1, n. 7, p. 661-666, 1995.

SURESH, T. et al. Prevalence and distribution of *Salmonella* serotypes in marketed broiler chickens and processing environment in Coimbatore City of southern India. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 823-825, 2011.

SWAMINATHAN, B. et al. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.3, n. 1, p. 36-50, 2006.

SWAMINATHAN, B. et al. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 382-389, 2001.

THRELFALL, E.J. et al. Antimicrobial drug resistance in non-Typhoidal salmonellas from humans in England and Wales in 1999: decrease in multiple resistance in *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium, Virchow, and Hadar. **Microbial Drug Resistance**, v.6, n. 4, p.319-325, 2000.

TORPDAHL, M. et al. Detection of *qnr* genes in *Salmonella* isolated from humans in Denmark. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 406-408, 2009.

TRABULSI, L.R.; MIMICA, I.M.; MIMICA, L.M.J. Características dos principais grupos de antibacterianos: espectro de ação e indicações. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.87-91.

TSIODRAS, S. et al. Human infections associated with wild birds. **Journal of Infection**, v. 56, n. 2, p. 83-98, 2008.

TU, L. T. et al. High levels of contamination and antimicrobial-resistant non-typhoidal *Salmonella* serovars on pig and poultry farms in the Mekong Delta of Vietnam. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 14, p. 3074-3086, 2015.

TURCOTTE, C.; WOODWARD, M. J. Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of the gene encoding the SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 7, p. 1477-1485, 1993.

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

TURNIDGE, J. Antibiotic use in animals - prejudices, perceptions and realities. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, n. 1, p.26-27, 2004.

VAN HOUDT, R. V.; MICHELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p.1117-1131, 2010.

VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS, M. S et al. 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.

VELDMAN, K.; VAN PELT, W.; MEVIUS, D. First report of *qnr* genes in *Salmonella* in The Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 452-453, 2008.

VIEIRA, M.A.M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, v. 33, n.4, p. 406-414, 2009.

VON RÜCKERT, D.A.S. et al. Pontos críticos de controle de *Salmonella* spp. no abate de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 2, p. 326-330, 2009.

WEDEL, S. D. et al. Antimicrobial-drug susceptibility of human and animal *Salmonella* Typhimurium, Minnesota, 1997-2003. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1899-1906, 2005.

WHITE, A. P. et al. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative

fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Journal 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 2<sup>nd</sup> WHO Expert Meeting held in Copenhagen**. Geneva, Switzerland, mai. 2007, 34 p.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acesso em: 21 outubro 2015.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **1st Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific Assessment**, Geneva, December 2003.

WILSON, R. L. et al. *Salmonella enterica* serovars Gallinarum and Pullorum expressing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Type 1 fimbriae exhibit increased invasiveness for mammalian cells. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 8, p. 4782-4785, 2000.

WINOKUR, P.L. et al. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2777-2783, 2000.

YAN, S. S. et al. An overview of *Salmonella* typing: Public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, n. 3, p. 189-204, 2004.

ZHANG, N. **A comparison of *Salmonella enterica* serovars:** are prevalence, virulence and responses to environmental conditions serovar or strain dependent? 2013. 66 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimento) - University of Tennessee, Tennessee, 2013.

ZHAO, S. et al. Antimicrobial resistance and genetic relatedness among *Salmonella* from retail foods of animal origin: NARMS Retail Meat Surveillance. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 106-117, 2006.