

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

NEWTON NASCENTES GALVÃO

***Salmonella* Heidelberg ISOLADAS NA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGO
DE CORTE: BIOFILMES E CONTROLE, VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA E IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA**

UBERLÂNDIA

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

G182 Galvão, Newton Nascentes, 1985-
2019 Salmonella Heidelberg isoladas na cadeia produtiva de frango
de corte [recurso eletrônico] : BIOFILMES E CONTROLE,
VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E IMPLICAÇÕES EM
SAÚDE PÚBLICA / Newton Nascentes Galvão. - 2019.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-
graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2600>

Inclui bibliografia.

1. Veterinária. I. Rossi, Daise Aparecida, 1963-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências
Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

NEWTON NASCENTES GALVÃO

***Salmonella* Heidelberg ISOLADAS NA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGO
DE CORTE: BIOFILMES E CONTROLE, VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA E IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA**

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

Área de concentração: Saúde Animal
Orientadora: Prof^a. Dra. Daise Aparecida Rossi

UBERLÂNDIA

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
 BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/013/2019				
Data:	30 de dezembro de 2019	Hora de início:	14:05	Hora de encerramento:	16:44
Matrícula do Discente:	11513MEV007				
Nome do Discente:	NEWTON NASCENTES GALVÃO				
Título do Trabalho:	<i>Salmonella</i> Heidelberg isoladas na cadeia produtiva de frango de corte: Biofilmes e controle, virulência, resistência antimicrobiana e implicações na saúde pública				
Área de concentração:	SAÚDE ANIMAL				
Linha de pesquisa:	CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	EPIDEMIOLOGIA DE ZOONOSES				

Reuniu-se na sala 54, bloco 2D, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Roberta Torres de Melo - UFU; Eliane Pereira Medonça - UNIUBE; Isaura Maria Ferreira - IFTM; Fernanda Raghianti - IFTM; Daise Aparecida Rossi orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Daise Aparecida Rossi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Daise Aparecida Rossi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/12/2019, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Torres de Melo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/12/2019, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliane Pereira Mendonça, Usuário Externo**, em 30/12/2019, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isaura Maria Ferreira, Usuário Externo**, em 30/12/2019, às 16:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Raghianti, Usuário Externo**, em 30/12/2019, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1782218** e o código CRC **77AB0CC8**.

Aos meus pais e meu irmão, pelo incentivo que sempre me forneceram ao longo da minha jornada acadêmica.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de realizar esta etapa acadêmica importante em minha vida e pelo conhecimento adquirido.

À minha família, aos meus pais e ao meu irmão por todo o apoio, paciência e dedicação que sempre tiveram comigo.

Ao meu tio e padrinho, Zama, que mesmo distante sempre me incentivou a buscar aperfeiçoamento e conhecimento.

Aos meus amigos da UFV, Renan, Daniel, Emílio, Frederico e Thiago que sempre foram grandes aliados neste caminho acadêmico.

Ao amigo e professor da UFU, Marcus Vinícius, que contribuiu com sugestões e ensinamentos importantes ao longo do curso.

A minha orientadora Daise, por ter aceitado me orientar na elaboração deste trabalho e que, mesmo executando muitas atividades concomitantes, prontamente sempre me atendeu, ensinou e auxiliou.

A grande família LABIO, Roberta, Eliane, Guilherme, Marcelo, Phelipe, Edson, Silvia, Francesca, Jocasta, Marcela e Renata que sempre se prontificaram a auxiliar e colaborar com a realização deste projeto.

A UFU que contribuiu com apoio estrutural para a realização deste projeto.

Às professoras que aceitaram compor esta banca de defesa, Roberta, Eliane, Isaura e Fernanda. Obrigado por se disponibilizarem a realizar a leitura, correções e avaliação deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Obrigado.

*“A persistência é o menor caminho
do êxito”*

(Charles Chaplin)

RESUMO

Salmonella Heidelberg é considerado um sorovar emergente, devido ao aumento de seu isolamento em alimentos, especialmente na carne de frango e derivados, bem como pelo seu envolvimento em surtos de infecções em humanos. A tese está dividida em três capítulos, sendo o primeiro composto pelas considerações gerais do tema, abordando assuntos chave que auxiliam na contextualização do que será abordado nos demais capítulos. O segundo capítulo possuiu como objetivo analisar 20 cepas de *S. Heidelberg*, provenientes de amostras avícolas da região sul do país quanto aos genes relacionados à virulência (*ompC*, *invA*, *sodC*, *avrA*, *lpfA*, *agfA* e *luxS*) e resistência antimicrobiana (*qnrS* e *qnrA* – fluoroquinolonas; *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* - β -lactâmicos), bem como determinar os perfis de resistência à drogas/classes de importância na medicina veterinária e humana (amoxicilina com clavulanato: classe dos β -lactâmicos, subclasse das penicilinas; colistina: classe das polimixinas; ciprofloxacina: classe das fluoroquinolonas; ceftriaxona: classe dos β -lactâmicos, subclasse das cefalosporinas de 3ª geração). Para pesquisa dos genes de virulência e de resistência no segundo capítulo, foi utilizada a técnica de PCR e para a avaliação da sensibilidade antimicrobiana foi realizada a determinação pela concentração inibitória mínima (CIM). O terceiro capítulo objetivou analisar duas cepas de *S. Heidelberg*, isoladas de amostras de frango de corte produzidos no sul do Brasil, quanto à capacidade de adesão, formação e inibição de biofilmes com e sem a adição de *chicken juice* em três temperaturas diferentes, 4, 25 e 37°C. Avaliou também a estrutura microscópica do biofilme e o sequenciamento genômico total das cepas para determinar a presença de genes de resistência. As análises de formação de biofilmes foram realizadas em microbiologia tradicional utilizando caldo Tryptic Soy Broth (TSB) e, paralelamente, em TSB suplementado com *chicken juice* (TSB + CJ) de formas quantitativa e qualitativa. A morfologia dos biofilmes foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os testes de inibição foram feitos com sanitizantes utilizados na indústria (hipoclorito, clorexidina e ácido peracético) e o sequenciamento genômico foi efetuado no sistema Illumina HiSeq e para a montagem das leituras obtidas no sequenciamento, foi utilizado o software fastQC.

Palavras-chave: *Chicken juice*. CIM. Microscopia eletrônica de varredura. Salmonelose. Sequenciamento.

ABSTRACT

Salmonella Heidelberg is considered an emerging serovar because of its increased isolation in food, especially in chicken meat and its derivatives, as well as its involvement in outbreaks of infections in humans. The thesis is divided into three chapters, the first consisting of the general considerations of the theme, addressing key issues that helps in contextualizing what will be discussed in the next chapters. The second chapter aimed to analyze 20 strains of *S. Heidelberg*, from poultry samples originated from the southern region of the country regarding the genes related to virulence (*ompC*, *invA*, *sodC*, *avrA*, *lpfA*, *agfA* and *luxS*) and antimicrobial resistance (*qnrS* and *qnrA* - fluoroquinolones; *bla_{TEM}* and *bla_{SHV}* - β -lactams), as well as to determine the antimicrobial resistance profiles of drugs / classes of importance in veterinary and human medicine (amoxicillin with clavulanate: β -lactams class, subclass of penicillins; colistin: class of polymyxins; ciprofloxacin: fluoroquinolone class; ceftriaxone: β -lactam class, subclass of 3rd generation cephalosporins). For the research of virulence and resistance genes in the second chapter, the PCR technique was used and the antimicrobial sensitivity was determined by the minimum inhibitory concentration (MIC). The third chapter aimed to analyze two strains of *S. Heidelberg*, isolated from broiler samples produced in southern Brazil, regarding the adhesion, formation and inhibition of biofilms with and without the addition of chicken juice at three different temperatures, 4, 25 and 37 ° C. It also evaluated the microscopic structure of the biofilm and the total genomic sequencing of the strains. In the third chapter, biofilm formation analyzes were performed in traditional microbiology using Tryptic Soy Broth (TSB) and in parallel in TSB supplemented with chicken juice (TSB + CJ) in quantitative and qualitative ways. Biofilm morphology was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). Inhibition tests were performed with sanitizers used in industry (hypochlorite, chlorhexidine and peracetic acid) and genomic sequencing was performed on the Illumina HiSeq system and fastQC software was used to assemble the sequencing readings.

Keywords: *Chicken juice*. MIC. Scanning electron microscopy. Salmonellosis. Sequencing.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Dados das cepas de *S. Heidelberg* utilizadas no estudo. 58
- Tabela 2.** *Primers* utilizados na identificação de genes específicos nas cepas de *Salmonella Heidelberg*. 59
- Tabela 3.** Distribuição da CIM e índice de resistência de *Salmonella Heidelberg*. 60
- Tabela 4.** Perfil de resistência das cepas de *Salmonella Heidelberg* no Brasil. 60

CAPÍTULO 3

- Tabela 1.** Contagens obtidas nos ensaios para análise de adesão nas duas cepas de *S. Heidelberg*. 82
- Tabela 2.** Classificação das cepas, de acordo com o Índice de Formação de Biofilmes IFB, nas diferentes condições testadas. 82
- Tabela 3.** Contagens obtidas nos ensaios para análise de biofilmes nas duas cepas de *S. Heidelberg*. 82

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Gráfico demonstrando os valores médios obtidos nas contagens de biofilmes de duas cepas de *S. Heidelberg* tratados com os TSB e TSB+CJ, nas temperaturas de 4, 25 e 37°C. Barras de erros indicam o desvio padrão para as médias das contagens obtidas para cada cepa nas três repetições. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ usando teste *T student* para as contagens nas amostras do mesmo tratamento. 83
- Figura 2.** Figura 2. Imagens de MEV para as duas cepas de *S. Heidelberg* nas temperaturas de 4°C (a, b), 25°C (c, d) e 37°C (e, f) em TSB. 84
- Figura 3.** Gráfico das contagens dos biofilmes de ambas as cepas de *S. Heidelberg* (\log de UFC.mL⁻¹) no controle e mantidos durante 24 horas em solução de ácido peracético 0,8%, hipoclorito de sódio 1% e clorexidina 1%. * $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$ usando *one way Anova* para as contagens entre os tratamentos. 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA: Associação Brasileira de Produção Animal

AMO: Amoxicilina com ácido clavulânico

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: American Type Culture Collection

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CFT: Ceftriaxona

CIDRP: Center for Infectious Disease Research and Policy

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CIP: Ciprofloxacina

CJ: Chicken Juice

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

COL: Colistina

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos

EFSA: European Food Safety Authority

ESBL: Betalactamase de espectro estendido

EUA: Estados Unidos da América

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FIOCRUZ: Fundação Instituto Oswaldo Cruz

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MH: Mueller Hinton

MR: Multirresistência

NARMS: The National Antimicrobial Resistance Monitoring System

OMS: Organização Mundial da Saúde

PB: Pares de Base

PCR: Polymerase Chain Reaction

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed

RNA: Ácido Ribonucleico

SH: *Salmonella* Heidelberg

SIF: Sistema de Inspeção Federal

SOD: Superóxido dismutase

TBE: Tris/Borato/EDTA

TSB: Tryptic Soy Broth

TSI: Tríplice Açúcar Ferro

UE: União Europeia

UFC: Unidade Formadora de Colônia

WHO: World Health Organization

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NEWTON NASCENTES GALVÃO - Nascido em Presidente Olegário, Estado de Minas Gerais, em 25 de setembro de 1985, filho de Nélio Donizetti Galvão de Lima e Vani de Fátima Nascentes Galvão. Médico Veterinário, graduado em janeiro de 2009 pelo Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa - UFV. Em 2009, iniciou o mestrado na mesma instituição de graduação, concluído em fevereiro de 2011. Em 2015, iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia - UFU. Médico Veterinário efetivo no Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA de 2009 a 2018, atuou na defesa sanitária animal contemplando todos os programas de sanidade animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Desde julho de 2018, atua na inspeção federal do abate de frangos de corte sendo servidor efetivo no cargo de Auditor Fiscal Federal Agropecuário – AFFA do MAPA. Tem experiência nas seguintes áreas: defesa sanitária animal, microbiologia, patógenos de origem alimentar e inspeção de produtos de origem animal.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Caracterização e nomenclatura do gênero <i>Salmonella</i> spp.	18
3.2 Epidemiologia do gênero <i>Salmonella</i> spp.	20
3.3 Infecção e manifestações clínicas de salmonelosa em humanos	22
3.4 Impactos da presença de <i>Salmonella</i> spp. na avicultura	23
3.5 <i>S. Heidelberg</i> na avicultura e na saúde pública	25
3.6 Resistência aos antimicrobianos em <i>Salmonella</i> spp.	27
3.6.1 Resistência aos β -lactâmicos	28
3.6.2 Resistência as quinolonas e fluoroquinolonas	30
3.6.3 Resistência às polimixinas	32
3.6.4 Resistência às sulfonamidas	33
3.6.5 Resistência às tetraciclinas	34
3.6.6 Resistência aos aminoglicosídeos	34
3.6.7 Resistência à fosfomicina	35
3.6.8 Multirresistência antimicrobiana em <i>Salmonella</i> spp. e métodos de avaliação da susceptibilidade	36
3.7 Fatores de virulência em <i>Salmonella</i> spp.	37
3.8 Capacidade de formação de biofilmes em <i>Salmonella</i> spp.	40
3.9 Inibição da capacidade de formação de biofilmes de <i>Salmonella</i> spp.	43
3.10 Análise genotípica de <i>Salmonella</i> spp.	45
CAPÍTULO 2 – Caracterização de <i>Salmonella</i> Heidelberg de origem avícola	48
CAPÍTULO 3 – Multirresistência antimicrobiana genotípica e caracterização de <i>Salmonella</i> Heidelberg séssil de origem avícola	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXOS	99

1	Normas do periódico Current Microbiology - Capítulo 2	100
2	Normas do periódico Biofouling - Capítulo 3	114

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Mesmo com os investimentos públicos e privados, tecnificação da avicultura e restrições determinadas pelos órgãos de saúde pública e importadores, a presença de *Salmonella* spp. na cadeia de produção avícola ainda é um desafio.

As dificuldades no controle não são restritas a países em desenvolvimento, mas trata-se de um problema mundial, pois são observadas mesmo em países com sistemas de vigilância epidemiológica ativos. Nestes casos, as preocupações ainda se amplificam, já que estes sistemas correlacionam informações obtidas de cepas isoladas de animais, alimentos e humanos, que muitas vezes demonstram a disseminação de fenótipos ou genótipos mais virulentos (CDC, 2018; EFSA, 2019), com maior resistência aos antimicrobianos (JAJERE, 2019) ou com maior capacidade de adaptação e permanência ambiental (ETTER et al., 2019).

As dificuldades no controle estão relacionadas à complexidade da epidemiologia de *Salmonella* spp., incluindo o grande número de fontes de infecção das aves e as possibilidades de contaminação das carcaças durante o processo de abate (MENDONÇA et al., 2019). São relacionadas também à característica zoonótica desse agente etiológico, que possui grande número de hospedeiros (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2019), muitos sorovares (LAMAS et al., 2018) e diferentes fatores que podem determinar sua virulência, resistência aos antimicrobianos ou persistência no ambiente (OBE et al., 2018; CHENG, EADE e WIEDMANN, 2019).

Os sorovares com maior importância na produção animal e saúde pública são geralmente destacados em programas nacionais de controle institucionais dos diferentes países ou blocos econômicos. Considerando estes dois fatores, os sorovares *S. Galinarum*, *S. Pullorum* (mais relacionados à saúde animal) e *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (mais relacionados à saúde pública) são os mais constantes nos programas institucionais de monitoramento e vigilância (YOUN et al., 2017).

Outros sorovares têm ganhado importância e instigado pesquisadores e produtores pelo aumento na prevalência de isolamentos na cadeia de produção avícola, envolvimento em surtos humanos e insuficiência de

35 informações sobre seu potencial virulento, diversidade genética e
36 susceptibilidade aos antimicrobianos, tanto em vida livre como em vida sésil
37 (MOURÃO et al., 2016; BORGES et al., 2018).

38 *S. Heidelberg* é considerado um sorovar emergente pelo número de
39 isolamentos na produção avícola, carne de frango e ovos (SOUZA, 2015;
40 EFSA, 2019), além do envolvimento em infecções humanas
41 (SIVARAMALINGAN et al., 2013; NAKAO et al., 2018). A emergência desse
42 sorovar também tem sido observada no Brasil (WEBBER et al., 2019). Seu
43 isolamento é frequente em produtos avícolas de exportação do Brasil para a
44 Europa, estando entre os principais sorotipos isolados desde 2013 (RASFF,
45 2019).

46 Além da emergência no número de isolamentos, *S. Heidelberg* também
47 é considerada muito invasiva, sendo a causa de quadros graves de
48 salmonelose que evoluíram para septicemia e endocardite, em surtos nos EUA.
49 Esse padrão de virulência já foi associado a presença de genes de virulência
50 como *invA*, *agfA* e *lpfA*, ligados ao processo inicial de adesão bacteriana e
51 invasão à célula hospedeira (BRONOWSKI e WINSTANLEY, 2009; OTTO et
52 al., 2014; NAKAO et al., 2018). Destaca-se ainda, pela resistência
53 antimicrobiana para fármacos de escolha no tratamento de salmonelose. No
54 Brasil, África e na América do Norte, cepas de *S. Heidelberg* isoladas de aves,
55 suínos e ovos demonstraram multirresistência a classes de antibióticos como
56 cefalosporinas de terceira geração e betalactâmicos (FOLSTER et al., 2012a;
57 FOLSTER et al., 2012b).

58 O uso de ferramentas e programas para controle de *S. Heidelberg*
59 possuem maior probabilidade de sucesso quando se baseiam em estudos da
60 caracterização e epidemiologia desses micro-organismos. As informações
61 incluem a presença de genes de virulência, a resistência antimicrobiana, a
62 capacidade de formar biofilmes e os agentes químicos eficazes para inibir
63 essas estruturas, e também, na diversidade genética e disseminação desse
64 agente.

65

66

67

68

69 2. OBJETIVOS

70 2.1. Objetivo geral

71 Determinar em *S. Heidelberg* isoladas de frangos de corte e de
72 carcaças: a resistência aos antimicrobianos, a presença de genes de virulência,
73 a formação de biofilmes e métodos para seu controle.

74

75 2.1. Objetivos específicos

76 Verificar em *S. Heidelberg* isoladas de frango de corte e de carcaças:

- 77 - resistência aos antimicrobianos e perfis de multirresistência;
- 78 - presença dos genes de resistência: *blaTEM* e *blaSHV* (betalactâmicos)
79 e *qnrS* e *qnrA* (fluorquinolonas);
- 80 - capacidade de produzir biofilmes com e sem a presença de *chicken*
81 *juice* e o uso de agentes desinfetantes na sua inibição;
- 82 - visualizar a estrutura dos biofilmes formados utilizando microscopia
83 eletrônica de varredura;
- 84 - presença dos genes relacionados a virulência: *invA*, *avrA*, *agfA*, *lpfA*,
85 *sefA*, *luxS* e *sodC* e perfis de virulência;
- 86 - verificar os genes de resistência presentes por método de análise do
87 genoma completo;
- 88 - utilizar os resultados obtidos para discutir a importância do sorovar e
89 saúde pública.

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100 3 REVISÃO DE LITERATURA

101

102 3.1 Caracterização e nomenclatura do gênero *Salmonella* spp.

103 *Salmonella* spp. foi primeiramente isolada em 1855, por Theobald Smith,
104 em amostras de intestinos de suínos infectados que apresentavam febre
105 clássica. A cepa foi nomeada em seguida pelo Dr. Elmer Salmon, um
106 patologista americano que trabalhou juntamente com Smith (ENG et al., 2015).

107 *Salmonella* spp. pertence à família Enterobacteriaceae (EUCAST, 2019),
108 possui morfologia de bastonete Gram negativo, é anaeróbio facultativo, não
109 forma esporo e, a maior parte dos sorovares é móvel, exceto *S. Pullorum* e *S.*
110 *Gallinarum* (RUBIO et al., 2017; WHO, 2018). Os micro-organismos do gênero
111 *Salmonella* spp. são intracelulares facultativos, com capacidade de multiplicar
112 no interior das células e sobreviver no interior de fagócitos (CDC, 2018). A faixa
113 de temperatura ótima para seu crescimento é de 35-43°C, no entanto podem
114 crescer em escalas de temperatura mais ampla, variando de 5-46°C. O pH
115 ótimo de crescimento é 7,0, mas também se multiplica entre 3,8 a 9,5.
116 *Salmonella* spp. é positiva para os testes de catalase e vermelho de metila, e
117 negativa para os testes de oxidase, urease e fenilalanina. Não produz indol,
118 descarboxila aminoácidos como a lisina e a ornitina, reduz nitratos a nitritos e
119 utiliza citrato como fonte de carbono, não fermenta lactose e sacarose, produz
120 gás a partir da fermentação da glicose e a maioria é capaz de reduzir o enxofre
121 em ágar TSI (tríplice açúcar ferro) produzindo ácido sulfídrico (H₂S) (ATIKUR et
122 al., 2019).

123 A nomenclatura do gênero *Salmonella* spp. é controversa e continua
124 sofrendo alterações. O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)
125 utiliza o sistema de nomenclaturas recomendado pela *World Health*
126 *Organization* (WHO), que divide o gênero *Salmonella* spp. em duas espécies,
127 *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, com base nas diferenças
128 sequenciais do RNA ribossomal na região 16S. *Salmonella bongori* possui 23
129 sorovares conhecidos e *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies
130 que compreendem mais de 2500 sorotipos/sorovares (CDC, 2018).

131 A classificação de espécies é pouco utilizada, sendo mais usual a
132 classificação taxonômica de *Salmonella* spp. em sorotipos ou sorovares,

133 sinônimos mais utilizados pela literatura. Este tipo de classificação foi proposta
134 por Kauffmann-White considerando as diferenças nas estruturas antigênicas na
135 superfície das células, sendo elas: os antígenos somáticos “O”, flagelares “H” e
136 capsulares “Vi”, estes últimos são subtipos dos antígenos capsulares K, menos
137 comuns que os anteriores e são encontrados somente nos sorovares Dublin,
138 Typhi e Paratyphi C (MOORE et al., 2019).

139 O antígeno O é um componente do oligossacarídeo localizado na
140 membrana externa, podendo ser expresso mais de um, em um mesmo sorotipo
141 (HU; KOPECKO, 2003). Os antígenos H estão associados ao
142 desencadeamento da resposta imune no hospedeiro e estão localizados nos
143 flagelos bacterianos, podendo existir em sua forma monomérica ou difásica,
144 quando possuem dois genes distintos responsáveis pela codificação das
145 proteínas flagelares. Estas proteínas são codificadas uma por vez, fazendo
146 com que dentro de um grupo populacional possam ser encontrados micro-
147 organismos em fase I ou fase II, dependendo da proteína que está sendo
148 expressa naquele momento (GUIBOURDENCHE et al., 2010; ENG et al.,
149 2015).

150 A identificação de um sorotipo pode ser realizada por sorotipagem
151 abrangendo todas as estruturas antigênicas da bactéria. No entanto,
152 rotineiramente são utilizadas reações mais simples de aglutinação ou anti-
153 soros específicos para os antígenos O com a finalidade de agrupar *Salmonella*
154 spp. em seis diferentes sorogrupos, designados A, B, C1, C2, D e E, facilitando
155 a coleta de informações para estudos epidemiológicos (WATTIAU et al. 2011;
156 ENG et al., 2015; MOORE et al., 2019).

157 Os sorovares de *Salmonella* spp. foram nomeados considerando
158 características como o local onde foi isolada a primeira vez, o tipo de síndrome
159 causada ou mesmo as espécies de animais mais acometidas. Antigamente,
160 estes sorotipos eram classificados na forma de espécies, por isso é comum
161 encontrar em literatura mais antiga os nomes dos sorotipos grafados em itálico
162 e minúsculo, diferente da grafia utilizada em outras espécies, que usualmente
163 são representados pela fórmula antigênica. Para *Salmonella* spp. foi adotada
164 uma nomenclatura específica, com o gênero apresentado em itálico seguido
165 pelo sorotipo com a primeira letra em maiúscula e ausência de grafia itálica
166 (GRIMONT; WEILL, 2007; FARIA, 2013).

167

168 **3.2 Epidemiologia do gênero *Salmonella* spp.**

169 *Salmonella* spp. é um micro-organismo ubíquo de distribuição mundial e
170 é um dos principais agentes zoonóticos causadores de gastroenterite
171 transmitidos pelos alimentos e água, tanto em países desenvolvidos quanto em
172 países emergentes (CDC, 2018). Seu ciclo de transmissão acomete a maior
173 parte dos vertebrados, em especial aves, suínos e bovinos, são disseminadas
174 no ambiente por roedores e invertebrados (EFSA, 2017; BRASIL, 2018).

175 O fato de ser um micro-organismo altamente ubíquo e associado à
176 emergência de novos sorotipos torna seu controle difícil. Desta forma, este
177 agente tornou-se um dos mais envolvidos em casos de toxi-infecções
178 alimentares, e por isso, um dos mais relevantes para a saúde pública (KICH;
179 CARDOSO, 2012; WHO, 2018).

180 *Salmonella* spp. está presente no trato intestinal de animais que muitas
181 vezes atuam como hospedeiros assintomáticos dentro do ciclo de transmissão.
182 A ausência de sintomas acaba contribuindo para a disseminação deste agente
183 entre as aves, resultando em alta prevalência na indústria alimentícia, e ainda,
184 em dificuldade de detecção durante a inspeção, já que na maioria das vezes
185 não há sinais de contaminação nas carcaças (BRASIL, 2018).

186 A contaminação dos produtos de origem animal representa um prejuízo
187 de milhões de dólares para a indústria alimentícia, tanto em nível de mercado
188 interno, mas especialmente para o mercado de exportação, uma vez que há
189 rigorosas normas para importação pelos mercados estrangeiros (EFSA, 2019).

190 A maior parte dos sorotipos de *Salmonella* spp. podem infectar
191 diferentes espécies de animais, no entanto, evolutivamente, alguns sorotipos
192 desenvolveram a capacidade de se especializar na infecção preferencial de um
193 determinado hospedeiro, essas bactérias são chamadas de cepas espécie-
194 específicas. Esta especificidade foi resultado de mutações durante o processo
195 evolutivo do micro-organismo juntamente com a pressão de seleção natural
196 que favoreceram populações bacterianas mais adaptadas a um hospedeiro
197 específico (MENDONÇA, 2016; JAJERE, 2019).

198 Dentre os sorotipos espécie-específicos, podemos destacar *S.*
199 *Gallinarum* e *S. Pullorum*, que infectam as aves, *S. Abortusovis* e *S.*

200 Abortusequis, ovinos e equinos respectivamente, *S. Choleraesuis*, suínos, *S.*
201 Dublin, bovinos e *S. Paratyphi A* e *S. Typhi* que acometem humanos. O
202 agravante é quando ocorre infecção de humanos, por sorotipos espécie-
203 específicos de outros animais, com cepas altamente invasivas, pois podem
204 resultar em quadros de alta gravidade e levar a óbito (WHO, 2015; NAKAO et
205 al., 2018).

206 *Salmonella* spp. destaca-se por ser um dos principais agentes
207 etiológicos envolvidos em infecções de origem alimentar em todo o mundo
208 (EFSA, 2017; BRASIL, 2018; CDC, 2018). Os alimentos de origem animal,
209 especialmente carne de frango e derivados, são as principais fontes de
210 infecção humana segundo dados divulgados em países onde há vigilância
211 sanitária ativa, como por exemplo, os EUA e os países da União Europeia
212 (EFSA, 2017; CDC, 2018).

213 Apesar de no Brasil ainda haver carência na identificação de patógenos
214 associados as doenças transmitidas pelos alimentos, estudos demonstram que
215 *Salmonella* spp. também é um dos mais envolvidos em surtos. Segundo
216 Oliveira (2013), entre 2008 a 2010, no estado de São Paulo, *S. Enteritidis*
217 esteve envolvida em 17 surtos e *Salmonella* spp. em 13, totalizando em 4,6% e
218 3,6% dos casos respectivamente. Entre 2000 a 2015, o Ministério da Saúde
219 confirmou o destaque de *Salmonella* spp., atribuindo a este agente 14,4% das
220 notificações de surtos alimentares (BRASIL, 2015) e segundo o boletim
221 epidemiológico de 2018, *Salmonella* spp. foi responsável por 11,3% dos surtos
222 entre de 2009 a 2018 (BRASIL, 2018).

223 Segundo os relatórios do CDC (2014), nos EUA, *Salmonella* spp., foi o
224 agente mais incriminado nas infecções humanas por DTAs no ano de 2012,
225 totalizando 40% dos casos e seguido por *Campylobacter* com 35%. Em 2018,
226 nos Estados Unidos, a FoodNet identificou 25.606 infecções em humanos por
227 agentes transmitidos por alimentos, totalizando em 5.893 hospitalizações e 120
228 mortes, novamente os mais incriminados foram *Salmonella* spp. e
229 *Campylobacter* sp. (TACK et al., 2019).

230 A prevalência dos sorotipos de *Salmonella* spp. sofrem constante
231 alteração, sendo que muitas vezes o controle de algum sorovar favorece a
232 emergência de outro. Normalmente, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* são os
233 sorovares mais prevalentes em casos de salmonelose humana (CDC, 2018),

234 no entanto, no ano de 2012, a União Europeia relatou *S. Heidelberg* e *S.*
235 *Minnesota* como os sorotipos mais prevalentes nas carnes de frango
236 importadas do Brasil (RASFF, 2012). Entre janeiro de 2018 a novembro de
237 2019, o RASFF emitiu mais de 100 notificações pela presença de *S.*
238 *Heidelberg* em produtos avícolas exportados do Brasil para a Europa (RASFF,
239 2019).

240 A emergência de *S. Heidelberg* tem sido demonstrada pelo seu
241 envolvimento na avicultura, com aumento de isolamento na carne de frango,
242 ovos e derivados (SOUZA, 2015; EFSA, 2019), e também, por casos de
243 infecções humanas (SIVARAMALINGAN et al., 2013; NAKAO et al., 2018).

244

245 **3.3 Infecção e manifestações clínicas de salmonelose em humanos**

246 As infecções por *Salmonella* spp. de um modo geral são caracterizadas
247 por diarreia com cólicas abdominais agudas, febre, náuseas e pode ou não
248 causar vômitos. Normalmente, a infecção é autolimitante com duração de até
249 sete dias, sem a necessidade de antibioticoterapia. Dependendo do potencial
250 virulento da cepa, da dose ingerida e das limitações imunológicas do indivíduo,
251 o quadro de salmonelose pode evoluir e tornar-se mais complicado com
252 necessidade de hospitalização e tratamento com antimicrobianos. Nesses
253 casos pode ocorrer desidratação, e se a cepa for muito invasiva, o quadro pode
254 evoluir para septicemia e culminar em morte nos casos mais graves (EFSA,
255 2017; CDC, 2018).

256 Idosos, crianças, gestantes e indivíduos imunocomprometidos são mais
257 susceptíveis a infecção por *Salmonella* spp. e possuem mais chances de
258 desenvolverem quadros de maior gravidade (CDC, 2018).

259 Após a infecção pela via oral, *Salmonella* spp. chega ao intestino
260 delgado onde irá se aderir e iniciar o processo de invasão da mucosa até
261 atingir as células M, e os enterócitos absortivos, que são consideradas as
262 principais portas de entrada deste agente. Normalmente, a infecção se mantém
263 localizada e permanece como uma gastroenterite comum, mas em casos mais
264 graves, as bactérias podem ultrapassar a mucosa intestinal a partir da invasão
265 de fagócitos onde irão modular seu aparato genético e se multiplicar no seu
266 interior. A migração dos fagócitos para órgãos como o baço e o fígado acelera

267 e facilita a disseminação do micro-organismo gerando um quadro septicêmico,
268 com risco de morte (VAN ASTEN et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013; YUKI et
269 al., 2019).

270

271 **3.4 Impactos da presença de *Salmonella* spp. na avicultura**

272 A avicultura brasileira é considerada uma das mais expressivas no
273 mundo e ocupa o primeiro lugar no ranking de maiores exportadores da carne
274 de frango desde 2008, tendo a segunda colocação dentre os maiores
275 produtores. Cerca de um terço da produção avícola é destinada para
276 exportação, para mercados como União Europeia, Japão, Arábia Saudita,
277 dentre outros países (ABPA, 2018).

278 A posição de destaque da avicultura brasileira é reflexo dos avanços
279 tecnológicos empregados. Esta modernização foi fundamental para alavancar a
280 produção, porém foi acompanhada de um aumento considerável no tamanho
281 dos lotes de aves, favorecendo a manutenção e disseminação de patógenos
282 nas granjas, e conseqüentemente, em toda a cadeia produtiva. Para contrapor
283 esta situação, o controle de qualidade ficou bem mais rígido, com métodos
284 focados em garantir um produto de qualidade, com investimentos na proteção
285 dos lotes contra doenças avícolas e na proteção do consumidor, incluindo aí, o
286 atendimento aos requisitos exigidos pelos mercados importadores (ABPA,
287 2016).

288 Uma das principais medidas adotadas pelo governo brasileiro para
289 garantir a soberania da avicultura brasileira foi a criação do Programa Nacional
290 de Redução de Patógenos (BRASIL, 2003). Nesse contexto, foi publicada pelo
291 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a Instrução Normativa
292 número 20, de 2016, visando estabelecer controle e monitoramento de
293 *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas sob inspeção federal com
294 objetivo de reduzir a prevalência desse agente e estabelecer um nível
295 adequado de proteção ao consumidor (BRASIL, 2016a).

296 Sabe-se que *Salmonella* spp. está intimamente ligada ao ambiente
297 avícola, uma vez que as aves são seus principais hospedeiros e, portanto,
298 pode ser facilmente disseminada em toda cadeia de produção das aves, desde
299 o ambiente de criação até a indústria. Portanto, é necessário identificar os

300 pontos críticos de controle para evitar a manutenção e multiplicação deste
301 micro-organismo no ambiente e no alimento (BRASIL, 2018; ETTER et al.,
302 2019).

303 Dentro da cadeia de produção avícola, *Salmonella* spp. pode ser
304 disseminada vertical ou horizontalmente. A partir de surtos relacionados ao
305 consumo de ovos crus ou malcozidos, associados principalmente aos sorotipos
306 *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Agona* e *S. Virchow* foi reconhecida a
307 capacidade de transmissão transovariana (vertical) de *Salmonella* spp.
308 (WHITE; FEDORKA-CRAY; CHILLER, 2006; MICHAILIDIS; THEODORIDIS;
309 AVDI, 2011; OLORUNSOLA et al., 2012).

310 A transmissão horizontal ocorre mais facilmente devido a sua adaptação
311 aos mais variados tipos de condições ambientais. A disseminação neste caso
312 ocorre por meio de roedores assintomáticos e invertebrados que acabam
313 carreando estes micro-organismos para diferentes áreas, além de bebedouros
314 com água contaminada ou a partir do contato entre as próprias aves, uma vez
315 que se há eliminação de *Salmonella* spp. nas fezes. Conseqüentemente, há
316 contaminação de ração e água no ambiente levando a disseminação para todo
317 o lote por via oral-fecal (BONI; CARRIJO; FASCINA, 2011; BRASIL, 2018).

318 Já na indústria, durante o processo de abate dos animais também pode
319 ocorrer contaminação da carne e dos derivados. Este ambiente atua na
320 manutenção e disseminação das cepas, especialmente nos pontos críticos da
321 cadeia produtiva. Porém, é importante ressaltar que a prevalência está
322 associada às condições que esses animais chegam para o abate, ou seja, está
323 relacionada ao grau de contaminação dos ambientes de criação (MOORE et
324 al., 2019).

325 Estudos confirmam que o jejum prolongado pré-abate altera o pH do
326 intestino das aves favorecendo a multiplicação de micro-organismos
327 patogênicos, em especial do gênero *Salmonella* spp., que podem ser
328 disseminados para o ambiente industrial durante o abate se houver rompimento
329 intestinal de alguma carcaça (PARRA-SUESCUN; AGUDELO-TRUJILLO;
330 LOPEZ-HERRERA, 2015). Desta forma, a bactéria pode ser disseminada por
331 toda a cadeia de produção e entrar em um ciclo de contaminação cruzada,
332 entre o alimento, o manipulador, as instalações e utensílios. Esta condição
333 pode ser agravada caso as cepas possuam potencial de formação de biofilmes,

334 que são fontes de contaminação constantes na cadeia produtiva e sustentam a
335 manutenção das mesmas no ambiente (MELO et al., 2017).

336 Os esforços para controlar *Salmonella* spp. na avicultura são árduos,
337 uma vez que a presença deste patógeno tanto nas granjas, quanto na indústria
338 ou no produto final geram grandes impactos econômicos, considerando a
339 necessidade de eliminação de lotes afetados e entraves nas exportações dos
340 produtos (KICK et al., 2011), além do impacto na saúde humana em casos de
341 salmonelose adquirida por alimentos. A fim de minimizar os riscos que
342 representa para a saúde pública, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária
343 publicou em 2001 a Resolução RDC 12, inviabilizando o consumo e
344 comercialização de alimentos com a presença de *Salmonella* spp. em 25g da
345 amostra analisada (BRASIL, 2001).

346 Os mercados externos também possuem normas para importação da
347 carne de frango brasileira, e órgão de controle e monitoramento para verificar a
348 qualidade e liberar a compra de produtos brasileiros. A União Europeia, por
349 exemplo, utiliza o RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*), que é um
350 sistema de alerta que registra e reporta o isolamento de sorotipos que
351 ofereçam riscos para saúde humana (RASFF, 2019; EFSA, 2019). Dessa
352 maneira, a fim de evitar prejuízos causados por embargos de cargas
353 brasileiras, é extremamente importante seguir as normas para prevenção e
354 controle deste patógeno preconizadas pelos países importadores do produto
355 avícola brasileiro.

356

357 **3.5 S. Heidelberg na avicultura e na saúde pública**

358 Apesar de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* serem os sorovares mais
359 prevalentes em casos de salmonelose humana (CDC, 2018), *S. Heidelberg* tem
360 sido considerado um sorotipo emergente, sendo o quarto sorotipo mais isolado
361 em surtos entre 1996 e 2006 pelo CDC (Jones et al., 2006). Seu envolvimento
362 é reportado tanto na avicultura, com aumento na incidência de isolamento em
363 carne de frango e ovos (SOUZA, 2015; EFSA, 2019), quanto por sua
364 associação a surtos em humanos (SIVARAMALINGAN et al., 2013; NAKAO et
365 al., 2018).

366 Os esforços do governo brasileiro em controlar *S. Enteritidis* e *S.*
367 *Typhimurium*, a partir da publicação da IN 20/2016, foi capaz de reduzir suas
368 prevalências (BRASIL, 2016a). Em contrapartida, outros sorovares que antes
369 eram menos prevalentes começaram a emergir, como é caso de *S. Heidelberg*
370 (WEBBER et al., 2019).

371 *S. Heidelberg* tem distribuição mundial e se encontra entre os dez
372 sorotipos de maior incidência em casos humanos de salmonelose (GRIMONT;
373 WEILL, 2007; CDC, 2013). Pelo seu impacto econômico na indústria avícola e
374 na saúde pública, atrelado ao fato de ser considerado um sorotipo emergente,
375 *S. Heidelberg* é monitorada pelo RASFF, órgão de vigilância da UE que de
376 meados de 2018 até o presente momento já reportou mais de 100 boletins
377 identificando a presença deste sorotipo em carnes ou derivados de aves
378 brasileiras exportadas para o continente europeu, situação considerada séria
379 pelas autoridades da UE. Este sorovar esteve entre os principais sorotipos
380 isolados em alimentos nos anos de 2013, 2014 2016, e entre os anos 2018 e
381 2019 (RASFF, 2019).

382 O sorotipo Heidelberg foi o terceiro mais frequente na avicultura, e
383 alternou entre o segundo e o terceiro lugar entre isolamentos em humanos no
384 Canadá (CHITTICK et al., 2006). Nos Estados Unidos, em 2013, foi o nono
385 sorotipo mais comum nas infecções humanas e o terceiro mais isolado em
386 produtos de origem avícola (NARMS, 2013; CDC, 2014). No ano de 2015, o
387 CDC reportou diversos surtos por *S. Heidelberg* nos EUA ocorridos entre os
388 anos de 2011 a 2014, relacionados ao consumo da carne de frango ou peru,
389 somando mais de 1000 pessoas acometidas (CDC, 2015). No mesmo país foi
390 reportado um surto por *S. Heidelberg* multirresistente em 15 estados em 2017
391 (CDC, 2017). Na Europa, esse sorovar ainda não demonstra tanta importância
392 para a saúde pública segundo os dados do relatório do *European Centre for*
393 *Disease Prevention and Control* (EU, 2014).

394 No Brasil, o aumento da ocorrência deste sorotipo em amostras de
395 alimentos, bem como em infecções humanas tem preocupado os órgãos de
396 saúde pública do governo, já que o controle e prevenção nos ambientes de
397 criação das aves são muito difíceis (WEBBER et al., 2019).

398 Desde a década de 60, *S. Heidelberg* tem sido isolada em amostras
399 avícolas (HOFER et al., 1997). No Brasil, em 1997, foi o terceiro sorotipo mais

400 frequente nas amostras de carcaças de frango analisadas por Nascimento e
401 colaboradores (1997), representando 11% dos isolamentos, atrás apenas de *S.*
402 *Enteritidis* (51%) e *S. Hadar* (26%). Em 2004, na região sul do Brasil, Dickel
403 (2004) coletou carcaças em três abatedouros diferentes, antes e após a etapa
404 do *chiller*, tendo encontrado 31,7% de positividade antes e 20% depois.
405 Identificando *S. Heidelberg* como o sorovar mais prevalente (64%), seguido por
406 *Enteritidis* (32%), e outros em menor quantidade.

407 *S. Heidelberg* é capaz de causar quadros graves de salmonelose
408 humana devido ao poder de invasão das cepas quando comparado a outros
409 sorotipos. A doença se desenvolve a nível sistêmico em aproximadamente 13%
410 dos casos de infecções (JONES et al., 2008; DUTIL et al., 2010).

411 Os surtos relacionados a este sorovar demonstram que as taxas de
412 hospitalização são altas e o tratamento muitas vezes é desafiador, uma vez
413 que perfis de multirresistência aos antimicrobianos são frequentemente
414 encontrados para este sorotipo (CDC, 2018; EFSA, 2019; ETTER et al., 2019).

415

416 **3.6 Resistência aos antimicrobianos em *Salmonella* spp.**

417 O aumento da resistência aos antimicrobianos por cepas de *Salmonella*
418 spp. é uma realidade e motivo de preocupação em todo o mundo. Da década
419 de 70 para 80, o percentual médio de resistência das cepas isoladas no país
420 aumentou de 17% para 31%, incluindo a classe das fluoroquinolonas, que é a
421 primeira escolha no tratamento de salmoneloses (BRASIL, 2018).

422 De um modo geral, o aumento na resistência representa risco para
423 saúde pública, uma vez que diminui a eficácia e as possibilidades dos
424 tratamentos de infecções. Atualmente, no mundo todo, tem-se incentivado
425 pesquisadores para o monitoramento das resistências e a busca de novas
426 alternativas para revertê-la, como por exemplo, a criação de novas moléculas
427 (WHO, 2011).

428 Este tema tão importante tem sido discutido periodicamente em reuniões
429 da Organização Mundial da Saúde (OMS) e *Codex Alimentarius*, que buscam
430 alternativas e soluções para o problema (WHO, 2011; BRASIL, 2018).

431 O fato de *Salmonella* spp. ser um micro-organismo zoonótico, ubíquo, e
432 presente na maioria das espécies destinadas à produção de proteína animal
433 para consumo humano, faz com que a resistência seja considerada alarmante

434 (KICH; CARDOSO, 2012). A preocupação acontece apesar de a salmonelose
435 ser uma enfermidade auto limitante, em que na maioria dos casos não é
436 indicado tratamento com antimicrobianos, mas que em infecções mais graves e
437 com cepas mais invasivas se torna imprescindível (WHO, 2018). Além disso a
438 possibilidade de disseminação da resistência entre cepas e para outros
439 gêneros ou espécies por recombinação gênica ou pressão de seleção,
440 amplificam as preocupações da emergência de cepas super-resistentes
441 (JAJERE, 2019).

442 No Brasil e em outros países em desenvolvimento não há um órgão de
443 vigilância ativa para monitorar a resistência antimicrobiana de isolados de
444 alimentos, animais ou humanos. Além disso, as informações obtidas nos
445 diferentes elos da cadeia não são comparadas, dificultando o entendimento do
446 envolvimento de cada uma das etapas de produção ou sua repercussão na
447 saúde pública e disseminação. Estes fatos, quando aliado ao uso dos
448 antimicrobianos de maneira empírica e indiscriminada, contribui para a pressão
449 de seleção de cepas resistentes que são disseminadas para os animais e
450 ambiente, facilitando a infecção humana (BRASIL, 2018; CDC, 2018; EFSA,
451 2019).

452 Também na cadeia avícola e na produção de animais de um modo geral,
453 o monitoramento da resistência antimicrobiana é fundamental, pois só dessa
454 forma é possível ter dados que corroborem com a conscientização no uso dos
455 antimicrobianos e seja evitada a resistência aos mesmos (JAJERE, 2019).

456 O monitoramento na produção animal influencia diretamente na saúde
457 pública, uma vez que a infecção por via alimentar é bastante comum, portanto
458 a prevenção à resistência aos antimicrobianos no campo e na indústria de
459 alimentos de origem animal, melhora as perspectivas do tratamento das
460 infecções humanas de origem alimentar.

461

462 **3.6.1 Resistência aos β -lactâmicos**

463 A classe dos β -lactâmicos é importante para o tratamento de infecções
464 bacterianas e possui alta versatilidade devido suas sub-classes penicilinas,
465 cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, e ainda, os inibidores de
466 β -lactamases. Na estrutura destes compostos é comum a presença de um anel

467 β -lactâmico, que é relacionada a atividade antibacteriana (TRABULSI; MIMICA;
468 MIMICA, 2008; KONATÉ et al., 2019).

469 Dentre os mecanismos de ação dos β -lactâmicos está a inibição da
470 síntese da camada de peptidoglicanos, que ocorre quando as bactérias estão
471 em fase de divisão celular, ou seja, de multiplicação, comprometendo a parede
472 celular e causando a morte do micro-organismo (YORK, 2018).

473 Os mecanismos bacterianos de resistência aos β -lactâmicos, podem
474 ocorrer de três diferentes formas: i) produção de enzimas β -lactamases, que
475 hidrolisam o anel β -lactâmico e inibe sua função; ii) modificações na estrutura
476 das proteínas ligadoras de penicilinas; e iii) modificações estruturais nas
477 porinas para diminuir a permeabilidade bacteriana (BRASIL, 2007;
478 CARATTOLI, 2008).

479 O uso frequente dos β -lactâmicos tanto na medicina veterinária quanto
480 na humana acabou contribuindo para a seleção de cepas produtoras de β -
481 lactamases, havendo mais de 340 β -lactamases descritas para *Salmonella* spp.
482 (KONATÉ, 2019).

483 Em *Salmonella* spp., os genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CMY}* e *bla_{CTX}* codificam
484 para a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), enzimas
485 associadas a resistência a várias antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos.
486 Essas β -lactamases podem ser codificadas por genes tanto de origem
487 cromossomal quanto plasmidial, além de genes presentes em elementos
488 móveis como transposons e integrons (MICHAEL et al., 2006).

489 A enzima ESBL confere resistência a uma grande variedade de
490 penicilinas e cefalosporinas. Nos EUA, o CDC (2014) reportou uma estimativa
491 de mais de 26 mil casos de infecções e aproximadamente 1.700 mortes em
492 decorrência de cepas produtoras de ESBLs (CDC, 2014).

493 Ampicilina e amoxicilina são penicilinas de espectro estendido e
494 bastante utilizadas para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-
495 negativos, no entanto, por serem inativadas pelas β -lactamases, muitas
496 bactérias apresentam resistência a essas drogas (TRABULSI; MIMICA;
497 MIMICA, 2008. YORK, 2018).

498 A crescente prevalência de bactérias resistentes às cefalosporinas
499 provavelmente está associada a β -lactamases AmpC, codificada pelo gene
500 *bla_{CMY}*. A associação destes genes a plasmídeos facilita sua transmissão para

501 outras bactérias, e conseqüentemente, a resistência se dissemina entre a
502 população bacteriana (AARESTRUP, 2004; CARSON et al., 2019).

503 Na resistência de cepas de *Salmonella* spp. às cefalosporinas, destaca-
504 se a ceftriaxona. A resistência foi provavelmente adquirida pelo uso comum de
505 outra cefalosporina, o ceftiofur, que tem espectro estendido e ampla utilização
506 na produção animal, o que pode ter estimulado a resistência cruzada
507 (CARATTOLI et al., 2002; CARSON et al., 2019).

508 Os carbapenêmicos possuem amplo espectro de ação, incluindo frente a
509 cepas produtoras de β -lactamases. São drogas pertencentes a esta classe
510 meropenem, imipinem e ertapanem. Estas drogas são utilizadas para tratar
511 infecções causadas por micro-organismos multirresistentes, e por esse motivo,
512 é considerada como criticamente importante. Assim, não devem ser tratadas
513 como drogas de primeira escolha ou de uso empírico para evitar pressão
514 seletiva de resistência (GOUVEIA; LINS; SILVA, 2019). Já foi relatada
515 sensibilidade de 100% de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de produtos de
516 origem animal no Brasil e de amostras humanas na China ao imipinem (PERIN
517 et al., 2019; LI et al., 2020).

518

519 **3.6.2 Resistência às quinolonas e fluoroquinolonas**

520 Os derivados quinolônicos, como as fluoroquinolonas, possuem como
521 mecanismo de ação a inibição da enzima DNA girase, e conseqüentemente, a
522 interrupção na síntese de DNA (ALTERTHUM, 2008). Esta classe de
523 antimicrobianos possui grande importância, uma vez que são as drogas de
524 primeira escolha no tratamento de salmonelose (EFSA, 2017). Por esse motivo
525 é reconhecida pela OMS como criticamente importante para a saúde pública,
526 que sugere que o uso das fluoroquinolonas seja monitorado e reduzido na
527 produção animal, a fim de evitar uma possível pressão de seleção de cepas
528 resistentes que possam ser transmitidas ao homem por via alimentar (WHO,
529 2011; EU, 2014).

530 Desde 2009, o uso das quinolonas como promotoras de crescimento ou
531 como método profilático na criação de animais foi banido pela legislação
532 brasileira, permitindo apenas o uso terapêutico (BRASIL, 2009).

533 A ciprofloxacina é um dos antimicrobianos pertencentes a classe das
534 fluoroquinolonas mais utilizados no mundo e a resistência de *Salmonella* spp. a
535 este antimicrobiano foi aumentando com o passar do tempo. Em 2012, no
536 Brasil, taxas de resistência baixas (0,4%) foram relatadas no Brasil (BRASIL,
537 2012), no entanto recentemente Mendonça e colaboradores (2019)
538 encontraram cerca de 7% de resistência em 111 cepas do sorovar Enteritidis
539 isolados de carcaças de frango. Porém, nos EUA, Nisar e colaboradores (2017)
540 não encontraram resistência para este fármaco em cepas de *S. Heidelberg*
541 provenientes de amostras de frangos e perus.

542 Na China, Lin e colaboradores (2015) em estudo realizado com 82
543 isolados de *Salmonella* spp. de diversos sorotipos, encontraram 39% de
544 resistência para ciprofloxacina, e ainda, alertaram sobre o aumento da
545 resistência às fluoroquinolonas ao longo do tempo no continente asiático.

546 A resistência adquirida às fluoroquinolonas pode ocorrer de diferentes
547 formas: i) ocorrência de mutações cromossômicas nos sítios de ligação da
548 DNA girase, que deixam de ser inibidas pelos antimicrobianos desta classe; ii)
549 por mutações nas porinas das membranas celulares bacterianas que afetam a
550 permeabilidade ao fármaco, e ainda, iii) pelo mecanismo conhecido como
551 bomba de efluxo (ALTERTHUM, 2008; HAO et al., 2018). Esses mecanismos
552 de aquisição de resistência para as fluoroquinolonas, podem ser também
553 associados a plasmídeos que carregam genes de resistência e elementos
554 móveis que disseminam o gene de resistência *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*)
555 (ALTERTHUM, 2008) que codifica a proteína Qnr que atua na proteção da DNA
556 girase (GAY et al., 2006).

557 Apesar da resistência às fluoroquinolonas ainda ser considerada
558 relativamente baixa, é importante que seja monitorada pelos órgãos de saúde
559 pública e animal. Os resultados do monitoramento também devem ser
560 divulgados para que a informações sejam motivadores de alertas e medidas de
561 controle, caso necessárias, uma vez que esta classe é a mais indicada para o
562 tratamento de salmonelose, o que reforça a sua importância crítica (WHO,
563 2011; BRASIL, 2018).

564

565

566 **3.6.3 Resistência às polimixinas**

567 A classe das polimixinas possui ação diferenciada das demais classes
568 de antimicrobianos, são polipeptídeos que atuam na membrana citoplasmática
569 se intercalando com moléculas de polissacarídeos da membrana externa de
570 Gram-negativas, causando um desarranjo na membrana bacteriana, e assim,
571 causando o extravasamento de material citoplasmático (ALTERTHUM, 2008;
572 MELETIS; SKOURA, 2018).

573 Por ter um mecanismo de ação diferenciado é raro que o uso das
574 polimixinas seja comprometido devido à resistência cruzada com outras
575 classes de antimicrobianos, e por isso, muitas vezes, acabam sendo utilizadas
576 em infecções de maior gravidade causadas por micro-organismos
577 multirresistentes (WHO, 2011).

578 Além de bactericidas, as polimixinas também são capazes de neutralizar
579 toxinas produzidas pelas Gram-negativas, por meio da inativação do lipídio A,
580 associado a presença de produção de endotoxinas (BRASIL, 2007; MELETIS;
581 SKOURA, 2018).

582 A colistina é o principal representante da classe das polimixinas, sendo
583 considerada pela OMS como criticamente importante por ser uma das últimas
584 opções no tratamento de infecções graves por bactérias multi-resistentes
585 (WHO, 2011). Apesar de serem mais estáveis quanto a resistência cruzada
586 com outras classes, a diminuição da ligação deste fármaco com a membrana
587 das bactérias Gram-negativas pode contribuir para a resistência às mesmas
588 (BRASIL, 2007; LIMA, DOMINGUES e da SILVA, 2019).

589 No Brasil, Rezende e colaboradores (2005) relataram 100% de
590 sensibilidade a colistina em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de
591 frangos. Posteriormente, em 2013, Figueiredo e colaboradores relataram 22%
592 de resistência também em *Salmonella* spp., isoladas de produtos de origem
593 animal e de modo geral, ao longo dos anos a literatura tem demonstrado
594 resistência crescente à colistina em várias partes do mundo, conforme revisão
595 de Lima, Domingues e da Silva (2019), que discutiram sobre o reconhecimento
596 da resistência à colistina mediada por plasmídeos que carregam genes do tipo
597 *mcr*. Os autores ainda comentaram sobre a preocupação global com a
598 disseminação dos genes *mcr* por elementos móveis, que podem disseminar a

599 resistência horizontalmente não só para colistina, mas também para outras
600 classes de antimicrobianos de forma cruzada.

601 Os dados da resistência de *Salmonella* spp. a colistina chamaram a
602 atenção da OMS e outros órgãos mundiais de saúde pública pelo impacto que
603 esta resistência poderia gerar nos tratamentos de infecções por micro-
604 organismos multirresistentes (WHO, 2011; LIMA; DOMINGUES; SILVA, 2019).
605 Convergindo com estas preocupações, o Ministério da Agricultura Pecuária e
606 Abastecimento (MAPA) brasileiro banuiu em 2016 o uso desta droga na
607 produção animal como promotor de crescimento (BRASIL, 2016b).

608

609 **3.6.4 Resistência às sulfonamidas**

610 As sulfonamidas são um grupo de drogas de amplo espectro de ação,
611 com ação bacteriostática (TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008).
612 Frequentemente, é realizada a associação entre sulfametoxazol e trimetoprim,
613 pois são drogas sinérgicas que interferem na síntese do DNA da bactéria, por
614 atuação na biossíntese do ácido fólico (ALTERTHUM, 2008).

615 De acordo com a Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA), a
616 resistência às sulfas está relacionada a mutações, que levam ao aumento de
617 produção de ácido para-aminobenzoico ou à síntese de diidropteróico
618 sintetase, os quais têm pouca afinidade pelo antimicrobiano. Os plasmídeos
619 também podem codificar resistência por levar a diminuição da permeabilidade
620 da bactéria (BRASIL, 2007). Já ao trimetoprim, a resistência pode ser conferida
621 cromossomalmente por plasmídeos ou transposon, por alteração da
622 permeabilidade celular e capacidade da ligação da bactéria a droga por
623 modificação na enzima diidrofalato redutase.

624 Dois genes são associados à resistência às sulfonamidas, *sul1* e *sul2*,
625 que codificam uma enzima necessária durante a síntese do ácido fólico (sítio
626 de atuação da droga), precursor do RNA e DNA, as quais não são inibidas pela
627 droga (LYNNE et al., 2008). Os genes *sul1* e *sul3* já foram identificados em *S.*
628 Heidelberg (ALCAINE; WARNICK; WIEDMANN, 2007).

629 Em estudos anteriores, foram encontrados índices de resistência de *S.*
630 Heidelberg à sulfonamidas entre 11,5% e 29,3%, de amostras humanas e
631 animais (LYNNE et al., 2009; HAN et al., 2011). Para sulfametoxazol e

632 trimetoprim, os índices variaram entre 100% de sensibilidade e 24,6% de
633 resistência (LYNNE et al., 2008; FDA, 2010).

634

635 **3.6.5 Resistência às tetraciclinas**

636 As tetraciclinas são drogas com amplo espectro, de ação bacteriostática
637 que se difundem ao interior da célula do hospedeiro, fazendo assim que sejam
638 muito utilizadas para patógenos intracelulares. O mecanismo de ação das
639 tetraciclinas é a ligação reversível à porção 30S do ribossomo, o que bloqueia
640 a ligação do RNA transportador e impede a síntese protéica (BRASIL, 2007;
641 TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008). O uso das tetraciclinas na medicina
642 veterinária pode ser a fonte para disseminação de resistência (BRASIL, 2007).

643 O mecanismo de resistência microbiana principal é a diminuição da
644 acumulação da droga no interior da célula, e a resistência pode ser
645 cromossômica ou mediada por plasmídeos ou transposons (BRASIL, 2007).

646 Proteínas Tet (Tet A, B, C e D), quando formadas, permanecem na
647 membrana citoplasmática bacteriana, provocando a saída do antibiótico da
648 célula por um mecanismo dependente de energia, levando à resistência
649 (ALTERTHUM, 2008). Mais de 35 genes relacionados a bombas de efluxo
650 associados à membrana são descritos como codificadores de resistência a
651 tetraciclina. Os genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetG* e *tetH* foram descritos em
652 *Salmonella*, onde *tetA* e *tetB* são encontrados com maior frequência e foram
653 identificados em *S. Heidelberg* (MICHAEL et al., 2006; ALCAINES; WARNICK;
654 WIEDMANN, 2007).

655 Em estudos anteriores, para esta droga foram relatados níveis de
656 resistência entre 19,1% e 70,9% em cepas de *S. Heidelberg* (PATCHANEE et
657 al., 2008; LYNNE et al., 2009).

658

659 **3.6.6 Resistência aos aminoglicosídeos**

660 Os aminoglicosídeos são antibióticos bactericidas, que agem através da
661 ligação à fração 30S do ribossomo, inibindo a síntese protéica ou produzindo
662 proteínas defeituosas (BRASIL, 2007). O processo pelo qual esta droga se liga
663 a superfície da célula para posteriormente ser transportado através da parede é
664 dependente de energia oxidativa. Seu espectro de ação envolve bactérias

665 Gram-negativas aeróbias e alguns estafilococos, e são geralmente usados em
666 combinação com outros antimicrobianos para garantir um maior espectro de
667 ação (ALCAINES; WARNICK; WIEDMANN, 2007; TRABULSI; MIMICA;
668 MIMICA, 2008).

669 A resistência aos aminoglicosídeos pode ocorrer por mecanismos
670 mediados por mutação – alteração do sítio de ligação no ribossomo e alteração
671 na permeabilidade celular à droga – ou mediados por plasmídeos –
672 modificação enzimática da droga (ALTERTHUM, 2008).

673 As enzimas que modificam os aminoglicosídeos se enquadram em três
674 grupos que são nomeados de acordo com os tipos de reações que catalisam:
675 acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases. Os genes de
676 acetiltransferases encontrados em *Salmonella* são *aac(3)* e *aac(6')*; os genes
677 adeniltransferases mais comuns são do tipo *aadA* – que media resistência à
678 estreptomicina e espectinomicina – e *aadB*, que confere resistência à
679 gentamicina, kanamicina e tobramicina; os *aac(3)* são mais comuns, e mediam
680 resistência a gentamicina (MICHAEL et al., 2006). Os genes associados as
681 fosfotransferases são designados como *aph*, e já foram encontrados em *S.*
682 Heidelberg (MICHAEL et al., 2006; ALCAINES; WARNICK; WIEDMANN, 2007).

683 Em trabalhos realizados de cepas de *S. Heidelberg* isoladas em
684 humanos e animais foram encontrados percentuais de resistência entre 17% e
685 62,1% (PATCHANEE et al.; LYNNE et al., 2009).

686

687 **3.6.7 Resistência à fosfomicina**

688 A fosfomicina é um antimicrobiano bactericida que impede a ligação de
689 componentes da camada de peptidoglicano, através da inibição da enzima
690 piruvil-transferase (ALTERTHUM, 2008). É uma droga de amplo espectro de
691 ação, atuando em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (FALAGAS et
692 al., 2008).

693 A resistência à fosfomicina foi determinada pelo gene *fosA3*, originado
694 de um plasmídeo conjugativo, em *Salmonella* spp. isolada de alimentos, por Lin
695 e Chen (2015). Este plasmídeo, segundo os autores, carregava genes *bla_{CTX-M-55}*
696 e *fosA3*, e esta associação pode inviabilizar o uso desta droga como alternativa
697 para o tratamento de salmonelose.

698

699 **3.6.8 Multirresistência antimicrobiana em *Salmonella* spp. e** 700 **métodos de avaliação da susceptibilidade**

701 *Salmonella* não tifóides acometem mais de um milhão de pessoas todos
702 os anos gerando um custo para os cofres público superior a \$350 milhões, e
703 segundo os dados do CDC, cerca de 5% dessas salmonelas são resistentes a
704 pelo menos cinco tipos de drogas (CDC, 2018).

705 A prevalência de cepas de *Salmonella* spp. com perfil de
706 multirresistência tem sido relatada pela literatura como motivo de preocupação
707 (PARISI et al., 2018; CHIOU et al.; 2019; GUPTA et al., 2019), já que essa
708 bactéria é um dos principais agentes associados a DTA's em todo o mundo, e
709 portanto, oferecem risco a saúde pública pelos obstáculos quanto as
710 possibilidades de tratamento.

711 No Brasil, há dados que demonstram multirresistência para *Salmonella*
712 spp. em isolados de 250 carcaças de frango congeladas, com identificação de
713 aproximadamente 77% (192/250) cepas resistentes a pelo menos três classes
714 diferentes de antimicrobianos. Foram observados 98 perfis de multirresistência
715 diferentes, sendo mais de 30% das cepas de *S. Enteritidis* e 27,7% de *S.*
716 *Typhimurium* resistentes a cinco ou mais classes. Neste estudo também foi
717 encontrado um isolado do sorotipo *Enteritidis* resistente a 16 antimicrobianos
718 de seis classes distintas, incluindo drogas de última geração (BRASIL, 2012).

719 Segundo o *Center for Infectious Disease Research and Policy* (CIDRP-
720 EUA), o sorotipo Heidelberg tem apresentado resistência a diversos
721 antimicrobianos de forma crescente ao longo dos anos, o que demonstra a
722 emergência desse sorovar com perfil de multirresistência (CIDRP, 2017).

723 A medicina veterinária e a medicina humana devem ser complementares
724 no controle da resistência antimicrobiana, já que muitos antimicrobianos
725 utilizados no tratamento de infecções humanas são também utilizados na
726 produção animal (NARMS, 2013; WHO, 2018).

727 O monitoramento da resistência em cepas isoladas de animais,
728 alimentos, ambiente e humanos é essencial para complementar o
729 conhecimento dos detalhes da epidemiologia complexa de *Salmonella* spp.
730 Esses dados são extremamente importantes para entender as possíveis
731 origens da resistência, os sorovares mais envolvidos, a importância para a

732 saúde pública e os métodos de prevenção e controle (BRASIL, 2012, CDC,
733 2018; WHO, 2018).

734 Uma das primeiras preocupações quando se quer avaliar a resistência
735 antimicrobiana é a identificação correta do agente infeccioso para nortear a
736 escolha dos antimicrobianos para os testes (CLSI, 2019; EUCAST, 2019). Os
737 resultados obtidos de forma consistente são essenciais para estabelecer a
738 droga mais indicada e as doses adequadas ao tratamento e podem também,
739 considerando as preocupações mundiais sobre a resistência aos
740 antimicrobianos, ser essencial para estabelecer medidas que evitem a pressão
741 de seleção de cepas resistentes (JAJERE, 2019).

742 Dentre os métodos mais utilizados para testar a susceptibilidade
743 antimicrobiana, tem-se o teste de disco difusão, que permite a classificação dos
744 isolados como sensíveis, intermediários ou resistentes de maneira qualitativa e
745 o teste da concentração inibitória mínima (CIM), que é quantitativo e capaz de
746 indicar a dose adequada para o tratamento (CLSI, 2019; EUCAST, 2019).

747 É cada vez mais comum, a preferência pelos métodos quantitativos de
748 concentração inibitória mínima para melhorar a precisão dos resultados da
749 resistência antimicrobiana, já que possibilitam a quantificação da dose
750 adequada em tratamentos e contribui na prevenção de uso de subdoses, um
751 dos principais contribuintes para aquisição de resistência pelas bactérias
752 (EUCAST, 2019).

753

754 **3.7 Fatores de virulência em *Salmonella* spp.**

755 Para *Salmonella* spp. ter sucesso na infecção do hospedeiro, é
756 necessário que tenha habilidade para resistir as várias condições adversas
757 como o pH estomacal, a variação de temperatura, a competição com a
758 microbiota natural do hospedeiro, as respostas imunes, dentre outras. Para
759 isso a bactéria necessita ter em seu aparato gênico condições de resistir e ser
760 capaz de modular a transcrição de genes associados necessário (OLIVEIRA et
761 al., 2013).

762 Durante o processo infeccioso é necessário que o agente seja capaz de
763 aderir, invadir, se multiplicar e resistir às respostas imunes do hospedeiro e
764 para cada etapa há o envolvimento de uma variedade de genes, cada qual com

765 funções específicas, que em conjunto, conferem o potencial virulento ou poder
766 de patogenicidade de cada cepa (OCHOA; RODRÍGUES, 2005).

767 Durante o processo de adesão, as adesinas presentes no micro-
768 organismo migram em direção a receptores específicos das células do
769 hospedeiro. No entanto, a presença dessas adesinas é capaz de sinalizar ao
770 hospedeiro a presença de um corpo estranho, levando a ativação dos linfócitos
771 B e neutrófilos, iniciando o processo de resposta imunológica (OLIVEIRA et al.,
772 2013).

773 O processo de ativação de sinalização celular do hospedeiro pode levar
774 a modificações na superfície celular do hospedeiro e na modificação de seus
775 receptores. Porém, o agente infeccioso é capaz de alterar o tipo de adesina
776 apresentada para garantir a colonização e a persistência bacteriana (OCHOA;
777 RODRÍGUEZ, 2005).

778 As adesinas em Gram-negativas geralmente estão presentes nas
779 fímbrias, flagelos, cápsula, pili e lipopolissacarídeo. O gênero *Salmonella* spp.
780 possui grande variedade delas, e isso auxilia seu sucesso na adesão às
781 superfícies bióticas e abióticas, sua adaptação ao ambiente e confere potencial
782 de formação de biofilmes (OLIVEIRA et al., 2013).

783 A internalização bacteriana é mediada pelo grupo de genes *inv* que são
784 altamente conservados no gênero *Salmonella* spp., que pelo mecanismo de
785 disparo (*trigger*) induzem a alteração do citoesqueleto das células epiteliais,
786 gerando uma morfologia em forma de vesícula onde o agente fica internalizado,
787 além de estimular um rearranjo nas proximidades onde ocorre a invasão
788 (OLIVEIRA et al., 2013). Em seguida, inicia-se o processo de inflamação,
789 inibição de Na⁺ e secreção de Cl⁻ e água, resultando em diarreia no hospedeiro,
790 que provavelmente também é estimulada com a produção de endotoxinas
791 (DARWIN; MILLER, 1999; OLIVEIRA et al., 2013).

792 Os genes associados aos fatores de virulência em *Salmonella* spp.
793 atuam em diferentes fases do processo infeccioso e podem estar presentes em
794 elementos móveis como plasmídeos e transposons, ou mesmo em regiões
795 cromossomais conhecidas como ilhas de patogenicidade (IP) (VAN ASTEN;
796 VAN DIJK, 2005).

797 Alguns genes específicos são considerados importantes e relacionados
798 à patogenicidade e virulência de *Salmonella* spp., entre eles, *invA*, *ompC*, *agfA*,

799 *lpfA*, *avrA*, *sefA*, *luxS* e o *sodC*. Os genes *invA* e *ompC* são bastante
800 utilizados para a identificação de *Salmonella* spp., por serem considerados
801 altamente conservados neste gênero. Webber et al. (2019) encontraram 100%
802 de positividade para o gene *invA* em 126 cepas de *S. Heidelberg* isoladas de
803 carcaças de frango no Brasil, e Aravena et al. (2019) confirmaram a
804 prevalência deste gene em isolados de amostras clínicas e ambientais no
805 Chile. Este gene está associado ao reconhecimento do hospedeiro e a
806 capacidade de invasão das células epiteliais (BORGES et al., 2013). Já o gene
807 *ompC* codifica a biossíntese da proteína C da membrana externa do gênero
808 *Salmonella* spp. e esteve presente em todos os isolados de diversos sorotipos
809 em estudo realizado por Jawad, Al-Charrakh e Tarish (2016).

810 Os genes *agfA* e *lpfA* são prevalentes em *Salmonella* spp., e foram
811 identificados em 100% das cepas estudadas por Weber et al. (2019) e Borges
812 et al. (2013). Estes genes estão relacionados a capacidade de formação de
813 biofilmes e à adaptação ambiental, e também, estão associados a invasão
814 celular, uma vez que codificam a produção de fímbrias que participam na
815 síntese da matriz de biofilmes (DARWIN; MILLER, 1999). Essas mesmas
816 fímbrias também participam no processo de colonização das células epiteliais
817 intestinais do hospedeiro (YOO et al., 2013).

818 Também é bastante frequente o gene *avrA*, por estar localizado em uma
819 região conservada no genoma de *Salmonella* spp. (BORGES et al., 2013;
820 ARAVENA et al., 2019; WEBBER et al., 2019). Este gene codifica a proteína
821 efetora AvrA, que é muito importante no processo de colonização e
822 multiplicação bacteriana (LABRIOLA; ZHOU; NAGAR, 2018), e ainda, limita as
823 respostas imunológicas no hospedeiro induzindo a apoptose de macrófagos
824 (BEN-BARAK et al., 2006).

825 O gene *sefA* é restrito ao grupo D de *Salmonella* spp., que inclui apenas
826 os sorotipos Enteritidis, Blegdon, Dublin e Moscow. É o gene codificador da
827 fímbria SEF14, que está albergado no operon *sefABCDE* e é associado à fase
828 de colonização das células intestinais (OCHOA; RODRIGUEZ, 2005). Apesar
829 da restrição deste gene ao grupo D, é importante monitorar sua presença nos
830 demais sorotipos de *Salmonella* spp., uma vez que alterações no genoma
831 bacteriano tendem a ocorrer ao longo do tempo.

832 O gene *sodC* é responsável por codificar a enzima SOD (superóxido
833 dismutase) que é capaz de catalisar e converter os radicais superóxidos em
834 oxigênio e peróxido de oxigênio fora da célula bacteriana, e auxilia na virulência
835 e sobrevivência da bactéria no ambiente. Já o gene *luxS* está associado ao
836 mecanismo de *quorum sensing* e atua controlando e regulando a comunicação
837 célula-célula para a formação de biofilmes. A pesquisa dos genes *luxS* e *sodC*
838 em seis sorotipos diferentes de *Salmonella* spp., dentre eles, *S. Gallinarum*, *S.*
839 *Typhimurium*, *S. Typhimurium* variante monofásica, *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis*
840 e *S. Minnesota* isoladas de carcaças de frango, mostrou que em todos os
841 isolados foi identificada a presença do gene *sodC*, e o gene *luxS* apenas não
842 foi identificado em *S. Gallinarum* (SILVA et al., 2019). Estes resultados
843 demonstraram que esses genes possuem alta prevalência no gênero
844 *Salmonella* spp.

845 As frequências dos genes de virulência podem alterar com o passar do
846 tempo, especialmente se forem considerados os genes presentes em
847 plasmídeos ou outros elementos gênicos móveis, pois são facilmente
848 adquiridos, mas também perdidos pelas bactérias. Em *S. Heidelberg* estudos
849 tem demonstrado essa variação gênica de acordo com o tempo. Webber e
850 colaboradores (2019) demonstraram que cepas isoladas entre 2016 e 2017 no
851 Brasil, apresentaram uma variabilidade genética maior quando comparadas a
852 de cepas isoladas em 2006. Portanto, monitorar os genes de virulência em
853 *Salmonella* spp. é importante e os resultados podem colaborar no
854 entendimento epidemiológico da salmonelose e no auxílio de métodos de
855 controle e prevenção da doença.

856

857 **3.8 Capacidade de formação de biofilmes em *Salmonella* spp.**

858 A formação dos biofilmes ocorre a partir do processo de adesão de
859 células bacterianas em uma superfície biótica ou abiótica. Esses micro-
860 organismos se arranjam de forma comunitária e ficam envolvidos por uma matriz
861 extracelular polimérica, composta por polissacarídeos, proteínas e material
862 genético (AZEVEDO; CERCA, 2012). A matriz litem a função de proteger o
863 biofilme contra fatores externos como inibidores, biocidas, desidratação, além

864 de manter uma concentração alta de nutrientes disponíveis para o
865 funcionamento das células bacterianas (MELO et al., 2017).

866 As bactérias podem ser encontradas no ambiente em sua forma livre,
867 também chamada de forma planctônica, ou em biofilmes, onde assumem a
868 forma sésil e permanecem aderidas em uma superfície. A capacidade de uma
869 bactéria formar biofilme não é considerada um fator de virulência, já que micro-
870 organismos não patogênicos também possuem essa capacidade, no entanto,
871 no caso de micro-organismos patogênicos, os biofilmes representam fontes
872 constantes de contaminação. Considerando esse fato, os biofilmes
873 representam perigos dentro dos sistemas de produção de alimentos, gerando
874 impactos econômicos e na saúde pública (ROSSI et al., 2016).

875 Os biofilmes são formados em 5 etapas, a saber: fase livre, fixação da
876 superfície, microcolônia, macrocolônia e dispersão (ROSSI et al., 2016). No
877 primeiro estágio há uma fixação reversível e facilitada pela motilidade flagelar,
878 gerando conexão de baixa intensidade e permite que a bactéria seja facilmente
879 removida por processos de limpeza. No segundo estágio ocorre a fixação
880 irreversível pelo aumento da resistência da união em função da produção de
881 exopolímeros e adesinas, e, para remoção, nesta fase é necessária a ação de
882 força mecânica. No terceiro estágio há formação de microcolônias, que para
883 *Salmonella* spp., ocorre após 2 horas, onde as células tornam-se sésseis, e o
884 mecanismo de detecção de quorum sensing é ativado. Após este estágio,
885 ocorre a maturação acompanhada pela formação de macrocolônias, resultante
886 do crescimento microbiano e recrutamento de outros microrganismos
887 ambientais. A última fase é a dispersão de formas planctônicas para formação
888 de novos biofilmes, processo passivo e independentemente da concentração
889 de oxigênio (CAPPITELLI; POLO; VILLA, 2014).

890 A formação de biofilmes em qualquer etapa do processo de produção de
891 animais favorece a manutenção dos micro-organismos no ambiente e
892 disseminação por toda a cadeia produtiva. Dorr e colaboradores (2009)
893 demonstraram que cepas de *Salmonella* spp. isoladas de caminhões de
894 transporte de animais continuaram a ser isoladas nos caminhões e nos animais
895 mesmo após o processo de desinfecção, sugerindo a presença de biofilmes
896 como fontes constantes de contaminação.

897 A associação bacteriana em biofilmes pode contribuir para surtos de
898 toxinfecção alimentar (STEENACKERS et al., 2012). Muitos surtos são
899 associados a presença dessas comunidades nas indústrias, pois ocorrem mais
900 de forma esporádica do que de forma contínua, indicando que podem estar
901 associados a falhas no processo de higienização nas indústrias de alimentos,
902 que acabam favorecendo o desprendimento de patógenos das camadas
903 externas dos biofilmes (KASNOWSKI et al., 2010).

904 A forma de vida séssil nos biofilmes garante uma maior proteção à
905 *Salmonella* spp. conta fatores externos, como a escassez de nutrientes,
906 variações de pH e temperatura, ação de antimicrobianos e agentes biocidas
907 (STEENACKERS et al., 2012).

908 A adesão inicial para a formação de biofilmes de *Salmonella* spp. pode
909 ocorrer em superfícies de diversos tipos de materiais dentro da indústria, como
910 plásticos, vidro, aço inoxidável e outros. A formação de biofilmes pode ser
911 beneficiada pela presença de matéria orgânica remanescente, longos períodos
912 entre as higienizações, limpeza inadequada, além de irregularidades nas
913 superfícies como ranhuras e corrosões (ZIECH et al., 2016).

914 A formação de biofilmes por *Salmonella* spp. é favorecida por alguns
915 fatores, como possuir fímbrias agregativas, conhecidas como fímbria Curli, e
916 produzir lipopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares e celulose
917 (CORCORAN, 2014). Essas funções são atribuídas a alguns genes, e em caso
918 de deleção de algum deles, a cepa pode perder a capacidade de formar
919 biofilmes maduros (GERSTEL; RÖMLING, 2003).

920 O gene *csgD* é responsável pela codificação das fímbrias Curli, que por
921 sua vez, é ligada à síntese de celulose, que é regulada pelo gene *adrA*. A
922 expressão desses dois genes conjuntamente é capaz de formar a estrutura dos
923 biofilmes por meio da produção da matriz extracelular (SOLANO et al., 2002;
924 GERSTEL; RÖMLING, 2003). Entretanto, somente a presença destes genes no
925 aparato genético de *Salmonella* spp. não é suficiente para garantir a produção
926 de biofilmes por si só, também é necessário que haja condições de estresse
927 ambiental que estimulem a transcrição destes genes (MONDS; O'TOOLE,
928 2009).

929 A capacidade de produção de matriz extracelular está relacionada ao
930 índice de formação de biofilmes e a ausência dessa estrutura pode

931 comprometer a maturidade do mesmo ou mesmo perder a capacidade de
932 formá-lo (CORCORAN, 2014). Já o polissacarídeo capsular é importante para
933 auxiliar na persistência de *Salmonella* spp. no ambiente, pois desempenha
934 papel fundamental na proteção das células contra a dessecação (GIBSON et
935 al., 2006).

936 O mecanismo de *quorum sensing* é um fator importante na formação dos
937 biofilmes e está relacionado a comunicação e sinalização entre as células.
938 Portanto, interfere na fisiologia do sistema de biofilmes, na regulação gênica,
939 na motilidade das células e na colonização do hospedeiro (PLUMMER, 2012).
940 Este mecanismo é mediado por auto-indutores, dentre eles o auto-indutor 2,
941 sintetizado pelo gene *luxS*, que coordena a modulação do aparato gênico da
942 população bacteriana, seja ela inter ou intraespecífica (STEENACKERS et al.,
943 2012).

944

945 **3.9 Inibição da capacidade de formação de biofilmes de *Salmonella* spp.**

946 A presença de biofilmes nos ambientes de produção de alimentos gera
947 impactos econômicos para a comercialização e para a saúde pública, e assim,
948 é importante que sua prevenção e monitoramento sejam mandatórios nos
949 controles de qualidade das indústrias. Para alcançar esses objetivos, os
950 processos de higienização são primordiais, devendo-se respeitar as
951 concentrações dos sanitizantes e os intervalos entre as higienizações (ROSSI
952 et al., 2016).

953 Geralmente quando estão na forma de vida planctônica, as bactérias são
954 susceptíveis a ação dos biocidas, no entanto, quando em biofilmes, a
955 penetração desses agentes pode ocorrer de maneira dificultada em alguns
956 casos. A principal barreira para ação dos sanitizantes é a matriz extracelular,
957 pois elas podem conferir resistência e impedir a difusão dos biocidas levando à
958 inativação dos agentes. O tamanho da biomassa também influencia na
959 atividade dos agentes antimicrobianos, sendo que quanto maior e mais densa é
960 essa biomassa, menor será a ação, em virtude da presença de matéria
961 orgânica (VAN HOUTT; MICHELS, 2010).

962 Portanto, a melhor forma de evitar a associação bacteriana em biofilmes
963 é pela prevenção, ou seja, impedindo a adesão das bactérias nas superfícies

964 das instalações da indústria de alimentos. A sanitização deve ser suficiente
965 para reduzir significativamente o número de células livres, que
966 conseqüentemente, irá diminuir as chances de adesão, que é a primeira etapa
967 de formação dos biofilmes (MILLEZI et al., 2012).

968 Para prevenir a formação de biofilmes nas indústrias de alimentos é
969 preciso adotar práticas adequadas e segui-las com rigor. Deve-se garantir que
970 a higienização considerando intervalos de tempo que impeçam a formação da
971 estrutura na sua forma irreversível, utilizar sanitizantes com capacidade de
972 eliminação de possíveis células aderidas e ter atenção redobrada aos pontos
973 críticos de controle, considerando o tipo de material e as irregularidades das
974 superfícies e os locais onde é mais propícia a adesão de bactérias e agregação
975 de nutrientes. Além disso, as concentrações dos sanitizantes devem ser
976 adequadas, evitando o uso de doses subletais para evitar a adaptação e
977 conseqüente resistência dos micro-organismos (PEREIRA, 2014; DONAGHY et
978 al., 2019).

979 Os agentes químicos mais utilizados na sanitização na indústria podem
980 ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação, sendo eles: i) os
981 oxidantes, como os compostos clorados, ácido peracético e peróxido de
982 hidrogênio; ii) sanitizantes que agem nas superfícies, como os aniônicos e
983 amônias quaternárias; iii) iodóforos, com capacidade de penetração na parede
984 celular e destruição de proteínas e ácidos nucléicos (VAN HOUDET; MICHIELS,
985 2010).

986 Na indústria de alimentos brasileira, dentre os agentes sanitizantes mais
987 utilizados, destacam-se o hipoclorito de sódio, o ácido peracético e a
988 clorexidina. O hipoclorito de sódio é um forte oxidante, de baixo custo
989 financeiro, capaz de causar alta mortalidade bacteriana, por causar danos na
990 membrana e alterar sua permeabilidade, levando a lise celular (VIRTO et al.,
991 2005). No entanto, sua ação é limitada na presença de matéria orgânica e pode
992 provocar corrosão em superfícies de metal que podem gerar problemas para
993 saúde humana, e por isso, sua concentração máxima permitida na indústria de
994 alimentos é de 200 ppm (PFUNTNER, 2011).

995 O ácido peracético é um agente antimicrobiano, bactericida e
996 considerado altamente eficaz como sanitizante de indústrias beneficiadoras de
997 alimentos de origem animal. É ativo em amplitude de temperatura de 4 a 25°C

998 e age rompendo as ligações químicas no interior da membrana celular
999 (CREMIEUX; DAVIN-REGLI, 2000). Sua ação também é limitada pela matéria
1000 orgânica, e em altas concentrações pode representar risco de segurança para
1001 os trabalhadores, porém, é menos corrosivo que o hipoclorito, porque não
1002 apresenta efeito residual (SINDE; CARBALLO, 2000; BRASÃO, 2017).

1003 A clorexidina é um agente sanitizante que age pela ruptura da
1004 membrana e inibe a ação da ATPase ligada a membrana das células
1005 bacterianas, cuja ação depende do pH do meio, e é reduzida pela presença de
1006 matéria orgânica (MCDONNELL, 1999).

1007

1008 **3.10 Análise genotípica de *Salmonella* spp.**

1009 Diferentes metodologias podem ser utilizadas para a análise genotípica
1010 de *Salmonella* spp., sendo os resultados obtidos amplamente aplicados como
1011 ferramentas para a compreensão da epidemiologia da salmonelose.
1012 Dependendo da técnica utilizada, pode-se avaliar a disseminação das cepas,
1013 conhecer os fatores determinantes para a emergência de genótipos, determinar
1014 mutações e recombinações, identificar fontes de contaminação, conhecer o
1015 aparato gênico virulento, a resistência aos antimicrobianos e capacidade de
1016 formar biofilmes, entre outras (GOGOI et al., 2018).

1017 As técnicas moleculares foram desenvolvidas com o intuito de superar
1018 as limitações dos testes fenotípicos, já que fornecem resultados mais
1019 fidedignos, e por isso, são amplamente utilizadas na caracterização de
1020 isolados. Dentre estas técnicas, o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), é
1021 considerado padrão-ouro na avaliação de enterobactérias (FITZGERALD et al.,
1022 2001) por trabalhar com todo o genoma bacteriano (WASSENAAR; NEWELL,
1023 2000; CDC, 2013b).

1024 Na técnica do PFGE, o DNA total do micro-organismo passa por uma
1025 digestão enzimática, onde ocorre a clivagem em sítios raros específicos
1026 reconhecidos pelas enzimas de restrição, sendo as variações nos locais de
1027 restrição responsáveis por gerar os diferentes perfis genéticos (GOERING,
1028 2010).

1029 No PFGE, a clivagem do DNA resulta em fragmentos grandes e lineares
1030 que posteriormente são visualizados em gel de agarose por meio da

1031 eletroforese. No equipamento, a orientação do impulso elétrico é alternada, em
1032 forma de “zigue-zague” permitindo a separação de grandes fragmentos do
1033 genoma completo na malha de agarose (CHAMPION et al., 2005).

1034 A comparação entre os padrões de bandas visualizadas ao final do
1035 PFGE, permite avaliar a variabilidade genética dentro de um grupo de isolados
1036 de uma mesma espécie, incluindo a maioria dos sorovares de *Salmonella*
1037 *enterica*. Existem *softwares* capazes de fazer esta análise computadorizada e
1038 criar dendrogramas que discriminam com base estatística, a similaridade
1039 genética entre as cepas (GOERING, 2010).

1040 Surtos de infecções bacterianas transmitidas por alimentos, dentre elas
1041 *Salmonella* spp., que ocorrem em vários estados dos EUA são identificados por
1042 meio do PulseNet, uma rede nacional de vigilância molecular onde são
1043 depositados os resultados de PFGE, que é coordenada pelos Centros de
1044 Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA. Nesse sistema são
1045 depositados resultados de isolados de pessoas infectadas, e também de
1046 alimentos, permitindo agrupar os isolados em “*clusters*” pela similaridade
1047 genética, e assim obter importantes informações epidemiológicas, como as
1048 rotas de infecção, origens de surtos e distribuição e circulação das cepas
1049 (GIERALTOWSKI et al., 2016).

1050 Anualmente, o CDC americano monitora e identifica cerca de 200 grupos
1051 de doenças causadas por *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, além de
1052 coordenar juntamente com outros órgãos governamentais as investigações
1053 epidemiológicas para identificar as fontes comuns de infecção, objetivando
1054 impedir possíveis surtos (GIERALTOWSKI et al., 2016).

1055 Outra importante ferramenta molecular tem sido empregada nos estudos
1056 mais recentes, o sequenciamento parcial ou completo dos genomas dos micro-
1057 organismos. O sequenciamento é capaz de fornecer informações importantes
1058 sobre espécies, sorovar, subtipos, além de identificar genes de virulência,
1059 patogenicidade, resistência e adaptação ambiental, incluindo aqueles
1060 relacionados a capacidade de formação de biofilmes (IBRAHIM; MORIN, 2018).

1061 Os dados de sequenciamento completo de genomas podem auxiliar os
1062 laboratórios de saúde pública e hospitais identificando as cepas com mais
1063 acurácia e relacionando-as a possíveis surtos. Isso é especialmente importante
1064 em ambientes restritos, pois possibilita a identificação da fonte de infecção, e

1065 ainda, caracteriza o agente etiológico, determinando a presença de todos os
1066 genes conhecidos relacionados a virulência e resistência aos antimicrobianos,
1067 auxiliando assim na escolha do tratamento. Permite também que seja estudada
1068 a expressão gênica a partir do sequenciamento do RNA e que se examine as
1069 interações patógeno-hospedeiro (OAKESON et al., 2017).

1070 O sequenciamento também pode ser utilizado na identificação da rota de
1071 transmissão de um patógeno em uma população, assim como fornecer
1072 informações que possibilitem a identificação da origem da infecção (IBRAHIM;
1073 MORIN, 2018). Também é adequado para o estudo da evolução dos micro-
1074 organismos, a identificação de mutações e recombinações gênicas, a filogenia
1075 entre um grupo de cepas, além de sanar dúvidas quando há divergência em
1076 testes genotípicos e fenotípicos, como os de resistência por exemplo, já que
1077 essa técnica é capaz de identificar todos os possíveis genes conhecidos
1078 envolvidos na resistência aos antimicrobianos (GILCHRIST et al., 2015;
1079 AHRENFELDT et al., 2017).

1080 Há estudos que mostram que a tipagem baseada no sequenciamento
1081 genômico total possui um poder discriminatório superior aos outros métodos de
1082 tipagem molecular para *Salmonella* (KOSER et al., 2012; DENG et al., 2015).

1083 Em estudo realizado por Ibrahim e Morin (2018), foi realizada uma
1084 análise retrospectiva, com 1041 cepas de *Salmonella* spp., coletadas entre
1085 1999 e 2017, isoladas de alimentos, rações e amostras ambientais. Todos os
1086 isolados foram sorotipados pela metodologia tradicional baseada no esquema
1087 de Kauffmann White e pelo método de sequenciamento completo do genoma,
1088 usando a ferramenta SeqSero *in silico* para comparação das técnicas. Apesar
1089 de uma coincidência superior a 85% (899/1041) entre os dois métodos, o
1090 sequenciamento identificou divergência em 7,7% (80/1041) das identificações
1091 do sorotipo, e ainda, identificou 62 isolados (5,9%) que não são previstos no
1092 esquema de Kauffmann White (IBRAHIM; MORIN, 2018). Este estudo
1093 exemplifica bem as vantagens do sequenciamento completo do genoma e
1094 demonstra a tendência das pesquisas mais modernas em incluir este tipo de
1095 técnica molecular para obtenção de resultados mais fidedignos.

1096

1097

1098

1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1120
1121
1122
1123

CAPÍTULO 2

Caracterização de *Salmonella* Heidelberg de origem avícola

Artigo a ser publicado no periódico

Current Microbiology

34

35

Caracterização de *Salmonella* Heidelberg de origem avícola

36

37 1. INTRODUÇÃO

38

39

40

41

Salmonella spp. representa o gênero de bacilos gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. É reconhecido como um dos principais agentes patogênicos transmitidos por alimentos em todo o mundo naturalmente encontrados nos intestinos de muitos animais [1], principalmente galinhas e perus.

42

43

44

45

Todos os anos, milhares de casos de doenças e mortes relacionadas à salmonelose são relatados em todo o mundo. Os principais fatores que favorecem a disseminação desse agente estão relacionados às condições sanitárias e higiene inadequadas na produção avícola [2].

46

47

48

49

50

51

52

53

O Brasil é o segundo maior produtor de frango (13.056.000 toneladas em 2017) do mundo e o principal país exportador (4.320.000 toneladas) de produtos à base de frango [3] e apresenta medidas de controle rigorosas para *Salmonella* spp. [4, 5]. Apesar disso, há que se destacar o ascendente número de isolamentos de *S. Heidelberg* em produtos avícolas, consequência do aumento da variabilidade genética deste sorotipo [6] e de sua capacidade de tolerância às condições de estresse [7] e com isso, há necessidade de estudos mais aprofundados para o entendimento epidemiológico deste sorovar e os perigos que pode representar para a saúde humana.

54

55

56

57

58

Salmonella Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis são os sorovares mais incidentes em casos de salmonelose humana [8, 9]; no entanto, estudos relataram *S. Heidelberg* como o mais comum sorotipo isolado na cadeia produtiva avícola nos EUA e Canadá, sendo a quarta principal causa de salmonelose humana de acordo com as estimativas [10, 11].

59 *S. Heidelberg* demonstrou ser muito invasiva, causando quadros graves de
60 salmonelose que evoluíram para septicemia e endocardite, em surtos identificados nos
61 EUA. Esse padrão de virulência já foi associado também a presença de genes de
62 virulência como *invA*, *agfA* e *lpfA*, ligados ao processo inicial de adesão bacteriana e
63 invasão à célula hospedeira [10, 12].

64 Além da virulência, destaca-se também a característica de resistência
65 antimicrobiana para fármacos de escolha no tratamento de salmonelose nesse sorovar.
66 Diversos estudos realizados com cepas de *S. Heidelberg* isoladas de aves, suínos e ovos
67 demonstraram padrões de multirresistência a classes de antibióticos betalactâmicos
68 como cefalosporinas de terceira geração [13, 14].

69 Considerando a importância e a emergência de *Salmonella Heidelberg*, este
70 trabalho teve como objetivo determinar a presença de genes de virulência e a resistência
71 antimicrobiana em cepas de *S. Heidelberg* isoladas da produção avícola de empresas da
72 região Sul do país, com comércio nacional e internacional, discutindo o perigo que
73 representam à saúde pública.

74

75 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

76 **2.1. Cepas**

77 O estudo foi realizado com 20 estirpes de *S. Heidelberg* previamente
78 identificadas e provenientes de frangos de corte, com idades de 11 a 46 dias, de plantas
79 de abate de frangos de corte com ciclo completo de produção e sistema de integração da
80 região Sul do país, inspecionadas pelo SIF, habilitadas para o comércio interno e
81 exportação.

82 Os isolamentos foram realizados em oito empresas (A, B, C, D, E, F, G e H) que
83 recebiam lotes de frangos de cinco produtores distintos (1, 2, 3, 4 e 5). As cepas foram

84 isoladas entre os anos de 2017 e 2018 e as análises foram realizadas entre 2017 e 2019.
85 As amostras positivas para *S. Heidelberg* eram provenientes de 17 suabes de arrasto de
86 cama de aves, uma amostra de fezes de aves, uma de ceco e uma de peito (Tabela 1).

87 A identificação bioquímica do gênero *Salmonella* spp. foi realizada conforme
88 Instrução Normativa 62 [15]. Os isolados foram confirmados por meio de testes
89 sorológicos no Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias da
90 Fundação Instituto Oswaldo Cruz no Estado do Rio de Janeiro para determinar o
91 sorovar (IOC/FIOCRUZ, RJ, Brasil).

92

93 2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

94 O teste foi feito de acordo com o método de microdiluição em caldo [16]. Os
95 antimicrobianos testados foram: amoxicilina com clavulanato, colistina, ceftriaxona e
96 ciprofloxacina. O critério de escolha dos antimicrobianos baseou-se na utilização dessas
97 drogas na medicina veterinária e humana e ocorrência de resistência em ambas. As
98 concentrações testadas foram: 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64mg.L⁻¹, considerando os pontos
99 de corte determinados para cada droga.

100 Em placas de microdiluição de 96 poços foram adicionados 180 µL de caldo
101 Mueller Hinton (MH) contendo as oito concentrações dos antimicrobianos
102 estabelecidas. A suspensão bacteriana foi preparada em NaCl 0,9% estéril
103 correspondente a escala 0,5 de McFarland, equivalente a um inóculo médio de 5,0 x 10⁸
104 UFC/mL. O volume de 20 µL da suspensão bacteriana foi transferida para os poços
105 contendo caldo MH com os antimicrobianos [16].

106 As microplacas foram incubadas 36 ± 1°C durante 18-20 horas e, após, realizada
107 a leitura visual. Foi definida como a CIM a menor concentração do antibiótico na qual
108 não foi observado crescimento visível da bactéria, pela ausência de turvação do meio.

109 Foram utilizados os seguintes pontos de corte para determinação da resistência
110 das cepas: amoxicilina com clavulanato > 8/2, colistina > 2, ciprofloxacina > 0.6 e
111 ceftriaxona > 2 mg.L⁻¹ de acordo com as diretrizes e recomendações do CLSI para
112 enterobactérias [16].

113 Foram utilizados controle negativo, composto do meio sem adição de bactérias,
114 e positivo, composto pela cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028.

115

116 2.3. Pesquisa de genes de virulência e resistência antimicrobiana

117 O DNA genômico foi extraído por meio do Wizard Genomic DNA Purification
118 Kit (Promega), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. As reações de PCR
119 foram realizadas utilizando 10 ng do DNA purificado da amostra.

120 As reações de PCR foram realizadas para os genes *ompC*, *avrA*, *sodC*, *invA*,
121 *sefA*, *agfA*, *lpfA* e *luxS* com a utilização do kit GoTaq® Green Master Mix (Promega),
122 de acordo com as instruções do fabricante. Para as cepas classificadas como resistentes
123 às respectivas classes de antimicrobianos, foi feito teste para os genes *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* (β -
124 lactâmicos); *qnrA* e *qnrS* (fluoroquinolonas) (Tabela 2).

125 Os microtubos contendo os reagentes da PCR foram transferidos para o
126 termociclador (*Eppendorf*®), com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5
127 minutos e 35 ciclos de amplificação: desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento
128 a 58°C por 30 segundos (*invA* e *ompC*); 50°C por 30 segundos (*sefA* e *lpfA*), 66°C por
129 30 segundos (*agfA*), 62°C (*avrA*, *sodC* e *luxS*); extensão à 72°C por 90 segundos, com
130 extensão final a 72°C por 10 minutos. Como controle positivo das reações foi utilizada
131 a cepa de *S. Enteritidis* ATCC 13076.

132 As condições de amplificação para os genes de resistência antimicrobiana aos
133 betalactâmicos diferiram quanto ao número de ciclos (30) e condições de anelamento

134 (50°C por 45 segundos (*bla_{TEM}*) e 56°C por 45 segundos (*bla_{SHV}*). Para os genes *qnrA* e
135 *qnrS*, a desnaturação inicial foi de 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de
136 desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto, extensão a 72°C
137 por 90 segundos, e por fim, extensão final a 72°C por 10 minutos. O controle positivo
138 foi uma cepa de campo de *Klebsiella pneumoniae*, previamente testada, fornecida pelo
139 Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia.

140 Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a
141 1,5%, utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (Invitrogen) e como padrão de peso
142 molecular, o marcador de 100pb (Invitrogen).

143

144 **2.4. Análise dos resultados**

145 Os resultados foram analisados por meio de estatística descritiva, com cálculo
146 das porcentagens. O teste de Fisher foi aplicado para avaliar diferenças significativas
147 entre os antibióticos testados, por meio do programa GraphPad Prism, versão 7.0
148 (GraphPad Software, Estados Unidos).

149

150 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

151

152 ***Resistência antimicrobiana***

153 O monitoramento do perfil de resistência antimicrobiana em bactérias
154 patogênicas é sempre importante para o acompanhamento evolutivo das estirpes. Em
155 especial, para *S. enterica* esses padrões variam de acordo com o sorovar, a localização,
156 ano de coleta e a origem [26]. A atual emergência de *S. Heidelberg* e sua disseminação
157 no Brasil tem demonstrado dados críticos ligados à sua resistência, e portanto, à
158 necessidade de implementação de medidas de controle [27].

159 Nossos resultados mostraram que das 20 cepas de *S. Heidelberg* estudadas, todas
160 (100,0%) apresentaram resistência à colistina, 18 (90,0%) à ceftriaxona, 12 (60,0%) à
161 amoxicilina associada ao clavulanato e duas (10,0%) à ciprofloxacina (Tabela 3). Esses
162 dados deixam evidentes que *S. Heidelberg* é um desafio em relação à resistência
163 antimicrobiana quando testado contra antibióticos rotineiramente utilizados no
164 tratamento de salmoneloses em medicina veterinária e humana.

165 Estudos realizados em países como EUA e Argentina, encontraram percentuais
166 inferiores, com 66%, e 37,5% dos isolados de *S. Heidelberg* oriundos de amostras de
167 alimentos, humanas, animais resistentes a pelo menos um antimicrobiano,
168 respectivamente [26, 28].

169 O elevado perfil de resistência identificado para colistina é alarmante e, de
170 maneira paradoxal, esperado. A preocupação cabe às restrições de uso desse
171 medicamento na medicina humana em virtude de sua classificação pela OMS como
172 criticamente importante, sendo uma das últimas opções terapêuticas para determinadas
173 enfermidades decorrentes de bactérias multirresistentes, inclusive a salmonelose. A
174 totalidade de cepas resistentes à colistina em nosso estudo se deve provavelmente a
175 utilização desse antimicrobiano como aditivo zootécnico melhorador de desempenho na
176 composição das rações para aves, bovinos e suínos, o que contribuiu na pressão de
177 seleção de cepas resistentes ao longo do tempo, ocasionando riscos à saúde humana e
178 animal [29].

179 Diante desse cenário, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
180 (MAPA) publicou, em 30 de novembro de 2016, a Instrução Normativa 45 proibindo o
181 uso da colistina como aditivo zootécnico em todo o Brasil [30].

182 Não há estudos no Brasil que relatem a resistência antimicrobiana à colistina em
183 *S. Heidelberg*, apesar de pesquisado, mas para outros sorovares esse perfil já foi

184 identificado e associado à presença do gene *mcr*, de origem plasmidial que codifica uma
185 fosfoetanolamina transferase que inibe a ação da colistina [31, 32].

186 A identificação de cepas resistentes às cefalosporinas de terceira geração
187 (90,0%) é preocupante, uma vez que são fármacos de escolha no tratamento da
188 salmonelose em humanos, e classificados pela OMS como criticamente importantes, por
189 estar entre as poucas alternativas para o tratamento de infecções graves em humanos.
190 De maneira particular, a ceftriaxona é uma droga importante usada para tratar crianças
191 com salmonelose [29].

192 Apesar da gradativa substituição do uso de amoxicilina por cefalosporinas no
193 tratamento em humanos, a resistência para ambas é considerada grave uma vez são
194 medicamentos de primeira escolha para tratamento da doença [33]. A resistência aos
195 antibióticos beta-lactâmicos está linearmente correlacionada com a presença de genes
196 ligados à produção de betalactamases (*bla_{AmpC}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}*), o que agrava
197 a situação pela possível transferência de cepas resistentes carreadoras de genes
198 específicos para outras bactérias, disseminando a característica, o que poderia levar à
199 ineficácia da terapia pelo uso desta droga [34]. No Brasil, estudo realizado pelo Instituto
200 Adolf Lutz demonstrou a emergência relacionada a presença de genes de resistência aos
201 betalactâmicos em 100% (12/12) das cepas de *S. Heidelberg* isoladas de amostras de
202 frangos [35]. Em nosso estudo, observamos que somente uma cepa apresentou o gene
203 *bla_{TEM}* (1/12 – 8,3%), que justificou a resistência à amoxicilina, em amostra oriunda de
204 suabe de cama de frangos com 11 dias de idade da empresa C. Já foi relatado que
205 bactérias recombinantes apresentam maior facilidade de adquirir genes plasmidiais em
206 intestino jovem, principalmente quando submetido a doses subletais de antibióticos que
207 fornece a seleção necessária para que a densidade do doador aumente e favoreça a
208 transferência do plasmídeo para as cepas receptoras [36]. Para as demais cepas

209 resistentes (11/12 – 91,6%), provavelmente outros mecanismos estão envolvidos no
210 desenvolvimento desse perfil.

211 O baixo percentual de cepas resistentes identificadas para ciprofloxacina (2/20 –
212 10%) pode estar ligado ao fato de que desde 2009, no Brasil, o uso de fluorquinolonas
213 foi proibido como promotor de crescimento ou como medicação preventiva, sendo
214 permitido apenas para fins terapêuticos [37]. O maior risco da utilização de
215 fluorquinolonas é a seleção de cepas bacterianas resistentes no trato digestivo dos
216 frangos. Outro fator a ser considerado é que, na maior parte das vezes, estas bactérias
217 adquirem resistência à toda classe e não apenas aos fármacos que foram administrados
218 [38]. Genes de resistência às quinolonas (*qnrS*, *qnrA* e *qnrB*) já foram identificados em
219 *Salmonella* spp. no Brasil [39], porém nas cepas testadas em nosso estudo não
220 identificamos nenhuma cepa positiva (0/2 – 0%) para os genes *qnrS* e *qnrA*.

221 Embora a resistência antimicrobiana não seja generalizada, o percentual de
222 resistência a uma variedade de medicamentos é preocupante. Doze isolados (60,0%)
223 foram resistentes a múltiplos fármacos (\geq três classes de antimicrobianos) (Tabela 4).
224 Destes, duas cepas apresentaram resistência a todas as drogas testadas (2/12 – 16,7%),
225 sendo ambas do mesmo produtor (1). É possível que as condições de manejo em granjas
226 favoreçam o desenvolvimento de cepas multirresistentes, em virtude da utilização
227 indiscriminada de fármacos, da formação de biofilmes que facilita a recombinação
228 gênica e a troca de genes ligados à expressão de bombas de efluxo [5].

229 De maneira geral, a presença de genes de resistência adquiridos via
230 recombinação, bombas de efluxo de agentes biocidas e a exposição a doses subletais
231 como em procedimentos de metafilaxia são comumente relatados no aparecimento de
232 perfis de multirresistência para o sorovar *S. Heidelberg* [40, 41].

233 O perfil de multirresistência (MR) identificado nas cepas intensifica o alerta em
234 saúde pública. Aliado a isso, considera-se os relatos de surtos envolvendo o sorovar
235 Heidelberg nos EUA com cepas MR [10]. Entre janeiro de 2015 a novembro de 2017
236 foram identificadas 56 pessoas infectadas em 15 estados norte-americanos, cuja origem
237 tratava-se de cepas de *S. Heidelberg* provenientes de ambientes veterinários que
238 apresentaram característica de MR (betalactâmicos, flouroquinolonas, tetraciclinas,
239 aminoglicosídeos, sulfas e carbapenêmicos) [42].

240

241 *Genes específicos*

242 A análise dos oito genes demonstrou que todas as cepas (100%) apresentaram os
243 genes *ompC*, *invA*, *sodC*, *avrA*, *lpfA* e *agfA*. Para o *luxS* a positividade foi de 70%
244 (14/20) e nenhuma cepa apresentou o gene *sefA*.

245 Estudos realizados nos EUA com cepas de *S. Heidelberg* de diferentes origens
246 isoladas entre 1985 e 2011 mostrou que fatores de virulência são altamente conservados
247 para esse sorovar, coincidindo com o nosso estudo [43].

248 A presença do gene *ompC* e *invA* em todas as cepas era esperada, uma vez que
249 ambos são utilizados na identificação do gênero *Salmonella* spp., sendo o primeiro
250 considerado mais fidedigno para caracterização do gênero e o segundo mais relacionado
251 à expressão da capacidade de invasão dos tecidos do hospedeiro pelo micro-organismo.
252 Rowlands et al. (2014) [44], que estudaram fatores de virulência em *Salmonella* spp.
253 isoladas de alimentos associados ou não a surtos de salmonelose no Brasil também
254 encontraram 100% de positividade para estes genes. No Chile, Aravena et al. (2019)
255 [26] observaram que 100% das cepas também apresentaram esses genes, assim como os
256 genes *agfA* e *lpfA* em cepas clínicas e ambientais de *S. Heidelberg*.

257 Os genes *agfA* e *lpfA* estão relacionados à forma de vida séssil e às fases iniciais
258 da patogenia de salmonelose. Ambos codificam fímbrias que carregam consigo adesinas
259 essenciais no processo de infecção e de fixação à superfícies abióticas, correspondendo
260 às fases iniciais da formação de biofilmes. Alguns trabalhos mostraram a existência de
261 efeitos aditivos dessas fímbrias na colonização do intestino e na expressão de virulência
262 no hospedeiro, que indicam potencial risco após infecção [45].

263 De maneira semelhante o gene *sefA* também codifica uma importante fímbria
264 associada ao processo de adesão. A ausência desse fator de virulência é condizente com
265 a literatura, uma vez que a fímbria SefA não está presente em todos os sorovares, sendo
266 restrita a sorovares do grupo D, nos sorotipos Enteritidis, Dublin, Moscow e Blegdon
267 [46]. Porém, devido à possibilidade de recombinação gênica, sua presença deve ser
268 investigada em outros sorovares de *Salmonella* spp., e por isso, sua presença foi
269 avaliada em *S. Heidelberg*.

270 Apesar de apresentarem alto potencial de adesão e inicialização do processo de
271 formação de biofilmes, é possível que em algumas cepas (30% - 6/20) não haja
272 estabilidade na estrutura do biofilme em virtude da ausência do gene *luxS*. A proteína
273 LuxS está ligada à produção de autoindutores que se acumulam no meio extracelular e
274 difundem-se livremente no citoplasma bacteriano, quando se encontram em situações de
275 estresse durante a formação dos biofilmes. Quando em elevadas quantidades, esses
276 autoindutores sinalizam o mecanismo de *quorum sensing* que permite a ativação de
277 sistemas de comunicação e reorientação bacteriana visando a formação de comunidades
278 bacterianas altamente organizadas, que garantem a estabilidade e a maturidade da
279 estrutura séssil [47].

280 O gene *avrA* representa um importante fator de virulência em *Salmonella* spp.
281 Está presente nas ilhas de patogenicidade de *Salmonella* spp. e é responsável por

282 codificar proteínas efetoras bacterianas essenciais para a infecção e proliferação
283 bacteriana por meio do escape das vias de resposta imune do hospedeiro. Esse
284 mecanismo é possível através da indução de apoptose celular que limita a resposta
285 inflamatória à infecção [48]. Trata-se de um gene altamente conservado em sorovares
286 de *Salmonella* spp. de importância em saúde pública, inclusive *S. Heidelberg* [28].

287 A detecção paralela de cepas multirresistentes e virulentas no gênero *Salmonella*
288 spp. representa a realidade atual, diretamente ligada ao aumento da capacidade de
289 realização dos processos de recombinação gênica, à pressão de seleção ambiental e à
290 aquisição de bombas de efluxo para eliminação de antibióticos múltiplos [49]. Esses
291 dados representam uma preocupação global acerca do risco relacionado à infecção por
292 *Salmonella Heidelberg* e às formas de tratamento da doença.

293 O estudo evidencia a presença de *S. Heidelberg* resistentes, em ordem
294 decrescente, à colistina, à ceftriaxona, à amoxicilina com clavulanato e à ciprofloxacina,
295 e virulentas, com a presença dos genes *ompC*, *invA*, *sodC*, *avrA*, *lpfA* e *agfA* em todas as
296 cepas, caracterizando o problema da dificuldade de tratamento para casos humanos e a
297 possível gravidade nos sinais clínicos em pessoas infectadas com o agente.

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308 **Tabelas**

309 **Tabela 1.** Cepas de *S. Heidelberg* isoladas de amostras avícolas provenientes da
 310 região Sul do Brasil, durante os anos de 2017 e 2018.

Identificação	Data	Empresa	Produtor	Idade das aves	Material recebido
H10	15/02/2018	A	1	26 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H11	15/02/2018	A	1	26 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H12	15/02/2018	A	1	26 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H15	16/02/2018	A	2	27 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H16	16/02/2018	A	3	26 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H17	16/02/2018	A	4	26 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H18	16/02/2018	A	5	27 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H19	16/02/2018	A	5	27 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H03	09/02/2018	B	1	24 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H04	09/02/2018	B	2	21 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H01	07/02/2018	C	1	11 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H02	08/02/2018	D	1	25 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H05	09/02/2018	D	2	21 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H06	29/11/2017	E	1	26 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H07	01/12/2017	F	1	40 Dias	Fezes de aves
H20	16/02/2018	F	2	44 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H08	23/12/2017	G	1	46 Dias	Ceco
H09	15/02/2018	H	1	46 Dias	Peito de aves
H13	16/02/2018	H	2	24 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves
H14	16/02/2018	H	3	34 Dias	Suabe de arrasto de cama de aves

311

312

313

314

315

316

317

318

319 **Tabela 2.** *Primers* utilizados na identificação de genes específicos nas cepas de *Salmonella* Heidelberg.

Gene	Concentração	Amplicon (pb)	Primer 5'-3'	Referência
<i>ompC</i>	10pmol	204	ATCGCTGACTTATGCAATCG CGGGTTGCGTTATAGGTCTG	[17]
<i>avrA</i>	20pmol	385	GTTATGGACGGAACGACATCGG ATTCTGCTTCCCGCCGCC	[18]
<i>sodC</i>	20pmol	500	ATGAAGCGATTAAGTTTACGATGG TTAATGACTCCGCAGGCGTAACGC	[19]
<i>invA</i>	10pmol	284	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	[20]
<i>sefA</i>	10 pmol	488	GATACTGCTGAACGTAGAAGG GCGTAAATCAGGATCTGCAGTAGC	[20]
<i>agfA</i>	10 pmol	350	TCCACAATGGGGCGGCGGCG CCTGACGCACCATTACGCTG	[21]
<i>lpfA</i>	10 pmol	250	CTTTCGCTGCTGAATCTGGT CAGTGTAAACAGAAACCAGT	[22]
<i>luxS</i>	20 pmol	1080	GATAATCCTGAACTAAGCTTCTCCGC GGTTATGAGAAAAGCATGCACCGATCA	[23]
<i>bla_{TEM}</i>	10pmol	643	CAGCGGTAAGATCCTTGAGA ACTCCCCGTCGTGTAGATAA	[24]
<i>bla_{SHV}</i>	10pmol	714	GGCCGCGTAGGCATGATAGA CCCGGCGATTTGCTGATTC	[24]
<i>qnrA</i>	10pmol	580	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	[25]
<i>qnrS</i>	10pmol	428	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	[25]

320

321

322

323

324

325

326

327 **Tabela 3.** Distribuição da CIM e índice de resistência de *Salmonella* Heidelberg.

Concentração do antibiótico (mg/L)	AMO	COL	CFT	CIP
<0,5	-	-	-	18
0,5	-	-	-	-
1	2	-	2	2
2	3	-	-	-
4	1	-	2	-
8	2	7	4	-
16	1	3	-	-
32	1	7	-	-
64	10	1	3	-
>64	-	2	9	-
Total de resistentes R(%)	12 ^a (60,0)	20 ^a (100,0)	18 ^a (90,0)	2 ^b (10,0)

328 Legenda: AMO – amoxicilina com ácido clavulânico; COL - colistina; CFT - ceftriaxona; CIP -
 329 ciprofloxacina; __ (linha) – ponto de corte de acordo com CLSI, 2019 e R(%) - índice de resistência.
 330 Letras diferentes na linha indicam diferença significativa (Teste de Fisher p<0.05).

331

332 **Tabela 4.** Perfil de resistência das cepas de *Salmonella* Heidelberg isoladas de amostras
 333 avícolas provenientes da região Sul do Brasil, durante os anos de 2017 e 2018.

334

Perfis de resistência	N (%)	Empresa	Produtor
P1: COL, CFT, AMO, CIP	2 (10,0)	A, E	1
P2: COL, CFT, AMO	10 (50,0)	A, B, C, D, F, H	1, 2, 3, 4
P3: COL, CFT	6 (30,0)	A, H	1, 2, 3, 5
P4: COL	2 (10,0)	D, G	1
Total	20 (100,0)		

335 Legenda: N (%) - número e porcentagem de cepas resistentes; AMO – amoxicilina com ácido
 336 clavulânico; COL - colistina; CFT - ceftriaxona; CIP – ciprofloxacina.

337

338 AGRADecIMENTOS

339 Os autores agradecem o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
340 Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
341 (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
342 pelo apoio financeiro e o Departamento de Bacteriologia do Laboratório de
343 Enterobactérias da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ, RJ, Brasil) pela
344 disponibilização das cepas.

345

346 REFERÊNCIAS

347

- 348 1. Deguenon E, Dougnon V, Lozes E et al (2019) Resistance and virulence determinants
349 of faecal *Salmonella* spp. isolated from slaughter animals in Benin. BMC Res Notes
350 12:317. <http://doi.org/10.1186/s13104-019-4341-x>.
- 351 2. Hung YT, Lay CJ, Wang CL, Koo M (2017) Characteristics of nontyphoidal
352 gastroenteritis in Taiwanese children: a 9-year period retrospective medical record
353 review. J Infect Public Health 10:518–21. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.09.018>
- 354 3. Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA (2018) Relatório Anual 2018.
355 Available from:
356 [http://abpabr.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2017_portugues_](http://abpabr.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2017_portugues_web_reduzido.pdf)
357 [web_reduzido.pdf](http://abpabr.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2017_portugues_web_reduzido.pdf). Accessed 28 mar 2019.
- 358 4. Brasl. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2016).
359 Instrução Normativa nº 20 de 21 de Outubro de 2016. Estabelece controle e
360 monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos
361 e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e
362 reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), com objetivo de reduzir a
363 prevalência desse agente e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor.
364 Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 de Outubro de 2016.
- 365 5. Mouttotou N, Ahmad S, Kamran Z and Koutoulis KC (2017) Prevalence, Risks and
366 Antibiotic Resistance of *Salmonella* in Poultry Production Chain, Current Topics in
367 *Salmonella* and Salmonellosis, Mihai Mares, IntechOpen.
368 [https://www.intechopen.com/books/current-topics-in-salmonella-and-](https://www.intechopen.com/books/current-topics-in-salmonella-and-salmonellosis/prevalence-risks-and-antibiotic-resistance-of-salmonella-in-poultry-production-chain)
369 [salmonellosis/prevalence-risks-and-antibiotic-resistance-of-salmonella-in-poultry-](https://www.intechopen.com/books/current-topics-in-salmonella-and-salmonellosis/prevalence-risks-and-antibiotic-resistance-of-salmonella-in-poultry-production-chain)
370 [production-chain](https://www.intechopen.com/books/current-topics-in-salmonella-and-salmonellosis/prevalence-risks-and-antibiotic-resistance-of-salmonella-in-poultry-production-chain). Acesso: 07 Mai 2019. doi: 10.5772/67438.
- 371 6. Webber B, Borges KA, Furian TQ et al (2019) Detection of virulence genes in
372 *Salmonella* Heidelberg isolated from chicken carcasses. Rev Inst Med Trop S Paulo
373 61:e36. <http://orcid.org/0000-0001-6578-7105>
- 374 7. Etter AJ, West AM, Burnett JL et al (2019) *Salmonella* enterica subsp. *enterica*
375 serovar Heidelberg food isolates associated with a salmonellosis outbreak have
376 enhanced stress tolerance capabilities. Appl Environ Microbiol 85:e01065-19.

- 377 8. Centers for Disease Control and Prevention – CDC (2018) Multistate outbreak of
378 multidrug-Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Contact with Dairy
379 Calves (Final Update) <https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-11-16/index.html>,
380 Acesso 07 Jun 2019.
- 381 9. European Food Safety Authority – EFSA (2019) European Food Safety Authority
382 (EFSA). *Salmonella* control in poultry flocks and its public health impact.
383 <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5596>. Acesso: 05 Ago
384 2019.
- 385 10. Nakao JH, Talkington D, Boop CA et al (2018) Unusually high illness severity and
386 short incubation periods in two foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg
387 infections with potential coincident *Staphylococcus aureus* intoxication. *Epidemiol*
388 *Infect* 146:19-27. <https://doi.org/10.1017/S0950268817002655>.
- 389 11. Sivaramalingam T, McEwen SA, Pearl DL et al (2013). A temporal study of
390 *Salmonella* serovars from environmental samples from poultry breeder flocks in Ontario
391 between 1998 and 2008. *Can J Vet Res* 77:1-11. PMID: PMC3525168
392 PMID: 23814352.
- 393 12. Yuki KE, Marei H, Fiskin E et al (2019) CYRI/FAM49B negatively regulates
394 RAC1-driven cytoskeletal remodelling and protects against bacterial infection. *Nat*
395 *Microbiol* 4:1516–1531. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0484-8>
- 396 13. Gupta, R, Chauhan SL, Kumar S et al (2019) Carriage of Class 1 integrons and
397 molecular characterization of *intI1* gene in multidrug-resistant *Salmonella* spp. isolates
398 from broilers. *Vet World* 12:609-613. doi: 10.14202/vetworld.2019.609-613.
- 399 14. Parisi A., Krump JA, Glass K et al (2018) Health Outcomes from Multidrug
400 Resistant *Salmonella* Infections in High-Income Countries: A Systematic Review and
401 Meta-Analysis. *Foodborne Pathog Dis* 15:428-436. doi: 10.1089/fpd.2017.2403.
- 402 15. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2003)
403 Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para
404 Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.
405 Departamento de Inspeção de Produto de Origem Animal, Brasília, 2003.
- 406 16. Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2019) In: Performance
407 standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed. Wayne, PA: Clinical and
408 Laboratory Standards Institute; 2019. CLSI supplement M100.
- 409 17. Jawad AA and Al-Charrakh AH (2016) Outer Membrane Protein C (*ompC*) Gene as
410 the Target for Diagnosis of *Salmonella* Species Isolated from Human and Animal
411 Sources. *J Med Biotech* 8:42-45. PMID: PMC4717466, PMID: 26855735
- 412 18. Prager R, Rabsch W, Streckel W et al (2003) Molecular properties of *Salmonella*
413 *enterica* serovar Paratyphi B distinguish between its systemic and its enteric pathovars.
414 *J Clin Microbiol* 41:4270-7278. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.9.4270-4278.2003>
- 415 19. Sanjay MK, Srideshikan SM, Usha MS et al (2010) Detection, amplification and
416 sequence homology of *sodC* in clinical isolates of *Salmonella* sp. *Indian J Med Res*
417 131:565-570. PMID: 20424309
- 418 20. Oliveira SD, Santos LRD, Schuch, MT et al (2002). Detection and identification of
419 salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Vet Microbiol* 87:25-35. PMID:
420 12079744

- 421 21. Collinson SK, Dig PC, Doran JL et al (1993) Thin, aggregative fimbriae mediate
422 binding of *Salmonella Entiridis* to fibronectin. J Bacteriol 175:12–18.
423 PMID: PMC196092 PMID: 8093237
- 424 22. Heuzenroeder MW, Murray CJ, Dalcin RM (2001) Molecular basis of benign
425 colonization of *Salmonella* Sofia in chickens. Rural Industries Research and
426 Development Corporation, n.1/106, 2001.
- 427 23. Choi J, Shin D, Ryu S (2007) Implication of *quorum* sensing in *Salmonella enterica*
428 serovar Typhimurium virulence: the *luxS* gene is necessary for expression of genes in
429 pathogenicity island 1. Infect Immun 75:4885-4890. [https://doi.org/10.1128/IAI.01942-](https://doi.org/10.1128/IAI.01942-06)
430 06
- 431 24. Chen S, Zhao S, White DG et al (2004) Characterization of multiple-antimicrobial-
432 resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. Appl Environ Microbiol 70:1-
433 7. <https://doi.org/10.1128/aem.70.1.1-7.2004>
- 434 25. Cattoir V, Weill FX, Poirel L et al (2007) Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in
435 France. J Antimicrob Chemother 59:751-754. <https://doi.org/10.1093/jac/dk1547>
- 436 26. Aravena C, Valencia B, Villegas A et al (2019) Caracterización de cepas clínicas y
437 ambientales de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg aisladas en
438 Chile. Rev Med Chile 147:24-33. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872019000100024>
- 439 27. Voss-Rech D, Kramer B, Silva VS et al (2019) Longitudinal study reveals persistent
440 environmental *Salmonella* Heidelberg in Brazilian broiler farms. Vet Microbiol
441 233:118-123. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.004>
- 442 28. Borsoi A, Santin E, Santos LR et al (2009) Inoculation of newly hatched broiler
443 chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different
444 virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis
445 patterns to intestinal changes evaluation. Poult Sci 88:750-758. [https://](https://doi.org/10.3382/ps.2008-00466)
446 doi.org/10.3382/ps.2008-00466
- 447 29. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health
448 Organization – FAO/WHO (2009) *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat:
449 meeting report. Microbiological Risk Assessment Series 19, Rome, 56p., 2009.
- 450 30. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2016)
451 Instrução Normativa Nº45, de 22 de novembro de 2016. Proibi, em todo o território
452 nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina,
453 com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação
454 animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 nov. 2016, seção 1, nº229, p. 14.
- 455 31. Borowiak M, Hammerl JA., Deneke C et al (2019). Characterization of *mcr-5-*
456 harboring *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from
457 animal and food origin in Germany. Antimicrob Agents Chemother 63.
458 <https://doi.org/10.1128/AAC.00063-19>
- 459 32. Trujillo-Soto T, Machuca J, Arca-Suárez, J et al (2019) Co-Occurrence of *mcr-*
460 *I* and *qnrSI* on an IncHI2 Plasmid in Clinical Isolates of *Salmonella* Typhimurium in
461 Spain. Vector Borne Zoonotic Dis. <http://doi.org/10.1089/vbz.2018.2398>
- 462 33. World Health Organization – WHO (2011) Critically Important Antimicrobials for
463 Human Medicine. 3rd rev. Geneva, Switzerland.

- 464 34. Giuriatti J, Stefani LM, Brisola MC et al (2017) *Salmonella* Heidelberg: Genetic
465 profile of its antimicrobial resistance related to extended spectrum β -lactamases
466 (ESBLs). *Microb Pathog* 109:195-199. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.040>
- 467 35. Tiba-Casas MR, Camargo CH, Soares FB et al (2018). Emergence of CMY-2-
468 Producing *Salmonella* Heidelberg Associated with IncII Plasmids Isolated from Poultry
469 in Brazil. *Microb Drug Resist* 25:271-276. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0044>.
- 470 36. Karami N, Martner A, Enne VI et al (2007) Transfer of an ampicillin resistance gene
471 between two *Escherichia coli* strains in the bowel microbiota of an infant treated with
472 antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 60:1142–1145. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm327>
- 473 37. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2009)
474 Instrução Normativa Nº 26, de 09 de julho de 2009. Aprova o regulamento técnico para
475 a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos
476 antimicrobianos de uso veterinário. *Diário Oficial da União*, DF, 10 jul. 2009, Seção 1,
477 p. 14.
- 478 38. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health
479 Organization / World Organisation for Animal Health - FAO/WHO/OIE (2008) Report
480 of the Joint FAO/WHO/OIE Expert meeting on critically important antimicrobials.
481 Report of the FAO/WHO/OIE Expert Meeting FAO Headquarters, Rome 26-30
482 November 2007. Rome, Italy, 2008. Available from:
483 <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/i0204e/i0204e00.pdf>>. Acesso: 07 Abr 2019.
- 484 39. Pribul BR, Festivo ML, Souza MMS, Rodrigues DP (2016) Characterization of
485 quinolone resistance in *Salmonella* spp. isolates from food products and human samples
486 in Brazil. *Braz J Microbiol* 47:196–201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.04.001>
- 487 40. Deblais L, Lorentz B, Scaria J et al (2018) Comparative Genomic Studies of
488 *Salmonella* Heidelberg Isolated From Chicken- and Turkey-Associated Farm
489 Environmental Samples. *Front. Microbiol* 9:1841.
490 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01841>
- 491 41. Murphy MJ (2012) *Clinical Pharmacokinetics*, American Society of Health-System
492 Pharmacists, Bethesda, Md, USA, 5th edition.
- 493 42. Centers for Disease Control and Prevention – CDC (2018) Multistate outbreak of
494 multidrug-Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Contact with Dairy
495 Calves (Final Update) <https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-11-16/index.html>.
496 Acesso 07 Jun 2019.
- 497 43. Hoffmann M, Zhao S; Pettengill J et al (2014) Comparative genomic analysis and
498 virulence differences in closely related *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolates
499 from humans, retail meats, and animals. *Genome Biol Evol* 6:1046-68.
500 <https://doi.org/10.1093/gbe/evu079>
- 501 44. Rowlands REG, Ristori CA, Ikuno AA et al (2014) Prevalence of drug resistance
502 and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with
503 salmonellosis in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 56:461-467.
504 <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652014000600001>
- 505 45. Yoo AY, Yu JE, Yoo H et al (2013) Role of sigma factor E in regulation of
506 *Salmonella* Agf expression. *Biochem Biophys Res Commun* 430:131-136.
507 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.025>

- 508 46. Amini K, Salehi TZ, Nikbakhht G et al (2010) Molecular detection of *invA* and *spv*
509 virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from human and animals in Iran. Afr
510 J Microbiol Res 4:2202-2210. <https://doi.org/10.5455/jrmds.20186262>
- 511 47. Parveen N, Cornell KA (2011) Methylthio adenosine/S-adenosylhomocysteine
512 nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism. Mol Microbiol 79:20.
513 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07455.x>.
- 514 48. Labriola JM, Zhou Y, Nagar B (2018) Structural Analysis of the Bacterial
515 Effector AvrA Identifies a Critical Helix Involved in Substrate Recognition.
516 Biochemistry 57:4985-4996. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00512>
- 517 49. Wajid M, Awan AB, Saleemi MK et al (2018) Multiple Drug Resistance and
518 Virulence Profiling of *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium and Enteritidis from
519 Poultry Farms of Faisalabad, Pakistan. Microb Drug Resist 25:133-142.
520 <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0121>
- 521
- 522
- 523
- 524
- 525
- 526
- 527
- 528
- 529

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

CAPÍTULO 3

**Multirresistência antimicrobiana genotípica e caracterização fenotípica de
Salmonella Heidelberg séssil de origem avícola**

Artigo a ser publicado no periódico
Biofouling

Multirresistência antimicrobiana genotípica e caracterização fenotípica de

Salmonella Heidelberg séssil de origem avícola

Newton N. Galvão^{1,2}, Roberta T. Melo², Phelipe A.B.M. Peres², Belchiolina B. Fonseca², Vasco A.C. Azevedo³, Rodrigo P. S. Santos³, Guilherme P. Monteiro², Daise A. Rossi².

^{1.} Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

^{2.} Universidade Federal de Uberlândia.

^{3.} Universidade Federal de Minas Gerais.

Resumo:

A utilização constante de práticas operacionais integradas na cadeia produtiva de frangos que incluem medidas de biossegurança, saneamento e aplicação de antibióticos para melhorar o desempenho das aves, muitas vezes não cumprem seu propósito, em virtude, da capacidade de adaptação de patógenos como *Salmonella* spp. Somado a isso, a emergência de *S. Heidelberg* em casos clínicos humanos subsidia o objetivo de avaliar as características fenotípicas da forma séssil desse sorovar submetida a diferentes temperaturas, em condições nutricionais semelhantes à encontrada na indústria e sob ação de diferentes agentes biocidas; e determinar a presença de genes ligados à resistência antimicrobiana, por meio de sequenciamento genômico completo. A estrutura séssil apresentou-se de forma densa, compacta e madura em biofilmes formados nas temperaturas de 25°C e 37°C e a inclusão de *chicken juice* garantiu a produção de uma biomassa de forte intensidade. Apesar da redução nas contagens de células após sanitização, houve tolerância aos agentes, principalmente ao hipoclorito de sódio 1%, cuja eficácia não foi identificada. A presença dos genes *aac3*, *aac6* e *ant3*; *sull* e *sul2*; *tetA* e principalmente *bla_{CTX-M-2}* e *fosA7* agrava o risco potencial ligado ao desenvolvimento de casos clínicos de difícil tratamento. Nossos resultados mostram o possível papel dos biofilmes de *S. Heidelberg* na dinâmica da disseminação e contaminação do produto final, além de que o conhecimento do perfil de resistência para esse sorovar emergente pode contribuir nas estratégias para controle e adoção de medidas na produção e na terapêutica clínica mais rápidas e eficazes, quando necessário.

Palavras-chave: Betalactâmico, Biomassa, *Chicken juice*, Fosfomicina, Salmonelose, Sanitizantes.

69 INTRODUÇÃO

70

71 *Salmonella* spp. é uma das principais causas de doenças entéricas em humanos e
72 sua importância em saúde pública está associada principalmente com a infecção de
73 origem alimentar. Sua ampla distribuição e variedade de reservatórios dificultam a
74 execução de medidas de controle. De maneira geral, o consumo de produtos avícolas
75 contaminados representa a principal forma de transmissão do agente aos humanos, uma
76 vez que a colonização nas aves por sorovares zoonóticos não resulta em apresentação de
77 manifestação clínica (Elhariri et al., 2017).

78 O *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que *Salmonella* spp.
79 afeta aproximadamente 1,2 milhão de pessoas a cada ano, resultando em 23.000
80 hospitalizações e 450 mortes somente nos Estados Unidos (CDC, 2018). Na União
81 Europeia, é a segunda principal causa de doenças transmitidas por alimentos após
82 *Campylobacter* spp. (EFSA, 2017). No Brasil, as infecções por *Salmonella* spp. foram
83 responsáveis por mais de 30% de todos os surtos de doenças transmitidas por alimentos
84 que ocorreram no Brasil entre 2000 e 2017 (Brasil, 2018).

85 Nos últimos anos, o aumento da ocorrência de *Salmonella enterica* sorovar
86 Heidelberg (*S. Heidelberg*) nas aves e em produtos avícolas foi identificado em muitos
87 países em todo o mundo, incluindo no Brasil. Além disso, a incidência de infecções
88 humanas por *S. Heidelberg* aumentou 25% entre 1996 e 2015, mesmo com a
89 identificação da diminuição geral no número de casos de salmonelose em 9% (Foley et
90 al., 2018; Alzwghaibi et al., 2018; Duarte, 2018).

91 Existe uma preocupação global com aspectos ligados à multirresistência
92 antimicrobiana e a presença de cepas virulentas de *S. Heidelberg* (Giuriatti et al., 2017).
93 Poucos estudos foram conduzidos para caracterizar biofilmes deste sorovar. No Brasil,
94 em estudo de Borges e colaboradores (2018), este sorovar foi classificado como fraco
95 produtor de biofilmes em diferentes temperaturas (3, 12, 28 e 37 °C).

96 A presença de biofilmes tem um enorme impacto sobre a contaminação de
97 alimentos durante o processamento. Células sésseis são mais resistentes que as células
98 planctônicas aos antimicrobianos e aos processos típicos de limpeza e saneamento.
99 Fatores extrínsecos como o tipo de superfície e a temperatura afetam o processo de
100 formação dessas estruturas (Van Houdt; Michiels, 2010). Diante disso, o presente
101 estudo foi projetado para caracterizar aspectos fenotípicos de biofilmes de duas cepas de

102 *S. Heidelberg* e avaliar o genoma das cepas para identificação de genes de resistência a
103 antibióticos.

104

105 **MATERIAL E MÉTODOS**

106

107 **Cepas**

108 O estudo foi conduzido com duas cepas de *S. Heidelberg* previamente
109 caracterizadas (Instrução Normativa 62 - Brasil, 2003), provenientes de suabe de arrasto
110 de cama de aves de corte com idades de 26 e 27 dias, isoladas nos anos de 2017 e 2018,
111 respectivamente, de plantas de abate com ciclo completo de produção e sistema de
112 integração da região Sul do país, inspecionadas pelo SIF, habilitadas para o comércio
113 interno e exportação.

114 A seleção das cepas foi baseada na análise molecular por PFGE (dados não
115 publicados), na qual ambas as bactérias apresentaram similaridade inferior a 80%.

116

117 **Produção de biofilmes**

118 A capacidade de produzir biofilmes foi realizada de forma qualitativa e
119 quantitativa, nas temperaturas de 4, 25 e 37°C.

120 Nos ensaios de adesão e de biofilme, as estirpes foram pré-cultivadas por 24
121 horas a 37°C em 20 mL de caldo Tryptic Soy Broth TSB (Merck®), utilizando como
122 inóculo a cultura presente nas placas de Ágar Tryptic Soy TSA (Merck®).
123 Paralelamente, esses ensaios foram realizados utilizando 20 mL de TSB suplementado
124 com 5% de *chicken juice* (CJ) para simular as condições da indústria.

125 Após crescimento e obtenção do inóculo bacteriano de 10^7 UFC/mL
126 correspondente a $DO_{600} = 0,22$ a $0,28$, as células foram centrifugadas (5.000rpm, 10
127 minutos, 4°C) e lavadas duas vezes (NaCl a 0,9%) antes do início dos cultivos para
128 adesão e biofilme.

129 A análise qualitativa dos biofilmes foi realizada conforme recomendações de
130 Kudirkiené et al. (2012), com modificações, incluindo a realização de oito réplicas em
131 cada uma das três repetições. De forma sucinta, 200µL da suspensão bacteriana em
132 meio TSB e em TSB enriquecido com CJ foi adicionado em placas de 96 poços. Para a
133 formação da biomassa, as placas foram incubadas durante 24 horas nas diferentes
134 temperaturas (4, 25 e 37°C) sob agitação (100 rpm). Após a incubação, os meios foram
135 removidos, os poços foram lavados três vezes em solução de NaCl 0,9% e secos durante

136 50 minutos a 55°C. A biomassa total foi medida por meio da fixação com Cristal
137 Violeta 0,1% (LaborClin) por 5 minutos, seguido da eluição com solução álcool-acetona
138 (80:20 v/v etanol- acetona) (Dinamica®). O corante eluído foi removido de cada poço e
139 colocado numa nova placa de 96 poços para leitura da DO₆₀₀ (DNM-9602 microplate
140 reader Perlong®). Os ensaios foram realizados com oito réplicas para cada estirpe em
141 três repetições. A determinação do índice de formação de biofilmes (IFB) foi realizada
142 de acordo com Stepanovic et al. (2000) a partir dos resultados da leitura da DO₆₀₀.
143 Utilizou-se como ponto de corte (DOc), o valor médio da DO₆₀₀ equivalente a 0,044,
144 obtido somando a média da densidade óptica dos controles negativos (que foi 0,007) ao
145 valor do desvio padrão multiplicado por três (0,0124 x 3). A classificação dos biofilmes
146 foi determinada da seguinte forma: a) inexistente: DO₆₀₀ ≤ 0,044, ou seja, menor que
147 DOc; b) fraco: DO₆₀₀ >0,044 e ≤ 0,088, ou seja, até duas vezes maior que DOc; c)
148 moderado: DO₆₀₀ >0,088 e ≤0,176, ou seja, entre duas a quatro vezes o valor de DOc e,
149 d) forte: DO₆₀₀ >0,176, ou seja, maior que quatro vezes o valor de DOc.

150 Os testes quantitativos de adesão (2 horas de incubação) e biofilme (24 horas de
151 incubação) foram realizados pela enumeração das células sésseis em UFC. Os biofilmes
152 foram formados nas mesmas condições descritas para o teste qualitativo com três
153 réplicas por repetição, além dos controles negativo e positivo. Após a formação da
154 massa aderida e do biofilme, os poços foram lavados duas vezes com solução de NaCl
155 0,9% e a biomassa foi retirada por meio de raspagem dos poços durante 90 segundos. A
156 suspensão celular obtida foi submetida a diluições seriadas e semeada em placas de agar
157 TSA para obtenção do número de UFC.

158

159 **Microscopia eletrônica de varredura**

160 A confirmação do fenótipo obtido nos ensaios de formação de biofilme nas
161 diferentes temperaturas e a avaliação da ultraestrutura da forma sésil foi realizada em
162 Microscópio Eletrônico de Varredura, de acordo com Brown et al. (2014), com algumas
163 alterações. Biofilmes foram formados em esferas de vidro de diâmetro de 5mm, em
164 caldo TSB respeitando as condições de crescimento descritas anteriormente. Após a
165 formação da biomassa, as amostras foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 2,5% de
166 paraformaldeído em 0,1M de tampão PBS (pH 7,4) *overnight* a 4°C. O fixador foi
167 removido, e as amostras lavadas três vezes com tampão PBS. As esferas foram pós-
168 fixadas com tetróxido de ósmio 1% durante uma hora e lavadas três vezes com tampão

169 PBS. As esferas foram desidratadas numa série de soluções de etanol (30, 40, 50, 60,
170 70, 80, e 90% e, em seguida, três vezes a 100%) durante 15 minutos para cada etapa.

171 As amostras foram secas em CPD (Ponto Crítico de Secagem) (CPD 030,
172 Baltec, Alemanha) utilizando dióxido de carbono líquido como fluido de transição, em
173 seguida foram revestidas com uma camada de 20nm de espessura de ouro (SCD 050,
174 Baltec, Alemanha) e visualizadas em MEV VP Zeiss Supra 55 FEG SEM operando a 20
175 kV.

176

177 **Teste de inibição dos biofilmes**

178 Para examinar a interação entre os biofilmes de *S. Heidelberg* com
179 componentes desinfetantes (ácido peracético 0,8%, hipoclorito de sódio 1% e
180 clorexidina 1%) foi utilizado o protocolo descrito por Nguyen e Yuk (2013), com
181 modificações.

182 Uma alíquota de 100µL correspondentes a 10^7 células foi inoculada à
183 superfície de uma membrana de celulose estéril com porosidade de 0,45µm e 47 mm de
184 diâmetro, em placa de ágar TSA (Merck®). As placas foram incubadas a 37°C e a cada
185 24 horas a membrana foi transferida para uma nova placa durante três dias.
186 Posteriormente, a membrana foi colocada em frasco contendo 20 mL de caldo MH com
187 as respectivas concentrações dos compostos químicos. Os frascos foram incubados a
188 37°C por 15 minutos. A membrana foi lavada três vezes com tampão fosfato (PBS),
189 seguido por tratamento em 25mL de tripsina a 0,1% durante 15 minutos, à temperatura
190 ambiente. Em seguida, a solução resultante sofreu diluições seriadas para a posterior
191 contagem.

192

193 **Sequenciamento genômico**

194 O sequenciamento genômico completo das cepas foi realizado utilizando a
195 plataforma Illumina HiSeq Technology com comprimento de leitura de 2 x 150 bp,
196 concentração de Qubit / FA de 5.013 ng/µl. O controle do tamanho do gDNA foi feito
197 usando eletroforese em gel de agarose. O tamanho dos *library insert* foi determinado
198 utilizando uma média de cerca de 450pb, tendo como controle o bioanalisador Agilent
199 2100. A preparação da biblioteca foi realizada usando procedimentos padrão validados,
200 modificados para otimizar o método automatizado.

201 A montagem das leituras obtidas no sequenciamento foi avaliada quanto a
202 qualidade pelo fastQC. Os contigs foram determinados pelo script *in house* com vários
203 montadores para realização de montagens '*ab initio*'. A melhor montagem foi escolhida
204 a partir do resultado do programa QUASt (Cui et al., 2013).

205

206 **Análise estatística**

207 Os resultados obtidos foram analisados usando o GraphPad Prism, versão 7.0.
208 Os ensaios quantitativos dos testes com biofilmes foram comparados por meio de
209 análise de variância simples (One way ANOVA). Para as comparações simples de duas
210 variáveis foi utilizado teste *t* de *student*. Todos os testes foram realizados com um nível
211 de confiança de 95%.

212

213 **RESULTADOS**

214

215 **Capacidade de adesão**

216 Os resultados demonstraram que ambas as cepas testadas possuíam a mesma
217 capacidade de adesão quando inoculadas em TSB e em TSB + 5% de *chicken juice*
218 ($p=0,153$). Considerando o inóculo inicial de aproximadamente 10^3 UFC/poço,
219 constatou-se que houve aumento nas contagens após o processo de adesão ($p<0,05$) nas
220 temperaturas de 25 e 37°C, mas a presença de *chicken juice* não favoreceu esse processo
221 ($p=0,124$) (Tabela 1).

222 O período de duas horas de incubação foi suficiente para o estabelecimento
223 inicial da estrutura do biofilme, exceto para a temperatura de 4°C, com isso podemos
224 inferir que temperaturas mais baixas podem auxiliar no controle inicial da formação da
225 estrutura séssil em *S. Heidelberg*.

226

227 **Classificação e quantificação dos biofilmes de *S. Heidelberg***

228 A 4°C não foi constatada a presença de biofilme pelo Índice de Formação de
229 Biofilme (IFB). Ambas as cepas apresentaram aumento na capacidade de formar
230 biofilmes ligado primeiramente às temperaturas de 25 e 37°C e, de maneira mais
231 intensa, após suplementação com *chicken juice*. A inclusão de *chicken juice*, promoveu
232 um reforço significativo na biomassa bacteriana, aumentando em média 0,2114 o IFB
233 quando comparado ao valor encontrado nas amostras não suplementadas, exceto na
234 temperatura de 4°C (Tabela 2).

235

236 Os resultados indicam que a presença constante de *chicken juice* durante o
237 beneficiamento das carcaças na indústria avícola favorece sobremaneira a intensidade e
238 consequente manutenção de biofilmes de *S. Heidelberg*, o que pode constituir uma
239 constante fonte de contaminação do produto final, se as medidas de higienização não
240 forem frequentes e suficientemente conduzidas.

241 A partir de um inóculo inicial constante ($p > 0,05$) em todos os ensaios, observou-se
242 que para a cepa H06 houve aumento significativo nas contagens obtidas no *chicken*
243 *juice* quando comparado às contagens em TSB, na temperatura de 25°C, todavia o
244 inverso foi observado nas temperaturas de 4 e 37°C. Para ambas as cepas a temperatura
245 de 4°C foi a que menos favoreceu a multiplicação bacteriana, sendo que cepa H06
246 mostrou-se mais eficiente na capacidade de replicação na forma séssil considerando as
247 condições suplementada ou não com CJ, nas temperaturas de 25 e 37°C (Figura 1).

248 A avaliação conjunta das cepas demonstrou que o *chicken juice* não influenciou
249 no número de bactérias presentes no biofilme nas três temperaturas testadas, e que o
250 aumento da temperatura de 4°C para 25 ou 37°C favoreceu de forma significativa o
251 número de bactérias aderidas nos biofilmes (Tabela 3).

252 De maneira complementar, o somatório dos dados obtidos no teste do cristal
253 violeta e nas contagens indicam que a maior influência da suplementação com *chicken*
254 *juice* está na produção de uma maior quantidade de matriz extracelular e não no
255 aumento de bactérias.

256

257 **Ultra-estrutura dos biofilmes de *S. Heidelberg***

258 No ensaio de Microscopia Eletrônica de Varredura observou-se alterações na
259 biomassa formada em ambas as cepas cultivadas em TSB nas diferentes temperaturas
260 (Figura 2).

261 As Figuras 2a e 2b evidenciam a presença de bactérias isoladas, com uma síntese
262 mínima de fibras de matriz extracelular, indicando a incapacidade de formar biofilme na
263 condição de 4 °C, condizente com o encontrado no ensaio qualitativo dos biofilmes. Em
264 2c e 2d observa-se a formação inicial do biofilme, com produção mais intensa de matriz
265 extracelular, a 25°C. Já em 2e e 2f fica mais evidente a presença de uma estrutura
266 tridimensional da matriz, indicando o desenvolvimento de um biofilme maduro, a 37°C.

267 Ficou evidente que houve maior produção de biomassa nas temperaturas de 25 e
268 37°C em ambas as cepas. A característica da matriz nesses biofilmes indica consistência

269 densa e compacta compatível com biofilmes ricos em carboidratos e proteínas (MELO
270 et al., 2017).

271

272 **Inibição de biofilmes de *S. Heidelberg***

273 A utilização de agentes químicos nas cepas de *S. Heidelberg* demonstrou o
274 mesmo comportamento em ambas as cepas para todos os tratamentos ($p > 0,2$). Nenhum
275 dos tratamentos promoveu eliminação total das células viáveis dos biofilmes. Todavia,
276 para todos os produtos utilizados houve redução significativa nas contagens bacterianas
277 em relação ao biofilme não tratado (7,23 log UFC/mL). A Figura 3 ilustra as contagens
278 obtidas nos biofilmes não tratados e tratados após 15 minutos de contato com os agentes
279 químicos mais utilizados na produção avícola (hipoclorito de sódio, ácido peracético e
280 clorexidina).

281 O tratamento com hipoclorito de sódio 1% reduziu a quantidade de bactérias
282 sésseis para 4,83 log UFC/mL. Já o ácido peracético 0,8% promoveu uma diminuição
283 de cerca de 3,51 ciclos de log em relação ao biofilme não tratado. O uso da clorexidina
284 1% foi o tratamento que apresentou o maior efeito no controle da estrutura sésseis de *S.*
285 *Heidelberg*, com uma biomassa viável de 2,69 log UFC/mL, representando uma redução
286 de 4,53 ciclos de log.

287 Apesar de identificada uma redução significativa nas contagens dos biofilmes
288 após os tratamentos, a manutenção de células viáveis mostra que provavelmente existem
289 mecanismos adaptativos intrínsecos ou extrínsecos que permitem sua sobrevivência de
290 *S. Heidelberg*.

291

292 **Análise genômica**

293 A avaliação da sequência genética das cepas permitiu constatar uma similaridade
294 genética entre elas, inferior a 80% através da tipagem pelo PFGE. A análise fenotípica
295 realizada nos testes com biofilmes permitiu comprovar algumas diferenças no
296 comportamento das cepas, que já é um parâmetro esperado, uma vez que a expressão de
297 características genéticas é variável de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos,
298 mesmo em se tratando de clones.

299 Quanto ao perfil de resistência antimicrobiana, a análise do genoma revelou a
300 presença de genes plasmidiais ligados à resistência aos aminoglicosídeos (*aac3*, *aac6* e
301 *ant3*), sulfonamidas (*sul1* e *sul2*), betalactâmicos (*bla_{CTX-M-2}*), fosfomicina (*fosA7*) e
302 tetraciclina (*tetA*), caracterizando um alarmante perfil de multirresistência.

303 Para avaliar a prevalência global de isolados clínicos e ambientais de *S. enterica*
304 abrigando os plasmídeos identificados, dados do NCBI - Banco de dados de detecção de
305 patógenos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/>) foram analisados. Dos 205.032
306 genomas de *S. enterica* selecionados, somente 0,4 a 21,1% apresentaram resistência
307 para pelo menos um desses genes, porém o sorovar *S. Heidelberg* foi o que mais
308 apresentou prevalência desses genes (64,4%). Do total, 58,2% foram recuperados de
309 amostras ambientais e de frangos, enquanto apenas 6,2% foram recuperados de casos
310 clínicos (Rehman et al., 2019).

311

312 **DISCUSSÃO**

313

314 **Fenótipo dos biofilmes de *S. Heidelberg***

315 *S. Heidelberg* está entre os mais predominantes sorovares implicados na
316 salmonelose humana na América do Norte, na Europa e no Brasil (Antunes et al., 2016;
317 Deblais et al., 2018; Duarte, 2018). Dada a importância para a saúde pública desta
318 zoonose é relevante compreender os mecanismos de sobrevivência adotados por este
319 patógeno, e uma delas é a habilidade de se manter na forma de vida sésil, que garante a
320 proteção do agente às diversas tensões ambientais, de agentes antimicrobianos e/ou
321 desinfetantes e da resposta imune do hospedeiro (Lucca et al., 2019).

322 Nesse estudo, temos que as estruturas sésseis de *S. Heidelberg* apresentaram um
323 efetivo aumento em sua intensidade sob temperaturas mais altas (25 e 37°C), e que a
324 presença do *chicken juice* afeta a quantidade de matriz extracelular produzida, porém o
325 aumento no número de células viáveis é uma característica cepa-dependente.

326 A influência da temperatura no estabelecimento da estrutura sésil é descrita
327 como uma característica dependente do sorovar e da cepa. De acordo com Cardoso
328 (2019), a utilização de temperaturas mais elevadas (25 e 36°C) favorecem
329 significativamente a produção de biofilmes em *S. Minnesota*. Todavia, outros estudos
330 mostram que temperaturas inferiores à temperatura ótima de crescimento intensificam a
331 produção de biomassa nos biofilmes de *Salmonella* spp. (Stepanović et al., 2003;
332 Cabarkapa et al., 2015; Piras et al., 2015).

333 A detecção de uma maior biomassa nos biofilmes de *S. Heidelberg*
334 suplementados com *chicken juice* corrobora com a ideia de que a sobrevivência e a
335 persistência na cadeia de produção podem representar o principal problema de
336 contaminação do alimento. A utilização do modelo de análise de biofilmes com *chicken*

337 *juice* aproxima-se da condição encontrada no ambiente de produção avícola, uma vez
338 que esse exsudato foi identificado como uma importante fonte de contaminação
339 bacteriana nas superfícies de processamento. O *chicken juice* contém uma mistura
340 complexa de carboidratos (0,06%) e proteínas (2,79%) proporcionando um meio ideal
341 para a proliferação e sobrevivência das bactérias. O acúmulo desses materiais orgânicos
342 permite a formação de micro-camadas nas superfícies que auxiliam na fixação
343 bacteriana. A influência do incremento promovido pelo *chicken juice* foi identificada
344 também nos sorovares *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (Melo et al., 2017; Li et al.,
345 2017; Cappitelli et al., 2014).

346 Para ambas as cepas de *S. Heidelberg* sob a forma séssil nas esferas de vidro,
347 observou-se em MEV que o comportamento relacionado a estruturação dos biofilmes
348 nas diferentes temperaturas testadas foi semelhante. A 25 e 37°C, a estrutura da matriz
349 do biofilme foi bastante similar, com uma arquitetura mais compacta e estável, além da
350 presença de uma cobertura regular ao longo da superfície, condizente com a
351 manutenção de várias macrocolônias. Diferentemente, a 4°C, foi observada somente a
352 produção de poucas fibras de matriz extracelular, indicando o estágio inicial da
353 formação dos biofilmes. A ultra-estrutura fechada composta de canais indica o padrão
354 homogêneo do biofilme, característico da classificação da estrutura séssil madura, com
355 a presença de interconexões que auxiliam no acesso a nutrientes para os agregados
356 celulares e na drenagem dos resíduos metabólicos (Donlan; Costerton, 2002).

357 O teste de inibição dos biofilmes mostrou que os três agentes químicos,
358 amplamente utilizados na rotina industrial, reduziram significativamente as contagens
359 das células sésseis. Porém, em nenhum teste foi detectada eliminação total do micro-
360 organismo. A tolerância aos diferentes sanitizantes sugere que o uso desses agentes na
361 rotina do ambiente industrial de forma inadequada pode resultar na exposição subletal a
362 estes biocidas, representando um risco real para a adaptação destas bactérias, além de
363 influenciar positivamente na produção de biofilmes, já que nestas condições os
364 mecanismos de resposta adaptativa das bactérias ao estresse são ativados, promovendo
365 sua sobrevivência, ainda que em ambientes inóspitos (Pereira, 2014, Capita et al.,
366 2017).

367 Sabe-se que a eficiência de um agente químico sanitizante é comprovada a partir
368 da redução de 3,0 ciclos log na contagem de células bacterianas em suspensão.
369 Estendendo-se esse conceito aos biofilmes, fica evidente que o hipoclorito de sódio 1%
370 foi o único produto que não atingiu esse escore, uma vez que promoveu a redução

371 média de 2,4 ciclos log. O baixo efeito detectado para esse agente pode estar associado
372 também a fatores moleculares, como os genes *RpoS*, *Dps*, ligados ao estresse oxidativo
373 e ativamente expressos em cepas de *S. enterica* resistentes à presença de hipoclorito de
374 sódio a 200ppm. Paralelamente, as propriedades desse sanitizante podem ser alteradas
375 de acordo com a variação do pH e com a presença de matéria orgânica que alternam a
376 disponibilidade de ácido hipocloroso, reduzindo sua eficiência (Pfundner, 2011; Ritter et
377 al., 2012).

378 Embora o uso de compostos químicos forneça benefícios na etapa de
379 desinfecção, estes agentes possuem a limitação de não destruir as estruturas residuais da
380 matriz do biofilme bacteriano, que podem facilitar o seu ressurgimento ou mesmo a
381 manutenção dessas estruturas nas superfícies. Dessa forma, são necessários esforços
382 especiais para a remoção completa de biofilmes de *S. Heidelberg* adaptados aos
383 biocidas. Provavelmente, a efetividade no controle desses micro-organismos seja
384 alcançada por meio de planos de higienização que associem medidas de limpeza focadas
385 na eliminação da matriz extrapolimérica combinados com a utilização de diferentes
386 agentes, e o rodízio periódico de sanitizantes, respeitando-se os períodos entre
387 higienizações (Ohsumi et al., 2015; Cardoso, 2019).

388

389 **Genótipo da resistência antimicrobiana de *S. Heidelberg***

390 A emergência de *S. Heidelberg* implica na necessidade constante de estudos
391 voltados ao acompanhamento de seu perfil molecular, em especial a parâmetros que
392 envolvem características de resistência antimicrobiana em virtude do aumento do
393 número de casos de salmonelose com envolvimento desse sorovar (Voss-Rech et al.,
394 2019). A avaliação genômica das cepas de *S. Heidelberg* em nosso estudo demonstrou
395 uma grande quantidade de genes ligados a resistência antimicrobiana e que ambas as
396 cepas são da mesma origem e identificadas como clones.

397 Oito genes de resistência foram identificados (*aac3*, *aac6*, *ant3*, *tetA*, *blaCTX-*
398 *M-2*, *sul1*, *sul2* e *fosA7*) para cinco classes de antimicrobianos. Genes de resistência
399 semelhantes foram relatados em *S. Heidelberg* anteriormente em amostras clínicas,
400 ambientais e de animais (Hoffmann et al., 2014; Keefer et al., 2019). Uma das
401 principais justificativas que explicam esses padrões de multirresistência em *Salmonella*
402 spp. está ligada à elevada transferibilidade de genes plasmidiais via conjugação em
403 espécies da ordem *Enterobacterales* na microbiota intestinal de animais de produção,
404 principalmente aves e suínos (Lim et al., 2013).

405 Os genes *aac3*, *aac6* e *ant3* estão diretamente envolvidos na resistência aos
406 aminoglicosídeos. Essa classe atua na alteração da função dos ribossomos bacterianos,
407 pela ligação à fração 30S, inibindo a síntese proteica ou produzindo proteínas
408 defeituosas. Os plasmídeos de resistência identificados codificam proteínas que atuam
409 em modificações enzimáticas dos antibióticos, principalmente a gentamicina (Brasil,
410 2007; Trabulsi; Mimica; Mimica, 2008, Noh et al., 2019).

411 A identificação do gene *tetA* não representa um achado de elevada relevância em
412 virtude da ampla distribuição desse plasmídeo em diversos sorovares de *Salmonella*
413 spp. (Michael et al., 2006), incluindo *S. Heidelberg* (Keefer et al., 2019). As
414 tetraciclina apresentam grande capacidade de difusão intracelular impedindo a síntese
415 proteica de maneira reversível (Brasil, 2007; Trabulsi; Mimica; Mimica, 2008). De
416 acordo com Delgado-Suárez et al. (2019), há evidências de evolução para a resistência à
417 tetraciclina no gênero *Salmonella* spp., associada ao complexo gênico *tet*.

418 Antibióticos betalactâmicos atuam na parede celular bacteriana interferindo na
419 síntese da camada de peptidoglicano. A resistência bacteriana mediada por plasmídeos
420 pertencentes aos subgrupos *bla*, como *bla_{CTX-M-2}*, apresentam destaque pela capacidade
421 de produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) (Alterthum, 2008).
422 Considerando a importância dessa classe como de escolha para tratamento de
423 salmoneloses, a presença de estirpes resistentes é alarmante. Nos EUA estima-se que
424 aproximadamente 26.000 infecções ocorram anualmente em decorrência de ESBL,
425 resultando em cerca de 1.700 mortes, gerando grandes despesas hospitalares no país
426 (CDC, 2014). A ocorrência de ESBLs em isolados de *Salmonella* spp. era baixa, no
427 entanto, houve recentemente um rápido aumento da resistência em todo o mundo,
428 inclusive no Brasil, tornando-se uma grande preocupação de saúde pública. Sabe-se que
429 *bla_{CTX}* e *bla_{CMY}* são as mais identificados em isolados de animais produtores de
430 alimentos (Biffi et al., 2014; Qiao et al., 2017; Jeon et al., 2018).

431 A resistência às sulfonamidas foi identificada pelos genes *sul1* e *sul2*, que
432 codificam uma enzima necessária durante a síntese do ácido fólico (sítio de atuação da
433 droga), precursor do RNA e DNA, as quais não são inibidas pela droga (LYNNE et al.,
434 2008). Apesar de não pesquisado, sabe-se que o plasmídeo pSH-04-1 foi descrito como
435 o principal responsável por carrear a resistência conjunta a sulfonamidas,
436 betalactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclina em *S. Heidelberg*, associada aos genes
437 identificados no presente estudo (Hoffmann et al., 2014; Keefer et al., 2019),
438 possivelmente presente também em nossas cepas.

439 A ação da fosfomicina se dá em nível de parede celular na ligação de
440 peptidoglicanos. A presença de *fosA7* é alarmante uma vez que trata-se de um gene
441 encontrado recentemente em um número limitado de estirpes de *Salmonella* spp.
442 Especificamente, *fosA7* foi identificado em *Salmonella* spp. pela primeira vez em 2017,
443 e até o momento essa sequência genética específica foi encontrada apenas em 36 dos,
444 aproximadamente, 40.000 genomas de *Salmonella*, *draft* e completos, presentes no
445 NCBI. Desse total, cerca de 75% eram *S. Heidelberg*. Somado a isso, estudos apontam
446 que esse gene se integra facilmente ao DNA cromossômico no gênero *Salmonella* spp.
447 (Alterthum, 2008; Rehman et al., 2017; Keefer et al., 2019).

448 Nossos achados enfatizam a necessidade de uma vigilância abrangente para
449 impedir uma maior disseminação de clones com característica de multirresistência, em
450 especial para o sorovar *S. Heidelberg*.

451

452 CONCLUSÃO

453 Em *S. Heidelberg*, as temperaturas de 25°C e 37°C favoreceram a formação de
454 biofilmes maduros e, também, classificados como de forte intensidade quando na
455 presença de *chicken juice*. A 4°C houve apenas o desenvolvimento inicial da estrutura
456 séssil. A sobrevivência aos biocidas testados sugere uma possível expressão exacerbada
457 de genes relacionados ao estresse oxidativo e/ou a existência de exposição a
458 concentrações subletais no ambiente, representando um risco real para o
459 desenvolvimento de mecanismos de adaptação, principalmente ao hipoclorito de sódio.

460 A emergência de *S. Heidelberg* com genótipo multirresistente a antimicrobianos
461 de importância na saúde pública e animal indica a necessidade de atenção especial a este
462 sorovar na produção de frangos, visando a inclusão de protocolos rigorosos de
463 monitoramento e a segurança alimentar.

464

465 AGRADECIMENTOS

466 Os autores agradecem o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
467 Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
468 (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
469 pelo apoio financeiro e o Departamento de Bacteriologia do Laboratório de
470 Enterobactérias da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ, RJ, Brasil) pela
471 disponibilização das cepas.

472

473

474 **REFERÊNCIAS**

475

476 Alterthum, F. (2008) Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de
477 resistência. In: Trabulsi, L. R.; Alterthum, F. (Ed.). Microbiologia. 5 ed. São Paulo:
478 Atheneu, 2008. p.79-85.

479 Alzwhaibi, A B, Yahyaraeyat, R, Fasaei, B N, Langeroudi, A G, Salehi, T Z. (2018)
480 Rapid molecular identification and differentiation of common *Salmonella* serovars
481 isolated from poultry, domestic animals and foodstuff using multiplex PCR assay. Arch
482 Microbiol 7:1–8.

483 Antunes, P.; Mourao, J.; Campos, J.; Peixe, L. 2016. Salmonellosis: the role of poultry
484 meat. Clin. Microbiol. Infect. 22:110–121.

485 Borges, K A, Furian, T Q, Souza, S N, Menezes, R, Tondo, E C, Moraes, H L S,
486 Nascimento V P.(2018) Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different
487 temperature conditions. Pesq Vet Bras, 38(1).

488 Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).
489 Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico. Brasília, 2007.

490 Brasil. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.
491 Brasília, 2018.

492 [http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao Surtos-](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao_Surtos-DTA-2018.pdf)
493 [DTA-2018.pdf](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao_Surtos-DTA-2018.pdf) Acesso 09 Dez 2019.

494 Brown, H L, Reuter, M, Salt, L J, Cross, K L, Betts, R P, Van Vliet, A H M. (2014)
495 Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of *Campylobacter*
496 *jejuni*. Appl Environ Microbiol, 80 (22):7053-7060.

497 Cabarkapa, I, Skrinjar, M, Levic, J, Kokic, B, Blagojev, N, Milanov, D, Suvajdzic, L.
498 (2015) Biofilm forming ability of *Salmonella* Enteritidis in vitro. Acta Vet., Beogr. 65:
499 371-389.

500 Capita, R, Buzón-Durán, L, Riesco-Peláez, F, Alonso-Calleja, C. (2017) Effect of Sub-
501 Lethal Concentrations of Biocides on the Structural Parameters and Viability of the
502 Biofilms Formed by *Salmonella* Typhimurium. Foodborne Pathog Dis; 14(6): 350-356.

503 Cappitelli, F, Polo, A, Villa, F. (2014) Biofilm formation in food processing
504 environments is still poorly understood and controlled. Food Eng. Rev.

505 CDC - (Center for Disease Control and Prevention). CDC, 2014. Antibiotic resistance
506 threats in the United States, 2013. Atlanta, USA. 2014.

- 507 CDC - (Center for Disease Control and Prevention). CDC, 2018. CDC 2017 estimates:
508 findings. CDC. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodborneburden/2018->
509 [foodborne-estimates.html](http://www.cdc.gov/foodborneburden/2018-foodborne-estimates.html)> Acesso em: 09 Dez 2019.
- 510 Cui, Y, Yu, C, Yan, Y, Li, D, Li, Y, Jombart, T, Weinert L A, Wang Z, Gui Z, Xu L et
511 al. (2013). Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia*
512 *pestis*. Proc Natl Acad Sci U.S.A 110: 577–582.
- 513 Deblais, L, Lorentz B, Scaria, J, Nagaraja, K. V, Nisar, M, Lauer, D, Voss, S,
514 Rajashekara, G. (2018) Comparative genomic studies of *Salmonella* Heidelberg isolated
515 from chicken- and turkey-associated farm environmental samples. Front Microbiol
516 9:1841.
- 517 Delgado-Suárez, E. J, Ortíz-López, R, Gebreyes, W. A, Allard, M. W, Barona-Gómez,
518 F., Rubio-Lozano, M. S. (2019). Genomic surveillance links livestock production with
519 the emergence and spread of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella* in Mexico.
520 Journal of Microbiology. doi:10.1007/s12275-019-8421-3
- 521 Donlan R M, Costerton JW. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant
522 microorganisms. Clin Microbiol Rev 15:167–193.doi: 10.1128/CMR.15.2.167-
523 193.2002
- 524 Duarte S C (2018) Epidemiologia dos principais sorotipos de *Salmonella* circulantes na
525 avicultura brasileira. In: Simpósio – *Salmonella*: cenários e desafios. Porto Alegre,
526 Brazil. 29 November 2018.
- 527 EFSA (European Food Safety Authority) (2017) The European Union summary report
528 on trends and sources of zoonosis, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016.
529 EFSA Journal. 15: 1–228.
- 530 Elhariri M, Aleslamboly Y S, Elshater M A, Elhelw R, Refai M K. (2017) Rapid
531 *Salmonella* Detection in Different Food Samples by Direct-PCR. Biosci Res 14:1005–
532 1010
- 533 Foley S L, Lynne A M. (2018) Food animal-associated *Salmonella* challenges,
534 pathogenicity and antimicrobial resistance. J Anim Sci 86:E173–E187.
- 535 Giuriatti J, Stefani, L M, Brisola M C, Crecencio R B, Bitner D S, Faria G A. (2017)
536 *Salmonella* Heidelberg: Genetic profile of its antimicrobial resistance related to
537 extended spectrum blactamases (ESBLs). Microb Pathog 109:195–199.
- 538 Hoffmann M, Zhao S, Pettengill J, Luo Y, Monday S R, Abbott J, Ayers S L, Cinar H
539 N, Muruvanda T, Li C, Allard M W, Whichard J, Meng J, Brown E W, McDermott P F.
540 2014. Comparative genomic analysis and virulence differences in closely related
541 *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolates from humans, retail meats, and
542 animals. Genome Biol Evol 6:1046–1068.

- 543 Jeon, H Y, Seo, K W, Kim, Y B, Kim, D K , Kim, S W, & Lee, Y. J.
544 (2018). Characteristics of third-generation cephalosporin-resistant *Salmonella* from
545 retail chicken meat produced by integrated broiler operations. Poultry
546 Science. doi:10.3382/ps/pey514
- 547 Keefer, A B, Xiaoli, L, M'ikanatha, N M, Yao, K, Hoffmann, M, Dudley, E G. (2019)
548 Retrospective whole-genome sequencing analysis distinguished PFGE and drug-
549 resistance-matched retail meat and clinical *Salmonella* isolates. Microbiology; 165(3):
550 270-286.
- 551 Kudirkiené E, Cohn MT, Stabler RA, Strong PCR, Serniene L, Wren BW, Nielsen EM,
552 Malakauskas M, Brondsted L. 2012. Phenotypic and genotypic characterizations of
553 *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler meat production process. Curr
554 Microbiol, 65(4):398-406.
- 555 Li, J, Feng, J, Ma, L, de la Fuente Núñez, C, Gölz, G, & Lu, X. (2017) Effects of meat
556 juice on biofilm formation of *Campylobacter* and *Salmonella*. International Journal of
557 Food Microbiology, 253, 20–28.
- 558 Lim, S K, Nam, H M, Lee, H S, Kim, A R, Jang, G C; Jung, S C; Kim, T S. (2013)
559 Prevalence and characterization of apramycin-resistant *Salmonella* enterica serotype
560 Typhimurium isolated from healthy and diseased pigs in Korea during 1998 through
561 2009. J Food Prot; 76(8): 1443-6.
- 562 Lynne, A M, Rhodes-Clark, B, Bliven, K, Zhao, S, Foley, S. (2008) Antimicrobial
563 resistance genes associated with *Salmonella* enterica serovar newport isolates from food
564 animals. Antim Ag Chem, v. 52, n. 1, p. 353-356.
- 565 Lucca, V, Borges, K A, Furian, T Q, Borsoi, A, Pippi Salle, C T, Moraes, H L S,
566 Nascimento, V P (2019). Influence of the norepinephrine and medium acidification in
567 the growth and adhesion of *Salmonella* Heidelberg isolated from poultry. Micr Pathog,
568 103799.
- 569 Melo, R T, Mendonça, E P, Monteiro, G P, Siqueira, M C, Pereira, C B, Peres, P A B
570 M, Fernandez, H, Rossi, D A . (2017) Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter*
571 *jejuni* biofilms. Front Microbiol 8:1-15.
- 572 Michael, G B, Butaye, P, Cloeckaert, A, Scwarz, S. (2006) Genes and mutations
573 conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. Microbes and Infection
574 8(7):1898-1914.
- 575 Nguyen H D N, Yuk H G. (2013). Changes in resistance of *Salmonella Typhimurium*
576 biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. Food Control,
577 29(1):236- 432.
- 578 Noh, Eun Bi, Kim, Yeong Bin, Jeon, Hye Young, Seo, Kwang Won, Son, Se
579 Hyun, Lee, Young Ju. (2019) Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity

- 580 of *Salmonella* Serotypes Recovered from Edible Pork Offal from Korea. *Microb Drug*
581 *Resist* ; 25(10): 1514-1520.
- 582 Ohsumi T, Takenaka S, Wakamatsu R, Sakaue Y, Narisawa N, Senpuku H, Okiji T.
583 (2015) Residual structure of *Streptococcus mutans* biofilm following complete
584 disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm re-development. *PLOS*
585 *ONE*. 10:e0116647.
- 586 Pereira, A A. Estudo da atividade bactericida de óleos essenciais sobre células
587 planctônicas e sésseis de *Salmonella* spp. 2014, 94p. Tese (Doutorado em
588 Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 94p. 2014.
- 589 Pfuntner, A. Sanitizers and Disinfectants: The Chemicals of Prevention. *Food Safety*
590 *Magazine*, august/September, 2011. Disponível em:
591 <[http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/augustseptember-2011/](http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/augustseptember-2011/sanitizers-and-disinfectants-the-chemicals-of-prevention/)
592 [sanitizers-and-disinfectants-the-chemicals-of-prevention/](http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/augustseptember-2011/sanitizers-and-disinfectants-the-chemicals-of-prevention/)>.
- 593 Piras F, Fois F, Consolati S G, Mazza R, Mazzette R. (2015) Influence of temperature,
594 source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig
595 slaughterhouses. *J. Food Prot* 8:1875-1878.
- 596 Rehman, M A, Hasted, T, Persau-Lachhman, M G, Yin, X, Carrillo, C, Diarra M S.
597 (2019) Genome Analysis and Multiplex PCR Method for the Molecular Detection of
598 Coresistance to Cephalosporins and Fosfomycin in *Salmonella enterica* Serovar
599 Heidelberg. *Journal of Food Protection* 82(11):1938–1949.
- 600 Rehman M A, Yin X, Persaud-Lachhman M G, Diarra M S. (2017) First detection of a
601 731 fosfomycin resistance gene, *fosA7*, in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg
602 isolated 732 from broiler chickens. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00410–e00417.
- 603 Cardoso, T R. (2019) *Salmonella* Minnesota isolados da cadeia de produção avícola:
604 genes de virulência, formação de biofilmes e inibição com biocidas. 2019. 77 f. Tese
605 (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em
606 Ciências Veterinárias, Uberlândia, 2019.
- 607 Ritter, A C, Bacciu, D, Santi, L, Silva, W O, Vainstein, M H, Rubino, S, Uzzau, S,
608 Tondo, E C. (2012) Investigation of *rpoS* and *dps* genes in sodium hypochlorite
609 resistance of *Salmonella* Enteritidis SE86 isolated from foodborne illness outbreaks in
610 southern Brazil. *J Food Prot* 75(3):437-42, 2012. doi: 10.4315 / 0362-028x.jfp-11-286
- 611 Stepanović S, Ćirković I, MIJAČ V, Švabić-Vlahović M. (2003) Influence of the
612 incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation
613 by *Salmonella* spp. *Food Microbiol* 20:339- 343.
- 614 Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. 2000. A modified
615 micro titer-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol*
616 *Methods*, 40(2):175–179.

- 617 Trabulsi, L R, Mimica, I M, Mimica, L M J. (2008) Características dos principais
618 grupos de antibacterianos: espectro de ação e indicações. In: Trabulsi, L. R.; Alterthum,
619 F. (Ed.). Microbiologia. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.87-91.
- 620 Van Houdt, R, Michiels, C W. (2010) Biofilm formation and the food industry, a focus
621 on the bacterial outer surface. J Appl Microbiol 109:1117–1131.
- 622 Voss-Rech, D, Kramer, B, Silva, V. S, Rebelatto, R, Abreu, P. G, Coldebella, A,
623 Silveira, C, Vaz, L. (2019) Longitudinal study reveals persistent
624 environmental *Salmonella* Heidelberg in Brazilian broiler farms. Vet Microb, 233:118-
625 123.
- 626
- 627
- 628
- 629
- 630
- 631
- 632
- 633
- 634
- 635
- 636
- 637
- 638
- 639
- 640
- 641
- 642
- 643
- 644
- 645
- 646
- 647
- 648
- 649
- 650

651

652

653

654 **Tabelas**

655 **Tabela 1. Contagens obtidas nos ensaios para análise de adesão nas duas cepas de *S. Heidelberg* em**
 656 **diferentes condições de temperatura após 2 horas de incubação.**

Meios	Média das contagens \pm desvio padrão (Log UFC/mL)			
	Inóculo inicial	4°C	25°C	37°C
TSB	3,22 \pm 0,29 a	3,99 \pm 0,21 a	4,05 \pm 0,12 b	4,81 \pm 0,33 b
TSB + CJ	3,25 \pm 0,32 a	3,74 \pm 0,12 a	4,64 \pm 0,25 b	4,86 \pm 0,43 b

657 Letras diferentes indicam diferença significativa em relação ao inóculo inicial, *teste one way ANOVA*.

658

659

660 **Tabela 2. Classificação das cepas de *Salmonella Heidelberg*, de acordo com o Índice de Formação**
 661 **de Biofilmes IFB, nas diferentes condições testadas**

Temperatura	Identificação	TSB		TSB + 5% de <i>Chicken juice</i>	
		IFB	Classificação	IFB	Classificação
4°C	H 06	0,0312	Inexistente	0,0334	Inexistente
	H 18	0,0393	Inexistente	0,0323	Inexistente
25°C	H 06	0,1466	Moderado	0,3526	Forte
	H 18	0,1756	Moderado	0,3456	Forte
37°C	H 06	0,1585	Moderado	0,329	Forte
	H 18	0,1658	Moderado	0,4649	Forte

662

663

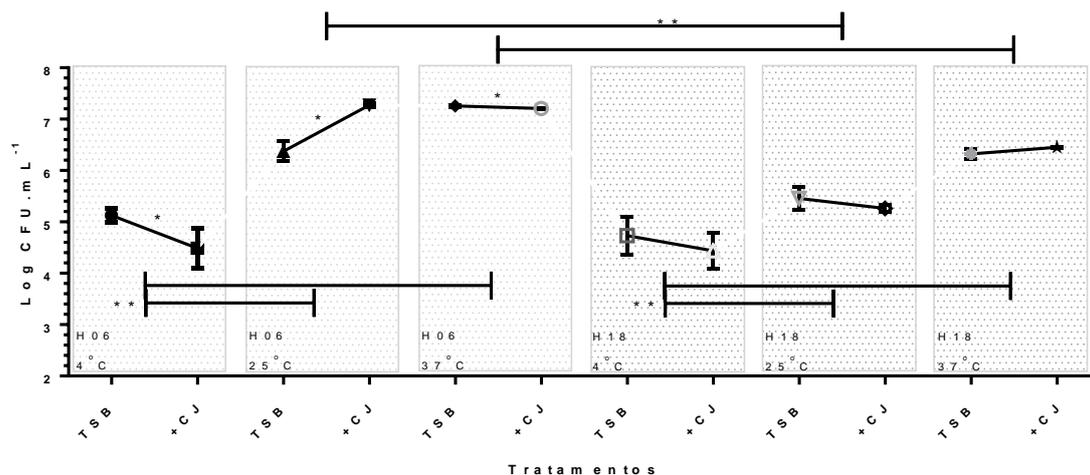
664 **Tabela 3. Contagens obtidas nos ensaios para análise de biofilmes nas duas cepas de *S. Heidelberg*.**

Meios	Média das contagens \pm desvio padrão (Log UFC/mL)			
	Inóculo inicial	4°C	25°C	37°C
TSB	3,22 \pm 0,29 a	4,895 \pm 0,35 b	5,825 \pm 0,51 c	6,471 \pm 0,49 c
TSB + CJ	3,25 \pm 0,32 a	4,456 \pm 0,35 b	6,294 \pm 0,73 c	6,529 \pm 0,41 c

665 Letras diferentes indicam diferença significativa, teste *one way ANOVA*.

666

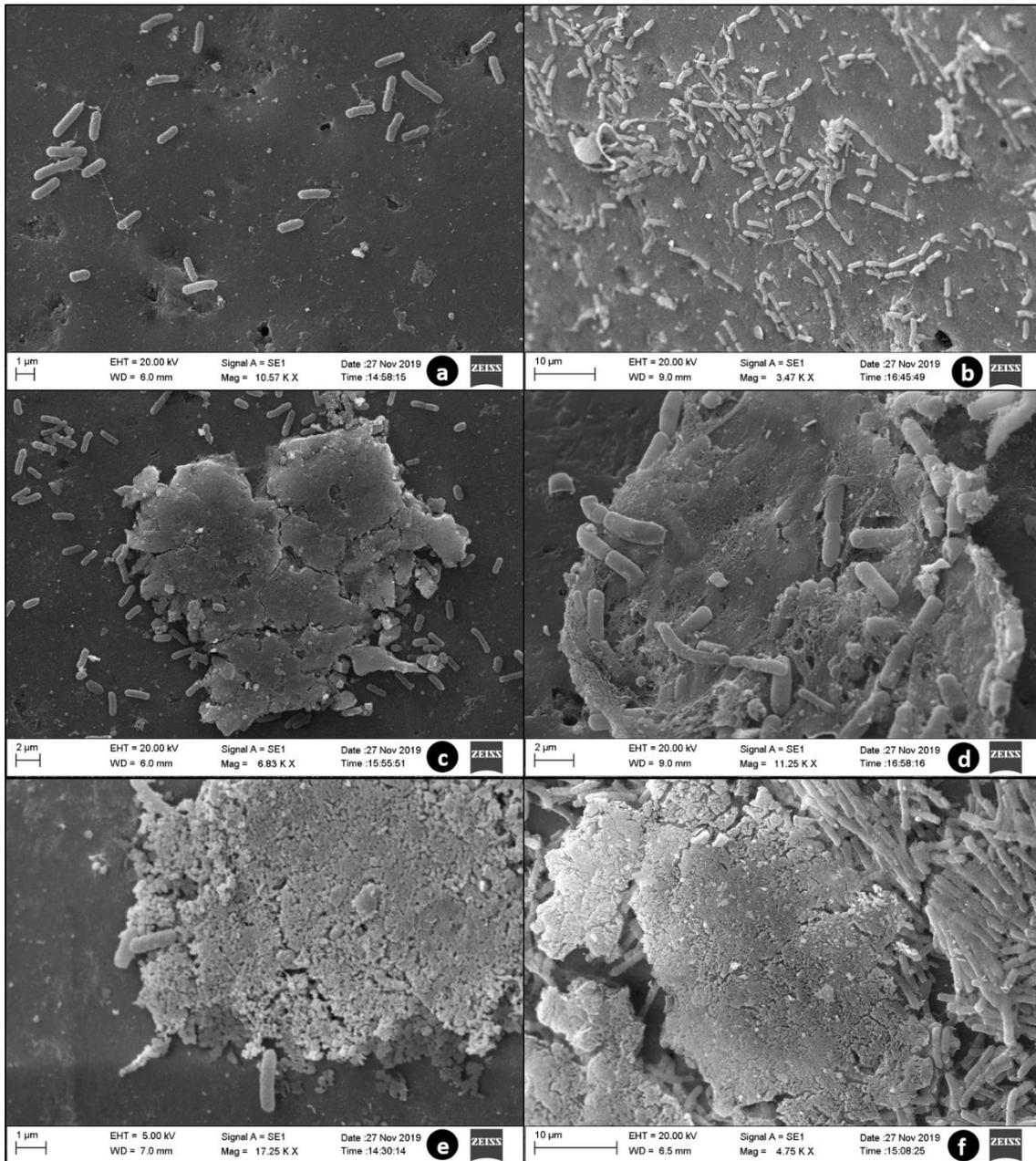
667



668
669

670 **Figura 1: Gráfico demonstrando os valores médios obtidos nas contagens de biofilmes de duas**
 671 **cepas de *S. Heidelberg* tratados com os TSB e TSB+CJ, nas temperaturas de 4, 25 e 37°C. Barras**
 672 **de erros indicam o desvio padrão para as médias das contagens obtidas para cada cepa nas três**
 673 **repetições. * p<0,05; ** p<0,01 usando teste *T student* para as contagens nas amostras do mesmo**
 674 **tratamento.**

675
676

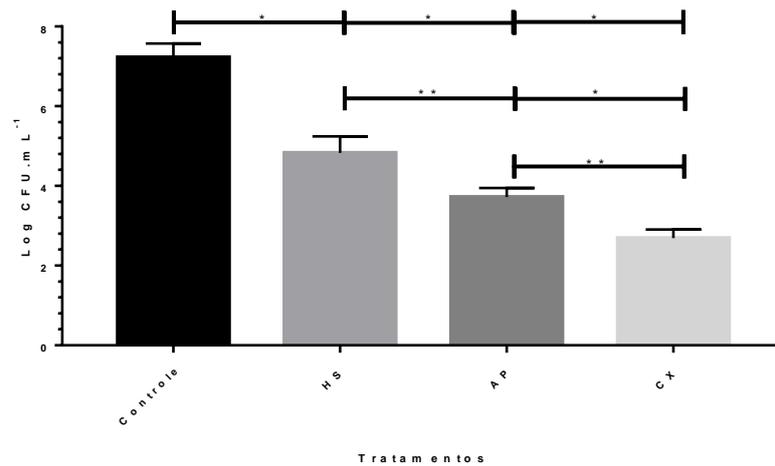


677

678 **Figura 2. Imagens de MEV para as duas cepas de *S. Heidelberg* nas temperaturas de 4°C (a, b),**679 **25°C (c, d) e 37°C (e, f) em TSB.**

680

681



682

683 **Figura 3. Gráfico das contagens dos biofilmes de ambas as cepas de *S. Heidelberg* (log de UFC.mL⁻¹) no controle e mantidos durante 15 minutos em solução de ácido peracético 0,8% (AP),**684 **hipoclorito de sódio 1% (HS) e clorexidina 1% (CX). * p<0,0001; ** p<0,001 usando *one way Anova***685 **para as contagens entre os tratamentos.**

686

1 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2

3 Cepas multirresistentes e virulentas no gênero *Salmonella* spp.
4 representam o cenário atual e sinalizam os desafios para saúde pública e
5 saúde animal. A recombinação gênica, a pressão de seleção ambiental e
6 aquisição de bombas de efluxo para eliminação de antibacterianos
7 proporcionam tais características à *Salmonella* Heidelberg.

8 Foram encontradas cepas resistentes á colistina, á ceftriaxona, á
9 amoxicilina com clavulanato e á ciprofloxacina, e, no sequenciamento genético
10 de duas cepas, foram encontrados oito genes de resistência para cinco classes
11 diferentes de antibacterianos: beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina,
12 sulfonamidas e fosfomicina, evidenciando a necessidade de controle e
13 vigilância destas cepas resistentes na cadeia de produção de frango de corte.
14 Todas as cepas analisadas neste estudo possuíam os genes *ompC*, *invA*,
15 *sodC*, *avrA*, *lpfA* e *agfA*, caracterizando a possibilidade de infecções graves em
16 humanos e com sinais clínicos severos.

17 Em relação a capacidade de formação de biofilmes, as temperaturas de
18 25 e 37°C favoreceram o desenvolvimento destas estruturas por *Salmonella*
19 Heidelberg e, com a suplementação de *chicken juice* no meio de cultura, o
20 biofilme formado foi superior. No ambiente industrial de abate de frango de
21 corte, condições ambientais similares são encontradas e devem ser avaliadas
22 pelos programas de autocontrole das empresas para minimizar os riscos de
23 contaminação ao produto final. Para isso, os procedimentos de higienização
24 devem ser realizados corretamente e de forma eficaz, evitando assim doses
25 subletais que conseqüentemente culminem em adaptação das cepas aos
26 agentes biocidas, principalmente ao hipoclorito de sódio.

27 **REFERÊNCIAS**

28

29 AARESTRUP, F. M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals:
30 principles and limitations. **Journal of Veterinary Medicine. B-Infectious**
31 **Diseases and Veterinary Public Health**, v. 51, n. 8-9, p. 380-388, 2004.

32

33 ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de
34 resistência. In: TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu; 2008. p.
35 79-85.

36

37 ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2016**.

38 Disponível em:

39 [http://abpabr.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_](http://abpabr.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf)
40 [abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf](http://abpabr.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf). Acesso em: 12 set. 2019.

41

42 ABPA BR. Exportações de Carne de Frango Alcançam 4,1 Milhões de
43 Toneladas em 2018. Disponível em: [http://abpa-br.com.br/noticia/exportacoes-](http://abpa-br.com.br/noticia/exportacoes-de-carne-de-frangoalcanca-41-milhoes-de-toneladas-em-2018-2656)
44 [de-carne-de-frangoalcanca-41-milhoes-de-toneladas-em-2018-2656](http://abpa-br.com.br/noticia/exportacoes-de-carne-de-frangoalcanca-41-milhoes-de-toneladas-em-2018-2656). Acesso
45 em: 12 set.2019.

46

47 ALCAINE, S. D.; WARNICK, L. D.; WIEDMANN, M. Antimicrobial resistance in
48 nontyphoidal *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, v.70, n.3, p.780-790,
49 2007.

50

51 ARAVENA, C. et al. Caracterización de cepas clínicas y ambientales de
52 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg aisladas en Chile.
53 **Revista Médica de Chile**, v. 147, p. 24-33, 2019.

54

55 AHRENFELDT, J. et al. Bacterial whole genome-based phylogeny: construction
56 of a new benchmarking dataset and assessment of some existing methods.
57 **BMC Genomics**, v. 18, n. 19, 2017.

58

59 ATIKUR, R. et al. Isolation, Identification and Antibiotic Sensitivity Pattern of
60 *Salmonella* spp from Locally Isolated Egg Samples. **American Journal of Pure**
61 **and Applied Biosciences**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2019.

62

63 AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. **Biofilms in: health, environment, industry**. 1
64 ed. Porto: Publindústria, 2012. 396 p.

65

66 BEN-BARAK, Z. et al. The expression of the virulence-associated effector
67 protein gene *avrA* is dependent on a *Salmonella enterica*-specific regulatory
68 function. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 25-38,
69 2006.

70

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

75

- 76 BORGES, K. A. et al. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella*
77 Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. **Pesquisa Veterinária**
78 **Brasileira**, v. 33, p. 1416-1422, 2013.
- 79
80 BORGES, K. A. et al. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at
81 different temperature conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n.
82 1, p. 71-76, 2018.
- 83
84 BRASÃO, S.C. **Biofilmes de *Salmonella* Minnesota: formação, influência**
85 **da superfície, inibição por agentes químicos e importância do período**
86 **entre tratamentos**. 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências
87 Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.
- 88
89 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução –RDC**
90 **nº 12**, de 02 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil,
91 ANO DE PUBLICAÇÃO. Disponível em: [http://elegis.](http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144)
92 [anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144](http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144). Acesso em: 02/08/2019.
- 93
94 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).
95 **Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a**
96 **comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso**
97 **veterinário**. Instrução Normativa Nº 26, de 09 de julho de 2009. Diário Oficial
98 da União, Brasília, DF, Brasil, 2009.
- 99
100 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).
101 **Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico e**
102 **Controle de *Salmonella* sp. em carcaças de Frangos e Perus**. Instrução
103 Normativa Nº 70, de 06 de outubro de 2003. Diário Oficial da União, Brasília,
104 DF, Brasil, 2003.
- 105
106 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).
107 **Estabelece controle e monitoramento de *Salmonella* spp. nos**
108 **estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos**
109 **estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e**
110 **reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), com**
111 **objetivo de reduzir a prevalência desse agente e estabelecer um nível**
112 **adequado de proteção ao consumidor**. Instrução Normativa nº 20 de 21 de
113 Outubro de 2016. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 de Outubro de
114 2016a.
- 115
116 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Proibi,**
117 **em todo o território nacional, a importação e a fabricação da substância**
118 **antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico**
119 **melhorador de desempenho na alimentação animal**. Instrução Normativa
120 Nº45, de 22 de novembro de 2016. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil,
121 2016b.
- 122
123 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária
124 (ANVISA). **Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico**. Diário Oficial da
125 União, Brasília, DF, Brasil, ANO DE PUBLICAÇÃO. Disponível em:

- 126 http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/op
127 [as_web/modulo1/conceitos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/op). Acesso em: 14/10/2019.
- 128
- 129 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária
130 (ANVISA). **Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos**.
131 Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil, 2012. Disponível em:
132 [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b362](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES)
133 [6d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES)
134 [mar2012.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES). Acesso em: 12/09/2019.
- 135
- 136 BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de**
137 **Notificação/Secretaria de Vigilância à Saúde Sinan/SVS. Doenças**
138 **Transmitidas por Alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil,
139 2015. Disponível em:
140 [http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta---](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta---o-dados315-gerais-DTA-2015.pdf)
141 [o-dados315-gerais-DTA-2015.pdf](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta---o-dados315-gerais-DTA-2015.pdf). Acesso em: 08/09/2019.
- 142 BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Surtos de Doenças Transmitidas por**
143 **Alimentos no Brasil**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil, 2018.
144 Disponível em:
145 [http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf)
146 [Surtos-DTA-2018.pdf](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf). Acesso em: 08/10/2019
- 147
- 148 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária
149 (ANVISA). **Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico**. Brasília, 2007.
150 Disponível em:
151 <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/o
152 [pas_web/modulo1/conceitos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/o)>. Acesso em: 2 fev. 2020.
- 153
- 154 BRONOWSKI, C.; WINSTANLEY, C. Identification and distribution of accessory
155 genome DNA sequences from an invasive African isolate of *Salmonella*
156 Heidelberg. **FEMS Microbiology Letters**, v. 298, p. 29-36, 2009.
- 157
- 158 CAPPITELLI, F.; POLO, A.; VILLA, F.; Biofilm formation in food processing
159 environments is still poorly understood and controlled. **Food Eng. Rev.**, v.6,
160 p.29-42, 2014.
- 161
- 162 CARATTOLI, A. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase
163 producers. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 1, p. 117-123, 2008.
- 164
- 165 CARATTOLI, A. et al. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from
166 expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strain isolated in the
167 United States between 1996 and 1998. **Antimicrobial Agents and**
168 **Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1269-1272, 2002.
- 169
- 170 CARSON, C. et al. Ceftiofur-resistant *Salmonella* enterica serovar Heidelberg of
171 poultry origin – a risk profile using the Codex framework. **Epidemiology and**
172 **Infection**, v. 147, e296, p. 1–20, 2019.
- 173

- 174 CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Foodborne**
175 **Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance**
176 **Report for 2012 (Final Report)**. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health
177 and Human Services, CDC. 2014.
178
- 179 CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National**
180 **Enteric Disease Surveillance: Salmonella annual report, 2013**. Atlanta,
181 Georgia: U.S. CDC, 2013a. Disponível em:
182 <[https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/salmonella-annual-report-2013-](https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/salmonella-annual-report-2013-508c.pdf)
183 [508c.pdf](https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/salmonella-annual-report-2013-508c.pdf)> Acesso em: 15 set. 2019.
184
- 185 CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION..
186 **Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of**
187 **Campylobacter jejuni by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**.
188 PulseNet USA. CDC, 2013. The National Molecular Subtyping Network for
189 Foodborne Disease Surveillance.
190
- 191 CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Preliminary**
192 **Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted**
193 **Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance**
194 **Network (FoodNet): FoodNet 2017 Preliminary Data**. CDC, 2018. Disponível
195 em: <<https://www.cdc.gov/foodnet/reports/prelim-data-intro-2017.html>> Acesso
196 em: 26 ago. 2019.
197
- 198 CDC – CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate**
199 **outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked**
200 **to contacto with dairy calves (Final update)**, 2017. Disponível em:
201 <https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-11-16/index.html>. Acesso em 02 fev.
202 de 2020.
203
- 204 CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.
205 **Salmonella. Reports of selected Salmonella Outbreak Investigations**.
206 Atlanta, Georgia: U.S. CDC, 2015. Disponível em:
207 <<http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>> Acesso em: 15 set. 2019.
208
- 209 CHAMPION, O. L., et al. Comparative phylogenomics of the foodborne
210 pathogen *Campylobacter jejuni* reveals genetic markers predictive of infection
211 source.
212 **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**
213 **America**, v. 102, n. 44, p. 16043-16048, 2005.
214
- 215 CHENG, R. A.; EADE, C. R.; WIEDMANN, M. Embracing Diversity: Differences
216 in Virulence Mechanisms, Disease Severity, and Host Adaptations Contribute to
217 the Success of Nontyphoidal *Salmonella* as a Foodborne Pathogen. **Frontiers**
218 **in Microbiology**, v. 10, p. 1368, 2019.
219
- 220 CHIOU, C. S., et al. New multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar
221 Anatum clone, Taiwan, 2015-2017. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, p.
222 144–147, 2019.
223

- 224 CHITTICK, P., et al. Summary of National Reports of foodborn outbreaks
225 of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease
226 prevention. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 5, p. 1150-1153, 2006.
227
- 228 CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI, 2019.
229 In: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed.
230 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019. CLSI supplement
231 M100.
232
- 233 CORCORAN, M., et al. Commonly used disinfectants fail to eradicate
234 *Salmonella* enterica biofilm from food contact surface materials. **Applied and**
235 **Environmental Microbiology**, v. 80, p. 1507-1514, 2014.
236
- 237 CREMIEUX, A.F.J.; DAVIN-REGLI, A. Methods of Testing Disinfectants. In:
238 BLOCK, S.S. (Ed.). **Disinfection, Sterilization, and Preservation**. 5 ed.
239 Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2000, p. 1305-1325.
240
- 241 DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella*
242 with the Intestinal Mucosa. **Clinical Microbiology Reviews** [online], v. 12, n. 3,
243 p. 405-428, 1999.
244
- 245 DENG, X., et al. Comparative analysis of subtyping methods against a whole-
246 genome sequencing standard for *Salmonella* enterica serotype enteritidis.
247 **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 212–218, 2015.
248
- 249 DICKEL, E.L. **Utilização da técnica microbiológica convencional, reação**
250 **em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no**
251 **monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle**
252 **higiênico sanitário do processo de abate**. 2004. 137 f. Tese (Doutorado em
253 Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade
254 Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
255
- 256 DONAGHY, J. A., et al. Relationship of Sanitizers, Disinfectants, and Cleaning
257 Agents with Antimicrobial Resistance. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 5,
258 p. 889-902, 2019.
259
- 260 DORR, P. M., et al. Longitudinal study of *Salmonella* dispersion and the role of
261 environmental contamination in commercial swine production systems. **Applied**
262 **and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 1478-1486, 2009.
263
- 264 DUTIL, L., et al. Ceftiofur resistance in *Salmonella* enterica serotype Heidelberg
265 from chicken meat and humans. **Emerging Infectious Disease**, v. 16, p. 48-54,
266 2010.
267
- 268 EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **The European Union**
269 **summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and**
270 **food-borne outbreaks in 2016**. EFSA, 2017. Disponível em:
271 <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5500>> Acesso em: 17 set.
272 2019.
273

- 274 EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **European Food Safety**
275 **Authority (EFSA). *Salmonella* control in poultry flocks and its public**
276 **health impact.** EFSA, 2019. Disponível em:
277 <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5596>>
278 Acesso em: 05 ago. 2019.
279
- 280 ETTER, A. J., et al. *Salmonella* enterica subsp. *enterica* serovar Heidelberg
281 food isolates associated with a salmonellosis outbreak have enhanced stress
282 tolerance capabilities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85,
283 e01065-19, 2019.
284
- 285 EUCAST – EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY
286 TESTING. **EUCAST Reading guide for broth microdilution. Version 1.0.**
287 EUCAST, 2019. Disponível em:
288 <[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_doc](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Reading_guide_BMD_v_1.0_2019.pdf)
289 [uments/2019_manuals/Reading_guide_BMD_v_1.0_2019.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Reading_guide_BMD_v_1.0_2019.pdf)> Acesso em: 19
290 set. 2019
291
- 292 EU - EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL.
293 **EU protocol for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in**
294 **human *Salmonella* and *Campylobacter* isolates.** Stockholm: The Centre;
295 2014.
296
- 297 FALAGAS, M. E. et al. Fosfomycin: Use beyond urinary tract and
298 gastrointestinal infections. **Clinical Infectious Disease**, v.46, n.7, p.1069-1077,
299 2008.
300
- 301 FARIA, A. M. **Principais sorotipos de *Salmonella enterica* isolados em**
302 **suínos.** 2013. 41 f. Seminário de Doutorado. Universidade Federal de Goiás.
303 2013.
304
- 305 FIGUEIREDO, R., et al. Resistência a antibióticos em isolados de *Salmonella*
306 *enterica* em alimentos de origem animal. **Revista Portuguesa de Ciências**
307 **Veterinárias.** v. 108, p. 39-43, 2013.
308
- 309 FITZGERALD, C. et al. Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter*
310 *jejuni* during an outbreak involving a food handler. **Journal of Clinical**
311 **Microbiology.** v. 39, n. 7, p. 2386-2390, 2001.
312
- 313 FOLSTER, J. P., et al. Characterization of multidrug-resistant *Salmonella*
314 *enterica* serovar Heidelberg from a ground turkey-associated outbreak in the
315 United States in 2011. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p.
316 3465-3466, 2012a.
- 317 FOLSTER, J. P., et al. Characterization of extended-spectrum cephalosporin-
318 resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from food animals,
319 retail meat, and humans in the United States 2009. **Foodborne Pathogens**
320 **and Disease**, v. 9, p. 638-645, 2012b.

- 321 FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. National antimicrobial
322 resistance monitoring system - enteric bacteria (NARMS): 2007 executive
323 report. U.S. Department of Health and Human Services, U.S. FDA, Silver
324 Spring, MD, 2010.
- 325
326 FREDRIKSSON-AHOMAA, M. Wild boar: a reservoir of foodborne zoonoses.
327 **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 16, n. 3, p. 153–165, 2019.
- 328
329 GAY, K. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of
330 *Salmonella enterica*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 3, p. 297–304,
331 2006.
- 332
333 GERSTEL, U.; ROMLING, U. The csgD promoter, a control unit for biofilm
334 formation in *Salmonella* Typhimurium. **Research in Microbiology**, v. 154, n.
335 10, p. 659–667, 2003.
- 336
337 GIBSON, D. L., et al. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by
338 AgfD and important for environmental persistence. **Journal of Bacteriology**, v.
339 188, p. 7722-7730, 2006.
- 340
341 GIERALTOWSKI, L., et al. National Outbreak of Multidrug Resistant *Salmonella*
342 Heidelberg Infections Linked to a Single Poultry Company. **PLoS ONE**, v. 11, n.
343 9, e0162369, 2016.
- 344
345 GILCHRIST, C. A., et al. Whole-genome sequencing in outbreak analysis.
346 **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, p. 541–563, 2015.
- 347
348 GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and
349 interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection,**
350 **Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 866-875, 2010.
- 351
352 GOGOI, P., et al. Efficacy of pulsedfield gel electrophoresis and repetitive
353 element sequence-based pcr in typing of *Salmonella* isolates from Assam,
354 **Indian Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, e02043-e0204317, 2018.
- 355
356 GOUVEIA, M. A. D. C.; LINS, M. T. C.; SILVA, G. A. P. Acute diarrhea with
357 blood: diagnosis and drug treatment. *Jornal de Pediatria (Rio J)*, 2019.
- 358
359 GUIBOURDENCHE, M., et al. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-
360 Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 26-
361 29, 2010.
- 362
363 GUPTA, R. et al. Carriage of Class 1 integrons and molecular characterization
364 of int1 gene in multiridrug-resistant *Salmonella* spp. isolates from broilers.
365 **Veterinary World**, v. 12, n. 4, p. 609-613, 2019.
- 366
367 GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella*
368 serovars World Health Organization Collaborating Center for Reference and
369 Research on Salmonella (9th ed.): Institut Pasteur, Paris. 2007.

- 370 HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS E.M.F. Prevalência de sorovares de
371 *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17,
372 n. 2, p. 55-62,1997.
- 373
374 HU, L., KOPECKO, D. J. Typhoid *Salmonella*. In: MILLOTIS, M. D.; BIER, J.W.
375 (Ed.). **International handbook of foodborne pathogens**. New York: Marcel
376 Dekker, Inc; p. 151–165, 2003.
- 377
378 IBRAHIM, G. M. and MORIN, P.M. *Salmonella* Serotyping Using Whole
379 Genome Sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2993, 2018.
- 380
381 JAJERE, S. M. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the
382 pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance
383 including multidrug resistance. **Veterinary World**, v. 12, p. 504-521, 2019.
- 384
385 JAWAD, A. A.; AL-CHARRAKH, A. H.;TARISH, H. R. Outer membrane protein
386 C (ompC) gene as target for diagnosis of *Salmonella* spp. using polymerase
387 chain (PCR) reaction. **AL-Qadisiya Journal of Veterinary Medicine Sciences**,
388 v. 15, n. 1, p. 1-5, 2016.
- 389
390 JONES, T. F., et al. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype.
391 **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, p. 109-114, 2008.
- 392
393 KASNOWSKI, M.C. et al. Formação de biofilmes na indústria de alimentos e
394 métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de**
395 **Medicina Veterinária**, v. 8, n. 15, 2010.
- 396
397 KICH, J. D.; CARDOSO, M. Salomelose In: SOBESTIANSKY, Y.;
398 BARCELLOS, D., **Doenças dos suínos**. Goiânia: Canône Editorial.
399 Bacterioses. p. 257-264, 2012.
- 400
401 KONATÉ, A., et al. Epidemiology and Resistance Phenotypes of *Salmonella*
402 spp. Strains Responsible for gastroenteritis in Children Less Than Five Years of
403 Age in Ouagadougou, Burkina Faso. **Archives of Clinical Microbiology**,
404 v.10, n. 2, p. 90, 2019.
- 405
406 KOSER, C. U., et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in
407 diagnostic and public health microbiology. **PLoS Pathogens**, v. 8, e1002824,
408 2012.
- 409
410 LABRIOLA, J. M.; ZHOU, Y.; NAGAR, B. Structural Analysis of the Bacterial
411 Effector AvrA Identifies a Critical Helix Involved in Substrate Recognition.
412 **Biochemistry**, v. 57, p. 4985-4996, 2018.
- 413
414 LAMAS, A. et al. A comprehensive review of non-enterica subspecies
415 of *Salmonella enterica*. **Microbiological Research**, v. 206, p. 60-73, 2018.
- 416
417 LI, W. W. et al. Analysis of drug resistance pattern and genes of *Salmonella*
418 spp. isolated from human infections in Anhui Province. **Chinese journal of**
419 **preventive medicina**, v.54, n.2, p.187-191, 2020.

- 420 LIMA, T.; DOMINGUES, S.; Da SILVA, G. J. Plasmid-mediated colistin
421 resistance in *Salmonella enterica*: a review. **Microorganisms**, v. 7, e55, 2019.
422
- 423 LIN, D.; CHEN, S. First detection of conjugative plasmid-borne fosfomycin
424 resistance gene fosA3 in *Salmonella* isolates of food origin. **Antimicrobial**
425 **Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1381-1383, 2015.
426
- 427 LYNNE, A. M. et al. Antimicrobial resistance genes associated with
428 *Salmonella enterica* sorovar newport isolates from food animals.
429 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 353-356, 2008.
430
- 431 LYNNE, A. M. et al. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella*
432 *enterica* serotype Heidelberg isolated from food animals. **Foodborne**
433 **Pathogens Disease**, v.6m p.207–215, 2009.
434
- 435 MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity,
436 action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179,
437 1999.
438
- 439 MELETIS, G. and SKOURA, L. Polymyxin resistance mechanisms: from
440 intrinsic resistance to Mcr genes. **Recent Patents on Anti-Infective Drug**
441 **Discovery**, v. 13, p. 198–206, 2018.
442
- 443 MELO, R. T., et al. Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni*
444 biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 15, 2017.
445
- 446 MENDONÇA, E. P. **Características de virulência, resistência e diversidade**
447 **genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública,**
448 **isolados de frangos de corte no Brasil.** 2016. 146 f. Tese (Doutorado em
449 Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.
450
- 451 MENDONÇA, E. P. et al. Spread of the serotypes and antimicrobial resistance in
452 strains of *Salmonella* spp. isolated from broiler. **Brazilian Journal of**
453 **Microbiology**, v. 1, p. 1-8, 2019.
454
- 455 MICHAEL, G. B. et al. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance
456 in *Salmonella*: an update. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1898-1914,
457 2006.
458
- 459 MICHAILIDIS, G.; THEODORIDIS, A.; AVDI, M. Effects of sexual maturation
460 and *Salmonella* infection on the expression of Toll-like receptors in the chicken
461 vagina. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 3-4, p. 234-241, 2011.
462
- 463 MILLEZI, A. F. **Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por**
464 ***Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.** 2012. 112 f. Tese (Doutorado em
465 Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
466
- 467 MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial
468 biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends in Microbiology**, v. 17,
469 p. 73–87, 2009.

- 470
471 MOORE, M. M., et al. Evaluation of a Bead-Based *Salmonella* Molecular
472 Serotyping Method for *Salmonella* Isolated from Food and Environmental
473 Samples. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 11, p. 1973–1987, 2019.
474
- 475 MOURÃO, J., et al. Tolerance to multiple metal stressors in emerging non-
476 typhoidal MDR *Salmonella* serotypes: a relevant role for copper in anaerobic
477 conditions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2147-57,
478 2016.
479
- 480 NAKAO, J. H., et al. Unusually high illness severity and short incubation periods
481 in two foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections with potential
482 coincident *Staphylococcus aureus* intoxication. **Epidemiology and Infection**, v.
483 146, p. 19-27, 2018.
484
- 485 NASCIMENTO, V.P., et al. Identificação de sorovares de *Salmonella* em cortes
486 e carcaças de frango. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA,**
487 **19.**, 1997, Rio de Janeiro, RJ. Anais... Rio de Janeiro: 1997. p. 287-287.
488
- 489 NARMS – NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING
490 SYSTEM FOR ENTERIC BACTERIA: **Annual Retail Meat Report: CDC, 2013.**
491 Disponível em:
492 <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/ucm334828.htm>> Acesso em:
493 18 out. 2019.
494
- 495
496 NISAR, M., et al. Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of
497 *Salmonella* Heidelberg isolated from chickens and turkeys in the midwestern
498 United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, p. 370-
499 375, 2017.
500
- 501 OTTO, S. J., et al. Estimating the number of human cases of ceftiofur-resistant
502 *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in Quebec and Ontario, Canada.
503 **Clinical and Infectious Diseases**, v. 59, p. 1281-1290, 2014.
504
- 505 OBE, T., et al. Homologous stress adaptation, antibiotic resistance, and biofilm
506 forming ability of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg ATCC8326 on
507 different food-contact surfaces following exposure to sublethal chlorine
508 concentrations¹, **Poultry Science**, v. 97, n. 3, p. 951–961, 2018.
509
- 510 OCHOA, I. M. F.; RODRIGUEZ, A. V. Mecanismos moleculares de
511 patogenicidad de *Salmonella* sp. **Review Article**, v. 47, n. 1-2, p. 25-42, 2005.
512
- 513 OLIVEIRA, A. P. de., et al. *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de
514 patogenicidade. **Enciclopédia biosfera**, v. 9, n. 6, p. 1947-1972, 2013.
515
- 516 OLORUNSOLA, R. A. et al. *Salmonella* organism transmission in hatching
517 broiler eggs. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 2, n. 10, p.
518 13-16, 2012.
519

- 520 PARISI, A., et al. Health Outcomes from Multidrug
521 Resistant *Salmonella* Infections in High-Income Countries: A Systematic
522 Review and Meta-Analysis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 7, p.
523 428-436, 2018.
- 524
525 PARRA-SUESCUN, J.; AGUDELO-TRUJILLO, J. H.; LOPEZ-HERRERA, A.
526 *Escherichia coli* lipopolysaccharides decrease molecular expression and activity
527 of disaccharidases and aminopeptidases in weaned pigs. **Revista Colombiana**
528 **de Ciencias Pecuarias**, v. 28, n. 1, p. 64-73, 2015.
- 529
530 PEREIRA, A. de A. **Estudo da atividade bactericida de óleos essenciais**
531 **sobre células planctônicas e sésseis de *Salmonella* spp.** 2014. 94 f. Tese
532 (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras,
533 Lavras. 2014.
- 534
535 PERIN., A.P.; MARTINS, B.T.F.; BARREIROS, M.A.B. et al. Occurrence,
536 quantification, pulse types, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* sp.
537 isolated from chicken meat in the state of Paraná, Brazil. **Brazil Journal of**
538 **Microbiology**, 2019.
- 539
540 PLUMMER, P. J. *luxS* and quorum-sensing in *Campylobacter*. **Frontiers in**
541 **Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 1-9, 2012.
- 542
543 PFUNTNER, A. Sanitizers and Disinfectants: The Chemicals of Prevention.
544 **Food Safety Magazine**, 2011. Disponível em:
545 <[http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/augustseptember-](http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/augustseptember-2011/sanitizers-and-disinfectants-the-chemicals-of-prevention/)
546 [2011/](http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/augustseptember-2011/sanitizers-and-disinfectants-the-chemicals-of-prevention/)
547 [sanitizers-and-disinfectants-the-chemicals-of-prevention/](http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/augustseptember-2011/sanitizers-and-disinfectants-the-chemicals-of-prevention/)>. Acesso em: 12 out.
548 2019.
- 549
550 RASFF – RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED. **The rapid alert**
551 **system for food and feed**. Annual Report of European Commission. RASFF,
552 2012. Disponível
553 em: <[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2012_en.pdf)
554 [012_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2012_en.pdf) >. Acesso em: 06 ago. 2019.
- 555
556 RASFF – RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED. **Notifications by**
557 **product category and notifying country**. European Commission. RASFF,
558 2019. Disponível em: <[https://webgate.ec.europa.eu/rasff-](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList)
559 [window/portal/?event=searchResultList](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList)> Acesso em: 17 nov. 2019.
- 560
561 REZENDE, C. S. M., et al. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de
562 frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a
563 antimicrobianos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, p.
564 199-203, 2005.
- 565
566 ROSSI, D. A., et al. Biofilms of *Salmonella* and *Campylobacter* in the poultry
567 industry. In: MANAFI, M. **Poultry Science**, 2016.
- 568

- 569 RUBIO, M. S., et al. Development of a multiplex qPCR in real time for
570 quantification and differential diagnosis of *Salmonella* Gallinarum
571 and *Salmonella* Pullorum, **Avian Pathology**, v. 46, n. 6, p. 644-651, 2017.
572
- 573 SILVA, P. L. A. P. A., et al. Biofilm Formation in Different *Salmonella* Serotypes
574 Isolated from Poultry. **Current Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 124-129, 2019.
575
- 576 SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria*
577 *monocytogenes* to stainless steel, rubber, and polytetrafluorethylene: The
578 influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food**
579 **Microbiology**, v. 17, n. 24, p. 439-447, 2000.
580
- 581 SIVARAMALINGAM, T., et al. A temporal study of *Salmonella* serovars from
582 environmental samples from poultry breeder flocks in Ontario between 1998
583 and 2008. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 77, p. 1-11, 2013.
584
- 585 SOLANO, C. et al. Genetic analyses of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation:
586 critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 793- 808, 2002.
587
- 588 SOUZA, I. D. P. Heidelberg é a salmonela da vez. **O presente rural -**
589 **Avicultura, corte e postura**. p.28, 2015.
590
- 591 STEENACKERS, H., et al. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence,
592 structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, n. 2,
593 p. 502-531, 2012.
- 594 TACK, D. M., et al. Preliminary Incidence and Trends of Infections with
595 Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases
596 Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2015–2018. **Morbidity and**
597 **Mortality Weekly Report**, v. 68, n. 16, p. 369-373, 2019.
- 598
- 599 TRABULSI, L. R.; MIMICA, I. M.; MIMICA, L. M. J. Características dos
600 principais grupos de antibacterianos: espectro de ação e indicações. In:
601 TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo:
602 Atheneu, 2008. p. 87-91.
603
- 604 VAN ASTEN, A. J. A. M.; KONINKX, J. F. J. G.; VAN DIJK, J. E. *Salmonella*
605 entry: M cells versus absorptive enterocytes. **Veterinary Microbiology**, v. 108,
606 p. 149-152, 2005.
607
- 608 VAN HOUDT, R. V.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry,
609 a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v.
610 109, n. 4, p.1117-1131, 2010.
611
- 612 VIRTO, R., et al. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in
613 the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. **Applied and**
614 **Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5022–5028, 2005.
615

- 616 WASSENAAR, T. M.; NEWELL, D. G. Genotyping of *Campylobacter* spp.
617 **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2000.
618
- 619 WATTIAU, P., BOLAND, C., BERTRAND, S. Methodologies for *Salmonella*
620 *enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. **Applied**
621 **and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 7877–7885, 2011.
622
- 623 WEBBER, B., et al. Detection of virulence genes in *Salmonella* Heidelberg
624 isolated from chicken carcasses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**
625 **de São Paulo**, v. 61, e36, 2019.
626
- 627 WHITE, D. G.; FEDORKA-CRAY, P.; CHILLER, T. C. The National
628 Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). **NMC Annual Meeting**
629 **Proceedings**, Florida, p. 56-60, 2006.
630
- 631 WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Critically Important**
632 **Antimicrobials for Human Medicine**. WHO, 2011. 3rd rev. Geneva,
633 Switzerland.
634
- 635 WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella**. WHO, 2015.
636 Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acesso em: 21 nov
637 2019.
638
- 639 WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Typhoid vaccines: WHO position
640 paper. **WHO The Weekly Epidemiological Record**, v. 13, n. 93, p. 153–72,
641 2018.
642
- 643 YOO, A. Y., et al. Role of sigma factor E in regulation of *Salmonella* Agf
644 expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.
645 430, p. 131-136, 2013.
646
- 647 YORK, A. Lysozyme protects bacteria from β -lactams. **Nature Reviews**
648 **Microbiology**, v. 16, p. 183, 2018.
649
- 650 YOUN, S. Y. et al. Development of a real-time multiplex PCR assay with
651 propidium monoazide treatment for simultaneous detection of live *Salmonella*,
652 and *Salmonella* Enteritidis, in: S. Typhimurium, S. Pullorum, S. Gallinarum
653 (Eds.), Rinse Water of Chicken Carcasses. **Food Analytical Methods**, v. 10, p.
654 1681–1689, 2017.
655
- 656 YUKI, K. E., et al. CYRI/FAM49B negatively regulates RAC1-driven cytoskeletal
657 remodelling and protects against bacterial infection. **Nature Microbiology**,
658 v. 4, p. 1516–1531, 2019.
659
- 660 ZIECH, R.E., et al. Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers
661 in *Salmonella* sp. isolated from Brazilian poultry processing plants. **Food**
662 **Science and Technology**, v. 68, p. 85-90, 2016.
663
664