

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

DISSEMINAÇÃO DE *Salmonella* sp NA CADEIA
PRODUTIVA DO FRANGO DE CORTE

Eliane Pereira Mendonça

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS – BRASIL

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

DISSEMINAÇÃO DE *Salmonella* sp NA CADEIA
PRODUTIVA DO FRANGO DE CORTE

Eliane Pereira Mendonça

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Área de Concentração: Saúde Animal).

Uberlândia - MG

Agosto - 2011

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ELIANE PEREIRA MENDONÇA - Nascida em Uberlândia, Estado de Minas Gerais, em 28 de junho de 1985, filha de Abadio José Mendonça e Maria Pereira Fernandes Mendonça. Médica Veterinária, graduada em 19 de julho de 2008 pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Durante a graduação foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas do Ensino de Graduação (PIBEG) no período de junho de 2005 a fevereiro de 2007 e, posteriormente, foi bolsista do Programa de Bolsas Institucionais de Iniciação Científica (FAPEMIG) de março de 2007 à fevereiro de 2008. Em 2009 iniciou o Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Saúde Animal, no qual foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), de março de 2009 a fevereiro de 2011.

"Todo mundo ama um dia, todo mundo chora,
um dia a gente chega, no outro vai embora.
Cada um de nós compõe a sua história, cada ser em si
carrega o dom de ser capaz, e ser feliz..."

Almir Sater

À minha mãe, que acreditou nos meus sonhos.
Que me permitiu viver e ao mesmo tempo sonhar e
lutar para alcançar meus objetivos... incluindo este.
Embora não esteja presente (fisicamente) aqui hoje, sei que
em algum lugar está, de alguma forma, compartilhando
deste momento e da minha felicidade
pela conclusão de mais uma etapa na minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida, por guiar minhas escolhas e me confortar nas horas difíceis.

Às pessoas mais preciosas do mundo, meus pais, Abadio e Maria (*in memorian*), por me concederem a vida e pelo amor que me dedicaram. Sem o apoio incondicional e ensinamento de vocês talvez hoje não estivesse aqui.

À minha irmã, Elisângela, pelos conselhos, companheirismo e amizade. Pelas muitas noites de sono mal dormidas por causa da minha insistência em deixar a luz do quarto acesa durante meus momentos inconvenientes de estudo. Mil desculpas, mas foi por uma boa causa...rsrs

À minha querida avó, Luzia, por seu amor e dedicação. Pelas preocupações infinitas comigo e com todos sempre. Vozinha te amo!

À minha orientadora, prof^a. Daise, que é para mim um grande exemplo. Obrigada por todas as oportunidades, inclusive a de realizar este trabalho, no qual aprendi muito com você e com todos no laboratório. E também pela paciência durante a execução da pesquisa. Tenho certeza que hoje, mais que uma orientadora, tenho uma grande amiga. Obrigada por tudo “mami”.

À grande amiga Bia, que me ensinou muito durante todo esse tempo de mestrado. E mesmo com a correria do dia a dia, principalmente com o doutorado, sempre tinha um tempinho pra tirar uma dúvida ou ensinar algo novo.

Agradeço de modo especial a todos os amigos que foram importantes nos mais diferentes períodos de realização do projeto. As “florzinhas”, Rob, Let e Pri, que me acompanharam por mais tempo nessa caminhada. A amizade, companheirismo e ajuda de vocês foram essenciais. A Ceci e ao Gui, não

esquecendo de citar também os amigos que me acompanharam mais no final do trabalho, mas que nem por isso foram menos importantes, Carol, Bia, Dudu, Filipe, Raquel e Mariela. Obrigada a todos.

À funcionária do Labio, Tchesca, por ter dividido seu espaço de trabalho com todos os alunos para a realização dos mais diferentes projetos de pesquisa.

Aos amigos de faculdade, que mesmo com a distância, não deixaram de estar ao meu lado quando precisei. A irmãzinha do “core” Marilinha, ao Pablito, Daniela, Max, João Helder e Lirinha. A amizade e apoio de vocês também foram muito importantes para a realização deste trabalho, pois foram fundamentais para me encorajar e ter forças para enfrentar uma “fase muito difícil”. Muito obrigada por tudo!

Ao Audecir, responsável pelo controle de qualidade das plantas industriais estudadas, que sempre esteve à disposição para esclarecer nossas dúvidas no decorrer do estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo auxílio financeiro sem o qual seria impossível executar o projeto.

À Melzinha, minha companheira de quatro patas, muito fiel e amiga.

À todos os animais, incluindo aqueles utilizados nesta pesquisa, que me motivam a aprender cada vez mais, e ter orgulho da minha profissão.

Enfim, espero que todos se sintam agradecidos. E se por acaso acabei injustamente esquecendo de citar alguém, peço desculpas e expresso o meu mais profundo agradecimento a você.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.1.1 Objetivo Geral.....	3
1.1.2 Objetivos Específicos.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Caracterização do gênero <i>Salmonella</i>	4
2.2 Características epidemiológicas da <i>Salmonella</i>	5
2.3 <i>Salmonella</i> sp na cadeia produtiva do frango de corte e riscos para a saúde pública.....	7
2.4 <i>Salmonella</i> e resistência aos antimicrobianos.....	14
2.5 Ribotipagem automatizada.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Isolados bacterianos.....	23
3.2 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	26
3.3 Ribotipagem dos isolados de <i>Salmonella</i>	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Identificação dos isolados.....	32
4.2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.....	35
4.3 Relação filogenética entre os isolados.....	46
5 CONCLUSÕES.....	52
6 REFERÊNCIAS.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEF - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos
AN - ágar nutriente
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
APT - água peptonada tamponada
ATCC - American Type Culture Collection
BHI - caldo infusão de cérebro e coração
CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*
CE - Comissão Européia
CEE - Comunidade Econômica Européia
CIM - concentração inibitória mínima
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CMS - carne mecanicamente separada
DNA - ácido desoxirribonucleico
EFSA - *European Food Safety Authority*
EUA - Estados Unidos
FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FIOCRUZ - Fundação Instituto Oswaldo Cruz
FSIS - Food Safety and Inspection Service
LABIO - Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada
LEMC - Laboratório Especial de Microbiologia Clínica
LIA - ágar lisina e ferro
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento
MH - ágar Mueller Hinton
mL - mililitro
NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards
OIE - *World Organisation for Animal Health / Office International des Epizooties*
pb – par de bases
PREBAF - Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango

PRP - Programa de Redução de Patógenos

RNA - ácido ribonucleico

rRNA - RNA ribossômico

RV – caldo Rappaport-Vassiliadis

SS - ágar *Salmonella-Shigella*

TSA - ágar triptona de soja

TSI - ágar ferro e açúcar tríplice

TT - caldo tetracionato

UBABEF - UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA

UE - União Européia

UFC - unidades formadoras de colônias

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

WHO - *WORLD HEALTH ORGANIZATION*

XLD - ágar desoxicolato-lisina-xilose

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Padrões e ciclos de amostragem para <i>Salmonella</i> em carcaças de frango nos EUA, UE e Brasil.	11
Tabela 2 -	Identificação de 96 cepas de <i>Salmonella</i> isoladas na indústria A (SP) e indústria B (MS), conforme sorotipificação realizada pela FIOCRUZ.	32
Tabela 3 -	Origem das 96 cepas de <i>Salmonella</i> spp. isoladas nas indústrias A (SP) e B (MS), conforme o tipo de amostra.	34
Tabela 4 -	Distribuição das 67 cepas de <i>Salmonella</i> isoladas na indústria A (SP), conforme três categorias de resistência frente a 10 antimicrobianos.	36
Tabela 5 -	Distribuição das 29 cepas de <i>Salmonella</i> isoladas na indústria B (MS), conforme três categorias de resistência frente a 10 antimicrobianos.	37
Tabela 6 -	Distribuição das 67 cepas de <i>S. Minnesota</i> , <i>S. Infantis</i> , <i>S. Schwarzengrund</i> e <i>S. Newport</i> isoladas na indústria A (SP), conforme 16 perfis de resistência a antimicrobianos.	38
Tabela 7 -	Distribuição das 29 cepas de <i>S. Minnesota</i> , <i>S. Schwarzengrund</i> e <i>S. Newport</i> isoladas na indústria B (MS), conforme 11 perfis de resistência a antimicrobianos.	40
Tabela 8 -	Ribogrupos das 39 cepas de <i>Salmonella</i> dos sorovares <i>Minnesota</i> , <i>Infantis</i> , <i>Schwarzengrund</i> e <i>Newport</i> isoladas na indústria A (SP) e na indústria B (MS).	48

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** Fluxograma da cadeia de produção industrial do frango de corte, indicando todos os pontos de colheita dos 239 isolados de *Salmonella*. 23
- Figura 2 -** Representação esquemática da cadeia de produção industrial do frango de corte, indicando os pontos de colheita das 96 cepas de *Salmonella* selecionadas para estudo. 24
- Figura 3 -** Sistema de caracterização microbiana - RiboPrinter®. 28
- Figura 4 -** Funcionamento do Sistema RiboPrinter®. 31
- Gráfico 1 -** Distribuição dos resultados da CIM ($\mu\text{g/ml}$) de tetraciclina para as amostras de *Salmonella* isoladas na indústria A (SP) e indústria B (MS). 44
- Gráfico 2 -** Distribuição dos resultados da CIM ($\mu\text{g/ml}$) de sulfametoxazol para as amostras de *Salmonella* isoladas na indústria A (SP) e indústria B (MS). 44
- Gráfico 3 -** Distribuição dos resultados da CIM ($\mu\text{g/ml}$) de amoxicilina para amostras de *Salmonella* isoladas na indústria A (SP) e indústria B (MS). 45

DISSEMINAÇÃO DE *Salmonella* sp NA CADEIA PRODUTIVA DO FRANGO DE CORTE

RESUMO - Objetivou-se determinar a resistência antimicrobiana e identificar os ribotipos de 96 cepas de *Salmonella* isoladas em plantéis avícolas com ciclo completo de produção para estabelecer seu perfil de disseminação. Os maiores percentuais de resistência foram para sulfonamida (56,25%), tetraciclina (53,12%) e amoxicilina (31,25%), enquanto 28,13% dos isolados foram sensíveis a todos antibióticos. Perfis de multiresistência foram observados para 28 cepas (29,17%) do sorovar Minnesota. Na CIM encontraram-se cepas com concentração acima da máxima (tetraciclina >256 µg/mL - 7; sulfametoxazol >1024 µg/mL - 45; amoxicilina >256 µg/mL - 16). A ribotipagem identificou 63/96 cepas. Das amostras testadas, 21 foram identificadas como Minnesota e agrupadas em seis ribotipos, sendo o 208-S-8 o mais prevalente com 11 identificações (52,38%). Quatorze amostras de *S. Infantis* foram agrupadas em sete ribogrupos, sendo o 337-S-2 o mais prevalente, 8/14 (57,14%). Duas amostras de *S. Schwarzengrund* e duas de *S. Newport* foram agrupadas nos ribogrupos 208-S-4 e 204-S-7, respectivamente. A multiresistência de *S. Minnesota* alerta para a necessidade de uma monitoria sistemática da resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas. A CIM acima da concentração máxima sugere que essas bactérias podem ter sofrido alterações com o surgimento de resistência adquirida. Os resultados reforçam a necessidade do uso responsável de antibióticos na produção animal, principalmente daqueles usados na medicina humana. A alta prevalência do ribogrupo 208-S-8 (*S. Minnesota*) e 337-S-2 (*S. Infantis*) caracteriza a disseminação clonal destes sorovares, isolados desde o ambiente de criação até o abate. Estes resultados indicam que aves positivas na granja contribuem para a contaminação das carcaças no abatedouro. A identificação de cepas clonais permite estabelecer o elo epidemiológico existente entre isolados de *Salmonella*, determinando assim a etapa da cadeia de produção industrial do frango de corte que contribui para a contaminação do produto final.

Palavras-Chave: avicultura, resistência antimicrobiana, ribotipagem, *Salmonella* sp

DISSEMINATION OF *Salmonella* sp IN BROILER CHICKEN PRODUCTION CHAIN

ABSTRACT - The objective was to determine the antimicrobial resistance and to identify the ribotypes of 96 *Salmonella* strains isolated from poultry plants with complete production cycle to establish their profile dissemination. The highest percentages of resistance were to sulfonamide (56.25%), tetracycline (53.12%) and amoxicillin (31.25%), while 28.13% of the isolates were sensitive to all antibiotics tested. The profiles of multidrug resistance were observed in 28 strains (29.17%) of serovar Minnesota. In MIC were found strains at concentrations above the maximum (tetracycline >256 µg/mL - 7; sulfamethoxazole >1024 µg/mL - 45; amoxicillin >256µg/mL - 16). The ribotyping identified 63/96 strains. Of the samples tested, 21 were identified as Minnesota and grouped into six ribotypes, and the 208-S-8 was the most prevalent with 11 identifications (52.38%). Fourteen samples of *S. Infantis* were grouped into seven ribogroups, and the 337-S-2 was the most prevalent, 8/14 (57.14%). Two samples of *S. Schwarzengrund* and two *S. Newport* were grouped in the ribogroups 208-S-4 and 204-S-7, respectively. The multidrug resistance of *S. Minnesota* alert to the needing of implements systematic monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic bacteria. The MIC above the maximum concentration suggests that these bacteria may have changed with the emergence of acquired resistance. The results emphasize the needing for responsible use of antibiotics in animal production, especially those used in human medicine. The high prevalence of ribogroup 208-S-8 (*S. Minnesota*) and 337-S-2 (*S. Infantis*) characterizes the clonal spread of these serovars, isolated from the farm until slaughter. These results indicate that positive birds at the farm contribute to contamination of carcasses at the slaughterhouse. The identification of clonal strains may establish the epidemiological link between isolates of *Salmonella*, thereby determining the stage of the chain of industrial production of broiler chickens that contributes to the contamination of the final product.

Keywords: aviculture, antimicrobial resistance, ribotyping, *Salmonella* sp

1 INTRODUÇÃO

As exportações brasileiras da carne de frango somaram 3,63 milhões de toneladas em 2009, gerando uma receita cambial de US\$ 5,8 bilhões. O desempenho por segmentos totalizaram exportações de 1,9 milhão de toneladas de cortes de frango, 1,4 milhão de toneladas do frango inteiro e 172 mil toneladas de produtos industrializados (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA - UBABEF, 2010). Para garantir essa produtividade anual, é necessário um crescimento racional que vise, sobretudo, assegurar a qualidade do produto avícola através do controle de enfermidades que causam, além de prejuízos econômicos, transtornos à saúde pública. As medidas gerais de profilaxia e as normas de biossegurança empregadas na avicultura industrial dificultam, mas não impedem a presença de microrganismos patogênicos. Entre os patógenos veiculados na avicultura, destacam-se os do gênero *Salmonella* e a importância da sua disseminação vem sendo amplamente estudada na cadeia produtiva das aves (SILVA; DUARTE, 2002).

Bactérias do gênero *Salmonella* são isoladas em todo o mundo, no entanto, em áreas de criação animal intensiva, principalmente de suínos e aves, os relatos são ainda mais frequentes (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH - OIE, 2010).

Na produção em sistema de confinamento existem inúmeros fatores que podem contribuir para a maior prevalência de *Salmonella*, como a falta de programas de higienização nas granjas, a presença de pragas nos locais de criação, a contaminação de rações e água de abastecimento, o uso de antibióticos de amplo espectro como promotores de crescimento e a presença de animais portadores da bactéria (BERENDS et al., 1996; SWANENBURG et al., 2001). A etapa de criação, portanto, pode ser epidemiologicamente muito importante na disseminação de *Salmonella* e, conseqüentemente, dar origem a um produto contaminado (SWANENBURG et al., 2001). No período pré-abate, o estresse do transporte dos animais do local de criação para o abatedouro também está relacionado ao aumento da prevalência e maior excreção de *Salmonella* no ambiente (BERENDS et al., 1996).

Os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais e posterior manipulação das carcaças também influenciam na ocorrência e quantidade de *Salmonella* presente na carne de frango. Estes microrganismos encontram-se albergados no trato intestinal das aves e podem contaminar as carcaças bem como outros produtos caso o processo de abate não seja realizado com os devidos cuidados higiênicos (CARVALHO; CORTEZ, 2005).

Além de ser um importante patógeno responsável por doenças em animais, a *Salmonella* também é conhecida por acometer a saúde do homem. A salmonelose é uma das principais causas de gastroenterite veiculada por alimentos em todo o mundo, e um importante problema de saúde pública, tanto em países industrializados como naqueles em desenvolvimento (RASSCHAERT et al., 2005).

Diversos países possuem programas de controle para prevenir a salmonelose, que incluem estudos que determinam a prevalência do microrganismo, seus sorovares e biótipos como formas de subsídio às medidas de seu controle nos lotes e na garantia da qualidade dos produtos oferecidos nos mercados interno ou externo (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA, 2008a).

O aumento no uso indiscriminado de antibióticos, inseridos no processo de produção de alimentos de origem animal, podem funcionar como pressão de seleção para alguns sorovares de *Salmonella* e para a resistência desses aos antimicrobianos. Assim, além do monitoramento constante, com identificação dos sorovares desse patógeno ao longo da cadeia de produção é importante avaliar a resistência aos antibióticos para verificar se há aquisição e disseminação desse perfil (EFSA, 2008b).

Tendo em vista a importância da carne de frango e derivados na veiculação de *Salmonella* aos humanos, torna-se necessário estudar a disseminação desse patógeno ao longo das diversas etapas integradas de produção, isto é, da granja ao abate, estabelecendo o papel de cada uma delas na contaminação do produto final. Assim, conhecer os sorovares, os perfis de resistência aos antimicrobianos e a relação filogenética entre isolados de *Salmonella* spp. em diferentes pontos ao longo da cadeia de produção avícola, permite estabelecer os elos de ligação entre os diferentes segmentos. Este conhecimento é a base para introdução de políticas de qualidade, para o gerenciamento dos riscos, e para a prevenção, permitindo a

implantação de medidas efetivas para o controle dos perigos relacionados à presença de *Salmonella*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a disseminação de *Salmonella* spp. nas diversas etapas da cadeia de produção industrial de frango de corte.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Verificar a presença de *Salmonella* spp. em cama de aviário de frangos de corte, farinhas animais usadas na produção de rações, carcaças e cortes cárneos em duas plantas de abate de frango de corte;
- Identificar e correlacionar os sorotipos de *Salmonella* isolados durante as etapas de criação e abate;
- Determinar a resistência aos antimicrobianos dos isolados de *Salmonella* spp. comparando o perfil de resistência entre os diferentes sorotipos;
- Identificar os ribotipos de *Salmonella* e estabelecer o modo de disseminação destes patógenos na cadeia de produção de frangos de corte.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização do gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é constituído pelas espécies *S. enterica* e *S. bongori*, sendo a primeira dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Cada subespécie (ou espécie, no caso de *S. bongori*) ainda é subdividida em função de seu perfil antigênico. A espécie *S. bongori* agrupa 22 sorotipos e as subespécies de *S. enterica* agrupam mais de 2400 sorotipos (POPOFF; BOCKEMÜHL; GHEESLING, 2004). Uma terceira espécie denominada de *S. subterrânea* foi descrita por SHELOBOLINA et al. (2004), mas, segundo GRIMONT e WEILL (2007), esta não pertence ao gênero *Salmonella*.

Estas espécies e subespécies podem ser distinguidas com base em características bioquímicas e genéticas. Nomes foram mantidos somente para os sorotipos mais freqüentes de *Salmonella enterica*. Esses nomes não devem ser indicados em itálico e a primeira letra deve ser maiúscula. Na prática, o nome da subespécie não precisa ser indicado, uma vez que somente os sorotipos da subespécie *enterica* têm nome. Assim, as designações: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium ou *Salmonella* Typhimurium podem ser usadas. Sorotipos de outras subespécies de *Salmonella enterica* e aqueles de *Salmonella bongori* são designados somente por seus perfis antigênicos (POPOFF, 2001; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2008). A sorotipagem de acordo com o esquema de classificação Kauffmann-White é um método amplamente utilizado para a caracterização inicial de isolados de *Salmonella* e baseia-se na variabilidade antigênica dos antígenos somáticos (O) de natureza polissacarídica, e flagelar (H) de natureza proteica, presentes na parede celular do organismo (BALE et al., 2007).

Salmonelas são bacilos Gram negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, catalase positiva e oxidase negativa, produzem ácidos e

fermentam glicose, reduzem nitrato a nitrito e não produzem citocromo oxidase. Podem ser móveis ou não, sendo que a maioria possui flagelos peritríquios (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2002; MARTÍNEZ, 2006; LOUREIRO et. al, 2010).

As bactérias do gênero *Salmonella* são relativamente resistentes ao calor e substâncias químicas, porém não sobrevivem à temperatura de 55 °C em 1 hora ou em 60 °C de 15 a 20 minutos (GAMA, 2001). São mesófilas, com temperatura de crescimento ótimo entre 35 e 37 °C e possuem a forma de bacilos pequenos medindo 0,7 a 1,5 por 2,0 a 5,0 micra. A maioria dos sorotipos é produtora de gás, H₂S, lisina e ornitina descarboxilase positiva, mas negativas para urease e indol (CAMPOS, 2002). Em relação ao pH, a *Salmonella* cresce em intervalo de 4,5 a 9,0, com crescimento ótimo na faixa de 6,5 a 7,5. Geralmente, em pH abaixo de 4,0 e acima de 9,0 as salmonelas são destruídas lentamente (COSTA, 1996). A atividade de água (aW) ideal é de 0,995, mas podem se multiplicar em aW de 0,93 a 0,95 (FRAZIER; WESTHOFF, 1993). O crescimento bacteriano é retardado por baixas temperaturas, portanto o controle dessa variável é significativo no comércio de produtos de origem avícola (GAST; HOLT, 2001).

2.2 Características epidemiológicas da *Salmonella*

A *Salmonella* spp. está amplamente difundida na natureza, principalmente onde existe uma alta densidade avícola. São capazes de infectar uma grande variedade de animais, podendo ser encontrada no trato gastrointestinal de mamíferos, répteis e até mesmo insetos, sendo as aves um dos mais importantes reservatórios capaz de introduzir a salmonela na cadeia alimentar do homem (CARDOSO; TESSARI, 2008). Alguns sorovares têm seu hábitat limitado, sendo denominados hospedeiros específicos, como os sorovares Typhi e Paratyphi A para seres humanos, Abortusovis para ovelhas, Gallinarum e Pullorum para aves e Choleraesuis para suínos (LOUREIRO et al., 2010). As salmonelas paratíficas, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis, são as de maior interesse em saúde animal e saúde pública.

Alguns sorovares podem infectar animais e seres humanos indistintamente. Assim, tanto a *Salmonella* específica das aves, quanto as paratíficas, podem causar problemas na produção, resultando em índices zootécnicos baixos, ocasionando perdas e prejudicando a comercialização dos produtos de origem avícola no mercado interno e externo (BERCHIERI JR.; BARROW, 1995).

A transmissão de *Salmonella* pode ocorrer de diversas formas e, portanto, sua epidemiologia é bastante complexa (HINTON, 1988), sendo difícil determinar como um lote foi infectado ou como ocorre a disseminação bacteriana no plantel. Acredita-se que a *Salmonella* Enteritidis é transmitida verticalmente de ovários e ovidutos infectados para os ovos de frangas de postura. Outra via proposta é a penetração da bactéria através da casca do ovo pelas fezes das aves depositadas quando o ovo passa pela cloaca (MINE, 2005). Como no ovo contaminado não ocorre morte embrionária, há eclosão do pintinho, que se constitui em uma importante fonte de infecção (EXCLUSÃO..., 2005).

Segundo KOTTWITZ et al. (2008), a capacidade de transmissão transovariana e horizontal de *S. Enteritidis* para os ovos resultou em ampla disseminação e persistência desse sorovar na indústria avícola. Uma vez que a *Salmonella* Enteritidis atinge uma ave é facilmente disseminada através das fezes (PLYM FORSHELL; WIERUP, 2006), e permanece no meio ambiente (DAVIES; WRAY, 1996; ZANCAN et al., 2000). Com isso, aves comerciais podem ser infectadas por toda vida.

A transmissão horizontal ocorre geralmente por via oral-fecal, sendo o consumo da água e ração contaminadas os principais veículos da contaminação (EXCLUSÃO..., 2005). As rações e suas matérias primas, principalmente as de origem animal, apresentam quase sempre, altas taxas de contaminação por *Salmonella* sp. GAMA, BERCHIERI JR. e FERNANDES (2003) isolaram *Salmonella enterica* cepa rugosa em fezes de poedeiras comerciais e atribuíram a infecção ao consumo de ração contaminada.

Outras fontes de transmissão no sistema atual de integração incluem: aquisição de aves infectadas, ambiente de criação, roedores, pessoas, pássaros e aves silvestres, falhas na biossegurança, manejo, instalações e equipamentos, entre outros (SILVA; DUARTE, 2002; CARDOSO; TESSARI, 2008).

A transmissão de *Salmonella* aos humanos ocorre através da ingestão de alimentos ou água contaminados com células viáveis da bactéria. Os alimentos de origem animal crus ou mal cozidos, principalmente carne de frango e em especial ovos, são os mais freqüentemente envolvidos em surtos (GALÁN, 2001; HUMPHREY, 2004). O período de incubação é de seis a 72 horas após a ingestão do agente, havendo um desenvolvimento brusco de febre, mialgias, cefaléia e mal-estar. Os sintomas principais consistem em dores abdominais, náusea, vômitos e diarreia. Comumente, a salmonelose tem curso benigno e a recuperação clínica ocorre de dois a quatro dias. O portador convalescente elimina *Salmonella* spp. durante semanas ou, mais raramente, por alguns meses. Uma das complicações é a desidratação causada pela diarreia especialmente em crianças pequenas e lactentes. Além destes sintomas, citam-se também, meningite e septicemia potencialmente mortais (VORVICK; VYAS; ZIEVE, 2010).

2.3 *Salmonella* sp na cadeia produtiva do frango de corte e riscos para a saúde pública

Os animais destinados à produção de carnes para consumo humano podem atuar como hospedeiros assintomáticos de patógenos entéricos importantes que representam risco de infecção para o homem, tornando um desafio para a indústria o seu controle, redução ou eliminação completa (DORMEDY et al., 2000).

Na produção industrial de frango de corte existem inúmeros fatores que contribuem para uma maior prevalência de *Salmonella*. Associações significativas foram encontradas entre o nível de infecção de frangos de corte e a higienização do aviário, ração, água, animais e materiais amostrados no ambiente. REITER et al. (2007) observaram que os frangos são colonizados por bactérias presentes na água de bebida, ração ou pelo contato com o solo contaminado.

Segundo ELGROUD et al. (2009), os principais fatores de risco associados com a contaminação por *Salmonella* nas criações de frangos foram a densidade de animais, taxa de mortalidade, tipo de terreno e o acesso de outros animais ao

ambiente de criação.

As aves infectadas podem excretar 10^8 células de *Salmonella* por grama de fezes (BRYAN; DOYLE, 1995), podendo infectar um lote de aves e alcançar lotes vizinhos sem que os animais apresentem nenhum sintoma da doença (PEREIRA; SILVA; LEMOS, 1999).

Estudo realizado na Europa entre outubro de 2005 e setembro de 2006 em frangos de corte, três semanas antes do abate, demonstrou uma prevalência média de 23,7% de aves positivas para *Salmonella* (EFSA, 2007)

Segundo COX, BERRANG e CASON (2000), os ovos incubáveis podem se tornar contaminados por *Salmonella* após a postura, ainda nos ninhos, nos galpões de matrizes, nos caminhões e no próprio incubatório, caracterizando a transmissão horizontal do microrganismo. Nas incubadoras e nascedouros, as condições de temperatura e umidade podem promover a proliferação de *Salmonella*.

Esses fatores parecem ser determinantes para a contaminação da carcaça com *Salmonella* no abatedouro (HEYNDRIX et al., 2002). A contaminação de carcaças com *Salmonella* parece estar principalmente ligada à contaminação das aves durante a criação e/ou transporte para o abate (NICHOLSON; GROVES; CHAMBERS, 2005). O nível de contaminação por *Salmonella* nas granjas e abatedouro depende ainda de vários fatores de risco, incluindo estação do ano, incubadora de origem, fábricas de rações, diversas medidas de higiene e o manejo dos animais. Animais portadores assintomáticos também podem infectar outros animais durante o transporte e espera para o abate. A contaminação fecal das carcaças durante o processo de abate é inevitável, e o grau de contaminação depende das técnicas de abate aplicadas e manipulação das carcaças (CARDINALE et al., 2004).

O ambiente de abate pode ser uma fonte importante na disseminação de *Salmonella*, pois uma vez instalada a contaminação pelo microrganismo na indústria, a remoção é dificultada devido à sua capacidade em formar biofilmes (JOSEPH; OTTA; KARUNASAGAR, 2001), e de se multiplicar a baixas temperaturas (D'AOUST, 1991). Isto pode ser comprovado no trabalho de FUZIHARA, FERNANDES e FRANCO (2000), que verificaram a presença de *Salmonella* spp. em utensílios (23,1%) e superfícies de refrigeradores e congeladores (71,4%) colhidas

em 60 pequenos abatedouros da cidade de Mauá, SP.

ARSENAULT et al. (2007) estudaram a incidência e os fatores de risco associados à *Salmonella* em 82 lotes de frangos de corte de quatro abatedouros do Canadá, onde foram analisadas 30 aves por lote. Os autores verificaram que a *Salmonella* estava presente em 21,2% das carcaças analisadas, e que o principal fator de risco foi a presença da bactéria no intestino dos animais.

Estudo realizado na Espanha por DOMÍNGUEZ, GÓMES e ZUMALACÁRREGUI (2002), demonstrou que de 198 carcaças de frango analisadas, 71 (35,8%) foram positivas para *Salmonella* sendo que os dois sorotipos mais isolados foram *S. Enteritidis* (47,8%) e *S. Hadar* (25,3%).

Entre 1998 e 2003, WHITE et al. (2007) analisaram 47.090 amostras de carcaças de frango relacionadas com o programa americano de redução de patógenos, e destas, 5.251 (11,2%) foram positivas para *Salmonella*. Das amostras positivas, 124 (2,36%) eram *Salmonella* Enteritidis.

Amostras de 877 carcaças de frangos de corte foram analisadas para presença de *Salmonella* no Reino Unido em 2005, com positividade média de 4%. Em 2004, a média de positividade para *Salmonella* foi de 4,9% (MELDRUM; WILSON, 2007). Neste mesmo país, entre 1995 e 2000, a *Salmonella* foi investigada em 1127 amostras de cortes de frango. Durante estes seis anos, o índice de contaminação por *Salmonella* nos cortes de frango foi de 11%, e os sorotipos predominantes foram *S. Bredeney* (20%), e *S. Enteritidis* (18%) (WILSON, 2002).

BOSCÁN-DUQUE et al. (2007) isolaram *Salmonella* em 23% das amostras de fígado e ceco obtidas em dois abatedouros de frangos da Venezuela. Cinco sorotipos diferentes foram identificados, sendo eles: *S. Paratyphi B* (62%), *S. Heidelberg* (31%), *S. Amager* (3%), *S. Javiana* (3%) e *S. Idikan* (1%).

No Brasil, *Salmonella* também tem sido isolada em percentuais variados em produtos avícolas. SANTOS et al. (2000) analisaram 150 amostras de carcaças de frangos de quatro diferentes marcas comerciais e constataram que a bactéria estava presente em 32% das amostras. TIROLI e COSTA (2006) isolaram *Salmonella* em 50% das 60 amostras de carcaças de frangos analisadas, e CARVALHO e CORTEZ (2005) detectaram *Salmonella* em 20% de 165 amostras analisadas.

Estudo realizado sobre a incidência de *Salmonella* em diferentes etapas do processamento de frangos em um abatedouro no Brasil, a bactéria foi detectada em 5,4% de 615 amostras analisadas. As maiores contaminações foram observadas nas caixas de transporte dos animais e na água de escaldagem, com índice de 16,7% em cada caso; seguido dos isolamentos na asa e na coxa congelada (13,3%), e na pele de peito e de coxa (10%). Em amostras de intestino, a porcentagem de positividade por *Salmonella* foi de 6,7%, demonstrando que a contaminação cruzada dentro do abatedouro pode ocorrer (REITER et al., 2007).

De acordo com BILLY (2002), o *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) dos EUA publicou em 1996 o Programa de Redução de Patógenos e de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) para a indústria avícola. O Programa estabeleceu quatro requisitos: 1. desenvolvimento, descrição e implementação de procedimentos de operação e padrões de sanitização; 2. testes regulares de amostras para verificar a adequação dos processos de controle, prevenção e remoção de contaminação fecal; 3. estabelecimento de padrões de redução de *Salmonella* e 4. desenvolvimento e implantação de um sistema de APPCC. Este Programa estabeleceu, entre outros critérios, a tolerância para *Salmonella* em carcaças de frango no país, com aceite de 12 positivas (20%) para 51 carcaças analisadas (Tabela 1).

A partir de 2003, o Brasil iniciou um programa semelhante ao programa americano denominado de PRP (Programa de Redução de Patógenos), para avaliar a eficiência do processo de abate de frangos e perus. Neste programa, igual ao aplicado nos EUA, a cada 51 carcaças analisadas quanto à presença de *Salmonella*, se aceita 12 carcaças positivas ou 20,0% de positividade (Tabela 1). No Brasil, este programa visa estabelecer um sistema de informação para avaliar a contaminação dos produtos, viabilizando a determinação do nível adequado de proteção aos consumidores para melhorar as medidas de controle (BRASIL, 2003a).

Na UE também foi desenvolvido um programa de avaliação de *Salmonella* em carcaças de frango, porém, de 50 carcaças analisadas, a tolerância é de sete amostras positivas, ou 14% de positividade (COMUNIDADE ECONÔMICA EUROPÉIA - CEE, 2007), índice menor aos praticados pelos EUA e Brasil (Tabela 1).

Tabela 1. Padrões e ciclos de amostragem para *Salmonella* em carcaças de frango nos EUA, UE e Brasil.

País	Padrão (% de amostras positivas para <i>Salmonella</i>)	Número de amostras testadas por ciclo	Número máximo de amostras positivas aceitável
EUA ¹	20,0	51	12
UE ²	14,0	50	7
Brasil ³	20,0	51	12

Fontes: ¹BILLY (2002); ²CEE (2007); ³BRASIL (2003a).

De acordo com BERSOT (2006), a etapa de criação pode ser epidemiologicamente importante na disseminação de *Salmonella* e, conseqüentemente, dar origem a um produto contaminado. No abate, as etapas tecnológicas de obtenção de carcaças também estão diretamente relacionadas com o aumento da prevalência do produto contaminado. Porém, avaliando as etapas críticas do processo de produção há um consenso de que o abate, no máximo, pode contribuir para a manutenção da prevalência de *Salmonella*. Com isso, fica claro observar que quanto maior a prevalência nos animais vivos, maior será o percentual de contaminação nas carcaças abatidas.

A incidência global de doenças causadas por alimentos é de difícil estimativa. No entanto, no ano de 2000, cerca de 2,1 milhões de pessoas morreram por doenças diarreicas, e em uma alta proporção desses casos a causa é atribuída a alimentos e água contaminados (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2002a).

Salmonella tem sido reconhecida mundialmente como um importante patógeno de origem alimentar, envolvida em muitos casos de surtos e considerada como uma das principais causas de gastroenterite humana (RASSCHAERT et al., 2005).

A cada ano, uma estimativa de 1,4 milhões de pessoas são infectadas com *Salmonella* não-tifóide nos EUA, resultando em 15.000 hospitalizações e 400 mortes (MEAD et al., 1999; VOETSCH et al., 2004). Na França, o número estimado de casos anuais de salmonelose atinge 30.000 com 92 a 535 mortes (DE VALK;

VAILLANT, 2004). As infecções por *Salmonella* são, portanto, responsáveis por enormes consequências econômicas. Na Dinamarca, os custos relacionadas com casos de salmonelose de origem alimentar foram estimados entre \$ 10,4 e 25,5 milhões de dólares em 2001 (AARESTRUP et al., 2007).

Nos EUA, de janeiro a abril de 2002, foi isolada *Salmonella* Newport em 47 pessoas com sintomas de diarreia, dor abdominal, febre e vômito (ZANSKY et al., 2002). Uma grande preocupação está relacionada à resistência bacteriana, pois casos de multi-resistência relacionados à *Salmonella* Newport têm sido relatados em homens e animais (DUNNE et al., 2000) e são decorrentes do uso indiscriminado de agentes antimicrobianos (ZHAO et al., 2003).

Segundo LÓPEZ e MARTÍN (2004), ovos e carne de aves estão envolvidos em 75,0% dos surtos de salmonelose humana na Espanha, constituindo numa importante ameaça para saúde pública. Segundo a COMISSÃO EUROPEIA (2007), neste país, somente carne de frango não contaminada por *Salmonella* poderá ser vendida para consumo humano a partir de 2011.

Nos países em desenvolvimento, a infecção com *Salmonella* não tifóide tem sido freqüentemente associada com aumento da mortalidade, particularmente em pacientes portadores de outras doenças, tais como malária grave ou HIV / AIDS (VIDAL et al., 2003; VARMA et al., 2005). As infecções por *Salmonella* não são limitadas pelas fronteiras de um país e o número de surtos que tem ocorrido, particularmente nos últimos 25 anos, tem envolvido vários países e, por isso, também tem sido investigado em inúmeros países (ESPIE; VAILLANT, 2005; AARESTRUP et al., 2007).

Em trabalho conduzido no Rio Grande do Sul em 2000, foram analisados 99 relatórios de investigação de surtos com o objetivo de analisar a ocorrência de surtos de salmonelose transmitidas por alimentos. Dos 99 surtos ocorridos, 74,7% foram ocasionados por *Salmonella* sp. Destes, 72,2% foram associados a alimentos preparados com ovos e 11,4% a carne de frango, revelando que 83,6% dos casos tiveram alimentos oriundos da cadeia avícola envolvidos (NADVORNY; FIGUEIREDO; SCHMIDT, 2004). No Estado do Rio de Janeiro, em estudo de 53 surtos que acometeram 461 pessoas, a *Salmonella* spp. foi responsável por 7% e atingiu maior número de indivíduos (15,8%), inclusive com um óbito (FERNANDEZ

et al., 2003).

Na América Latina, entre 1995 e 2001, foram relatados 5300 surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, 175 mil acometidos e 274 mortes. Na América do Sul 38,1% dos surtos ocorreram no Brasil, 24,8% no Chile, 11,1% na Argentina, 8,3% no Peru, 8,2% no Uruguai, 6,3% no Paraguai e 3,2% no Equador. Porém, a avaliação destes dados deve ser criteriosa, pois os levantamentos epidemiológicos podem ser precários em alguns países, não refletindo a realidade. As bactérias foram responsáveis por 86,2% e 94,8% dos surtos e casos, respectivamente, onde o agente etiológico era conhecido. Nestes mesmos países, foram relatados 406 surtos e 16.304 casos de salmonelose entre 1995 e 2001 (FRANCO et al., 2003).

Há evidência de que a carne e leite crus, aves e produtos derivados das aves estão entre as mais importantes fontes de infecções humanas por *Salmonella* (GORMAN; ADLEY, 2004; WEILL et al, 2004), sendo que os frangos contribuem substancialmente para a transmissão de *Salmonella* ao homem. Recentemente, foi demonstrado que o consumo da carne de frango preparada “fora de casa” é um fator de risco para infecções por *Salmonella* Enteritidis nos EUA (KIMURA et al., 2004). Na Dinamarca, o rápido aumento da incidência de salmonelose humana foi atribuído à disseminação de *Salmonella* em frangos de corte, o que levou ao início de um programa nacional específico. A taxa de contaminação de frangos de corte caiu de mais de 65% durante o período de 1988/1989 para menos de 5% em 2000, e a incidência de salmonelose associada ao frango concomitantemente também reduziu (WEGENER et al., 2003).

As empresas que pesquisam a presença de microrganismos patogênicos em toda a cadeia de produção industrial avícola, abrangendo desde a granja até o produto final, geralmente não divulgam essas informações à comunidade científica nem tornam seus dados públicos. Isso se deve provavelmente, ao temor da publicidade negativa e a consequente perda financeira que poderiam resultar da divulgação destas informações. Por isso, apesar da elevada incidência de *Salmonella* em aves no Brasil ainda são poucos os dados publicados que mostram sua disseminação desde a produção primária até o produto final, e também dados a respeito do perfil genético de cepas de *Salmonella* isoladas de aves e produtos de

aves no Brasil. A ausência desses dados torna ainda mais difícil a adoção de medidas mais eficazes para impedir a disseminação do patógeno dentro do processo de produção avícola e posterior transmissão ao homem.

2.4 *Salmonella* e resistência aos antimicrobianos

A possível transferência de bactérias resistentes a antimicrobianos dos animais para o homem é um tema de grande importância e que tem mobilizado esforços de controle por parte de várias instituições internacionais, incluindo WHO, OIE e *Codex Alimentarius*. Nesse sentido, as duas principais preocupações são a transferência do(s) microrganismo(s) resistente(s) que pode(m), assim, causar uma infecção de difícil controle, e a transferência do(s) gene(s) de resistência do(s) microrganismo(s) de origem animal para o(s) microrganismo(s) de origem humana (BRASIL, 2008).

São conhecidas mais de 15 classes de antimicrobianos. Essas classes diferem entre si pela estrutura química e pelo mecanismo de ação, sendo que antibióticos específicos são necessários para o tratamento de patógenos específicos (WHO, 2002b).

O uso exagerado e abusivo de antimicrobianos em todo mundo e em diferentes áreas, tais como a medicina humana, medicina veterinária e agricultura, como medida profilática ou como agente promotor de crescimento na alimentação de animais destinados ao consumo humano, criou uma enorme pressão para a seleção de resistência antimicrobiana entre os patógenos bacterianos e a microflora endógena (WHO, 2000). Além disto, o uso de um único antibiótico como tratamento também pode selecionar resistência a outros antibióticos cujos genes residem no mesmo elemento genético ("resistência associada") (AARESTRUP et al., 2001). Assim, o aumento da resistência às drogas entre os microrganismos torna-se um problema cada vez maior que tem sérias implicações para tratamento e prevenção de doenças infecciosas tanto no homem como em animais (CE, 1999).

Como é difícil evitar a contaminação da carcaça durante o abate e posteriores

etapas na preparação de alimentos, bactérias resistentes aos antibióticos derivadas do trato intestinal de animais podem ser transmitidas a seres humanos através dos alimentos. Uma estratégia de controle é reduzir contaminação da carcaça por meio da melhoria de manejo na granja, no transporte, no abate, nas práticas de matança e de resfriamento das carcaças. Além disto, a resistência aos antibióticos deve ser rigorosamente controlada em microorganismos zoonóticos (CARRAMIÑANA et al., 2004).

Em uma reunião realizada pela FAO/WHO/OIE em Roma, na Itália, no final de 2007, foram apresentadas duas listas elaboradas pela WHO e a OIE referentes, respectivamente, aos antibióticos de uso criticamente importante para a saúde humana e animal (OIE, 2007; WHO, 2007). Esta reunião buscou identificar os antimicrobianos pertencentes às duas listas e, tanto quanto possível, analisar o risco desse fato para a saúde humana. Segundo este estudo, três classes de antimicrobianos foram consideradas como prioritárias para o desenvolvimento de medidas e estratégias para manejo da resistência bacteriana, pois apareciam em ambas as listas, sendo eles: cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, as quinolonas (incluindo as fluorquinolonas) e os macrolídeos.

A Organização Mundial de Saúde informa que há estimativa de que, do total de antibióticos produzidos no mundo, metade é utilizada em rações animais. Em pesquisa realizada na Europa verificou-se que aproximadamente 100 miligramas de antimicrobiano são usados em animais para a produção de um quilograma de carne para consumo humano (WHO, 2005).

As rações avícolas têm sido relatadas como um elo de grande importância no ciclo epidemiológico da salmonelose aviária. REIS, KRUGER e MACIEL (1995) relatam que o emprego de antibióticos em rações para promover o crescimento, tem contribuído para potencializar a distribuição de salmonelas resistentes presentes nas aves, agravando assim as infecções alimentares causadas por estas bactérias.

Analisando 200 amostras de ração avícola, BERCHIERI JR. et al. (1993) verificaram que 20 (10%) estavam contaminadas com mais de um sorotipo de *Salmonella* spp. e ao testarem as cepas isoladas frente à ação de antimicrobianos, detectaram 92,86% resistentes à tetraciclina, 75% à cefalotina, 46,5% à ampicilina, 21,4% à amicacina e sulfazotrim, 17,9% ao cloranfenicol e 6,3% à cefoxitina.

BERCHIERI JR. e PAULILLO (1985) testaram a sensibilidade de 139 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de amostras de farinha de origem animal pertencentes a 32 sorotipos e verificaram que todas as cepas foram sensíveis ao cloranfenicol e sulfato de colistina e resistentes a sulfazotrim, bacitracina e penicilina. Verificou-se também resistência parcial a tetraciclina (77,1%), ácido nalidíxico (18%), nitrofurantoína (2,16%), amicacina (1,44%) e cefoxitina (0,7%). Em estudo com 60 amostras de farinha de carne e osso e 60 de farinha de sangue, constituintes de ração para animais, identificaram-se 25 amostras positivas para *Salmonella* spp. e oito sorotipos, sendo o maior índice de resistência a antimicrobianos foi em relação ao ácido nalidíxico (43,1%), seguido por estreptomicina (3,4%) e ampicilina (1,7%) (CALIXTO et al., 2002). Os autores ainda ressaltam que a utilização de farinhas de origem animal como fonte de proteína na ração de frangos é um ponto importante e deve ser monitorado, pela potencialidade da contaminação por *Salmonella* spp., que pode chegar à carne e aos ovos.

Em outra pesquisa, BERCHIERI JR. et al. (1987), testando 18 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros, verificaram que todas foram sensíveis à colistina e ao ácido nalidíxico e resistentes à tetraciclina. Foi verificada resistência parcial aos seguintes antimicrobianos: amicacina, ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, lincospectin, neomicina, tobramicina e nitrofurantoína. MARTINS et al. (2000) analisaram 26 amostras de miúdos de aves e isolaram 11 amostras de *Salmonella* spp., observando que 54,5% das amostras foram resistentes ao cloranfenicol e 45% à ampicilina.

SANTOS et al. (2000) pesquisaram 150 amostras de carcaças de frango congeladas e encontraram 48 amostras positivas. Analisaram a suscetibilidade aos antimicrobianos e verificaram baixa resistência ao aztreonam e amicacina 2,1% (1/48), à tetraciclina 6,2% (3/48) e a gentamicina 4,2% (2/48). Já resultados obtidos por CORTEZ (2006) em abatedouros de aves no Estado de São Paulo mostram que 86,21% das amostras analisadas apresentaram resistência ao aztreonam e à ampicilina, 93,10% à amicacina, 72,43%, à tetraciclina e à cefotaxima, enquanto índices menores de resistência foram avaliados em relação à gentamicina com 3,45% de amostras resistentes.

Outro aspecto a ser considerado na resistência aos antibacterianos é o alerta

da Organização Mundial de Saúde para a emergência de um grande número de amostras multirresistentes a antibióticos, uma vez que muitas cepas de *Salmonella* spp. têm incorporado essa característica em seu material genético. Como resultado há uma limitação severa das possibilidades de tratamento efetivo de infecções em seres humanos (WHO, 2005), pela redução do número de antibióticos de escolha.

A resistência antimicrobiana de *Salmonella* é uma questão preocupante para a saúde pública, já que está crescendo regularmente e está associada a um grande número de hospitalizações (VARMA et al., 2005). Suspeita-se que bactérias multirresistentes como a *Salmonella* encontrada em humanos são, pelo menos em parte, de origem animal e pode ter adquirido seu(s) gen(s) de resistência durante a criação, antes de ser transmitida ao homem através do consumo de alimento (WHITE et al., 2001; UNGEMACH; MÜLLER-BAHRDT; ABRAHAM, 2006).

Nos EUA estima-se que essa resistência aos antimicrobianos resultou, em aproximadamente 30.000 infecções adicionais por *Salmonella* spp., cerca de mais 300 hospitalizações e dez mortes. Na Dinamarca verificou-se que pessoas susceptíveis às infecções por *Salmonella* spp. têm apresentado taxa de mortalidade mais alta. O coeficiente de mortalidade para pessoas com infecções resistentes a vários medicamentos foi calculada ser dez vezes mais alta do que para a população em geral (WHO, 2005). Por esse motivo, o tratamento da salmonelose com medicamentos antimicrobianos não é recomendado para a maioria dos casos de gastroenterites sem complicações. No entanto, em idosos, pacientes muito jovens ou imunocomprometidos e quando há infecção extra-intestinal, o uso de um antimicrobiano adequado é essencial. A infecção com *Salmonella* resistente aos antimicrobianos pode representar um risco para a saúde pública, adicional àquele observado em infecções em que os microrganismos são suscetíveis (EFSA, 2008b).

No Brasil, entre os anos de 2004 a 2006 houve a implementação pelo Ministério da Saúde do Programa PREBAF - Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (carcaças congeladas), como parte do conjunto de estratégias de ação definidas pela ANVISA para a área de alimentos. O estudo foi realizado de acordo com recomendações do *Codex Alimentarius* para programas de vigilância e controle sobre a resistência microbiana em microrganismos zoonóticos transmitidos por alimentos (BRASIL, 2008).

O PREBAF permitiu o conhecimento de dados de pesquisa em vigilância sanitária até então inexistentes, e seus resultados demonstraram os maiores percentuais de resistência de *Salmonella* isolada de carcaças de frango para as drogas: estreptomicina (89,3%), sulfonamida (72,4%), florfenicol (59,2%), ampicilina (44,8%), ácido nalidixico (44,0%), ceftiofur (22,8%), aztreonam (20,4%), enrofloxacin (18,4%), cefoxitina (17,3%) e cefalotina (12,4%). A determinação da concentração inibitória mínima revelou que a totalidade das cepas apresentou resistência a uma ou mais drogas, tendo sido reconhecidos 98 perfis de multirresistência (>2 classes de antimicrobianos) em 192 (76,8%) cepas (BRASIL, 2008).

Um estudo para verificar a resistência aos antimicrobianos em *Salmonella* spp. foi realizado na Alemanha no período de 2000 e 2002 no *National Veterinary Reference Laboratory for Salmonella*. Dos isolados provenientes de alimentos processados, 64% foram de origem avícola, 28% de origem bovina e 24% de origem suína. A maioria dos isolados (63%) foi resistente a uma das drogas testadas e, 40% resistente a mais de um antibiótico (SCHROETER; HOOG; HELMUTH, 2004).

Assim, o crescente isolamento de cepas de *Salmonella* apresentando resistência a um ou vários antimicrobianos a partir de fontes humanas e animais é considerado alarmante e tem constituído um importante problema de saúde pública (SCHORETER; HOOG; HELMUTH, 2004; LARKIN et al., 2004; VARMA et al., 2005).

2.5 Ribotipagem automatizada

As técnicas tradicionais de microbiologia de alimentos fundamentam-se na utilização de testes morfológicos e bioquímicos para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros, espécies e subespécies microbianas. Estes testes, embora confiáveis e eficientes, requerem de vários dias a semanas antes dos resultados serem obtidos (GANDRA et al., 2008). Por isso, métodos baseados em características fenotípicas têm sido comparados desfavoravelmente com aqueles que examinam o cromossomo bacteriano, cujo poder discriminatório das tipagens

moleculares e a reprodutibilidade, são considerados tão elevados que lhe rendeu o nome de “impressão digital do DNA”, do inglês, “DNA *fingerprinting*” (DARINI; MAGALHÃES; CROTT, 1998).

Na busca da produção de alimentos seguros à saúde do consumidor, do ponto de vista microbiológico, tem-se tentado identificar as fontes de contaminação por patógenos nas diversas etapas de produção de alimentos. Uma ferramenta importante nesta identificação é a subtipagem dos isolados. A ligação epidemiológica entre as linhagens isoladas permite que se determine os locais onde uma linhagem aparece ou desaparece, revelando etapas que contribuem para a contaminação final do produto (DODD, 1994).

O aumento mundial de *S. Enteritidis* constitui num problema de saúde pública, sendo o seu controle um desafio para epidemiologistas. A principal ferramenta adotada para monitorar a disseminação de *Salmonella* dentro da cadeia produtiva consiste na utilização de técnicas moleculares. Métodos baseados na restrição do DNA podem identificar cepas de *Salmonella* envolvidas numa infecção humana e dar informações epidemiológicas sobre as relações genéticas entre sorotipos. Desta forma, a ribotipagem tem sido empregada pelos laboratórios de referência mundial, como um método molecular imprescindível para investigação epidemiológica, pela detecção da fonte de infecção (MARTINS et al., 2006).

Razões para a aplicação de diferenciação baseada no ribotipo de isolados independentes dentro de uma espécie têm incluído a classificação taxonômica (GRIMONT; GRIMONT, 1986), monitoramento epidemiológico, distribuição geográfica, biologia e filogenia da população (HOLMES et al., 1999; SUN et al., 1995).

No DNA das bactérias, cada operon do RNA ribossômico consiste de três genes que codificam a molécula estrutural do RNA ribossomal (rRNA), sendo eles 16S, 23S e 5S. Estes genes contêm seqüências altamente conservadas dentro dos gêneros ou famílias bacterianas. O gene 16S é o mais conservado dos três genes rRNA, é encontrado em todas as bactérias e tornou-se o padrão universal para a identificação e classificação taxonômica de espécies bacterianas (BOUCHET; HUOT; GOLDSTEIN, 2008). Entre as espécies bacterianas, o comprimento médio dos genes rRNA estruturais é 1522 pb, 2971 pb e 120 pb, para 16S, 23S e 5S,

respectivamente (GUTELL; NOLLER; WOESE, 1986).

O conhecimento da conservação intra-espécies da sequência do gene 16S rRNA e a estrutura do operon ribossomal 16S-23S-5S levou GRIMONT e GRIMONT (1986) para os primeiros conhecimentos da utilidade do desenvolvimento da ribotipagem para a classificação bacteriana.

A técnica de ribotipagem descrita por GRIMONT e GRIMONT (1986) tem como princípio avaliar o polimorfismo do DNA bacteriano na região onde se localiza o operon *rrn*, composto pelos genes 16S e 23S, que codificam o rRNA bacteriano. Estes genes são altamente conservados nas espécies bacterianas e assim, permitem que esta técnica seja aplicada com sucesso para diferenciar cepas bacterianas.

Baseado nestes conhecimentos fundamentais, buscou-se elucidar a base genética molecular da ribotipagem, a qual consiste na extração e purificação do DNA total da bactéria, clivagem pela endonuclease de restrição do DNA genômico total (digestão do DNA com enzimas de restrição) seguida por separação eletroforética dos fragmentos, a transferência do DNA para uma membrana ("*Southern blot*"), e hibridização dos fragmentos de DNA transferidos com uma sonda operon ribossomal radiomarcada e por fim a autoradiografia, ou revelação do padrão de bandas (DARINI; MAGALHÃES; CROTT, 1998). Estas sondas complementares aos genes que codificam o rRNA permitem a caracterização das cepas com base na localização e número de cópias de seus genes rRNA (GRIMONT; GRIMONT, 1986; MARTINETTI; ALTWEGG, 1990). As sondas são então derivadas das sequências altamente conservadas dos genes que codificam o rRNA para tipificação de bactérias (AARESTRUP, 2006; RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2007). Após autoradiografia, apenas as bandas contendo uma porção do operon ribossomal são visualizadas. O número de fragmentos gerados pela ribotipagem é um reflexo da multiplicidade de operons rRNA presentes em uma espécie bacteriana. Os números de cópias de operons ribossomais rRNA em espécies bacterianas variam de 1 a 15 e é normalmente constante dentro da espécie (KLAPPENBACH et al., 2001).

A técnica de ribotipagem apresenta grandes vantagens quando comparada a outros métodos que utilizam sondas genéticas. São elas: 1) todas as bactérias possuem o operon *rrn* e dessa forma codificam o rRNA, que é altamente conservado

entre as espécies, permitindo assim que uma única sonda genética seja utilizada para todas as espécies bacterianas (sonda universal); 2) pelo fato da maioria das espécies bacterianas possuírem múltiplos operons *rrn*, um número razoável de bandas é obtido com a hibridização (BINGEN; DENAMUR; ELION, 1994).

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

O funcionamento do sistema *RiboPrinter®* inicia-se com amostras de culturas puras em placa, cultivadas pelo método tradicional, não sendo necessário um pré-enriquecimento específico. Trabalhando a partir de uma colônia bacteriana isolada, o sistema processa todas as etapas necessárias para a caracterização da cepa em questão. Para a análise, a colônia é coletada da placa, diluída e homogeneizada numa solução tampão e transferida para um carregador de amostra. O carregador é colocado em um bloco de aquecimento por 22 minutos a 80 °C para inativar qualquer bactéria viável reduzindo as chances de contaminação bacteriana no equipamento. Após são adicionados os reagentes de lise e inicia-se então o processamento no aparelho.

O *RiboPrinter®* consiste de quatro módulos internos, sendo: 1. Preparação do DNA, 2. Separação e transferência, 3. Processamento da membrana e 4. Detecção. Durante o preparo do DNA, através de uma série de reações bioquímicas, a bactéria é lisada e o seu DNA torna-se disponível para ser processado. Então, uma enzima de restrição específica corta o DNA em fragmentos. Estes fragmentos são separados por tamanho em um gel de agarose sob ação de um campo elétrico (eletroforese) e então transferidos e imobilizados para uma membrana de nylon. Os fragmentos de DNA são submetidos ao processo de quimiluminescência por exposição da membrana a uma série de tratamentos químicos e enzimáticos, gerando assim uma imagem padrão da banda de DNA, que é capturada por uma máquina fotográfica digital. Essa imagem digitalizada fica armazenada na memória do computador e

então o sistema utiliza uma série de informação para gerar um padrão de ribotipo ou um perfil. Uma vez armazenados os resultados, o sistema caracteriza, arquiva e compara esse padrão com um banco de dados próprio do *RiboPrinter® System* utilizando um software. Todos os reagentes e materiais utilizados na *RiboPrinter®* vêm prepreparados e pré-embalados. Apenas a preparação da amostra requer uma intervenção manual pela colheita da colônia em placa.

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

Este sistema permite realizar a rastreabilidade completa do microrganismo em questão, identificando a fonte e causa da contaminação de maneira direta e indubitável, pois fornece um perfil genético de cada uma das bactérias implicadas, permitindo que as bactérias com o ribogruppo coincidente sejam identificadas e a causa do problema prevenida e/ou eliminada. Este sistema consiste em um avanço tecnológico com relação à comodidade, reprodutibilidade e velocidade de realização (BOUCHET; HUOT; GOLDSTEIN, 2008).

Isolados de *Salmonella* de fezes de aves, carcaça, água de escaldagem, gaiolas de transporte, forro de papel, lixo, conteúdo cecal, poeira, amostras de moscas, *swab* de arraste, gaiolas pós-transporte, swabs de botas, água pós-escaldagem, resultou em uma taxa de identificação no *RiboPrinter®* maior que 80% quando utilizada a enzima de restrição *PvuII* (BAILEY et al., 2002).

A *Salmonella* pode ser bem caracterizada pela ribotipagem automatizada utilizando tanto *EcoRI* (HILTON; PENN, 1998; OSCAR, 1998) quanto *PvuII* (FRITSCHER, 2001), mas quando se estudou *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, a enzima *PvuII* proporcionou melhor discriminação (DECESARE et al., 2001).

Objetivando realizar o monitoramento epidemiológico de patógenos do ambiente até o produto final, vários pesquisadores, trabalhando com diferentes espécies bacterianas, determinaram a relação entre isolados bacterianos coletados ao longo da cadeia alimentar utilizando o sistema *RiboPrinter®* (BATT, 1997; BAILEY, 1998; WACHTEL; WHITEHAND; MANDRELL, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados bacterianos

O estudo foi realizado em cepas de *Salmonella* previamente isoladas em duas plantas de abate de frangos de corte com ciclo completo de produção e sistema de integração, identificadas como indústria A, localizada no Estado de São Paulo, e indústria B no Estado de Mato Grosso do Sul, durante o período de abril de 2009 a abril de 2010.

As amostras para isolamento de *Salmonella* sp. foram colhidas em todo o ciclo de produção, desde granjas de frangos de corte até o produto final industrializado pronto para comércio, incluindo análise de amostras provenientes de matrizes, da fábrica de ração e da fábrica de farinha e óleo, totalizando 239 isolados (Figura 1).

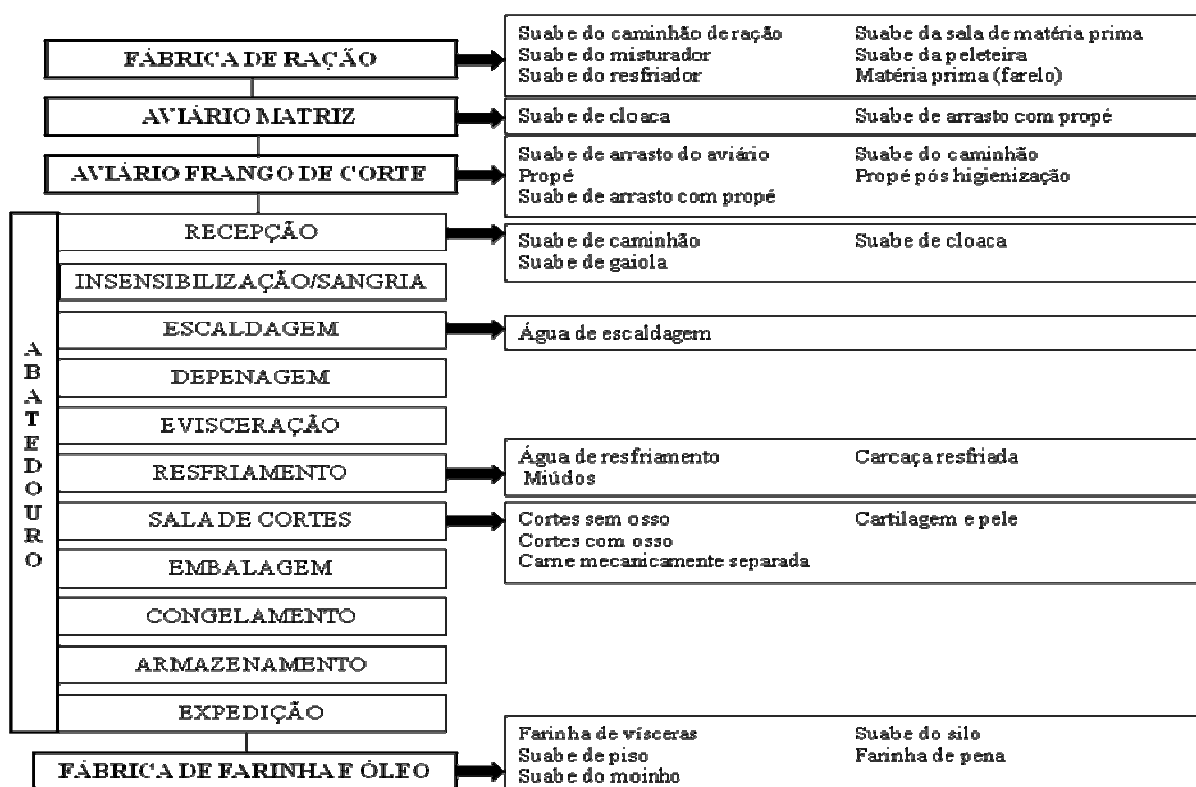


Figura 1. Fluxograma da cadeia de produção industrial do frango de corte, indicando

todos os pontos de colheita dos 239 isolados de *Salmonella*.

Do total de 239 isolados de *Salmonella* obtidos foram utilizadas 96 cepas, as quais foram testadas quanto à sensibilidade aos antimicrobianos e submetidas à análise de ribotipagem automatizada. A seleção destes isolados foi feita juntamente com o responsável pela Garantia da Qualidade dos frigoríficos tendo como critérios para a seleção dos sorotipos, aqueles mais frequentemente isolados dentro da cadeia de produção, e também aqueles envolvidos em ocorrência de surtos de infecção alimentar.

As 96 amostras analisadas neste estudo foram isoladas de pontos de colheita desde o aviário do frango de corte até o ambiente de abate em ambas as plantas, incluindo a fábrica de ração. Na figura 2 tem-se a representação esquemática do fluxograma da cadeia de produção avícola, com os diferentes pontos em que estas amostras foram colhidas.

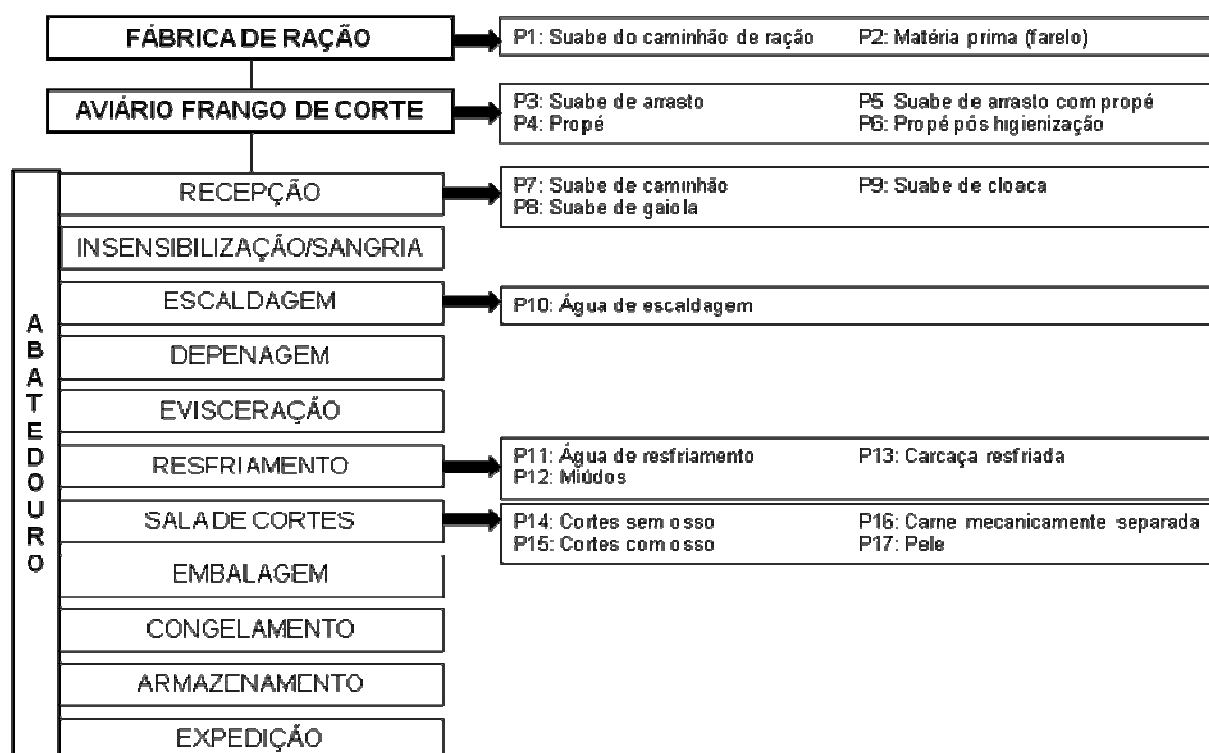


Figura 2. Representação esquemática da cadeia de produção industrial do frango de corte, indicando os pontos de colheita das 96 cepas de *Salmonella* selecionadas para estudo.

Dentre os sorovares selecionados para estudo, não houveram isolados de *Salmonella* provenientes do aviário de matriz e da fábrica de farinha e óleo, por isso não constam na figura 2.

A seleção dos aviários foi feita de forma a se obter o máximo de informações sobre a diversidade e distribuição dos diferentes perfis genéticos nas regiões. A colheita de amostras nos aviários foi realizada quando os frangos estavam com aproximadamente 30 dias. O piso dos aviários das unidades industriais de São Paulo e Mato Grosso do Sul é de chão batido com adição de cama. A cama utilizada para frangos de corte é trocada em média a cada 4 a 5 lotes, sendo que na retirada de cada lote é realizado um procedimento de fermentação da cama. O período de vazio sanitário adotado é em média de 13 dias. Para matrizes a troca de cama é realizada a cada lote.

As fábricas de rações são das próprias empresas estudadas que utilizam ingredientes de origem vegetal para rações de matrizes, enquanto que para rações de frango de corte são utilizados ingredientes de origem animal e vegetal.

A seleção dos pontos de colheita de amostras também foi determinada em conjunto com o responsável pela Garantia da Qualidade dos frigoríficos, sendo amostrados aqueles pontos exigidos no Programa de Redução de Patógenos - PRP (BRASIL, 2003b). Adicionalmente, outros pontos que apresentavam maior frequência de isolamento de salmonela na rotina das indústrias estudadas, também foram amostrados.

O material colhido nos locais especificados foi acondicionado em caixa com gelo e transportado aos laboratórios das plantas selecionadas para análise de *Salmonella*. Amostras de ração e outras amostras sólidas foram previamente acondicionados em sacos plásticos estéreis e colocadas em caixa com gelo para transporte.

O processamento das amostras foi realizado nos laboratórios das plantas selecionadas para estudo. O protocolo de análise para verificar a presença/ausência de *Salmonella* spp. foi realizado com o uso do sistema de PCR automatizado BAX System da Du Pont®, com procedimentos idênticos aos descritos no USER'S GUIDE BAX® (2007).

Todas as amostras positivas no PCR automatizado foram cultivadas pelo método tradicional de análise, com objetivo de obter colônias puras destinadas à sorotipagem e ribotipagem.

Nos laboratórios das indústrias foram realizados o isolamento e identificação preliminar das amostras. Primeiramente, elas foram pré-enriquecidas em água peptonada tamponada (APT) (DIFCO®) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após, foram transferidas para os caldos de enriquecimento seletivo Rappaport-Vassiliadis (RV) (DIFCO®) e caldo tetrionato (TT) (DIFCO®), e incubadas a 42°C e 37°C, respectivamente, por 24 horas. Após, foram estriadas nos meios sólidos seletivos, ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (BBL®) e ágar desoxicolato-lisina-xilose (XLD) (DIFCO®), incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias suspeitas de pertencerem ao gênero *Salmonella* foram identificadas por suas características morfológicas e bioquímicas em ágar ferro e açúcar tríplice (TSI) (DIFCO®) e ágar lisina e ferro (LIA) (DIFCO®). Colônias que apresentaram resultados típicos para *Salmonella* sp. foram confirmadas por provas bioquímicas adicionais, e após foram estriadas em duplicata em tubos de ensaio contendo ágar nutriente (AN) (DIFCO®). Um exemplar foi enviado ao Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO/UFU) e o outro para o Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias da Fundação Instituto Oswaldo Cruz no Estado do Rio de Janeiro (IOC/FIOCRUZ, RJ, Brasil) para tipificação antigênica.

No LABIO/UFU, as amostras recebidas também foram submetidas à identificação bioquímica complementar e sorológica, conforme recomendado na Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2003a). Os isolados confirmados como *Salmonella* sp. em cultura pura foram conservados em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (BACTO®), acrescido de 15% do crioprotetor glicerol e congeladas, e também foram estriadas em duplicata em AN (DIFCO®) e mantidas em geladeira.

3.2 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

As cepas selecionadas para estudo foram submetidas ao teste de

sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de Kirby-Bauer de difusão com disco (BAUER; KIRB; SHERRIN, 1966), utilizando protocolo recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002).

A preparação e padronização dos inóculos foram realizadas seguindo o método de suspensão direta das colônias. Os isolados foram estriados em placas contendo ágar tripton de soja (TSA) (OXOID®) e incubados a 37°C por 24 horas. Três a cinco colônias puras, bem isoladas, de mesmo tipo morfológico foram selecionadas da placa e transferidas para um tubo contendo 5mL de NaCl 0,85%. A turbidez foi ajustada com salina estéril de modo a obter turbidez óptica comparável à da solução padrão de MacFarland a 0,5, corresponde a aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL. Em seguida, os inóculos foram semeados com auxílio de suabes estéreis em toda a superfície do ágar Mueller Hinton (MH) (DIFCO®). As placas permaneceram entreabertas por 5 a 15 minutos, à temperatura ambiente, para que o inóculo fosse completamente absorvido pelo ágar antes da aplicação dos discos. Após absorção, foram adicionados os seguintes discos de antimicrobianos: amoxicilina (10µg) (β-lactâmico/penicilina), norfloxacino (10µg) (fluorquinolona), neomicina (30µg) (aminoglicosídeo), gentamicina (10µg) (aminoglicosídeo), trimetropim (5µg) (pirimidínicos), ceftazidima (30µg) (β-lactâmico/cefalosporina), cloranfenicol (30µg) (fenicol), imipenem (10µg) (β-lactâmico/carbapenem), tetraciclina (30µg) (tetraciclina), sulfonamida (300µg) (sulfonamida) (LABORCLIN®).

As placas foram incubadas a 37°C em aerobiose por 18 a 20 horas, em seguida medidos os diâmetros dos halos de inibição (em milímetros), com auxílio de régua. Seguindo os critérios de interpretação dos diâmetros dos halos os microrganismos foram classificados como sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano testado. Para o controle de qualidade dos testes de sensibilidade, utilizou-se uma cepa da American Type Culture Collection (ATCC) *E. coli* ATCC 25922.

Para os antimicrobianos em que houve maior frequência de cepas resistentes ou com resistência intermediária foi realizada a concentração inibitória mínima (CIM), por meio das fitas de gradiente antimicrobiano Etest (BIOMÉRIEUX®). Primeiramente, o inóculo bacteriano foi preparado em salina e a turbidez ajustada a

0,5 da escala de McFarland (1 a 2×10^8 UFC/mL). Em seguida, essa suspensão do inóculo bacteriano foi semeada em placa de ágar MH (DIFCO®) e em até 15 minutos após sua preparação, as fitas Etest (BIOMÉRIEUX®) foram dispensadas sobre a placa. As placas foram incubadas à 37°C por um período de 18 a 20 horas em aerobiose. O valor da CIM foi lido no ponto onde a elipse de inibição intersectou a tira, ou seja, na concentração de antimicrobiano correspondente à intersecção entre a fita e a área de crescimento bacteriano. Para interpretação dos resultados utilizou-se tabela fornecida pelo fabricante das fitas de Etest (BIOMÉRIEUX®).

Os critérios de escolha dos antimicrobianos testados baseou-se nos seguintes pontos: utilização dessas drogas na medicina veterinária e humana, ocorrência de resistência dentro da produção avícola brasileira e na medicina humana.

3.3 Ribotipagem dos isolados de *Salmonella*

Os 96 isolados de *Salmonella* foram enviados ao Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), em São Paulo (SP), em tubos de ensaio contendo AN (DIFCO®). As amostras foram analisadas pelo *RiboPrinter® Microbial Characterization System* (Qualicon, Wilmington, DE) (Figura 3), e os resultados foram utilizados para estabelecer as relações filogenéticas entre os isolados em cada ponto da cadeia produtiva.



Fonte: http://www.kryptonbio.com/food_m_ribo.html

Figura 3. Sistema de caracterização microbiana - *RiboPrinter®*.

Para a análise no aparelho, as colônias foram novamente estriadas em placas de XLD (DIFCO®) para obtenção de culturas puras. Do crescimento bacteriano obtido foi selecionada uma colônia típica de *Salmonella*, com auxílio de um bastão esterilizado descartável fornecido pelo fabricante (Figura 4 - A) e transferido para a solução tampão ("*Sample Buffer*" – Qualicon, Wilmington, DE, USA). Esta suspensão composta pelas células bacterianas e 200µl de tampão foi homogeneizada com auxílio de um agitador e 30 µl deste inóculo foi transferido para um tubo cônico, apropriado para introduzir as amostras no aparelho.

Na etapa seguinte, foi realizado o tratamento térmico das amostras, inativando as nucleases presentes e preparando as células para a lise. Para a realização deste tratamento, ciclos de aquecimento e resfriamento foram realizados segundo o programa da unidade de tratamento térmico ("Heat Treatment Station") (Figura 4 - B), que é um equipamento que acompanha o *RiboPrinter*®.

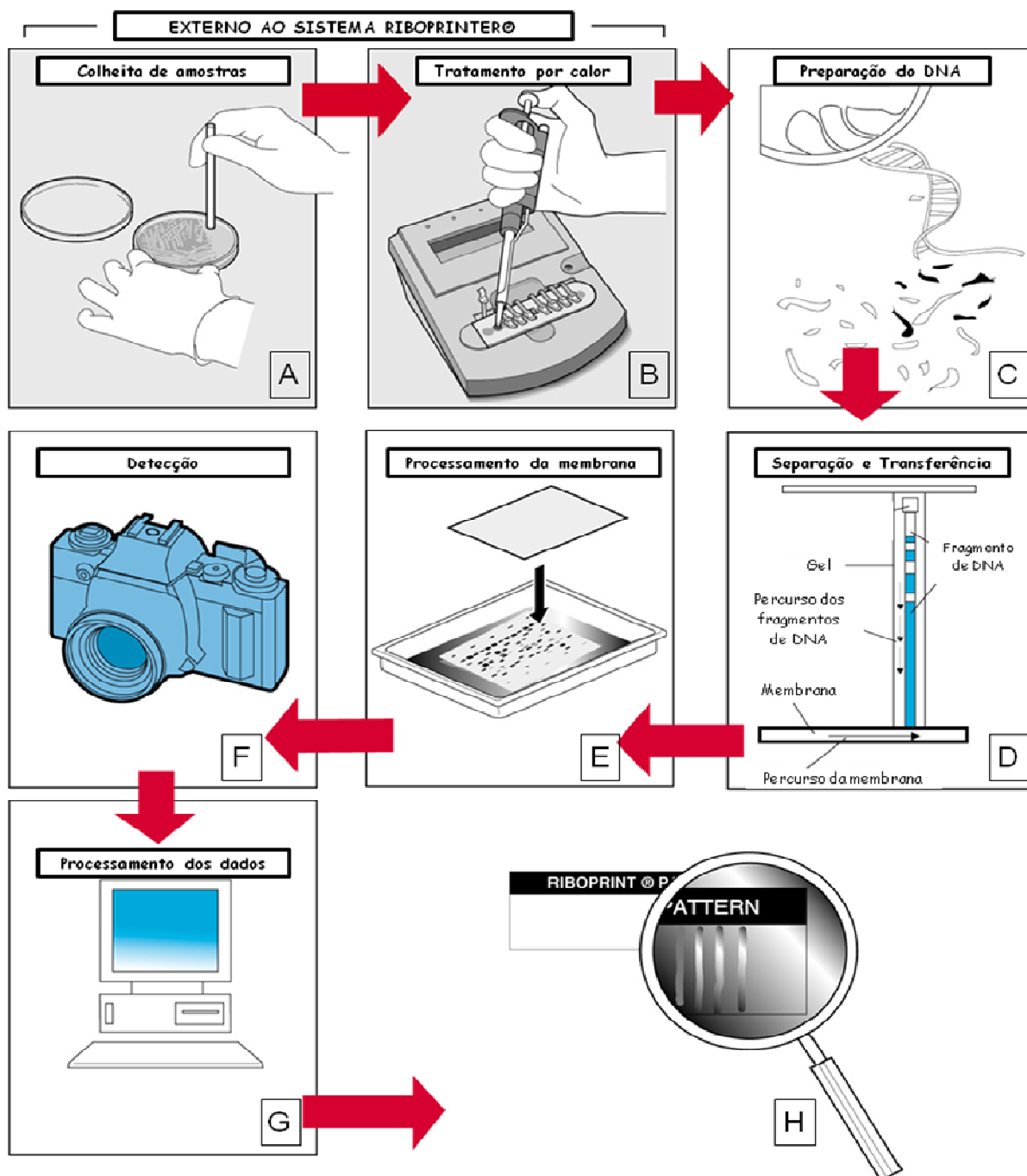
Após o tratamento térmico, 5µl dos reagentes de lise A e B (Qualicon, Wilmington, DE, USA) foram adicionados a cada amostra para iniciar a ruptura da membrana das células. Em seguida as amostras foram inseridas no aparelho *RiboPrinter*® e processadas.

No aparelho, as seguintes etapas automatizadas foram realizadas: (1) preparo do DNA, onde foi realizada a extração do mesmo de dentro das células bacterianas e posterior fragmentação com a enzima de restrição *PvuII* (Figura 4 - C); (2) separação e transferência, caracterizada por uma corrida em gel de eletroforese, que separou os fragmentos por gradiente de peso molecular e pela transferência destes fragmentos que foram imobilizados em uma membrana de nitrocelulose, utilizando a técnica de "*Southern blotting*" modificado (Figura 4 - D); (3) processamento da membrana, onde os fragmentos do DNA foram expostos a um tratamento químico-enzimático com uma sonda de DNA, derivada do rRNA de uma *E. coli* e um marcador quimioluminescente, que revelou os fragmentos hibridizados (Figura 4 - E); (4) detecção, onde a imagem padrão da banda de DNA gerada pelos fragmentos quimioluminescentes, é capturada por uma máquina fotográfica, inserida no sistema e transferidas eletronicamente para o computador acoplado ao aparelho (Figura 4 - F). No computador a imagem de cada gel foi tratada e comparada com o banco de dados para a caracterização das cepas. Cinco marcadores de peso

molecular foram distribuídos no gel, permitindo que cada coluna – representando os dados da amostra – fosse normalizada de acordo com um marcador padrão, baseado na posição e intensidade das bandas (HOLLIS et al., 1999).

O próximo passo consistiu no processamento da imagem digitalizada e comparação dos padrões obtidos pela enzima de restrição (Figura 4 - G e H). Essa imagem digitalizada fica armazenada na memória do computador e os resultados foram analisados usando o software e o banco de dados do próprio *RiboPrinter*®. Esses padrões foram utilizados para identificação e caracterização de todas as amostras analisadas em nível de gênero, espécie, subespécie e sorotipo. Como parte do processo de caracterização, o padrão riboprint (amostra processada) foi automaticamente analisado e os padrões são agrupados pela similaridade existente entre eles. Uma coleção de padrões riboprint é chamada de padrão ribogrupo.

Coeficientes de similaridade foram calculados pelo sistema de computação acoplado ao aparelho, baseando-se na posição e no peso relativo das bandas. Todos os isolados que apresentaram coeficientes de similaridade iguais ou maiores que 0,93 (93%) foram classificados como do mesmo ribogrupo. Aqueles que apresentaram coeficientes de similaridade $\leq 0,92$, foram considerados isolados diferentes com padrões de ribotipagem distintos (BRUCE et al., 1996).



Fonte: http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/assets/downloads/rpproc.pdf (com adaptações).

Figura 4. Funcionamento do Sistema RiboPrinter®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação dos isolados

Ao todo, foram recebidas no LABIO/UFU 239 cepas de *Salmonella* provenientes das duas unidades de produção avícola estudadas. Conforme a sorotipificação realizada pela FIOCRUZ foram identificados 24 diferentes sorovares. A relação dos sorovares encontrados em ordem decrescente de frequência foi: *S. Minnesota* (31,38%), *S. Infantis* (22,60%), *S. Schwarzengrund* (7,95%), *S. enterica* (5,86%), *S. Cubana* (5,44%), *S. Agona* (4,19%), *S. Typhimurium* (3,35%), *S. Newport* (2,51%), *S. Mbandaka* (2,09%), *S. Livingstone*, *S. Saintpaul* e *S. Seftenberg* (1,67% cada), *S. Worthington*, *S. Cerro*, *S. Orion* e *S. Tennessee* (1,25% cada), *S. Montivideo*, *S. Hadar* e *S. Panama* (0,84% cada), *S. Freundii*, *S. Anatum*, *S. Gafsa*, *S. Havana* e *S. Oranienburg* (0,42% cada).

Foram encontradas duas amostras positivas para *Salmonella* provenientes do aviário de matrizes, uma isolada de suabe de cloaca e outra de suabe de arrasto com propé, pertencentes ao sorovar *Agona*. Apesar da importância do isolamento de *Salmonella* em matrizes, estas não foram selecionadas para estudo por não estarem disseminadas na cadeia produtiva.

Dentre os 239 isolados utilizou-se neste estudo 96 cepas, as quais foram selecionadas em conjunto com o responsável pela Garantia da Qualidade das indústrias A e B. Os critérios utilizados para escolha dos sorotipos baseou-se naqueles mais freqüentemente isolados dentro da cadeia produtiva, sendo eles *S. Minnesota* e *S. Infantis*. E também naqueles com envolvimento crescente em casos de surtos de infecção alimentar, sendo por isso selecionados os sorovares *Schwarzengrund* (AARESTRUP et al., 2007; VUGIA et al., 2004) e *Newport* (CDC, 2006). A tabela 2 mostra a identificação das espécies estudadas, conforme local de isolamento.

Tabela 2. Identificação de 96 cepas de *Salmonella* isoladas na indústria A (SP) e

indústria B (MS), conforme sorotipificação realizada pela FIOCRUZ.

Espécie	Indústria	Identificação	N° de isolados (%)
<i>Salmonella</i> Minnesota	A	1 a 22	22 (22,92)
<i>Salmonella</i> Infantis	A	23 a 50	28 (29,17)
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	A	51 a 62	12 (12,50)
<i>Salmonella</i> Newport	A	63 a 67	5 (5,21)
<i>Salmonella</i> Minnesota	B	68 a 93	26 (27,08)
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	B	94 e 95	2 (2,08)
<i>Salmonella</i> Newport	B	96	1 (1,04)
Total			96 (100)

Das 96 amostras de *Salmonella* analisadas nas duas plantas industriais, 48 (50%) pertenciam ao sorovar *S. Minnesota*, 28 (29,17%) a *S. Infantis*, 14 (14,58%) a *S. Schwarzengrund* e seis (6,25%) a *S. Newport*.

S. Enteritidis e *S. Typhimurium* são os sorovares mais frequentemente isolados em produtos de origem avícola (BERCHIERI et al., 2009). No entanto, neste estudo, o sorovar *S. Minnesota* foi o mais isolado, tanto na indústria A como na indústria B. Existem indícios de que o intenso controle na produção avícola frente a certos sorovares como *Enteritidis* acaba por ocasionar o aparecimento de outros sorotipos pelo mecanismo de exclusão competitiva, o que poderia explicar a alta frequência encontrada para *S. Minnesota*.

O alto número de isolados de *S. Infantis* encontrado assemelha-se a um estudo desenvolvido na UE, que demonstrou ser este sorovar o mais frequente tanto no ambiente de criação do frango de corte (EFSA, 2007), como em carcaças (EFSA, 2010).

S. Infantis está entre os sorovares mais envolvidos em casos de salmonelose humana no Brasil, sendo reconhecido por seu potencial patogênico, o qual, além do quadro gastroentérico, pode determinar infecção septicêmica em animais jovens e no homem, principalmente em casos de infecções graves em crianças (FONSECA et al., 2006, LOUREIRO et al., 2010). Já nos EUA, segundo o CDC (2006), *S. Newport* é que está entre os sorotipos mais frequentemente isolados em humanos com salmonelose, denotando o risco potencial desse agente.

Poucos trabalhos mencionam o envolvimento do sorovar *S. Schwarzengrund* na avicultura ou em surtos de infecção alimentar no Brasil. No entanto, atualmente, a incidência deste sorovar parece ter aumentado, e um estudo conduzido por VUGIA

et al. (2004), nos EUA, demonstrou que este foi o quinto sorovar mais comumente isolado da carne de frango, colocando as aves como seu reservatório mais comum. Além disso, há relato da disseminação de cepas de *S. Schwarzengrund* multi resistentes do frango para o homem, causada pela ingestão de alimentos contaminados (AARESTRUP et al., 2007)

As cepas analisadas foram isoladas em diferentes etapas de processamento e de variados tipos de amostra dentro da cadeia produtiva do frango de corte, conforme pode ser verificado na Tabela 3.

Tabela 3. Origem das 96 cepas de *Salmonella* sp. isoladas nas indústrias A (SP) e B (MS), conforme o tipo de amostra.

Ponto coleta ¹	Etapas de processamento	Tipo de amostra	Identificação das cepas ²	A ³	B ⁴	Nº total isolados
P1	Fábrica de ração	Suabe do caminhão	9	1	-	1
P2	Fábrica de ração	Matéria prima (farelo)	57	1	-	1
P3	Aviário frango corte	Suabe de arrasto	1 2 7 24 25 26 27 28 29 30 51 52 53	13	-	13
P4	Aviário frango corte	Propé	3 4 5 6 8 31 32 54 55 56 63	11	-	11
P5	Aviário frango corte	Suabe com propé	23 70 71 72 73 74 75 77	1	7	8
P6	Aviário frango corte	Propé pós higienização	76	-	1	1
P7	Recepção	Suabe de caminhão	69	-	1	1
P8	Recepção	Suabe de gaiola	68	-	1	1
P9	Recepção	Suabe de cloaca	78 79	-	2	2
P10	Escaldagem	Água de escaldagem	19 41	2	-	2
P11	Resfriamento	Água de resfriamento	42 84 91 96	1	3	4
P12	Resfriamento	Miúdos	18 44 93	2	1	3
P13	Resfriamento	Carcaça resfriada	10 11 12 14 16 20 39 40 46 61 64 85 86 87 88 89 94	11	6	17
P14	Sala de cortes	Cortes sem osso	21 22 33 45 50 59 60 62 65 95	9	1	10
P15	Sala de cortes	Cortes com osso	13 17 37 43 66 80 81 82 90	5	4	9
P16	Sala de cortes	CMS*	34 35 36 38 47 48 49 58 83 92	8	2	10
P17	Sala de cortes	Pele	15 67	2	-	2
TOTAL				67	29	96

¹ Consultar a figura 1 para localização dos pontos de coleta; ² Consultar a tabela 2 para identificação dos sorovares; ³A: isolados da indústria A; ⁴S: isolados da indústria B; *CMS: Carne mecanicamente separada.

Salmonella Minnesota foi o sorotipo que apresentou maior distribuição (cepas

1 a 22 e 68 a 93, tabela 3), identificada em quase todos os pontos de coleta, exceto na matéria prima utilizada pela fábrica de ração. Neste local, *S. Schwarzengrund* foi o único sorotipo isolado.

Os resultados positivos encontrados nas diferentes etapas do processo de abate, apresentados na tabela 3, indicam a importância de todos estes locais na contaminação por *Salmonella*, ressaltando que vários são os pontos a serem controlados. No entanto, alguns destes pontos merecem atenção especial por indicarem possíveis falhas, tanto na etapa de criação, como observado no ponto P6 (propé pós higienização, aviário frango de corte), como no processo de abate, demonstrado pelo ponto P11 (água de resfriamento, abatedouro).

O fator mais importante na manutenção da saúde avícola é a higiene, sendo a limpeza considerada um ponto fundamental na sanitização da granja. A presença de *Salmonella* em propé após higienização do aviário do frango de corte (ponto P6, tabela 3), indica uma baixa eficácia do programa de sanitização nas granjas, a qual não foi capaz de eliminar a presença deste microrganismo do ambiente de criação, podendo haver a contaminação dos lotes subseqüentes.

A legislação estabelece que a temperatura das carcaças ao final do processo de resfriamento deve ser igual ou inferior a 7°C (BRASIL, 1998). O objetivo de abaixar a temperatura das carcaças é evitar a proliferação de microrganismos. No entanto, as positividade observadas na água de resfriamento (P11, tabela 3) demonstram que este ponto não exerceu controle sobre *Salmonella* podendo, ao contrário, agir como fonte de disseminação do patógeno para as carcaças. Este inconveniente pode ser devido a temperaturas inadequadas e cloração deficiente da água de resfriamento.

Segundo BERSOT (2006), a qualidade da água, renovação, cloração e temperatura devem ser constantemente monitorados dentro do fluxograma de abate, desde o transporte das aves vivas até as carcaças embaladas, para a manutenção da qualidade microbiológica da carne, com conseqüente redução da prevalência de *Salmonella* no produto final.

4.2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

O uso desequilibrado de antimicrobianos na medicina humana e em animais de produção carrega riscos pela seleção de bactérias resistentes aos mesmos, o que enfraquece, gradativamente, o emprego da antibioticoterapia. Assim, o uso de antibióticos na avicultura com objetivos profiláticos e de promoção de crescimento, proporcionam a liberação de resíduos no ambiente que por sua vez acabam aumentando essa pressão de seleção e favorecendo a emergência de microrganismos resistentes (PALERMO NETO, 2011).

A determinação do perfil de resistência das cepas de *Salmonella* é importante para o estabelecimento de suas características dentro da cadeia produtiva do frango, já que os antibióticos são muito empregados durante a etapa de criação. A utilização do método de difusão com discos de antibióticos constituiu numa importante ferramenta no monitoramento da resistência, e a análise da concentração inibitória mínima (CIM) permitiu a obtenção de resultados mais precisos quanto à sensibilidade dos microrganismos em relação aos antimicrobianos.

Os resultados obtidos pelo teste de difusão em discos estão apresentados nas tabelas 4 e 5, referentes aos isolados das indústrias A e B, respectivamente.

Tabela 4. Distribuição das 67 cepas de *Salmonella* isoladas na indústria A (SP), conforme três categorias de resistência frente a 10 antimicrobianos.

ANTIMICROBIANO	NÚMERO DE CEPAS (%)		
	RESISTENTES	INTERMEDIÁRIAS	SENSÍVEIS
Amoxicilina (10µg)	9 (13,43)	12 (17,91)	46 (68,66)
Gentamicina (10µg)	2 (2,98)	0	65 (97,02)
Trimetoprima (5µg)	1 (1,49)	0	66 (98,51)
Ceftazidima (30µg)	1 (1,49)	1 (1,49)	65 (97,02)
Tetraciclina (30µg)	23 (34,33)	2 (2,98)	42 (62,69)
Sulfonamida (300µg)	26 (38,81)	2 (2,98)	39 (58,21)
Outros*	0	0	67 (100)

* Outros: norfloxacina (10µg), neomicina (30µg), cloranfenicol (30µg), imipenem (10µg).

Conforme pode ser verificado na tabela 4, para as 67 cepas analisadas na indústria A, o maior percentual de resistência, considerando também isolados com resistência intermediária, foi para sulfonamida com 28 cepas (41,79%), seguido pela

tetraciclina com 25 (37,31%) e amoxacilina com 21 (31,34%) cepas. Para os antibióticos gentamicina, trimetoprima e ceftazidima foram obtidas menores percentagens de cepas resistentes ou com resistência intermediária. Todos os 67 isolados foram sensíveis ao norfloxacin, neomicina, cloranfenicol e imipenem.

Na tabela 5 pode-se observar que das 29 cepas estudadas na indústria B, o maior percentual de resistência, incluindo cepas com resistência intermediária, também foi para tetraciclina e sulfonamida com 26 cepas (89,66%), seguido pela neomicina com 13 (44,83%) e amoxacilina com nove (31,03%). Para trimetoprima e cloranfenicol também foram encontradas cepas resistentes, porém em pequena quantidade. Todas as 29 cepas analisadas foram sensíveis ao norfloxacin, gentamicina, ceftazidima e imipenem.

Tabela 5. Distribuição das 29 cepas de *Salmonella* isoladas na indústria B (MS), conforme três categorias de resistência frente a 10 antimicrobianos.

ANTIMICROBIANO	NÚMERO DE CEPAS		
	RESISTENTES	INTERMEDIÁRIAS	SENSÍVEIS
Amoxacilina (10µg)	5 (17,24)	4 (13,79)	20 (68,97)
Neomicina (30µg)	0	13 (44,83)	16 (55,17)
Trimetoprima (5µg)	5 (17,24)	0	24 (82,76)
Cloranfenicol (30µg)	1 (3,45)	0	28 (96,55)
Tetraciclina (30µg)	26 (89,66)	0	3 (10,34)
Sulfonamida (300µg)	26 (89,66)	0	3 (10,34)
Outros*	0	0	29 (100)

* Outros: norfloxacin (10µg), gentamicina (10µg), ceftazidima (30µg), imipenem (10µg).

Considerando o número total de amostras isoladas nas indústrias A e B (96 cepas), os maiores percentuais de resistência foram obtidos para sulfonamida com 54 cepas (56,25%), seguido pela tetraciclina com 51 (53,12%) e amoxacilina com 30 (31,25%) (tabelas 4 e 5), os quais pertencem, respectivamente, as classes das sulfonamidas, tetraciclina e beta lactâmicos benzilpenicilâmicos, que tiveram seu uso banido no Brasil como promotores de crescimento (BRASIL, 2009). Esses dados podem ser indicativos do uso, não controlado ou não assistido, desses antimicrobianos na avicultura de corte, propiciando o aparecimento de cepas resistentes, o que dificulta o seu controle.

De acordo com a Instrução Normativa nº 26 (BRASIL, 2009), os antibióticos

pertencentes as classes dos anfenicóis, tetraciclinas, beta lactâmicos subclasse dos benzilpenicilâmicos, beta lactâmicos subclasse das cefalosporinas, quinolonas e sulfonamidas sistêmicas são de uso exclusivo veterinário em terapêutica, sendo vedada a sua utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais.

Para o antibiótico cloranfenicol (anfenicol) houve apenas um (1,04%) isolado resistente. De acordo com a Instrução Normativa n° 9 (BRASIL, 2003) é proibido a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso do princípio ativo cloranfenicol e os produtos que contenham este princípio ativo para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos.

Para a ceftazidima (cefalosporina 3ª geração) houveram dois (2,08%) isolados resistentes, enquanto que para norfloxacin (fluorquinolona) não houve relato de cepas resistentes neste estudo, sugerindo uma boa aplicação dessas drogas na terapêutica veterinária. Dados fornecidos pelo Prebaf (BRASIL, 2008) apontaram maiores percentuais de resistência ao encontrado neste estudo, com 59,2% de isolados resistentes ao grupo dos anfenicóis, 44% para as quinolonas e 22,8% para cefalosporinas de 3ª geração.

Em outro estudo desenvolvido no Brasil, em Jaboticabal, São Paulo, utilizando cepas de *Salmonella* isoladas de carcaças de frangos congelados, 100% dos isolados foram resistentes à ampicilina (beta lactâmico penicilâmicos), 75% à cefalotina (cefalosporina), 52,1% à cefoxitina (cefalosporina) e 6,2% à tetraciclina (SANTOS et al., 2000). Esses resultados não concordam com este estudo, no qual foram encontrados menores percentuais de resistência para antibióticos dos grupos beta lactâmicos benzilpenicilâmicos (31,25%) e cefalosporinas (2,08%), e maiores para o grupo das tetraciclinas (53,12%).

Nas tabelas 6 e 7 estão apresentados os sorotipos de *Salmonella* e os respectivos perfis de resistência a antimicrobianos. Neste estudo, foram considerados multi resistentes aqueles isolados que apresentaram resistência a três ou mais antibióticos, de acordo com o adotado por BRASIL (2008).

Tabela 6. Distribuição das 67 cepas de *S. Minnesota*, *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*

e *S. Newport* isoladas na indústria A (SP), conforme 16 perfis de resistência a antimicrobianos.

PERFIL	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS ^a	ESPÉCIE ^b	CEPAS ^c	Nº DE CEPAS
A1	(AMO)	<i>S. Infantis</i>	23 31 32 33 34 47 49	7
		<i>S. Schwarzengrund</i>	54 57	2
A2	(TET)	<i>S. Schwarzengrund</i>	60	1
A3	(SUL)	<i>S. Infantis</i>	30	1
		<i>S. Schwarzengrund</i>	55	1
A4	AMO	<i>S. Infantis</i>	26 35	2
		<i>S. Schwarzengrund</i>	52	1
A5	TET	<i>S. Infantis</i>	43	1
A6	SUL	<i>S. Newport</i>	64 65	2
A7	SUL (AMO)	<i>S. Infantis</i>	40	1
A8	SUL (TET)	<i>S. Schwarzengrund</i>	61	1
A9	AMO CAZ	<i>S. Infantis</i>	28	1
A10	TET SUL	<i>S. Minnesota</i>	1 2 3 6 10 11 12 13 14 15 18	11
		<i>S. Infantis</i>	42 44	2
A11	TET SUL (AMO)	<i>S. Minnesota</i>	20	1
A12	TET SUL AMO	<i>S. Minnesota</i>	7 8 21 22	4
A13	TET SUL AMO (CAZ)	<i>S. Minnesota</i>	16	1
A14	TET SUL GEN	<i>S. Minnesota</i>	4 5	2
A15	TET SUL TRI (AMO)	<i>S. Minnesota</i>	17	1
A16	Multi-sensível	<i>S. Minnesota</i>	9 19	2
		<i>S. Infantis</i>	24 25 27 29 36 37 38 39 41 45 46 48 50	13
		<i>S. Schwarzengrund</i>	51 53 56 58 59 62	6
		<i>S. Newport</i>	63 66 67	3
TOTAL				67

^a Perfis entre parênteses = cepas com resistência intermediária ao(s) antimicrobiano(s); AMO: amoxicilina (10µg); CAZ: ceftazidima (30µg); GEN: gentamicina (10µg); TRI: trimetoprima (5µg); TET: tetraciclina (30µg); SUL: sulfonamida (300µg); Multi-sensível: cepas sensíveis a todos os antimicrobianos acima, além de norfloxacino (10µg), neomicina (30µg), cloranfenicol (30µg) e imipenem (10µg).

^b Espécies identificadas de acordo com a sorotipificação realizada pela FIOCRUZ.

^c Consultar as tabelas 2 e 3 para identificação do local de isolamento das cepas.

Conforme apresentado na tabela 6 foram reconhecidos 16 perfis de resistência a antimicrobianos (A1 a A16) na indústria A, com uma a 13 cepas cada. O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos revelou que dentre as 67 cepas analisadas, 43 (64,18%) apresentaram resistência ou resistência intermediária a uma ou mais drogas, sendo estas agrupadas nos perfis A1 a A15. Apenas 24 (35,82%) cepas foram sensíveis a todos antibióticos testados (perfil A16). Do total de 43 cepas resistentes, 34 (79,07%) foram resistentes a um ou dois antimicrobianos

(A1 a A10) e nove (20,93%) foram consideradas multi resistentes, por apresentarem resistência a mais de duas drogas (≥ 3 antibióticos) (A11 a A15) (tabela 6).

Foram encontrados dois perfis de *S. Newport*, seis de *S. Schwarzengrund*, sete de *S. Minnesota* e oito perfis de *S. Infantis*. Os sorovares *Infantis*, *Schwarzengrund* e *Newport* apresentaram resistência a até dois antibióticos, enquanto que o sorovar *Minnesota* apresentou resistência de dois a até quatro antibióticos, denotando o caráter multi resistente desse sorovar. Das 22 cepas de *S. Minnesota*, nove (40,91%) foram resistentes a três ou quatro antibióticos (A11 a A15), 11 (50%) a dois (A10) e apenas duas (9,09%) cepas foram sensíveis a todos os antibióticos (tabela 6).

Tabela 7. Distribuição das 29 cepas de *S. Minnesota*, *S. Schwarzengrund* e *S. Newport* isoladas na indústria B (MS), conforme 11 perfis de resistência a antimicrobianos.

PERFIL	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS ^a	ESPÉCIE ^b	CEPAS ^c	Nº DE CEPAS
A10	TET SUL	<i>S. Minnesota</i>	71 74 80 81 83	5
		<i>S. Schwarzengrund</i>	94 95	2
A11	TET SUL (AMO)	<i>S. Minnesota</i>	86	1
A12	TET SUL AMO	<i>S. Minnesota</i>	82 88	2
A15	TET SUL TRI (AMO)	<i>S. Minnesota</i>	93	1
A17	TET SUL (NEO)	<i>S. Minnesota</i>	69 76 77 78 79 85 90	7
A18	TET SUL (AMO NEO)	<i>S. Minnesota</i>	87	1
A19	TET SUL AMO (NEO)	<i>S. Minnesota</i>	70 72 89	3
A20	TET SUL TRI	<i>S. Minnesota</i>	73 84	2
A21	TET SUL TRI (NEO)	<i>S. Minnesota</i>	75	1
A22	TET SUL TRI CLO (AMO NEO)	<i>S. Minnesota</i>	92	1
A 23	Multi-sensível	<i>S. Minnesota</i>	68 91	2
		<i>S. Newport</i>	96	1
TOTAL				29

^a Perfis entre parênteses = cepas com resistência intermediária ao(s) antimicrobianos; AMO: amoxicilina (10µg); NEO: neomicina (30µg); CLO: cloranfenicol (30µg); TRI: trimetoprima (5µg); TET: tetraciclina (30µg); SUL: sulfonamida (300µg); Multi-sensível: cepas sensíveis a todos os antimicrobianos acima, além de norfloxacino (10µg), gentamicina (10µg), ceftazidima (30µg) e imipenem (10µg).

^b Espécies identificadas de acordo com a sorotipificação realizada pela FIOCRUZ.

^c Consultar as tabelas 2 e 3 para identificação do local de isolamento das cepas.

Entre as 29 cepas de *Salmonella* isoladas na indústria B, foram identificados

11 diferentes perfis de resistência a antimicrobianos (A10 a A12, A15, A17 a A23), com uma a sete cepas cada (tabela 7). Com exceção do perfil A23, os demais perfis agruparam 26 (89,66%) cepas resistentes ou com resistência intermediária, sendo que entre estas sete (26,92%) foram resistentes a dois antimicrobianos e um total de 19 (73,08%) apresentaram resistência a mais de dois antibióticos. Apenas três (10,34%) cepas foram sensíveis a todos antibióticos testados.

Das amostras da indústria B foi encontrado um perfil para os sorovares Newport (A23) e Schwarzenrund (A10) e 11 perfis para *S. Minnesota* (tabela 7). Os dois isolados de *S. Schwarzenrund* estudados apresentaram resistência a dois antibióticos, sendo eles tetraciclina e sulfonamida. O único isolado de *S. Newport* analisado foi sensível a todos antibióticos, enquanto o sorovar *Minnesota* apresentou resistência de dois a até seis antibióticos, reforçando o achado da indústria A sobre o caráter multi resistente desse sorovar. Das 26 cepas de *S. Minnesota*, cinco (19,23%) apresentaram resistência a dois antibióticos, 18 (69,23%) a três ou quatro, uma (3,85%) a seis antibióticos e apenas duas (7,69%) foram sensíveis a todas as drogas testadas.

A correlação entre os dados referentes aos perfis de resistência antimicrobiana (tabelas 6 e 7), com os pontos de isolamento das cepas de *Salmonella* na cadeia produtiva (pontos de coleta P1 a P17, tabela 3) mostra que os isolados multi resistentes (≥ 3 antibióticos) estiveram presentes nos mais variados tipos de amostras analisadas no aviário e no abatedouro. No ambiente de criação foram encontradas cepas multi resistentes nas seguintes amostras: suabe de arrasto (cepa 7), propé (cepas 4, 5 e 8), suabe com propé (cepas 70, 72, 73, 75 e 77) e propé pós higienização (cepa 76). Já no abatedouro cepas com perfis de multi resistência estiveram presentes em amostras de: suabe de caminhão (cepa 69), suabe de cloaca (cepas 78 e 79), água de resfriamento (cepa 84), miúdos (cepa 93), carcaças resfriadas (cepas 16, 20, 85, 86, 87, 88 e 89), cortes sem osso (cepas 21 e 22), cortes com osso (cepas 17, 82 e 90) e CMS (cepa 92).

A cepa 92 de *S. Minnesota*, perfil A22 (tabela 7), multi resistente (seis antibióticos), foi isolada de carne mecanicamente separada na sala de cortes do abatedouro (P16, tabela 3) da indústria B. Ainda neste local foram isoladas outras culturas desse mesmo sorovar, com resistência a dois (perfil A10, cepas 80, 81 e 83)

e três antimicrobianos (perfis A12 e A17, cepas 82 e 90) (tabela 7).

A frequência de cepas resistentes pode ser considerada alta, uma vez que do total de 96 cepas apenas 27 (28,13%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados (perfis A16 e A23), enquanto 69 (71,87%) apresentaram perfis de resistência a pelo menos um antibiótico (tabelas 6 e 7). Dentre essas 69, 28 isolados, sendo nove deles provenientes da indústria A e 19 da indústria B, apresentaram perfil de multi resistência (≥ 3 antibióticos), todos pertencentes ao sorovar *S. Minnesota*.

Acredita-se que o uso incorreto ou ilegal de antimicrobianos na avicultura industrial acabou por selecionar cepas do sorovar Minnesota de caráter multi resistente, melhor adaptadas as essas condições de pressão, que acabaram se disseminando no ambiente. Associado a esta hipótese, pode ter ocorrido a disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos, o que não foi avaliado neste estudo. A Prebaf (BRASIL, 2008) enfatiza a importância de caracterizar os clones multi resistentes quanto a sua capacidade de albergar e disseminar genes de resistência a antimicrobianos, o que demonstra a necessidade de prosseguimento deste assunto no presente estudo.

THRELFALL et al. (2000) acreditam que o aumento significativo no isolamento de cepas de *Salmonella* resistentes em países em desenvolvimento está associado principalmente ao uso profilático de antimicrobianos em animais destinados a produção de alimentos. Segundo LOGUE et al. (2003), o uso de antimicrobianos em nível de campo influencia na criação de um ambiente que promove a seleção de *Salmonella* resistente a antibióticos, o que pode refletir no processo de abate. E então, um pequeno número de carcaças contaminadas pode servir como fonte de disseminação de bactérias resistentes para outras carcaças.

A oposição do uso de antibióticos em baixas concentrações em rações de animais de produção, tem origem na preocupação de desenvolvimento da resistência a antibióticos pelas bactérias presentes nos animais e sua possível transferência para a população humana por meio da cadeia alimentar. Por isso, a ocorrência de cepas de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos em produtos de origem animal, alerta para uma condição de risco à saúde pública (BRASIL, 2008). Essa condição tem sido motivo de preocupação de órgãos internacionais como a

WHO, OIE e *Codex Alimentarius*.

Em uma reunião realizada pela FAO/WHO/OIE em Roma, na Itália, no final de 2007, foram apresentadas duas listas elaboradas pela WHO e a OIE referentes, respectivamente, aos antibióticos de uso criticamente importante tanto para a saúde humana como animal (OIE, 2007; WHO, 2007). Esta reunião buscou identificar os antimicrobianos pertencentes às duas listas e, tanto quanto possível, analisar o risco desse fato para a saúde humana. Segundo este estudo, três classes de antimicrobianos foram consideradas como prioritárias para o desenvolvimento de medidas e estratégias para manejo da resistência bacteriana, pois apareciam em ambas as listas, sendo eles: cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações, as quinolonas (incluindo as fluoroquinolonas) e os macrolídeos. No presente estudo, no entanto, como visto anteriormente, para o grupo das cefalosporinas foram encontrados apenas dois (2,08%) isolados resistentes, enquanto que para o grupo das fluoroquinolonas não houve relato de cepas resistentes. Este resultado demonstra o uso prudente e monitorado dessas drogas na avicultura, o que, conseqüentemente, reduz o risco de envolvimento de cepas resistentes aos mesmos na medicina humana, minimizando o risco para os humanos. Contudo, a relativa importância e contribuição do frango para o problema de resistência antimicrobiana em humanos é difícil de avaliar.

Para análise da CIM foram utilizadas fitas de Etest (BIOMÉRIEUX®) apenas para antibióticos aos quais foram encontrados os maiores percentuais de cepas resistentes pelo teste de difusão em disco, sendo eles sulfonamida, tetraciclina e amoxicilina. A análise da CIM foi realizada apenas nas cepas resistentes pelo teste de difusão em disco, com intuito de reavaliar a resistência de cada um desses isolados, além de determinar as concentrações mínimas do antibiótico necessárias para impedir o crescimento microbiano.

Para o antibiótico sulfonamida não foi encontrado a fita de Etest (BIOMÉRIEUX®), assim, utilizou-se a fita Etest de sulfametoxazol, correspondente ao mesmo grupo ou classe de antibióticos da sulfonamida.

Os gráficos 1, 2 e 3 representam o número de isolados obtidos em relação as diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) dos antibióticos tetraciclina, sulfonamida e amoxicilina, respectivamente.

Conforme informações da tabela do fabricante (BIOMÉRIEUX®) têm-se os seguintes critérios de interpretação para os antibióticos:

- tetraciclina: $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ (sensível), $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ (resistente).
- sulfametoxazol: $\leq 256 \mu\text{g/mL}$ (sensível), $\geq 512 \mu\text{g/mL}$ (resistente).
- amoxacilina: $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ (sensível), $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ (resistente).

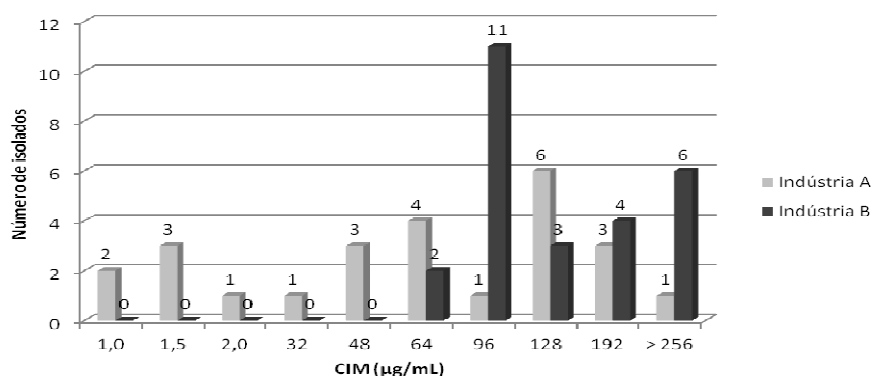


Gráfico 1. Distribuição dos resultados da CIM (µg/ml) de tetraciclina para amostras de *Salmonella* isoladas na indústria A (SP) e indústria B (MS).

Na análise do gráfico 1, para o antibiótico tetraciclina, as 25 cepas de *Salmonella* resistentes pelo teste de difusão em disco provenientes de da indústria A, apresentaram CIMs entre 1,0 e >256 µg/ml. Seis destas foram reclassificadas como sensíveis, por apresentarem CIM $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ e os demais isolados (19 cepas) foram considerados resistentes, com maior número de isolados para a CIM de 128 µg/ml. Para as 26 cepas da indústria B, as CIMs estiveram entre 64 e >256 µg/ml, todas resistentes, com maior número de isolados para CIM de 96 µg/ml.

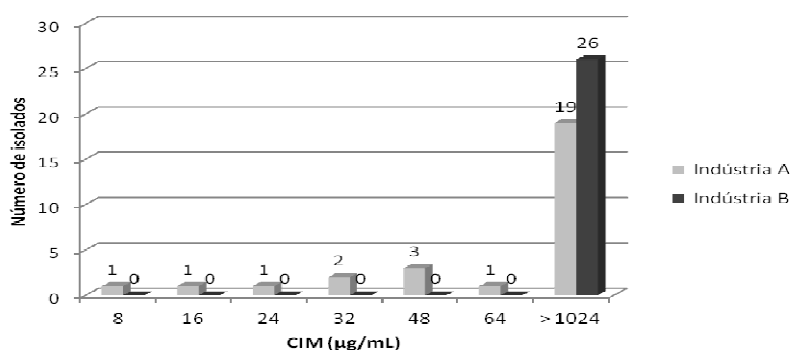


Gráfico 2. Distribuição dos resultados da CIM (µg/ml) de sulfametoxazol para amostras de *Salmonella* isoladas na indústria A (SP) e na indústria B (MS).

Os resultados das CIMs obtidas para o sulfametoxazol (gráfico 2), demonstram que nove dos 28 isolados analisados da indústria A, foram considerados sensíveis com CIMs $\leq 64 \mu\text{g/ml}$, enquanto que para o restante das amostras (19 cepas) a CIM foi maior que a máxima CIM analisada ($>1024 \mu\text{g/ml}$). Todos os isolados da indústria B (26 cepas) também apresentaram CIM $>1024 \mu\text{g/ml}$, portanto, todos resistentes.

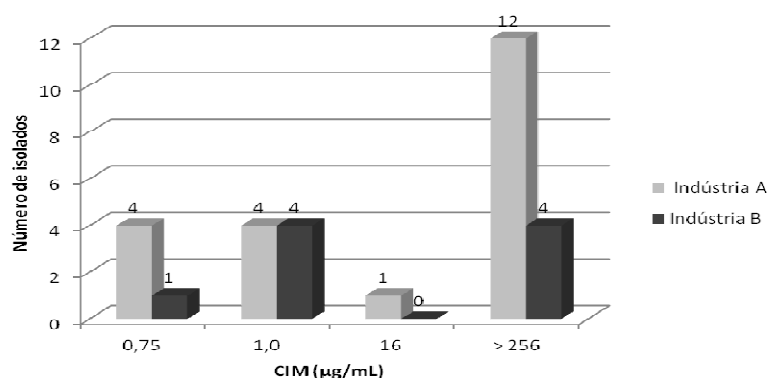


Gráfico 3. Distribuição dos resultados da CIM ($\mu\text{g/ml}$) de amoxicilina para amostras de *Salmonella* isoladas na indústria A (SP) e na indústria B (MS).

Para a análise da CIM frente ao antibiótico amoxicilina (gráfico 3), os isolados da indústria A (21 cepas) apresentaram CIMs entre $0,75 \mu\text{g/ml}$ e $>256 \mu\text{g/ml}$, definindo oito deles como sensíveis (CIMs de $0,75$ e $1,0 \mu\text{g/ml}$), um como intermediário (CIM de $16 \mu\text{g/ml}$) e 12 como resistentes (CIM $>256 \mu\text{g/ml}$). Das nove amostras da indústria B, cinco foram consideradas sensíveis (CIMs de $0,75$ e $1,0 \mu\text{g/ml}$) e quatro resistentes ($>256 \mu\text{g/ml}$).

Os dados apresentados pelos gráficos 1, 2 e 3, chamam a atenção pelo elevado número de cepas que apresentaram CIM acima da concentração máxima de cada antibiótico ($>256 \mu\text{g/ml}$ para amoxicilina e tetraciclina, e $>1024 \mu\text{g/ml}$ para sulfametoxazol), o que indica que as propriedades primitivas desse microrganismo podem ter sofrido alteração com o surgimento da resistência adquirida nessas cepas.

De acordo com PALERMO NETO (2011) a resistência adquirida a um determinado antibiótico é aquela que surge em uma bactéria primitivamente sensível

a esse mesmo antibiótico. Ou seja, refere-se ao aparecimento em um determinado momento, de cepas de uma espécie bacteriana que não mais sofrem a ação de medicamentos que se mostraram efetivos contra a população original dessa bactéria.

Estes resultados enfatizam a necessidade do uso mais criterioso de antibióticos na produção animal, baseado em testes prévios para avaliação da resistência, e na determinação de doses adequadas a serem aplicadas, através de análise da concentração inibitória mínima, evitando assim o surgimento de cepas com resistência adquirida a outros antibióticos, principalmente aos de uso comum na medicina humana. Para isso, se faz necessário um esforço contínuo, colaboração entre vários profissionais, de maneira especial, os profissionais das áreas de saúde e agropecuária, que devem atuar também na conscientização da população como um todo.

4.3 Relação filogenética entre os isolados

Para a ribotipagem automatizada, o DNA de cada cepa foi submetido à digestão com a enzima de restrição *PvuII*. Esta enzima foi selecionada por apresentar bons resultados para caracterização de *Salmonella*. Um estudo desenvolvido por BAILEY et al. (2002) utilizando isolados de *Salmonella* provenientes de aves resultou em uma taxa de identificação no *RiboPrinter*® maior que 80% quando utilizada a enzima de restrição *PvuII*. A *Salmonella* também pôde ser bem caracterizada por ribotipagem automatizada em trabalho desenvolvido por DE CESARE et al. (2001), no qual a enzima *PvuII* proporcionou melhor discriminação quando se estudou *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

Uma pesquisa desenvolvida por DE CESARE e MANFREDI (2002) utilizando o *Riboprinter*® para caracterização de bactérias do gênero *Salmonella*, demonstrou ser a técnica de ribotipagem automatizada uma ferramenta útil para trabalhar com a identificação de fontes e vias de transmissão de bactérias patogênicas relacionadas com alimentos, ou seja, para compreensão da

epidemiologia destes patógenos.

Das 96 amostras ribotipadas neste estudo, 63 foram identificadas, enquanto que para as 33 amostras restantes não foi possível obter a identificação do sorovar e seus respectivos ribogrupos.

As 33 amostras não identificadas pelo aparelho apresentaram restrição de DNA, porém não obtiveram caracterização de sorovar, pois ficaram abaixo do limiar de identificação de gênero, espécie e sorovar que é de 87%, não sendo reconhecidas pela biblioteca do aparelho.

O *RiboPrinter*® identifica gênero, espécie e sorovar dos microrganismos quando a similaridade do perfil de restrição obtido é igual ou superior a 87% de similaridade com os perfis existentes na livreria/biblioteca do aparelho. Quando esse percentual não chega a 87% a comparação e identificação manual pode ser feita, ou seja, o aparelho indica o microrganismo mais próximo existente na livreria e o identifica. Baseado nestes critérios, a técnica de ribotipagem automatizada reconheceu os seguintes sorovares dentre as 63 amostras identificadas: 21 cepas de *S. Minnesota* (33,34%), 14 *S. Infantis* (22,22%), 3 *S. Grumpensis* (4,76%), 2 cepas para os sorotipos *S. Agona*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Jangwani*, *S. Schwarzengrund*, *S. Newport* e *Pvu Group III* (3,17% cada) e 1 cepa para os sorotipos *S. Rubislaw*, *S. Poona*, *S. Sya*, *S. Javiana*, *S. Chicago*, *S. Paratyphi B*, *S. Livingstone*, *S. Derby*, *S. Kottbus*, *S. Saintpaul* e *Pvu Group II* (1,59%).

Sabendo que foram encaminhados para tipagem molecular apenas aqueles isolados identificados sorologicamente como *Minnesota*, *Infantis*, *Schwarzengrund* e *Newport*, observa-se que a ribotipagem permitiu a identificação de um maior número de sorovares de *Salmonella* comparado a identificação pelo método de sorotipificação realizado pela FIOCRUZ. Estes resultados indicam que a ribotipagem apresentou maior poder discriminatório que a tipagem sorológica de isolados de *Salmonella*, o que já era esperado, uma vez que a identificação se dá em nível genético. BAILEY et al. (2002) encontraram 80% de concordância entre os resultados do *RiboPrinter*® e da análise sorológica quando analisaram 259 isolados de *Salmonella*.

A sorotipagem é descrita por ser um método trabalhoso, demorado e de baixo poder discriminatório, e que requer um número amplo de reagentes especializados,

que não estão prontamente disponíveis. Além disso, a expressão de antígenos de superfície na célula é influenciada por condições ambientais, o que pode limitar a reprodutibilidade da sorotipagem de resultados entre laboratórios (DECESARE e MANFREDI, 2002). Métodos sorológicos tradicionais ainda requerem uma habilidosa equipe para realizar o protocolo e interpretar os resultados da aglutinação, o qual pode ser muito subjetivo. Já o sistema *Riboprinter*® analisa fragmentos genômicos gerados pela restrição dos operons rRNA, altamente conservados e presentes em várias cópias no cromossomo bacteriano, permitindo que a técnica seja aplicada com sucesso para diferenciar cepas bacterianas (GRIMONT e GRIMONT, 1986). As regiões mais conservadas dos operons permitem a identificação da bactéria em nível de gênero e espécie, enquanto que as regiões variáveis permitem a discriminação entre cepas (BRUCE, 1996).

Dentre os diferentes sorovares identificados pela técnica de ribotipagem, foram utilizados neste estudo, para análise de similaridade, apenas aqueles isolados pertencentes aos sorovares Minnesota, Infantis, Schwarzengrund e Newport. Desta forma, ao todo foram analisadas 39 cepas ribotipadas, as quais foram distribuídas nos ribogrupos apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Ribogrupos das 39 cepas de *Salmonella* dos sorovares Minnesota, Infantis, Schwarzengrund e Newport isoladas na indústria A (SP) e na indústria B (MS).

SOROVAR	RIBOGRUPO	CEPAS ¹										TOTAL	
		Indústria A					Indústria B						
Minnesota	208-S-8	1	2	5	11	21	70	76	77	81	83	87	11
	338-S-1	-					78	79	89				3
	339-S-7	4					-						1
	345-S-2	13					74	88					3
	345-S-8	22					82						2
	346-S-6	15					-						1
Infantis	206-S-4	44					-						1
	337-S-2	23	25	27	36	37	42	47	48	-			8
	338-S-6	26					-						1
	340-S-2	24					-						1
	340-S-4	31					-						1
	345-S-3	30					-						1
Schwarzengrund	347-S-6	29					-						1
	208-S-4	55	61				-						2
Newport	204-S-7	64	65				-						2
TOTAL													39

¹Consultar tabela 3 para identificação da origem dos isolados.

Entre as 21 amostras classificadas como sorovar Minnesota foram identificados seis ribotipos, sendo o ribogrupo 208-S-8 o mais prevalente com 11 identificações (52,38%). Dentre os 14 isolados do sorovar Infantis, houve sete ribogrupos diferentes, entretanto o ribogrupo 337-S-2 foi o mais prevalente com oito identificações (57,14%). Todas as amostras dos sorovares Schwarzengrund e Newport apresentaram o mesmo ribogrupo, 208-S-4 e 204-S-7, respectivamente, com 2 identificações cada (100%) (tabela 8).

O *RiboPrinter*® identifica o ribogrupo dos microrganismos quando a similaridade obtida pelo perfil de restrição é igual ou superior a 93% com os perfis existentes na biblioteca do aparelho. Assim, todos os isolados que apresentaram coeficientes de similaridade iguais ou maiores que 0,93 (93%) foram classificados como do mesmo ribogrupo, sendo estas amostras consideradas clones.

A alta prevalência do ribogrupo 208-S-8 do sorovar *S. Minnesota*, identificado tanto em amostras da indústria A (SP) como da indústria B (MS), caracteriza uma disseminação clonal deste sorovar, uma vez que foi encontrado em amostras coletadas em diferentes pontos dentro da cadeia produtiva industrial avícola e em regiões distintas. Este resultado demonstra que perfis de restrição idênticos podem ser encontrados, mesmo em se tratando de cepas sem relação geográfica ou outra relação epidemiológica conhecida.

O ribogrupo 208-S-8 incluiu cepas isoladas em amostras de suabe de arrasto e propé oriundas do aviário até cortes cárneos e carcaças refrigeradas provenientes do ambiente de abate. Estes resultados indicam que aves positivas na granja podem contribuir para um produto final contaminado, o que demonstra que medidas de controle no campo, se eficientes na redução da presença deste patógeno no conteúdo intestinal da ave, conseqüentemente também auxiliam na diminuição do mesmo durante as etapas de abate o que reduz o risco de transmissão ao homem via alimento. A classificação dentro deste mesmo grupo clonal de *S. Minnesota* isolada de propé pós-higienização do aviário (cepa 76, tabela 8) sugere a negligência as normas de biossegurança, o que contribui para a manutenção do microrganismo no ambiente de criação. REITER et al. (2007) encontraram associações significativas entre o nível de contaminação de frangos de corte e a

higiene do aviário, ração, água, animais e materiais amostrados no ambiente.

Todas as cepas pertencentes ao sorovar Minnesota ribogrupo 338-S-1 foram isoladas na indústria B nas dependências do ambiente de abate. A presença restrita destes isolados na indústria sugere possíveis falhas no processo de limpeza, propiciando o desenvolvimento deste microrganismo e aumentando o risco de contaminação devido à sua permanência após a higienização. De acordo com JOSEPH, OTTA e KARUNASAGAR (2001) a *Salmonella* tem sido recuperada a partir de uma variedade de superfícies de contato com alimentos e equipamentos no abatedouro, devido à capacidade deste patógeno aderir às superfícies no ambiente de processamento de alimentos e formar biofilme.

Para os demais ribotipos classificados dentro do sorovar Minnesota, o baixo número de amostras não permitiu traçar de maneira precisa o perfil de disseminação dentro da cadeia produtiva do frango de corte, por se tratarem de casos isolados.

O ribogrupo 337-S-2, mais prevalente dentre os ribogrupos encontrados para o sorovar Infantis, agrupou amostras isoladas tanto do aviário, provenientes de suabe, propé e suabe de arrasto, como do abatedouro, com isolados oriundos de cortes cárneos, carne mecanicamente separada e de água de resfriamento das carcaças. Este resultado caracteriza a disseminação clonal desse ribogrupo na cadeia produtiva, o qual foi identificado apenas na indústria A.

S. Infantis está entre os sorovares mais envolvidos em casos de salmonelose humana no Brasil, sendo reconhecida por seu potencial patogênico, caracterizado por um quadro gastroentérico, podendo determinar infecção septicêmica nos animais jovens e homem, principalmente em casos de infecções graves em crianças (FONSECA et al., 2006, LOUREIRO et al., 2010)

O baixo número de cepas pertencentes aos ribogrupos encontrados para os sorovares Schwarzengrund e Newport não permite fazer uma análise mais detalhada sobre sua disseminação.

Um grande número de cepas agrupadas em um mesmo ribogrupo indica que são de alta frequência em um habitat, enquanto que a ocorrência de uma única cepa formando um ribotipo representa que a cepa é esporádica no ambiente. Os isolados classificados em um mesmo ribotipo, quando identificados apenas em um sistema específico, ou seja, na granja ou na indústria, como aqui observado para amostras

do sorovar Newport ribogruppo 204-S-7 e para sorovar Minnesota ribotipo 338-S-1, ambos isolados apenas no ambiente de abate, podem ser considerados endógenos. Por outro lado, as cepas agrupadas em um mesmo ribogruppo provenientes de diferentes fontes podem ser mais facilmente disseminadas (DECESARE e MANFREDA, 2002). No entanto, neste trabalho não há como comprovar essa teoria, visto que foram analisadas um número restrito de amostras pela ribotipagem.

A identificação de um único ribotipo, associado a uma ou mais fontes de isolamento, e a possibilidade de distinguir cepas clonais, pode ser essencial para entender a origem e as vias de transmissão de muitas bactérias patogênicas e pode ser usada em modelos de avaliação de risco (DECESARE e MANFREDA, 2002).

5 CONCLUSÕES

Salmonella foi isolada nos mais variados pontos dentro da cadeia produtiva do frango de corte, abrangendo desde o ambiente de criação até o abate, incluindo também a fábrica de ração. Estes dados reforçam a importância de um monitoramento rigoroso que permita subsidiar ações que promovam o controle adequado deste patógeno desde a granja até as etapas de abate e garantam a saúde do consumidor.

Os maiores percentuais de resistência foram obtidos para antibióticos das classes das sulfonamidas, seguido pelo das tetraciclinas e beta lactâmicos benzilpenicilâmicos, os quais tiveram seu uso banido no Brasil como promotores de crescimento. Esses resultados podem ser indicativos do uso não controlado ou não assistido desses antimicrobianos na avicultura, levando a seleção de cepas resistentes, o que dificulta o seu controle.

A ocorrência de isolados de *S. Minnesota* que exibiram perfis de multi resistência (≥ 3 antibióticos) alertam para a necessidade de implantação de monitoramento sistemático da resposta aos antimicrobianos em bactérias zoonóticas transmitidas pelos alimentos.

A técnica de ribotipagem automatizada permitiu a identificação de dois grupos clonais mais prevalentes, pertencentes ao ribotipo 208-S-8 de *S. Minnesota* e ribotipo 337-S-2 de *S. Infantis*, os quais agruparam isolados coletados desde amostras do ambiente de criação até o abatedouro. Estes resultados indicam que aves positivas na granja contribuem para a contaminação do produto final, o que demonstra que medidas de controle no campo, se eficientes na redução da presença deste patógeno no conteúdo intestinal da ave, conseqüentemente também auxiliam na diminuição do mesmo durante as etapas de abate o que reduz o risco de transmissão ao homem via alimento.

O estudo da ligação epidemiológica existente entre as cepas de *Salmonella* permite que se determine, com precisão, os locais onde uma cepa aparece ou desaparece, identificando a etapa da cadeia de produção industrial do frango de corte que contribui para a contaminação do produto final.

6 REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.M. **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin**. 1. ed. Washington: ASM Press, 2006. 442 p.

AARESTRUP, F. M.; HENDRIKSEN, R. S.; LOCKETT, J.; GRAY, K.; TEATES, K.; MCDERMOTT, P. F.; WHITE, D. G.; HASMAN, H.; SORENSEN, G.; BANGTRAKULNONT, A.; PORNREONGWONG, S.; PULSRIKARN, C.; ANGULO, F. J.; GERNER-SMIDT, P. International spread of multidrug-resistant *Salmonella* Schwarzengrund in food products. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 13, n. 5, p. 726–731, mai. 2007.

AARESTRUP, F. M.; SEYFARTH, A. M.; EMBORG, H. D.; PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R. S.; BAGER, F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 45, n. 7, p. 2054-2059, jul. 2001.

ARSENAULT, J.; LETELLIER, A.; QUESSY, S.; BOULIANNE, M. Prevalence and risk factors for *Salmonella* and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 8, p. 1820-1828, ago. 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGO - ABEF. Avicultura brasileira: uma história de sucesso. **Ave World**. Biodiesel: uma fonte alternativa de renda para o avicultor, Paulínia, n. 28, p. 24-25, jun./jul. 2007.

BACK, A. Biosseguridade na avicultura brasileira. **Avicultura Industrial**, São Paulo, v. 98, n. 10, p. 22-24, 2006.

BAILEY, J. S. Detection of *Salmonella* cells within 24 to 26 hours in poultry samples with the polymerase chain reaction BAX system. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 7, p. 792-795, jul. 1998.

BAILEY, J. S.; FEDORKA-CRAY, P. J.; STERN, N. J.; CRAVEN, S. E.; COX, N. A.; COSBY, D. E. Serotyping and ribotyping of *Salmonella* using restriction enzyme *PvuII*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 6, p. 1005-1007, jun. 2002.

BALE, J. A.; DE PINNA, E. M.; THRELFALL, E. J.; WARD, L. R. **Kauffmann-White Scheme - 2007: Salmonella Identification; Serotypes and Antigenic Formulae**. London: Centre for Infections Health Protection Agency, 2007. 168 p.

BATT, C. A. Molecular Diagnostics for dairy-borne pathogens. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 1, p. 220-229, jan. 1997.

BAUER, A. W.; KIRB, M. M.; SHERRIN, J. D. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 45, n. 4, p. 493 – 496, 1966.

BERCHIERI JR., A.; BARROW, P. A. Patologias e métodos diagnósticos de *Salmonella* Enteritidis em aves. In.: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FACTA, 1995. p. 1-5.

BERCHIERI JR., A.; FERNANDES, S. A.; IRINO, K.; QUINTANA, J. L.; SANTOS, A. J. *Salmonella* in poultry feeds in Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 22-25, 1993.

BERCHIERI JR., A.; PAULILLO, A. C. Sensibilidade a antimicrobianos por *Salmonella* isolados de farinha de origem animal utilizados no preparo de rações. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 56-60, 1985.

BERCHIERI JR., A.; ROSSI JR., O. D.; PAULILLO, A. C.; IRINO, K.; FERNANDES, S. A.; ÁVILA, F. A.; PESSOA, G. V. A.; CALZADA, C. T. *Salmonella* em abatedouro avícola. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 3, n. 1, p. 81-87, 1987.

BERCHIERI JR., A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JR., A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 435-454.

BERENDS, B. R.; URLINGS, H. A. P.; SNIJDERS, J. M. A.; VAN KNAPEN, F. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 1-2, p.37-53, 1996.

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

BILLY, T. J. HACCP – a work in progress. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 6-7, p. 359-362, sep./oct. 2002.

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

BOLDRIN, M. C. F.; SILVEIRA, E. T. F. Qualidade de carne e seus impactos na indústria avícola. **Anuário 2007 da Avicultura Industrial**, São Paulo, v. 98, n. 11, p. 106-111, dez. 2006/jan. 2007.

BOSCÁN-DUQUE, L. A.; ARZÁLLUZ-FISHER, A. M.; UGARTE, C.; SÁNCHEZ, D.; WITTUM, T. E.; HOET, A. E. Reduced susceptibility to quinolones among *Salmonella* serotypes isolated from poultry at slaughter in Venezuela. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 9, p. 2030-2035, set. 2007.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 9, de 27 de Junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 jun. 2003, seção 1, p. 4.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2003a, seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 70, de 06 de outubro de 2003. Institui o programa de Redução de Patógenos -

Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em carcaças de Frangos e Perus. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 out. 2003b. Seção 1, p.9.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Aprova o regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 nov. 1998. Seção 1, p. 226.

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

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

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

CALIXTO, A. E. R.; SERAFINI, A. B.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B. Prevalência de *Salmonella* e ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos em insumos de rações para aves produzidos por um matadouro-frigorífico com fiscalização permanente, em Goiânia, GO. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 101, p. 56-62, 2002.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In. TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p 229-234.

CARDINALE, E.; TALL, F.; GUÈYE, E. F.; CISSE, M.; SALVAT, G. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* infection in senegalese broiler-chicken flocks. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 63, n. 3-4, p. 151-161, 2004.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Divulgação técnica - Salmonela na segurança dos alimentos. **Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 11-13, jan./jun., 2008.

CARRAMIÑANA, J. J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, I.; HERRERA, A. High prevalence of

multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 104, n. 1-2, p. 133-139, nov. 2004.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1465-1468, nov./dez. 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL - CDC. ***Salmonella* surveillance: annual summary, 2006**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2006/SalmonellaIntroduction2006.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2010.

CENTER FOR DISEASE CONTROL- CDC. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly through Foods – 10 States, United States, 2005. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 55, n. 14, p. 392-395, 2006.

COMISSÃO EUROPEIA - CE. Regulamento (CE) N° 646/2007 da comissão de 12 de junho de 2007. Dá execução ao Regulamento (CE) n° 2160/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere ao objetivo comunitário de redução da prevalência de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em frangos e que revoga o Regulamento (CE) n° 1091/2005. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, UE, 13 jun. 2007. L. 151/21.

COMISSÃO EUROPEIA – CE. Opinion of the Scientific Steering Committee on Antimicrobial Resistance. mai. 1999. 121 p.

COMUNIDADE ECONÔMICA EUROPÉIA - CEE. Regulamento N.º 1441/2007 de 05 de dezembro de 2007. Altera o Regulamento (CE) N.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, Bruxelas, 05 dez. 2007, p. 12-29.

CORTEZ, A. L. L. **Disseminação de bactérias dos gêneros *Campylobacter* e *Salmonella* em linhas de abate de aves**. 2006. 80 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2006.

COSTA, F.N. Sorotipos de *Salmonella* em carcaças e cortes de frango obtidos na

indústria e no comércio e comportamento das cepas isoladas frente à ação de antimicrobianos. 1996. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, 1996.

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

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

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

DAVIES, R. H.; WRAY, C. Studies of contamination of three broiler breeder houses with *Salmonella* Enteritidis before and after cleaning and disinfection. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 40, n. 1, p. 626-633, 1996.

DE CESARE, A.; MANFREDA, G.; DAMBAUGH, T. R.; GUERZONI, M. E.; FRANCHINI, A. Automated ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular typing of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Italy. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 5, p. 780-785, nov. 2001.

DE CESARE, A.; MANFREDA, G. Use of the automated ribotyping for epidemiological investigations. **Annals of Microbiology**, v. 52, p. 181-190, 2002.

DE VALK, H.; VAILLANT, V. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France. **Institut de Veille Sanitaire**, Charenton, France, mar. 2004.

DODD, C.E.R. The application of molecular typing techniques to HACCP. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 5, n. 5, p. 160-164, mai. 1994.

DOMÍNGUEZ, C.; GÓMEZ, I.; ZUMALACÁRREGUI, J. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 165-168, jan. 2002.

DORMEDY, E. S.; BRASHEARS, M. M.; CUTTER, C. N.; BURSON, D. E. Validation of acid washes as critical control points in hazard analysis and critical control point systems. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 12, p. 1676-1680, dez. 2000.

DUNNE, E. F.; FEY, P. D.; KLUDT, P.; REPORTER, R.; MOSTASHARI, F.; SHILLAM, P.; WICKLUND, J.; MILLER, C.; HOLLAND, B.; STAMEY, K.; BARRETT, T. J.; RASHEED, J. K.; TENOVER, F. C.; RIBOT, E. M. ; ANGULO, F. J. Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with ampC beta-lactamase. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 284, n. 24, p. 3151-3156, dez. 2000.

ELGROUD, R.; ZERDOUMI, F.; BENAZZOUZ, M.; BOUZITOUNA-BENTCHOUALA, C.; GRANIER, S. A.; FRÉMY, S.; BRISABOIS, A.; DUFOUR, B.; MILLEMANN, Y. Characteristics of *Salmonella* Contamination of Broilers and Slaughterhouses in the Region of Constantine (Algeria). **Zoonoses and Public Health**, Berlin, v. 56, n. 2, p. 84-93, mar. 2009.

ESPIE, E.; VAILLANT, V. International outbreak of *Salmonella* Stourbridge infection, April–July 2005: results of epidemiological, food and veterinary investigations in France. **Eurosurveillance**, Saint Maurice, v. 10, n. 8, ago. 2005.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. **The EFSA Journal**, Italy, v. 8, n. 3, p. 1-99, 2010.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks of *Gallus gallus*, in the EU, 2005-2006, Part A: *Salmonella* prevalence estimates. **The EFSA Journal**, Italy, v. 98, p. 1-85, mar. 2007.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs. Part A. *Salmonella* prevalence estimates. **The EFSA Journal**, Italy, v. 135, p. 1-111, mai. 2008a.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Scientific Opinion of the Panel on

Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. **The EFSA Journal**, Italy, v. 765, p. 1-87, 2008b.

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

FERNANDEZ, A. T.; FORTES, M. L. M.; ALEXANDRE, M. H. S.; BASTOS, C. S. P. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos na cidade do Rio de Janeiro. **Higiene Alimentar**, Rio de Janeiro, v.17, n.111, p. 58-63, 2003.

FONSECA, E. L.; MYKYTCZUK, O. L.; ASENSI, M. D.; REIS, E. M. F.; FERRAZ, L. R.; PAULA, F. L.; NG, L. K.; RODRIGUES, D. P. Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 8, p. 2767-2772, 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; GELLI, D. S. Foodborne diseases in Southern South America. In: MILIOTIS, M. D.; BIER, J. W. (Ed.). **International handbook of foodborne pathogens**. New York: Marcel Dekker, 2003. p.733-743.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiología de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

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

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. Enterobacteriaceae. In: FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S.; BARON, E. J. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology**. 11. ed. St. Louis: Mosby, 2002. p. 509-526.

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

GALÁN, J. E. *Salmonella* Interactions With Host Cells: type III Secretion at Work. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 17, p. 53-86,

2001.

GAMA, N. M. S. Q.; BERCHIERI JR, A; FERNANDES, S. A. Occurrence of *Salmonella* sp in laying hens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 5, n. 1, p. 15-21, jan./apr. 2003.

GAMA, N.M.S.Q. ***Salmonella* spp em aves de postura comercial**. 2001. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, 2001.

GANDRA, E. A.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S.; GODÓI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GAST, R. K.; HOLT, P. S. Assessing the frequency and Consequences os *Salmonella enteritidis* deposition on the egg yolk membrane. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, n. 7, p. 997-1002, jul. 2001.

GIROTTTO, A. F.; MIELE, M. Situação atual e tendências para a avicultura de corte nos próximos anos. **Anuário 2005 da Avicultura Industrial**, São Paulo, v. 96, n. 11, p. 20-28, 2004.

GORMAN, R.; ADLEY, C.C. Characterization of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium isolates from human, food, and animal sources in the republic of Ireland. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 5, p. 2314-2316, mai. 2004

GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. **Annales de l'Institut Pasteur. Microbiologie**, v. 137, n. 1, p. 165-175, jul. 1986. Supplement 2.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. **Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars**. 9. ed. Paris: World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, 2007. 166p.

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

HEYNDRICKX, M.; VANDEKERCHOVE, D.; HERMAN, L.; ROLLIER, I.; GRIJSPEERDT, K.; DE ZUTTER, L. Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 129, n. 2, p. 253–265, out. 2002.

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

HINTON, M. *Salmonella* infection in chicks following the consumption of artificially contaminated feed. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 100, n. 2, p.247-256, abr. 1988.

HOLLIS, R. J.; BRUCE, J. L.; FRITSCHER, S. J.; PFALLER, M. A. Comparative evaluation of an automated ribotyping instrument versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 34, n. 4, p.263-268, aug. 1999.

HOLMES, A.; NOLAN, R.; TAYLOR, R.; FINLEY, R.; RILEY, M.; JIANG, R. Z.; STEINBACH, S.; GOLDSTEIN, R. An epidemic of *Burkholderia cepacia* transmitted between patients with and without cystic fibrosis. **Journal of Infectious diseases**, Chicago, v. 179, n. 5, p. 1197–1205, mai. 1999.

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 504-509, jun. 2004.

IBAÑEZ, M. Marketing Internacional. **Anuário 2007 da Avicultura Industrial**, São Paulo, v. 98, n. 11, p. 28-29, dez. 2006/jan. 2007.

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

KIMURA, A. C.; REDDY, V.; MARCUS, R.; CIESLAK, P. R.; MOEHLE-BOETANI, J. C.; KASSENBERG, H. D.; SEGGER, S. D.; HARDNETT, F. P.; BARRETT, T.; SWERDLOW, D. L. Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in the United States: a case-control study in FoodNet sites. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 38, p. 244-

252, abr. 2004. Supplement 3.

KLAPPENBACH, J. A.; SAXMAN, P. R.; COLE, J. R.; SCHMIDT, T. M. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 181–184, jan. 2001.

KOTTWITZ, L. B. M.; BACK, A.; LEÃO, J. A.; ALCOCER, I.; KARAN, M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Contaminação por *Salmonella* spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 496-498, 2008.

LARKIN, C.; POPPE, C.; MCNAB, B.; MCEWEN, B.; MAHDI, A.; ODUMERU, J. Antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from hog, beef, and chicken carcass samples from provincially inspected abattoirs in Ontario. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.67, n. 3, p.448-55, mar. 2004.

LOGUE, C. M.; SHERWOOD, J. S.; OLAH, P. A.; ELIJAH, L. M.; DOCKTER, M. R. The incidence of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp on freshly processed poultry from US Midwestern processing plants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 1, p. 16-24, 2003.

LÓPEZ, M. T. J.; MARTÍN, C. M. Vigilancia epidemiológica de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Castilla y León (II) (años 1987 a 2003). **Boletín Epidemiológico de Castilla y León**, v. 20, n. 3, p. 1-8, 2004.

LOUREIRO, E. C. B.; MARQUES, N. D. B.; RAMOS, F. L. P.; REIS, E. M. F.; RODRIGUES, D. P.; HOFER, E. *Salmonella* serovars of human origin identified in Pará State, Brazil from 1991 to 2008. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Manaus, v. 1, n. 1, p. 93-100, 2010.

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

MARTÍNEZ, M. E. T. **Caracterización Molecular y Fenotípica como Herramienta de Marcaje Epidemiológico Para Cepas de Salmonella de Origen Porcino**. 2006. 63f. Tese (Doutorado de Medicina y Sanidad Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Autônoma de Barcelona, Barcelona, mar. 2006.

MARTINS, C. H. G.; SANTOS, V. R.; CASTRO, F. A.; FERNANDES, S. A.; MARTINEZ, R. Ribotyping of *Salmonella* Enteritidis strains reveals the spread of a single genotype in the Brazilian city of Ribeirão Preto. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 19-23, fev. 2006

MARTINS, S. C. S.; SERIO, J.; MATTEI, A. C. M.; ALBUQUERQUE, L. M. B. *Salmonella* em miúdos de aves: resistência a antibióticos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 78/79, p. 74-76, 2000.

MARTINS, F. M.; TALAMINI, D. J. D.; NOVAES, M. Avicultura: situação e perspectivas brasileira e mundial. **Ave World**, Paulínia, v. 4, n. 20, p. 24-30, fev./mar. 2006.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infection Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 5, p.607-625, set./out. 1999.

MELDRUM, R. J.; WILSON, I. G. *Salmonella* and *Campylobacter* in United Kingdom retail raw chicken in 2005. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 8, p. 1937-1939, aug. 2007.

MENDES, A. A. UBA: competitividade e qualidade do frango brasileiro para exportação. **Anuário Ave World**, Paulínia, p. 44-49, 2004.

MINE, Y. Controle e prevenção da *Salmonella* Enteritidis em frangos e ovos. **Ave World**: Os 10+ na carne de frango, Paulínia, v. 3, n. 15, p.34-35, abr./mai. 2005.

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

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twelvth informational supplement**. NCCLS M100-S12, v. 22, n. 1, Wayne, 2002.

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

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

PALERMO NETO, J. Mecanismos de resistência aos antibióticos em saúde pública. In: CONFERÊNCIA FACTA 2011 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2011, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 2011. p. 39-50.

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

PLYM FORSHELL, L; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, Paris, v. 25, n. 2, p. 541-554, ago. 2006.

POPOFF, M. Y. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars**. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 8.ed., Paris: Pasteur Institute, 2001. 156 p.

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

QUEVEDO, A. Segurança alimentar em avicultura. **Avicultura Industrial**, São Paulo, v. 98, n. 10, p. 31-33, 2006.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; IMBERECHTS, H.; GRIJSPEERDT, K.; DE ZUTTER, L.; HEYNDRICKX, M. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 8, p. 3615–3623, ago. 2005.

REIS, R. B.; KRUGER, C. S.; MACIEL, M. S. *Salmonella* spp. em produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá-MT. Avaliação da metodologia de pesquisa. Modelos de resistência a drogas antimicrobianas. **Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 74-78, 1995.

REITER, M. G. R.; FIORESE, M. L.; MORETTO, G.; LOPEZ, M. C.; JORDANO, R. Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 7, p. 1723-1725, 2007.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; LOMBARD, B.; SMITH, H.; RZEUZKA, A.; D'AGOSTINO, M.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; MIKO, A.; GUERRA, B.; DAVISON, J.; KOBILINSKY, A.; HERNÁNDEZ, M.; BERTHEAU, Y.; COOK, N. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 18, n. 6, p. 306-319, jun. 2007.

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

SCHROETER, A.; HOOG, B.; HELMUTH, R. Resistance of *Salmonella* Isolates in Germany. **Journal of Veterinary Medicine. Series B**, Berlin, v.51, n. 8-9, p.389-392, out./nov. 2004.

SHELOBOLINA, E. S.; SULLIVAN, S. A.; O'NEILL, K. R.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Isolation, characterization, and U (VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U (VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 5, p. 2959-2965, 2004.

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

SONCINI, R. A. Visão global da sanidade avícola. **Ave World**. Consumo de carne em alta, Paulínia, v. 6, n.32, p. 36-41, fev./mar. 2008.

SUN, L.; JIANG, R. Z.; STEINBACH, S.; HOLMES, A.; CAMPANELLI, C.; FORSTNER, J.; SAJJAN, U.; TAN, Y.; RILEY, M.; GOLDSTEIN, R. The emergence of a highly transmissible lineage of cbl+*Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* causing CF centre epidemics in North America and Britain. **Nature Medicine**, New York, v. 1, n. 7, p. 661-666, jul. 1995.

SWANENBURG, M.; BERENDS, B. R.; URLINGS, H. A. P.; SNIJDERS, J. M. A.; VAN KNAPEN, F. Epidemiological investigation into the sources of *Salmonella*

contamination of pork. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, Berlin, v. 114, n. 9-10, p. 356-359, 2001.

TALAMINI, D. J. D.; MARTINS, F. M.; NOVAES, M. A resposta da avicultura ao desafio da gripe aviária. **Anuário 2007 da Avicultura Industrial**, São Paulo, v. 98, n. 11, p. 18-26, dez. 2006/jan. 2007.

THRELFALL, E. J.; WARD, L. R.; FROST, J. A.; WILLSHAW, G. A. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.62, n.1-2, p.1-5, 2000.

TIROLI, I. C. C.; COSTA, C. A. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, n. 2, p. 205-208, 2006.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório anual 2009/2010**. São Paulo, 2010. 31 p. Disponível em:
<http://www.abef.com.br/noticias_portal/exibenoticia.php?notcodigo=2264>. Acesso em: 11 mar. 2011.

UNGEMACH, F. R.; MÜLLER-BAHRDT, D.; ABRAHAM, G. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 296, p. 33-38, jun. 2006. Supplement 2.

USER'S GUIDE BAX®. System PCR assay with automated detection for bacterial screening, Wilmington, Du Pont Qualicon, 2007.

VARMA, J. K.; MOLBAK, K.; BARRETT, T. J.; BEEBE, J. L.; JONES, T. F.; RABATSKY-HER, T.; SMITH, K. E.; VUGIA, D. J.; CHANG, H. G.; ANGULO, F. J. Antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 191, n. 4, p. 554-561, fev. 2005.

VIDAL, J. E.; SILVA, P. R. M.; NOGUEIRA, R. S.; BONASSER FILHO, F.; HERNANDEZ, A. V. Liver abscess due to *Salmonella* enteritidis in a returned traveler with HIV infection: case report and review of the literature. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 115-117, mar./abr. 2003.

VOETSCH, A. C.; VAN GILDER, T. J.; ANGULO, F. J.; FARLEY, M. M.; SHALLOW, S.; MARCUS, R.; CIESLAK, P. R.; DENEEN, V. C.; TAUXE, R. V. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 38, p. 127-134, abr. 2004. Supplement 3.

VORVICK, L. J.; VYAS, J. M.; ZIEVE, D. **Enterocolitis por Salmonella**. 2010. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000294.htm>>. Acesso em: 15 nov. 2010.

VUGIA, D. J.; SAMUEL, M.; FARLEY, M. M.; MARCUS, R.; SHIFERAW, B.; SHALLOW, S.; SMITH, K.; ANGULO, F. J. Invasive *Salmonella* infections in the United States, Food-Net, 1996–1999: incidence, serotype distribution, and outcome. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 38, p. s149–s156, abr. 2004. Supplement 3.

ZANCAN, F. T.; BERCHIERI Jr., A.; FERNANDES, S. A.; GAMA, N. M. S. Q. *Salmonella* investigation in transport boxes of day-old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 230-232, 2000.

ZANSKY, S.; WALLACE, B.; SCHOONMAKER-BOPP, D.; SMITH, P.; RAMSCY, P.; PAINTER, J.; GUPTA, A.; KALLURI, P.; NOVIELLO, S. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Newport. United States, January-April 2002. **MMWR**, v. 51, n. 25, p. 545-548, jun. 2002. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5125a1.htm>>. Acesso em: 13 out. 2010.

ZHAO, S.; QAIYUMI, S.; FRIEDMAN, S.; SINGH, R.; FOLEY, S. L.; WHITE, D. G.; MCDERMOTT, V.; DONKAR, T.; BOLIN, C.; MUNRO, S.; BARON, E. J.; WALKER, R. D. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolated from humans and food animals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n.12, p. 5366-5371, dez. 2003.

WACHTEL, M. R.; WHITEHAND, L. C.; MANDRELL, R. E. Prevalence of *Escherichia coli* associated with a cabbage crop inadvertently irrigated with partially treated sewage wastewater. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 3, p. 471-475, mar. 2002.

WEGENER, H. C.; HALD, T.; LO FO WONG, D.; MADSEN, M.; KORSGAARD, H.; BAGER, F.; GERNER-SMIDT, P.; MOLBAK, K. *Salmonella* control programs in

Denmark. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 7, p. 774–780. 2003.

WEILL, F. X.; LAILLER, R.; PRAUD, K.; KÉROUANTON, A.; FABRE, L.; BRISABOIS, A.; GRIMONT, P. A.; CLOECKAERT, A. Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTXM-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella* enteric serotype Virchow in poultry and humans in France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 12, p. 5767-5773, dez. 2004.

WHITE, P. L.; NAUGLE, A. L.; JACKSON, C. R.; FEDORKA-CRAY, P. J.; ROSE, B. E.; PRITCHARD, K. M.; LEVINE, P.; SAINI, P. K.; SCHROEDER, C. M.; DREYFUSS, M. S.; TAN, R.; HOLT, K. G.; HARMAN, J.; BUCHANAN, S. *Salmonella* Enteritidis in meat, poultry, and pasteurized egg products regulated by the U.S. Food Safety and Inspection Service, 1998 through 2003. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 3, p. 582-591, mar. 2007.

WHITE, D. G.; ZHAO, S.; SULDER, R.; AYERS, S.; FRIEDMAN, S.; CHEN, S.; MCDERMOTT, P. F.; MCDERMOTT, S.; WAGNER, D. D.; MENG, J. The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meat. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 16, p. 1147–1154, out. 2001.

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

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Food safety and foodborne illness**. 2002a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>>. Acesso em: 30 jan. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans**. 2002b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs268/en/print.html>>. Acesso em: 13 nov. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. Geneva, Switzerland, 5-9 June 2000. p. 1-7.

WILSON, I. G. *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of raw retail chickens from different producers: a six year survey. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 129, n. 3, p. 635-645, dez. 2002.

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

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH - OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2010. Salmonellosis. Paris, 2010. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.09_SALMONELLOSIS.pdf>. Acesso em: 17 out. 2010.