

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS,
DIVERSIDADE E RELAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA
DE *Salmonella* spp. ISOLADAS NA GRANJA DE
TERMINAÇÃO E ABATE DE SUÍNOS**

**Adélia Rodrigues Guimarães
Médica Veterinária**

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Agosto de 2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS,
DIVERSIDADE E RELAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA
DE *Salmonella* spp. ISOLADAS NA GRANJA DE
TERMINAÇÃO E ABATE DE SUÍNOS**

Adélia Rodrigues Guimarães
Orientadora: Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária – UFU, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciências Veterinárias (Produção Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Agosto de 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- G324a Guimarães, Adélia Rodrigues, 1967-
 “Resistência aos antimicrobianos, diversidade e relação epidemiológica de bactérias do gênero *Salmonella* spp isoladas na granja de terminação e abate de suínos” [manuscrito] / Adélia Rodrigues Guimarães. - 2010.
 56 f. : il.
- Orientadora: Daise Aparecida Rossi.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
 Inclui bibliografia.
 1. Microbiologia veterinária - Teses. I. Rossi, Daise Aparecida.
 II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 579.62

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Produção Animal

Dissertação defendida e aprovada em 25 de agosto de 2010, pela comissão
examinadora constituída por:

Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi
Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Maria Teresa Destro
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. André Luiz Quagliato Santos
Coordenador do Programa de Pós-graduação Ciências Veterinárias

“O verdadeiro caminho da sabedoria é não ter medo de errar e ter perseverança na conquista de nossos objetivos.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas pessoas especiais e oportunidades de aprendizagem colocadas em meu caminho.

Aos meus pais, Maria da Conceição R. Guimarães e Arnaldo Borges Guimarães (*in memoriam*) pelo amor, carinho e dedicação à família e pelos exemplos de perseverança e fé que sempre demonstraram na conquista de seus objetivos na vida.

Aos meus filhos, Eduardo Guimarães L. Paula, Enrique Guimarães L. Paula, pelo carinho e alegria que me proporcionam em todo momento.

Ao meu esposo, Eudes L. de Paula, pelo carinho, apoio e companheirismo que sempre teve comigo na alegria e nas adversidades da vida.

Aos funcionários do LABIO, Francesca e Liliane, pela amizade e ensinamentos que me proporcionaram ao longo da nossa convivência. Aos amigos e estagiários do LABIO, Eliane, Roberta, Belchiolina (Bia), Guilherme e Pedro pelo trabalho em equipe e colaborações prestadas durante a realização do meu projeto de pesquisa.

À Faculdade de Medicina Veterinária, em particular funcionários e docentes da Pós-Graduação, por tornar possível a realização do meu Mestrado e à FAPEMIG pelo financiamento desta pesquisa.

Em especial agradeço minha orientadora, Daise Aparecida Rossi, pela compreensão, amizade, apoio incondicional e aprendizagem proporcionada ao longo da nossa convivência e, sobretudo na realização deste trabalho. Para mim, é um exemplo de ética, competência e sabedoria na arte de ensinar.

Dedico este trabalho a minha mãe, Maria da Conceição R. Guimarães, pelo incentivo, apoio e por acreditar na concretização do meu mestrado. Pelos exemplos de luta, paciência e tolerância nas adversidades da vida, que me ensinaram a importância de ter perseverança e coragem na conquista de nossos sonhos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos gerais	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1 <i>Salmonella</i> spp.....	4
3.2 Saúde pública e <i>Salmonella</i> spp. na cadeia produtiva de suínos	6
3.2.1 Resistência aos antimicrobianos	11
3.3 <i>Randon Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD-PCR)	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Local	17
4.2 Amostras utilizadas no estudo.....	17
4.3 Processamento das amostras	19
4.3.1 Identificação sorológica preliminar e completa.....	20
4.4 Suscetibilidade aos antimicrobianos	21
4.5 Relação filogenética entre os isolados	21
4.6 Análise dos resultados	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Identificação dos isolados	23
5.2 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	37
6. CONCLUSÕES	43
7. TRABALHOS FUTUROS.....	44
REFERÊNCIAS	45

RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS, DIVERSIDADE E RELAÇÃO
EPIDEMIOLÓGICA DE *Salmonella* spp. ISOLADAS NA GRANJA DE
TERMINAÇÃO E ABATE DE SUÍNOS

RESUMO - *Salmonella* spp. é um importante patógeno zoonótico que pode ser disseminado ao longo da cadeia produtiva de suínos. Sua presença na carne destes animais é causa de preocupação para os frigoríficos e risco para a saúde pública. Foram utilizadas 86 amostras de *Salmonella* spp. previamente isoladas na cadeia produtiva de suínos, provenientes de 90 amostras de fezes suínas, 135 carcaças e 24 amostras ambientais. Objetivou-se determinar a resistência aos antimicrobianos, identificar os sorovares e estabelecer a relação filogenética entre eles pela técnica de RAPD-PCR. Foi realizada a identificação sorológica preliminar com o antissoro polivalente somático “O” e os monovalentes B, C e D, e em paralelo, foi realizada a caracterização antigênica definitiva em laboratório oficial. A resistência aos antimicrobianos foi determinada pelo método de difusão em discos, e a similaridade filogenética entre isolados pela técnica de RAPD-PCR. Os sorovares identificados foram: Typhimurium (32,55%), Agona (23,26%), Infantis (19,77%), Minnesota (17,44%) e Panama (6,98%). Os dendrogramas demonstraram homologia entre isolados dos diferentes sorovares agrupados em *clusters*. A similaridade foi independente do local de isolamento, comprovando a presença de clones ao longo da cadeia de produção. Indicaram também, que suínos excretando *S. Typhimurium* nas fezes contribuem para a contaminação da carcaça e para a contaminação cruzada, e que as condições de abate limitaram a sobrevivência de *S. Agona*. Para estes dois sorovares, a ração possivelmente foi a fonte primária de infecção dos animais na granja. Foi observada contaminação da depiladeira com o mesmo clone de *S. Minnesota* identificado nas fezes, porém, não houve isolamento nas carcaças. *S. Panamá* nas carcaças aparentemente não está relacionada à infecção prévia dos animais. Isolamentos de *S. Infantis* nas fezes foram relacionados à contaminação ambiental da granja ou à infecção em etapas anteriores à terminação dos animais. Foi observado padrão de multirresistência aos antimicrobianos testados para todos os sorovares, com mais de 50% apresentando resistência a nove dos 11 antibióticos testados. As drogas mais efetivas foram o sulfazotrim e a norfloxacin, com resistência de 16,3% e 54,6%, respectivamente. *S.*

Minnesota e *S. Infantis* apresentaram os mais elevados perfis de resistência ao sulfazotrim. Os resultados desse estudo demonstram a necessidade de monitoramento da resistência aos antimicrobianos de bactérias zoonóticas e implantação de medidas de controle mais eficazes para controlar a presença e persistência de *Salmonella* ao longo do processo produtivo de suínos como forma de garantir a inocuidade do alimento e segurança do consumidor.

Palavras-chave: *Salmonella*, RAPD, suínos, resistência aos antimicrobianos

ANTIMICROBIAL RESISTANCE, DIVERSITY AND EPIDEMIOLOGICAL RELATION OF *Salmonella* spp. ISOLATED FROM A FINISHING PORK FARM SLAUGHTERHOUSE

ABSTRACT - *Salmonella* spp. constitute an important zoonotic pathogen that may be disseminated widespread in the pork production chain. Its presence in the meat of these animals is cause of concern to slaughterhouses and a risk to human health. Eighty six samples of *Salmonella* spp. were used, previously isolated from the pork production chain, from 90 samples of swine feces, 135 carcasses and 24 environmental samples. The objective of this study was to determine the antimicrobial resistance, to identify the serotypes and to establish the phylogenetic relationship among them through RAPD-PCR technique. The serological identification was previously performed through O-somatic polyvalent antiserum and B, C and D monovalent ones, and concomitantly, the definite antigenic characterization tests were undertaken in official laboratory. The antimicrobial resistance was determined through disk diffusion antibiotic sensitivity testing, and the phylogenetic similarity among isolate samples through RAPD-PCR technique. The identified serotypes as follows: Typhimurium (32.55%), Agona (23.26%), Infantis (19.77%), Minnesota (17.44%) and Panama (6.98%). The dendrograms demonstrated homology among isolate samples from different serotypes grouped in clusters. The similarity was independent from the place of isolation confirming the presence of clones along the production chain. They also indicated swine that excrete *Salmonella* Typhimurium in feces contribute to the contamination of carcasses and to the cross contamination, and the slaughtering conditions limited the survival of *Salmonella* Agona. In regard to those two serotypes, the animal feed was probably the primary source of animal infection within the farm. Contamination was observed in the pork's epilator, where the same clone of *Salmonella* Minnesota identified in swine feces was present, but there were no isolate samples among carcasses. *Salmonella* Panamá among carcasses is apparently not related to the previous infection of animals. Isolate samples of *Salmonella* Infantis in swine feces were related to tenvironmental infection of the farm or to the infection during anterior stages in relation to finishing animals.

Multiresistance pattern to antimicrobials was observed in all serotypes tested, being more than 50% with resistance to nine out of the eleven tested antibiotics. The most effective drugs were the Sulfazotrim and the Norfloxacin, with resistance from 16.3% to 54.6%, respectively. *Salmonella* Minnesota and *Salmonella* Infantis presented the most elevated pattern of resistance to Sulfazotrim. The results of this study demonstrated the necessity of monitoring the antimicrobial resistance of zoonotic bacteria and the implantation of more effective manners to control the presence and persistence of *Salmonella* along the pork production chain as a way to guarantee the innocuity of food and consumer safety.

Keywords: *Salmonella*, RAPD-PCR, pork, antimicrobial resistance

1. INTRODUÇÃO

Salmonella é considerado o gênero mais complexo da família *Enterobacteriaceae*, sendo descritos mais de 2500 sorovares (GRIMONT, WEILL 2007). Trata-se de um problema de saúde pública, considerando-se sua ampla distribuição na natureza, seu caráter zoonótico e principalmente por acometer seres humanos e animais indistintamente, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (WEISS *et al.*, 2002; EFSA, 2009).

A diversificação da produção industrial de alimentos de origem suína e o intercâmbio comercial de animais e seus derivados destinados ao consumo humano podem ser importantes disseminadores de sorovares de *Salmonella* spp. na cadeia alimentar. Dessa forma, a presença desse microrganismo no processo de produção representa uma importante barreira sanitária para o comércio de animais e seus subprodutos (ALMEIDA *et al.*, 2000; SEIXAS *et al.*, 2009).

Produtos de origem suína merecem atenção como fontes potenciais de salmoneloses que acometem humanos. A preocupação aumentou depois que surtos de infecção alimentar ocorridos na Dinamarca tiveram sua origem associada ao consumo destes produtos (FEDORKA-CRAY, 1996). Mais recentemente, Hill *et al.* (2008) relataram que de 1% a 10% das salmoneloses humanas são atribuídas ao consumo de carne suína e que 17% dos suínos em idade de abate podem estar infectados por *Salmonella* spp. e 4% deles excretando o microrganismo nas fezes.

Diversos países possuem programas de controle para prevenir a salmonelose, que incluem estudos que determinam a prevalência do microrganismo, seus sorovares e biótipos como forma de subsídio às medidas de seu controle nos rebanhos e na garantia da qualidade dos produtos oferecidos nos mercados internos ou externos (EFSA, 2008a).

Segundo relatórios da EFSA (2008a), nos países da União Européia, em 2007, houve uma diminuição de 13,5% nos relatos de salmonelose em humanos em relação a 2007. Porém, esta zoonose continua sendo a causa mais frequente de infecções alimentares notificadas, representando 35% do total, seguida por vírus e toxinas bacterianas. Entre as fontes alimentares mais comuns, a carne suína e seus subprodutos foi a segunda mais incriminada representando 10% do total.

Em suínos, poucos sorovares de *Salmonella* spp. causa doença, como *S. Choleraesuis* e *S. Typhimurium*, e podem se manifestar como uma septicemia aguda ou como uma enterocolite aguda ou crônica (BARCELLOS *et al.*, 1984; SOBESTIANSKY *et al.*, 1999). Porém, estudos demonstram que sorovares considerados específicos de uma espécie animal, como *S. Choleraesuis* para suínos e *S. Pullorum* para galinhas, apesar de causar doença clínica, não são os principais envolvidos na contaminação da carne e de seus produtos (WILCOCK, SCHWARTZ, 1993; FEDORKA-CRAY, GRAY, 1996). Isso ressalta a importância de animais com infecção assintomática.

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 (OIE, 2004). O aumento da densidade e o uso indiscriminado de antibióticos, inseridos no processo de produção de alimentos de origem animal, podem funcionar como pressão de seleção para alguns sorovares e para a resistência desses aos antimicrobianos.

Segundo Wray e Sojka (1977) é amplamente aceito que os animais infectados com *Salmonella* são as maiores fontes de infecção para outros animais e seres humanos. Assim, é importante o monitoramento constante com identificação dos sorovares e estabelecimento da relação epidemiológica desses ao longo da cadeia de produção. A resistência aos antimicrobianos também deve ser determinada para verificar se há aquisição e disseminação desse perfil (EFSA, 2008b).

Conhecer resistência às drogas antimicrobianas, sorovares e relação filogenética entre espécimes de *Salmonella* spp. isolados nos diferentes pontos da cadeia produtiva de suínos poderá contribuir para o melhor entendimento do comportamento do microrganismo e gerar informações que podem auxiliar na implantação de medidas de controle efetivas para a produção de alimentos seguros.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer a relação entre espécies de *Salmonella* spp. isoladas em granja de terminação de suínos e no frigorífico, sua disseminação e presença na carne produzida.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar *Salmonella* spp. provenientes de swabs retais e de carcaças suínas, isoladas por meio da:

- identificação dos sorovares mais frequentes em fezes de animais vivos nas granjas produtoras e após o transporte ao frigorífico;
- avaliação de sorovares mais frequentemente isolados nas etapas de abate, após depilação, em linfonodos da cadeia mesentérica e após serragem da carcaça;
- determinação da susceptibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos;
- identificação dos sorovares em ração e utensílios utilizados no abate, e discussão da sua relação com os isolados em animais vivos e em carcaças;
- comparação dos resultados obtidos na sorologia preliminar com antisoros B, C e D e identificação antigênica em laboratório oficial;
- avaliação da relação filogenética entre os microrganismos isolados.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bacilos gram negativos, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. Fermentam glicose, reduzem nitratos a nitritos e não produzem citocromo oxidase. A maioria é móvel por possuírem flagelos peritríquios (FORBES, 2002; MARTINEZ, 2006; LOUREIRO *et al.*, 2010).

Métodos moleculares demonstram que o gênero consiste de duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* (LE MINOR e POPOFF, 1987; REEVES *et al.*, 1989). 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*.

Baseado em reações bioquímicas, por meio da utilização de carboidratos, proteínas e produção de gás, a espécie *enterica* foi subdividida em seis subespécies: I- *enterica*; II- *salamae*; IIIa - *arizonae*; IIIb- *diarizonae*; IV- *houtenae*; V- *indica* (TOZETTO, 2006; LOUREIRO *et al.*, 2010).

A forma de citação para designar membros do gênero *Salmonella* é a seguinte: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ou, simplesmente, *Salmonella* Typhimurium, com o nome do gênero, espécie e subespécie em itálico e do sorovar em tipo romano. Na rotina, utiliza-se o esquema de Kauffmann-White na caracterização antigênica de bactérias do gênero, determinando-se as frações dos antígenos somáticos (O) de natureza polissacarídica, e as nove estruturas flagelares (H), que são de natureza protéica (LOUREIRO *et al.*, 2010).

De acordo com Grimont e Weill (2007) há um total de 2.579 sorovares isolados de *Salmonella* spp. Desses, 22 pertencem à espécie *S. bongori* e a maior parte, à espécie *enterica* subsp. *enterica* com 1.531 espécimes.

Salmonella spp. está amplamente difundida na natureza, sendo encontrada no trato gastrointestinal de mamíferos, aves, répteis e insetos. Em seres humanos podem causar doenças como a febre tifóide, bacteremia, gastroenterite e infecções

focais. 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. Porém há sorovares que podem infectar animais e seres humanos indistintamente (LOUREIRO *et al.*, 2010).

O consumo de alimentos contendo bactérias patogênicas em doses infectantes é um problema de saúde pública. Alimentos a base de carne e ovos têm sido os mais correlacionados como veiculadores da salmonelose para seres humanos, embora muitos outros alimentos possam ser contaminados secundariamente (EFSA, 2009).

A frequência de isolamento de *Salmonella* spp. em alimentos é um fator de risco de infecção alimentar para seres humanos. A avaliação dos sorovares de *Salmonella* spp. isolados de alimentos foi relatada por vários autores.

Dezessete sorovares de *Salmonella* spp. foram identificados na Região de São José do Rio Preto-SP entre os anos de 1990 a 1999 a partir de fezes de humanos com infecção clínica. Foi observado aumento na frequência de isolamento de *S. Enteritidis* a partir de 1992. Nos isolados fecais, verificou-se uma predominância de *S. Enteritidis* (76,3%) e o surgimento de outros sorovares, embora em porcentagens menores: *S. Emek*, *S. Agona*, *S. Ohio*, *S. Bredeney* e *S. Javiana*. Em alimentos envolvidos em doenças, *S. Enteritidis* também foi a mais frequente (56,2%) havendo uma maior diversificação de sorovares em carnes e especiarias. *S. Oranienburg* foi detectada somente em especiarias e temperos. Nas carnes e derivados foram identificados *S. Enteritidis*, *S. Albany*, *S. Agona*, *S. Infantis* e *S. Mbandaka* (ALMEIDA *et al.*, 2000).

Gutiérrez *et al.* (2000) identificaram antigenicamente como *Salmonella*, 24.394 microrganismos isolados nos serviços públicos do México durante os anos de 1972 a 1999. Destes, 15.843 (64,9%) possuíam origem humana e 8.551 (35,1%) eram de fonte não humana. Foram identificados 199 sorovares, sendo os mais frequentes em amostras clínicas humanas: *S. Typhimurium* (20,4%), *S. Enteritidis* (18,3%), *S. Agona* (5,4%), *S. Newport* (5,6%), *S. Derby* (4,2%), *S. Anatum* (3,8%) e *S. Heidelberg* (3,9%). Já em amostras não humanas as mais frequentes foram: *S. Derby* (13,8%), *S. Anatum* (8,7%), *S. Agona* (7,5%), *S. Typhimurium* (6,8%), *S.*

Enteritidis (6,7%), *S. Newport* (2,7%) e *S. Heidelberg* (2,5%). Dos isolamentos de amostras não humanas, 57,6% foram oriundos de alimentos, dentre eles, 51% de alimentos prontos para consumo, 4,5% de água e 37,9% de amostras ambientais. Os autores destacaram como importante o isolamento de *S. Worthington* nas amostras provenientes de seres humanos (2,2%), pois há seu relato em 1975 em amostra de água e os níveis de isolamento mantiveram-se em menos de 1% em 1991.

3.2. Saúde pública e *Salmonella* spp. na cadeia produtiva de suínos

A salmonelose é uma das principais causas de gastroenterite em humanos veiculada por alimentos em todo o mundo, sendo considerada um importante problema de saúde pública tanto em países industrializados como em desenvolvimento (EFSA, 2009; EFSA, 2010; LOUREIRO *et al*, 2010).

Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgados no Global *Salmonella* Surveillance no Rio de Janeiro, *Salmonella* spp. foi o agente etiológico mais prevalente nas doenças transmitidas por alimentos no período de 1999 a 2004 no Brasil. Os sorovares mais frequentemente envolvidos foram: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Panama*, *S. Agona*, *S. Mbandaka*, *S. Senftenberg*, *S. Infantis*, *S. Hadar* e *S. Anatum* (RODRIGUES, 2005).

Tozetto (2006) identificou 102 estirpes de *Salmonella enterica* isoladas no período de outubro de 2002 a maio de 2004 no Estado do Paraná, provenientes de 22 surtos notificados de doença gastrointestinal e 26 casos de infecção esporádica (duas meningites, uma bacteremia, uma infecção urinária e 22 gastroenterites). Os sorovares mais prevalentes foram: *S. Enteritidis* (82,36%), *S. Livingstone* (4,90%), *S. Muenster* (2,94%), *S. Panama* (1,96%), já *S. Typhimurium*, *S. London*, *S. Derby*, *S. Saintpaul*, *S. Weltevreden* e a soma de *S. Newport* e *S. Javiana* representaram 0,98% dos isolamentos.

Borch *et al.* (1996) relacionaram na Dinamarca, a contaminação bacteriana de carcaças suínas durante o abate com casos de infecções humanas de causa alimentar. *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* e/ou *C. coli* e *Yersinia enterocolítica* foram os patógenos mais predominantes em fezes e carcaças de

suínos e em amostras ambientais provenientes de abatedouros. No mesmo ano, 1994, 85% dos casos de gastroenterites de origem alimentar em seres humanos naquele país foram causados por *Salmonella* spp.

Em países da União Européia, segundo a EFSA (2009), *Salmonella* spp. foi a maior causa de surtos de infecção alimentar notificados em seres humanos. Animais de produção e seus subprodutos foram as principais fontes de disseminação desses patógenos. Neste mesmo relatório, há registros de que, no ano de 2008, nos 21 países membros da União Européia, 28,7% e 33,3% das propriedades criadoras comerciais e produtoras de suínos, respectivamente, foram positivas para *Salmonella* spp.

O relatório da EFSA (2008a) sobre fontes de salmonelose humana demonstra que o consumo de alimentos de origem animal foi responsável por 90% a 95% dos casos. Apesar de ovos e seus subprodutos serem as fontes mais frequentemente implicadas, a carne também representa um importante veículo de disseminação, com aves e suínos apresentando maior envolvimento nos casos de surtos. Para a infecção com *S. Typhimurium*, a exposição ocupacional e o consumo de carne crua foram identificados como principais fatores de risco.

De acordo com o CDC (2006), somente nos Estados Unidos são constatados, por ano, cerca de 76 milhões de casos de doenças atribuídas ao consumo de alimentos contaminados, com 325 mil hospitalizações e morte de 5,2 mil pessoas. Além das perdas humanas, há também prejuízos na forma de custos, com gastos de sete bilhões de dólares com despesas médicas e na diminuição da produtividade, que equivale a 37 bilhões de dólares. Segundo esta instituição norte-americana somente a *Salmonella* spp. é responsável por 1,4 milhões casos de infecção alimentar por ano, ocasionando cerca de mil óbitos.

A infecção dos animais ou a contaminação das carcaças de suínos por *Salmonella* spp. pode ocorrer nas diferentes etapas da produção de suínos. Primariamente, as fontes de infecção podem ser animais pertencentes ao próprio grupo, animais de outros grupos da mesma granja ou fatores externos como ração, pessoal ou vetores, como roedores (VAN DER GAAG *et al.*, 2004).

Suínos que apresentam *Salmonella* spp. em linfonodos mesentéricos podem ser considerados portadores de infecção prévia ocorrida na granja produtora. Esses

animais podem excretar *Salmonella* spp. nas fezes e contaminar outros suínos, que albergam a bactéria no conteúdo intestinal, tornando-se disseminadores passivos (MORROW, DAVIES, 2000).

A maioria dos sorovares de *Salmonella* spp. que infectam suínos não causam doença clínica nesses animais. Todavia, mesmo animais aparentemente saudáveis podem excretar a bactéria de forma intermitente pelas fezes e, assim, contaminar o ambiente e outros animais (WILCOCK; SCHWARTZ, 1993; CASTAGNA, *et al.*, 2004).

Os principais veículos de *Salmonella* que causam infecções em seres humanos são os alimentos de origem animal e as granjas de criação (EFSA, 2009). Segundo esse órgão, na União Européia em 2008, a prevalência de *Salmonella* spp. foi maior que 50% nas propriedades produtoras e criadoras de suínos abrangendo diferentes etapas da cadeia produtiva. Os sorovares mais frequentes foram *S. Derby* (29% dos criadores e 28,5% produtores) e *S. Typhimurium* (25,4% dos criadores e 20,1% dos produtores); os sorovares *S. Rissen* e *S. Infantis* representaram cerca de 7% das identificações em ambos os tipos de propriedades. Já nos casos de salmonelose humana, *S. Typhimurium* foi o sorovar mais isolado na União Européia no mesmo ano.

Espécimes de *Salmonella* spp. isoladas de diversas amostras de suínos, entre os anos de 1997 a 2002 na Espanha, foram armazenadas e sorotipadas na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Autônoma de Barcelona. De um total de 135 isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, 25 foram variantes do sorovar Typhimurium estando em fase flagelar invertida, pois aparentemente possuíam apenas uma das fases e não as duas, característica desse sorovar; 25 identificadas como *S. Anatum*, 12 como *S. Tilburg*, sete como *S. Virchow*, seis como *Choleraesuis* e uma como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (4,5,12:-:-), esta última pertencente ao sorogrupo B (DE LA TORRE *et al.*, 2005).

Hill *et al.* (2008) estudaram a dinâmica da transmissão de *Salmonella* spp. na cadeia produtiva de suínos na Inglaterra. Verificaram que de 1% a 10% das salmoneloses que acometeram seres humanos, foram atribuídas ao consumo de carne suína. No mesmo estudo, os autores classificaram os suínos em susceptíveis, portadores, excretadores e imunes. Segundo eles, a via oral-fecal é a principal forma

de infecção entre suínos, que a adquirem do ambiente nos primeiros estágios de produção na granja. Desta forma, acreditam que 17% dos suínos em idade de abate podem estar infectados por *Salmonella* spp. e 4% deles, eliminando o microrganismo.

Um estudo realizado para verificar a presença de *Salmonella* spp. em três frigoríficos do Estado do Rio Grande do Sul foi conduzido com amostras de fezes e linfonodos de suínos coletados no momento do abate. A incidência de isolamentos foi de 55,66% (125/226), sendo identificados 26 sorovares diferentes entre os 226 isolados. Os sorovares mais prevalentes foram: Typhimurium (24,3%), Agona (19,9%), Derby (13,2%) e Bredeney (12%). Outros sorovares foram encontrados em frequências menores (total 30%) como Panama, Newport, Anatum, Enteritidis, Heidelberg, Infantis e Senftenberg. Também foi observado nesse estudo que *S. Choleraesuis*, considerado o sorovar mais adaptado aos suínos e que está mais correlacionado a sintomas clínicos, não foi isolado em nenhuma das amostras pesquisadas (BESSA *et al.*, 2004).

Também no Estado do Rio Grande do Sul, Weiss *et al.* (2002) coletaram amostras de fezes por meio de *swab* retal em suínos em granjas de terminação. No abatedouro coletaram linfonodos e conteúdo intestinal desses mesmos animais e observaram a presença de *Salmonella* spp. em 6,4% das amostras de fezes, em 5,6% dos linfonodos e em 5,3% no conteúdo intestinal analisado. Porém, nas amostras de *swabs* retais não houve isolamento de *Salmonella* spp., indicando que esse tipo de material não foi o mais indicado para detectar animais excretores deste agente. Foram identificados oito sorovares de *Salmonella* spp.: Agona, Bredeney, Lexington, London, Mbandaka, Panama, Schwarzengrund, e os que não puderam ser sorotipificados foram classificados como *Salmonella* spp. Os sorovares mais prevalentes foram Agona e Bredeney.

Outro estudo correlacionou a presença de *Salmonella* spp. em amostras de *swabs* de carcaças suínas durante o abate e de sangue dos mesmos animais coletados durante a sangria em um frigorífico localizado no Estado de Santa Catarina. Observou-se que elevado número de animais já chegavam ao abate soropositivos para *Salmonella* spp. (71,1% das amostras de sangue coletadas), sugerindo que a infecção foi adquirida no início da produção (creche, matrizes) ou

na terminação. Na sorotipagem dos isolados provenientes de carcaças houve prevalência dos sorovares *S. Typhimurium* (46%) e *S. Derby* (26,7%) (SEIXAS *et al.*, 2009).

A investigação sobre a presença de *Salmonella* spp. em linguiça frescal suína no Município de Lages em Santa Catarina, revelou que 27% das 200 amostras coletadas em diferentes estabelecimentos comerciais apresentaram positividade para esse agente. Dentre os isolados foram identificados diferentes sorovares: Panama, Agona, Anatum, London, Infantis, Heidelberg, Schwarzengrund, e com maior prevalência, *S. Typhimurium* e *S. Derby* (SPRICIGO *et al.*, 2008).

A importância da qualidade das matérias-primas utilizadas na fabricação de ração para animais de produção, do controle ambiental interno e do alimento destinado aos animais, foi destacada no trabalho de Albuquerque *et al.* (1999). Nesse estudo, foram analisadas 136 amostras de ingredientes utilizados para fabricação de rações para animais e 43 amostras de rações prontas para o consumo de aves e suínos. *Salmonella* spp. foi isolada em 19,85% das matérias-primas, sendo que nos subprodutos de origem animal a presença foi de 50%, nos derivados vegetais e industriais 12,5% e nos derivados lácteos 7,5%. Em rações prontas, a bactéria foi isolada em 4,65% das amostras destinadas à alimentação de aves e suínos. Os sorovares mais frequentes foram: *S. Anatum*, *S. Senftenberg*, *S. Newlands*, *S. Mbandaka*, *S. Cerro* e *S. Mokola*.

Borch *et al.* (1996) relacionaram a contaminação de *Salmonella* spp. em carcaças suínas durante o abate com os casos de infecções em seres humanos causadas por alimentos contaminados pela mesma bactéria em países como Dinamarca, Noruega e Suécia. Segundo os autores, as principais fontes de infecção de *Salmonella* spp. para suínos são a ração, o ambiente e o contato com fezes contaminadas. Também citaram que o estresse durante a produção é um fator agravante, pois torna os animais mais vulneráveis a infecção. Contudo, os programas de controle de pontos críticos e de higienização na produção e durante o abate de suínos são importantes na prevenção desses patógenos.

3.2.1. Resistência aos antimicrobianos

O tratamento da salmonelose com medicamentos antimicrobianos não é recomendado para a maioria dos casos que acometem indivíduos saudáveis. 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).

O alimento é considerado uma importante via de infecção por *Salmonella*, incluindo cepas de *Salmonella* multirresistentes aos antimicrobianos. Surto com envolvimento destes microrganismos, onde o agente etiológico foi isolado de animais, dos alimentos e dos pacientes são descritos por vários autores ao longo do tempo. *S. Typhimurium* multirresistente, com resistência adicional a quinolona, foi isolada de um surto em 1998 cuja fonte foi identificada na cadeia produtiva de suínos (MOLBAK *et al.*, 1999), e no mesmo ano, no Reino Unido, houve um surto que envolveu mais de 200 pessoas, em que o veículo de infecção foi o leite contaminado com *S. Typhimurium* DT 104, multirresistente, oriundo de uma fazenda (WALKER *et al.*, 2000).

Salmonella Typhimurium DT 104 é um fagotipo multirresistente epidêmico (THRELFALL, 2000). Apesar de atualmente apresentar baixa incidência na Europa, ainda representa risco significativo à saúde pública mundial. A cepa é tipicamente resistente a ampicilina, cloranfenicol, florfenicol, espectinomicina, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclinas (EFSA, 2008b).

Microrganismos patogênicos, resistentes aos antimicrobianos, veiculados por alimentos são uma preocupação mundial. Wegener *et al.* (1999) já atribuíram o aumento da resistência ao uso indiscriminado de antimicrobianos como promotores de crescimento na produção animal e posterior disseminação dos genes que carregam esta resistência a outros microrganismos. Os autores recomendaram o uso de redes de vigilância como forma de monitoramento e prevenção. Desde então, o problema vem se agravando.

Hopkins *et al.* (2010) relataram a prevalência de *S. enterica* sorovar 4,{5},12:i:-, com resistência a ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina em vários países europeus. As amostras eram provenientes de humanos, de suínos e de produtos de origem suína entre 2006 e 2008. Os autores argumentaram que este sorovar pode ser uma variante genética da *S. Typhimurium* DT 104, que teve seus índices de isolamento reduzidos na Europa a partir de 2006.

Vários países ou associações monitoram a resistência aos antimicrobianos de microrganismos transmitidos pelos alimentos. A resistência aos antimicrobianos em *Salmonella* spp. isolada de carne suína foi relatada em cinco países membros da União Européia. Os isolados, incluindo os sorovares Derby, Enteritidis, Infantis, Londres, Saintpaul, Senftenberg, Typhimurium e Virchow e outros não identificados, demonstraram resistência à ampicilina variando de 21% a 35%, sulfonamidas (36% a 52%) e tetraciclina (38% a 59%). A resistência à ciprofloxacina e à enrofloxacina foi observada na Dinamarca e Itália, respectivamente, em taxas de 1% e 0,6% (EFSA, 2006).

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%), enrofloxacina (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).

A sorotipagem pode fornecer informações úteis durante a investigação de surtos, mas também sobre os riscos à população. A identificação antigênica tem demonstrado que alguns sorotipos de *Salmonella* são mais observados em determinados animais e/ou alimentos. Hald *et al.* (2007) verificaram que a resistência de *Salmonella* aos antimicrobianos podia ser associada a sorovares específicos e ao tipo de alimento onde era realizado o isolamento. Os autores observaram na Dinamarca, em cepas isoladas de infecções, que havia predominância de *S. Typhimurium* resistente às quinolonas em isolados provenientes de ovos, carne de porco e carne bovina importados e carne suína dinamarquesa.

Fernandes *et al.* (1992) selecionaram aleatoriamente 734 isolados de *S. Typhimurium* e 631 de *S. Agona* provenientes de alimentos, ambiente, fezes e urina humana, sangue, vísceras de animais, água de esgoto, ração animal e secreções, no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo entre os anos de 1971 a 1987. Nestas amostras foram identificados 65 biótipos de *S. Typhimurium* e um biótipo de *S. Agona*, sendo a maioria dos isolados multiresistentes a sulfonamidas e ao sulfazotrim. Segundo os autores a maioria das infecções hospitalares adquiridas nas enfermarias da pediatria nesse período, em São Paulo, foi causada por *S. Typhimurium* multiresistente.

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. O sorovar mais frequentemente isolado de suínos e produtos derivados foi *S. Typhimurium*, predominando na Alemanha o fagotipo DT104 (SCHROETER *et al.*, 2004).

Nas regiões de Marche e Úmbria na Itália, foi pesquisada a prevalência de *Salmonella* spp. em casos de enterites suínas. Os sorovares mais frequentes e a sensibilidade aos aminoglicosídeos mais usados em animais nessas regiões. Dos 79 isolados, 47 foram identificados como *Salmonella* spp., prevalecendo os sorovares *Typhimurium* (69%), *Panama* (7%) e outros (4%). Quanto à sensibilidade

antimicrobiana, 92,4% dos isolados foram sensíveis a apramicina, 77,25% à gentamicina e 67,1% à tobramicina, mas 35,4% foram resistentes à estreptomicina (MAGISTRALI *et al.*, 2006).

Weiss *et al.* (2002) analisaram *Salmonella* spp. isoladas de amostras de fezes, linfonodos e conteúdo intestinal de suínos de terminação no Rio Grande do Sul, Brasil. Os testes de resistência aos antimicrobianos demonstraram 97% de resistência à sulfonamida, 82,6% à estreptomicina, 36,9% à tetraciclina e 15,2% ao sulfazotrim.

Em Santa Catarina, Menin *et al.* (2008) verificaram que as infecções entéricas em suínos são responsáveis por 30% das perdas econômicas na suinocultura industrial e 60% dos gastos com antimicrobianos na produção, sendo a *Salmonella* spp. um dos principais patógenos envolvidos em casos de diarreia em suínos nas diferentes faixas etárias. Nas amostras de *Salmonella* spp. isoladas houve maior resistência aos antimicrobianos oxitetraciclina (77%) e tetraciclina (42,1%); e menor resistência a gentamicina (3,5%) e amoxicilina (4,8%).

Tessmann *et al.* (2008) verificaram a susceptibilidade aos antimicrobianos de *S. Typhimurium*, *S. Panama* e *S. Infantis* isoladas de cortes de carne suína adquiridas em feiras-livres em Pelotas. Todos os isolados foram sensíveis aos antimicrobianos trimetropim e cefoxitina e 39,1% dos isolados apresentaram padrão de multirresistência. Todos os sorovares de *S. Typhimurium* e o isolado de *S. Panama* apresentaram resistência a três ou mais antibióticos. Resistência a tetraciclina foi observada em 100% dos isolados identificados como *S. Typhimurium* e 7% de *S. Infantis*.

Spricigo *et al.* (2008) isolaram *Salmonella* de linguiça frescal suína no Paraná, Brasil. Entre os isolados foi observada a resistência aos antimicrobianos, sendo que 56,7% apresentaram resistência a pelo menos um dos 14 antimicrobianos testados e 20% apresentaram perfil de multirresistência (a quatro ou mais antimicrobianos). Os maiores índices de resistência foram às sulfonamidas (45%) e à tetraciclina (41,67%), enquanto nenhuma amostra foi resistente à amoxicilina, gentamicina, neomicina, cefaclor e tobramicina. Um isolado, identificado como sorovar Schwarzengrund apresentou resistência ao maior número de antimicrobianos testados (50%), assim como os isolados identificados como sorovar

Typhimurium que apresentaram alta porcentagem (41,67%) de amostras multiresistentes.

3.3. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR)*

Técnicas moleculares são cada vez mais utilizadas para estabelecer a relação filogenética entre isolados bacterianos e fornecem importantes dados para o entendimento da epidemiologia.

A técnica de *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR)* constitui uma ferramenta amplamente utilizada em estudos de tipagem molecular de microrganismos patogênicos, inclusive *Salmonella*, principalmente pela sua rapidez (BETANCOR *et al.*, 2004). Segundo LIN *et al.* (1996), os problemas de reprodutibilidade podem ser superados com uso de *primers* apropriados.

As técnicas de RAPD-PCR e *Salmonella Enteritidis Repeat Element (SERE-PCR)* foram utilizadas por Tozetto (2006) para analisar isolados de *Salmonella* spp. em amostras clínicas de sete regiões do Estado do Paraná entre os anos de 2002 e 2004. Segundo o autor, a técnica de RAPD-PCR foi um método rápido, relativamente barato e aplicável à tipagem de *Salmonella*, pois apresentou boa reprodutibilidade e bom poder discriminatório, distinguindo 84 estirpes de *Salmonella* Enteritidis e classificando-as em 11 grupos. Já a técnica de SERE-PCR gerou perfis distintos para os diferentes sorovares de *Salmonella*, mas não foi capaz de determinar diferenças entre os isolados de um mesmo sorovar, concluindo que o RAPD-PCR apresenta maior nível de discriminação que SERE-PCR.

Oliveira *et al.* (2007) estudaram o envolvimento de *S. Enteritidis* em surtos de origem alimentar no Rio Grande do Sul no período de 2001 a 2002 com o uso de técnicas moleculares de ribotipagem e RAPD. Os autores concluíram que as técnicas de ribotipagem e RAPD possuem bom poder discriminatório para avaliar relação entre sorovares de *Salmonella* spp., ótima reprodutibilidade e apresentam resultados semelhantes entre si. Citam ainda, que segundo Hudson *et al.* (2001), o RAPD é um método rápido e poderoso, que demonstra grande poder discriminatório entre sorovares de *Salmonella* spp., com resultados semelhantes aos obtidos na técnica de PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Segundo os autores é

importante a utilização de técnicas moleculares em diagnósticos, pois possibilitam estudos epidemiológicos mais abrangentes dentro da cadeia produtiva.

A importância da otimização da técnica de RAPD-PCR foi ressaltada por Tozetto (2006). O autor relatou que há alguns parâmetros que podem afetar a análise por RAPD-PCR, como a temperatura baixa de anelamento entre 25°C a 40°C para a amplificação adequada, componentes do tampão como Mg^{2+} , números de ciclos entre 35 a 50, pois números menores resultam na ausência de algumas bandas e padronização da técnica (preparo do DNA, volumes e concentrações consistentes dos reagentes). Oliveira *et al.* (2007) complementaram que a otimização cuidadosa dos fatores que podem interferir na reprodutibilidade do método inclui a concentração de DNA alvo, *primer* e concentração de cloreto de magnésio ($MgCl_2$).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local

As fezes foram coletadas em uma granja de terminação de suínos e na pocilga de espera de um frigorífico não exportador e sob inspeção municipal, ambos em Uberlândia-MG, onde também foram coletadas as amostras das carcaças suínas durante o abate. A coleta e isolamento de *Salmonella* spp. foram realizados por Pacheco (2009).

Os isolados foram armazenados sob congelamento (-20°C) no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO-UFU), onde também foram realizados as análises laboratoriais do presente estudo. A sorotipagem foi realizada no setor de Enterobactérias da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) no Estado do Rio de Janeiro.

4.2. Amostras utilizadas no estudo

Foram utilizados neste estudo 86 culturas de *Salmonella* spp. previamente isoladas por Pacheco (2009), mantidas congeladas em caldo BHI (Difco®) com 15% de glicerol. O tipo e número de amostras inicialmente coletadas por Pacheco (2009) em cada etapa e o número de isolados estão discriminados na Tabela 1. As culturas de *Salmonella* spp. foram isoladas em três lotes diferentes em coletas distintas, onde foram amostrados fezes, ambiente, ração, água e swabs de carcaças. Em cada um dos lotes foram coletadas amostras de 15 animais, sendo estes animais amostrados brincados para identificação. As coletas subsequentes nos pontos pré-determinados foram sempre realizadas nos mesmos animais.

Tabela 1. *Salmonella* spp. isoladas de suínos, discriminadas por etapa de coleta, tipo de amostra e local de colheita

Amostras coletadas	Local de colheita	Isolamentos			TOTAL P (%)
		1 ^a etapa	2 ^a etapa	3 ^a etapa	
Fezes-Swab retal (n=45)	Granja (terminação)	9	9	7	25 (29,07)
Ração (n=3)	Granja (terminação)	1	1	0	2 (2,33)
Água (n=3)	Granja (terminação)	0	0	0	0
Swab arrasto (n=3)	Granja (terminação)	0	0	0	0
Fezes-Swab retal (n=45)	Pocilga de espera	7	8	7	22 (25,58)
Swab arrasto (n=3)	Pocilga de espera	0	0	1	1 (1,16)
Carcaça após depilação (n=45)	Frigorífico (abate)	7	3	0	10 (11,63)
Linfonodos cadeia mesentérica (n=45)	Frigorífico (abate)	3	6	2	11 (12,79)
Carcaça após serragem (n=45)	Frigorífico (abate)	7	3	3	13 (15,12)
Swab superfície depiladeira (n=3)	Frigorífico (abate)	0	0	1	1 (1,16)
Swab superfície serra (n=3)	Frigorífico (abate)	1	0	0	1 (1,16)
Swab superfície faca (n=3)	Frigorífico (abate)	0	0	0	0
Swab superfície mesa toalete (n=3)	Frigorífico (abate)	0	0	0	0
TOTAL (n= 249)		35	30	21	86 (100)

n= número de amostras analisadas; P= amostras positivas para *Salmonella* spp.; % - porcentagem de amostras positivas por amostra em relação ao total isolado.

Fonte: compilado de PACHECO (2009).

Um fluxograma (Figura 1) ilustra a cadeia de produção de suínos com os pontos de coleta das amostras em que Pacheco (2009) isolou *Salmonella* spp., que foram estudadas no presente trabalho.

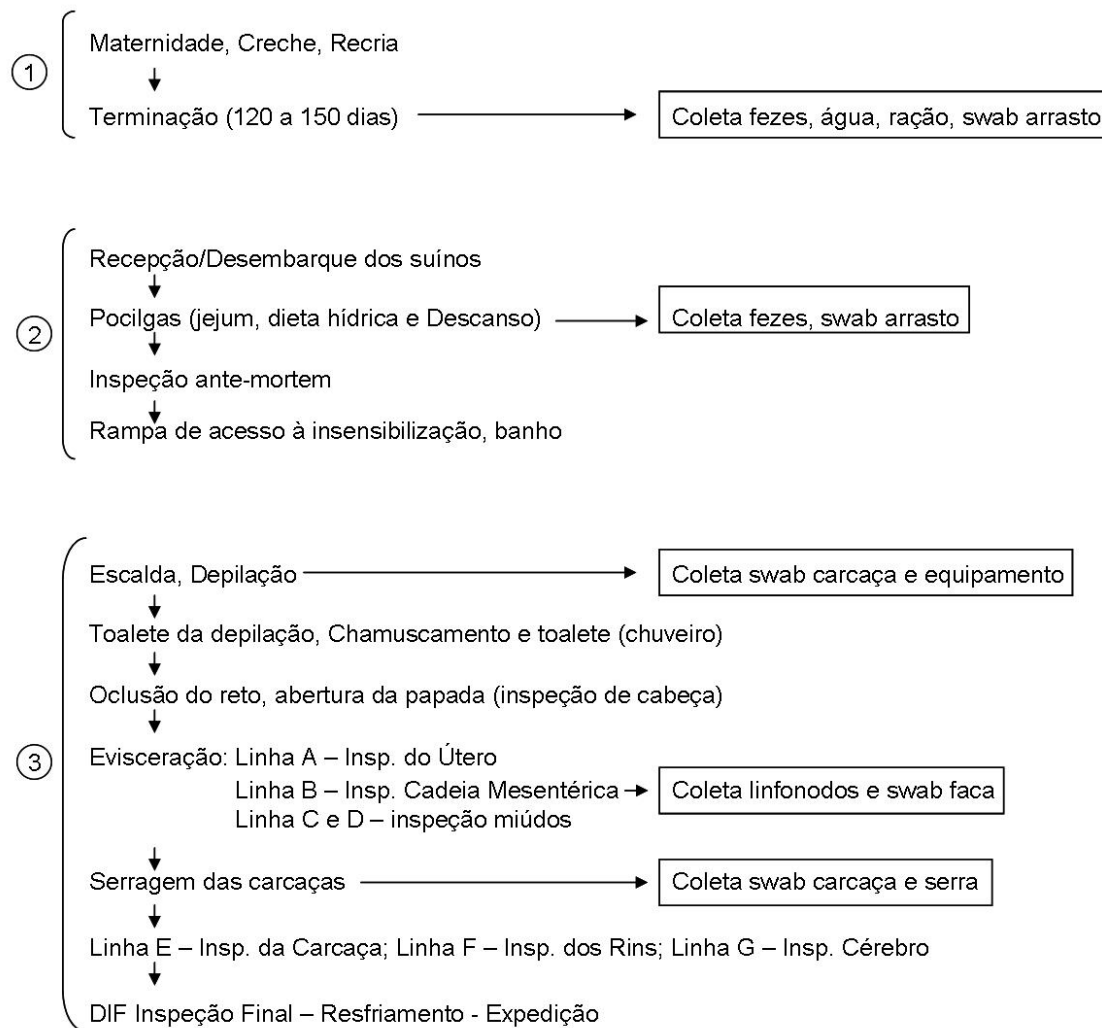


Figura 1. Fluxograma das etapas de produção de suínos com especificação dos pontos de coleta de amostra. 1- Granja de terminação de suínos. 2- Pré-abate de suínos (pocilga de espera). 3. Abate de suínos (frigorífico). Compilado de Pacheco (2009).

4.3. Processamento das amostras

As amostras previamente identificadas como *Salmonella* spp. e mantidas congeladas foram reativadas e confirmadas quanto a pureza. Após descongelamento em temperatura ambiente, uma alíquota de cada amostra foi transferida para caldo de infusão cérebro-coração (BHI) (Oxoid®), seguida de incubação a 37°C por 24 horas. Após, foi repicada em agar xilose-lisina desoxicolato (XLD) (DIFCO®) e incubada a

37°C por 24 horas. Uma colônia isolada foi repicada em dois tubos contendo ágar nutriente (DIFCO®) inclinado e incubada a 37°C por 24 horas.

4.3.1. Identificação sorológica preliminar e completa

A identificação sorológica do gênero foi realizada com o antisoro polivalente somático “O” (BIOBRÁS®) e a caracterização preliminar dos grupos com os antisoros monovalentes somáticos B, C e D (BIORAD®). Foi utilizada a metodologia de aglutinação em placa conforme protocolo recomendado no PNSA - Programa Nacional de Sanidade Avícola, em 1994 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1994).

Adicionou-se ao cultivo bacteriano em ágar nutriente (DIFCO®), 1,0mL de solução salina a 0,85% estéril e a mistura foi homogeneizada (suspensão bacteriana). Em uma lâmina de microscópio foram depositadas em paralelo, uma gota de NaCl 2% estéril e uma gota de soro anti-somático “O” polivalente, e após, adicionou-se uma gota da suspensão bacteriana em cada uma delas. Após homogeneização, a observação de aglutinação foi realizada em 30 a 60 segundos, com iluminação sob o fundo escuro. Foi considerada positiva a amostra que apresentou aglutinação na mistura cultura + soro anti-*Salmonella* e ausência de aglutinação na solução de NaCl 2%. No caso de aglutinação em ambas as misturas (cultura + soro anti-*Salmonella* e cultura + NaCl 2%), a caracterização antigênica foi inviabilizada por tratar-se de cepa rugosa (autoaglutinável).

As cepas não rugosas que apresentaram resultado positivo frente ao soro anti-somático “O” polivalente foram caracterizadas antigenicamente com os soros anti-somáticos “B”, “C” e “D”, da mesma forma como o descrito para o antisoro polivalente. Os isolados não rugosos e que não reagiram com os anti-somáticos “B”, “C” ou “D” foram consideradas *Salmonella* spp.

Em paralelo, o segundo tubo da mesma amostra em ágar nutriente foi enviado ao Setor de Enterobactérias da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) para a caracterização antigênica completa.

4.4. Suscetibilidade aos antimicrobianos

A técnica utilizada foi a de difusão de discos (BAUER *et al.*, 1966). Para o teste, 3 a 5 colônias puras de *Salmonella* spp. em agar nutriente (DIFCO®) foram inoculadas em 5 mL de caldo BHI (Difco®) e incubadas a 37°C até atingir a turvação 0,5 na escala de MacFarland (aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹). Em seguida, com auxílio de um swab estéril, a cultura foi semeada na superfície do ágar Muller Hinton (Difco®). Aguardou-se a secagem das placas e em seguida, com auxílio de uma pinça estéril, foram depositados sobre a superfície de cada placa inoculada discos impregnados com os seguintes antimicrobianos/concentrações: amoxicilina 10µg, norfloxacin 10µg, gentamicina 10µg, eritromicina 15µg, ácido nalidíxico 30µg, tetraciclina 30µg e sulfazotrim 25µg (Laborclin®); ceftiofur 10µg, enrofloxacin 5 µg e lincomicina 2 µg (Sensifar®). A cepa de *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle. As placas foram incubadas a 37°C por 18 a 20 horas, e depois foi realizada a medida dos halos de sensibilidade (em milímetros) com auxílio de um paquímetro e posterior classificação do microrganismo como sensível, intermediário ou resistente ao antimicrobiano testado.

4.5. Relação filogenética entre os isolados

Isolados identificados como pertencentes ao mesmo sorovar pelo teste de sorotipificação antigênica foram agrupados e submetidos à análise gênica por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) utilizando o protocolo descrito por Oliveira *et al.* (2007), com algumas modificações.

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

A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro (Femto 750®) com comprimento de onda de 280nm

Foi utilizado o *primer* P1254 (5' CCGCAGCCAA 3'), recomendado por OLIVEIRA et al. (2007). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25µL por amostra, contendo: 100 mmol Tris HCl, 750 mmol KCl pH 8,8, 10 mmol dNTPs (5 mmol de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 50 mmol MgCl₂, 40 pmol do *primer*, 1 U de Taq DNA Polymerase 5 U/µL (Invitrogen) e 30 ng de DNA. A reação PCR foi conduzida dentro das seguintes condições: um ciclo de 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 30°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72° C por 5 minutos.

Todas as reações de PCR foram realizadas no termociclador (Eppendorf) e os produtos amplificados separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. O gel foi corado com Syber Safe (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e visualizado em luz ultravioleta. A análise foi realizada em paralelo com a cepa ATCC 13076 de *Salmonella* Enteritidis e incluiu um controle negativo composto de água ultrapura em substituição ao DNA alvo.

As análises foram realizadas utilizando o coeficiente de similaridade de Dice, com tolerância de 1,5% na comparação da posição de bandas e o dendograma formado com base no método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean - agrupamento pareado não ponderado baseado na média aritmética) com otimização do gel de 0,80%. Estes procedimentos e a construção do dendograma foram realizados com o software BioNumerics.

4.6. Análise dos resultados

Os resultados obtidos com a tipificação antigênica foram tabulados e submetidos à estatística descritiva.

A resistência aos antimicrobianos testados entre os diferentes sorovares foi comparada utilizando o teste do χ^2 com 95% de confiança. Os cálculos foram realizados com o auxílio do programa Biostat 5.0. (AYRES, 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram descongeladas e utilizadas, neste estudo, 86 amostras de *Salmonella* spp. previamente isoladas por Pacheco (2009). Destas, 25 (29,07%) foram isoladas de fezes e duas (2,33%) de ração, ambas na granja de terminação, 22 (25,59%) nas fezes dos mesmos animais na pocilga de espera do frigorífico e, neste ambiente, uma (1,16%) recuperada por meio de *swab* de arrasto. No frigorífico, 34 (39,53%) foram isoladas das carcaças durante o abate e duas (2,32%) de equipamentos (depiladeira e serra).

5.1. Identificação dos isolados

O uso do antisoro “O” confirmou os 86 isolados como *Salmonella* spp. A análise com os antisoros B, C e D apresentou resultados concordantes com os obtidos na identificação oficial realizada no Laboratório de Enterobactérias da FIOCRUZ (Tabela 2).

Tabela 2. Sorologia preliminar com antisoros B, C e D e caracterização antigênica completa em Laboratório oficial de 86 isolados de *Salmonella* spp.

Sorologia Preliminar		Caracterização Antigênica – FIOCRUZ	
Sorogrupo	N (%)	Sorovar	N (%)
B	48 (55,8)	<i>S. Typhimurium</i>	28 (32,55)
		<i>S. Agona</i>	20 (23,26)
C	17 (19,77)	<i>S. Infantis</i>	17 (19,77)
D	6 (6,98)	<i>S. Panama</i>	6 (6,98)
<i>Salmonella</i> spp.	15 (17,44)	<i>S. Minnesota</i>	15 (17,44)

N (%) – número de amostras positivas e porcentagem em relação ao total de cepas de *Salmonella* spp.

Apesar de estudos epidemiológicos necessitarem da identificação antigênica definitiva nos laboratórios oficiais, a sorotipificação preliminar nos laboratórios das indústrias de alimentos imediatamente após o isolamento é muito importante, principalmente, do ponto de vista da sanidade animal. Por meio da classificação preliminar é possível realizar uma comparação inicial entre os sorovares isolados

em diferentes pontos da produção dos animais, estabelecendo possíveis rotas de infecção. Com esta informação é possível também o uso mais racional da antibioticoterapia em doença clínica nos plantéis, já que há drogas de escolha para determinados grupos antigênicos.

As indústrias, para garantir a qualidade do produto final, devem possuir ferramentas que permitam analisar se há correlação entre os isolamentos de *Salmonella* ao longo da cadeia produtiva e a sorotipificação preliminar é uma delas. O resultado desta análise permite associar rapidamente contaminações de produtos com possíveis fontes de infecção como a ração animal, instrumentos e equipamentos. Pode também fornecer indícios da forma de transmissão do microrganismo, vertical ou horizontal, e, desta forma, orientar as medidas de controle imediatas que devem ser introduzidas ou reforçadas.

Todos os sorovares foram isolados tanto na granja quanto no frigorífico, com exceção de *S. Panama* que não foi encontrada em amostras de fezes coletadas na granja de terminação (Tabela 3). Considerando somente as amostras de fezes, *S. Agona* foi o mais identificado, mas nas amostras de animais abatidos houve maior incidência de *S. Typhimurium*, evidenciando maior resistência deste sorovar às condições encontradas nas etapas de abate.

A diversidade de sorovares identificados em fezes e carcaças suínas, com maior incidência de *S. Typhimurium* também foi observada em outro estudo. Bessa *et al.* (2004), no Rio Grande do Sul, identificaram 26 sorovares diferentes em 226 isolados de 300 suínos abatidos em três frigoríficos. Os sorovares mais prevalentes foram: *Typhimurium* (24,3%), *Agona* (19,9%), *Derby* (13,2%) e *Bredeney* (12%). *S. Panama* e *S. Infantis* também foram identificados, porém com menor frequência, 5,75% e 0,88%, respectivamente.

Weiss *et al.* (2002) também verificaram diversidade ao identificarem no Rio Grande do Sul, oito sorovares diferentes de *Salmonella* em amostras de fezes coletadas por *swab* retal, conteúdo intestinal e linfonodos mesentéricos. As amostras foram colhidas na granja de terminação e durante o abate dos mesmos animais num frigorífico no Rio Grande do Sul. Os sorovares identificados foram *Agona*, *Bredeney*, *Lexington*, *London*, *Mabandaka*, *Panama* e *Schwartzengrund*. A maior prevalência observada foi para *S. Agona* nas propriedades de terminação e

de *S. Agona* e *S. Bredeney* nas amostras colhidas no frigorífico. *S. Typhimurium* não foi identificado em nenhuma das amostras.

Tabela 3. Sorovares de *Salmonella* isolados em granja de terminação, pocilga de espera e durante etapas do abate de suínos

Sorovar	Granja de terminação	Pocilga de espera (frigorífico)	Etapas do abate (frigorífico)	TOTAL
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>S. Typhimurium</i>	8 (9,30)	5 (5,81)	15 (17,44)	28 (32,56)
<i>S. Agona</i>	9 (10,46)	6 (6,98)	5 (5,81)	20 (23,25)
<i>S. Infantis</i>	4 (4,65)	5 (5,81)	8 (9,30)	17 (19,77)
<i>S. Minnesota</i>	6 (6,98)	6 (6,98)	3 (3,49)	15 (17,44)
<i>S. Panama</i>	--	1 (1,16)	5 (5,81)	6 (6,98)
TOTAL	27 (31,40)	23 (26,74)	36 (41,86)	86 (100)

N (%) – número de amostras positivas de cada sorovar e porcentagem em relação ao total de amostras identificadas como *Salmonella* spp.

O maior número de isolados neste estudo de *S. Typhimurium* (32,56%) atenta para o possível risco de enterocolite no rebanho, já que este sorovar, juntamente com *S. Cholerasuis* são os mais incriminados em doença clínica (HURD *et al.*, 2001). Também, *S. Agona*, o segundo sorovar mais isolado, tem sido relatado junto a *S. Derby* como sorovares relacionados à doença clínica que têm aumentado significativamente, principalmente nos Estados Unidos (OLIVEIRA e CARVALHO, 2003). Porém, a identificação de casos clínicos de salmonelose no rebanho não foi pesquisada no presente estudo.

S. Typhimurium, *S. Agona* e *S. Infantis* foram os sorotipos mais isolados neste estudo. De acordo com Loureiro *et al.* (2010) e Weiss *et al.* (2002), estes sorovares estão associados a casos de salmonelose humana no Brasil. Já nos Estados Unidos, os três sorotipos mais frequentemente isolados em humanos com salmonelose são *Typhimurium*, *Enteritidis* e *Newport*, denotando o risco potencial desses agentes (CDC, 2005).

S. Typhimurium é um dos principais sorovares isolados em casos esporádicos e surtos de gastroenterite no Brasil. Está também associado a meningites, especialmente em crianças. Este sorotipo representa risco devido ao

seu potencial invasivo e eminentemente patogênico. O fagotipo DT 104 do sorotipo Typhimurium é considerado um patógeno altamente virulento e com elevada resistência a antibióticos (DDTHA, 2005).

S. Infantis e *S. Agona* também são reconhecidos por seu potencial patogênico, o qual, além do quadro gastroentérico, pode determinar infecção septicêmica nos animais jovens e homem, principalmente em casos de infecções graves em crianças (FONSECA *et al.*, 2006; TESSMANN *et al.*, 2008).

Os resultados da sorotipificação definitiva por colheita, animal e local de isolamento podem ser observados nas Tabelas 4, 5 e 6. De forma geral, a incidência de um mesmo sorovar pôde ser associada ao lote, sendo o mesmo isolado ao longo da cadeia.

Tabela 4. Identificação antigênica de *Salmonella* por suíno amostrado, de acordo com o local de isolamento, desde a granja até o final do abate (1ª colheita)

LOCAL DE ISOLAMENTO					
FAZENDA			FRIGORÍFICO		
Amostra	Fezes		Animais abatidos		
Animal	Granja Terminação	Pocilga Espera	Após Depilação	Linfonodos Mesentéricos	Após Evisceração
1	<i>S. Typhimurium</i>	N	N	N	<i>S. Typhimurium</i>
2	N	<i>S. Typhimurium</i>	N	N	N
3	N	N	<i>S. Agona</i>	N	N
4	<i>S. Typhimurium</i>	N	N	N	<i>S. Typhimurium</i>
5	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>
6	<i>S. Typhimurium</i>	N	<i>S. Typhimurium</i>	N	N
7	N	<i>S. Typhimurium</i>	N	N	<i>S. Typhimurium</i>
8	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>	N	N	<i>S. Typhimurium</i>
9	N	<i>S. Agona</i>	<i>S. Agona</i>	N	N
10	<i>S. Agona</i>	<i>S. Agona</i>	<i>S. Agona</i>	N	N
11	N	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>	N
12	<i>S. Agona</i>	N	N	N	N
13	<i>S. Typhimurium</i>	N	N	N	N
14	<i>S. Typhimurium</i>	N	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>
15	N	N	N	N	<i>S. Typhimurium</i>

N= não houve isolamento.

Os mesmos sorovares foram identificados ao longo da cadeia de produção e nos mesmos suínos. Das 75 amostras provenientes dos animais analisadas na primeira colheita, *Salmonella* spp. foi isolada em 33 (44%) ocasiões, sendo 16 provenientes das fezes e 17 nas carcaças. *S. Typhimurium* foi o sorovar mais prevalente, representando 78,8% (26/33) dos isolamentos, seguido de *S. Agona*, que foi isolada em 21,2% (7/33) das amostras.

Tabela 5. Identificação antigênica de *Salmonella* por suíno amostrado, de acordo com o local de isolamento, desde a granja até o final do abate (2ª colheita)

Animal	LOCAL DE ISOLAMENTO				
	FAZENDA		FRIGORÍFICO (Abate)		
	Granja Terminação	Pocilga Espera	Após Depilação	Linfonodos mesentéricos	Após Evisceração
16	<i>S. Infantis</i>	<i>S. Infantis</i>	N	N	N
17	N	<i>S. Infantis</i>	N	<i>S. Infantis</i>	N
18	N	N	N	<i>S. Panama</i>	<i>S. Panama</i>
19	N	<i>S. Agona</i>	N	N	N
20	<i>S. Agona</i>	<i>S. Panama</i>	N	N	<i>S. Panama</i>
21	<i>S. Agona</i>	<i>S. Agona</i>	<i>S. Panama</i>	<i>S. Panama</i>	N
22	<i>S. Infantis</i>	N	N	<i>S. Infantis</i>	N
23	N	N	<i>S. Infantis</i>	N	N
24	N	<i>S. Infantis</i>	N	N	N
25	<i>S. Agona</i>	N	N	<i>S. Agona</i>	N
26	<i>S. Agona</i>	<i>S. Agona</i>	N	N	N
27	<i>S. Agona</i>	N	N	N	N
28	N	N	<i>S. Infantis</i>	<i>S. Agona</i>	<i>S. Infantis</i>
29	<i>S. Agona</i>	<i>S. Agona</i>	N	N	N
30	<i>S. Infantis</i>	N	N	N	N

Na segunda colheita, a positividade para *Salmonella* foi de 38,67% (29/75). Destas, 41,38% (12/29) foram identificadas sorologicamente como *S. Agona*, 37,93% (11/29) como *S. Infantis* e 20,69% (6/29) como *S. Panamá*.

S. Agona e *S. Infantis* foram os sorovares mais incidentes nas fezes e *S. Infantis* e *S. Panamá* os mais identificados nas amostras de animais abatidos. Apesar de os mesmos sorovares terem sido identificados nos mesmos animais, no 20º e 21º suínos, os sorovares *Agona* e *Panama* foram identificados em diferentes pontos da coleta.

Tabela 6. Identificação antigênica de *Salmonella* por suíno amostrado, de acordo com o local de isolamento, desde a granja até o final do abate (3ª colheita)

LOCAL DE ISOLAMENTO					
FAZENDA			FRIGORÍFICO (Abate)		
Animal	Granja Terminação	Pocilga Espera	Após Depilação	Linfonodos mesentéricos	Após Evisceração
31	N	S. Minnesota	N	N	N
32	N	N	N	N	S. Minnesota
33	N	S. Minnesota	N	N	N
34	S. Minnesota	S. Minnesota	N	N	N
35	N	S. Infantis	N	N	N
36	S. Minnesota	S. Minnesota	N	N	N
37	S. Minnesota	N	N	N	N
38	S. Minnesota	N	N	N	N
39	S. Infantis	N	N	N	N
40	N	N	N	N	S. Infantis
41	N	S. Infantis	N	N	N
42	S. Minnesota	S. Minnesota	N	N	N
43	N	N	N	S. Minnesota	S. Infantis
44	N	N	N	S. Infantis	N
45	S. Minnesota	N	N	N	N

Salmonella foi isolada em 28% (21/75) amostras na terceira colheita, sendo 71,43% (15/21) identificadas sorologicamente como S. Minnesota e 28,57% (6/21) como S. Infantis.

O maior número de isolamentos foi observado nas fezes dos animais, sendo S. Minnesota o mais identificado.

A homologia entre isolados identificados como de um mesmo sorovar, comparados pelo coeficiente de similaridade de Dice e agrupados em dendograma, estão ilustrados nas Figuras 2, 3, 4, 5.

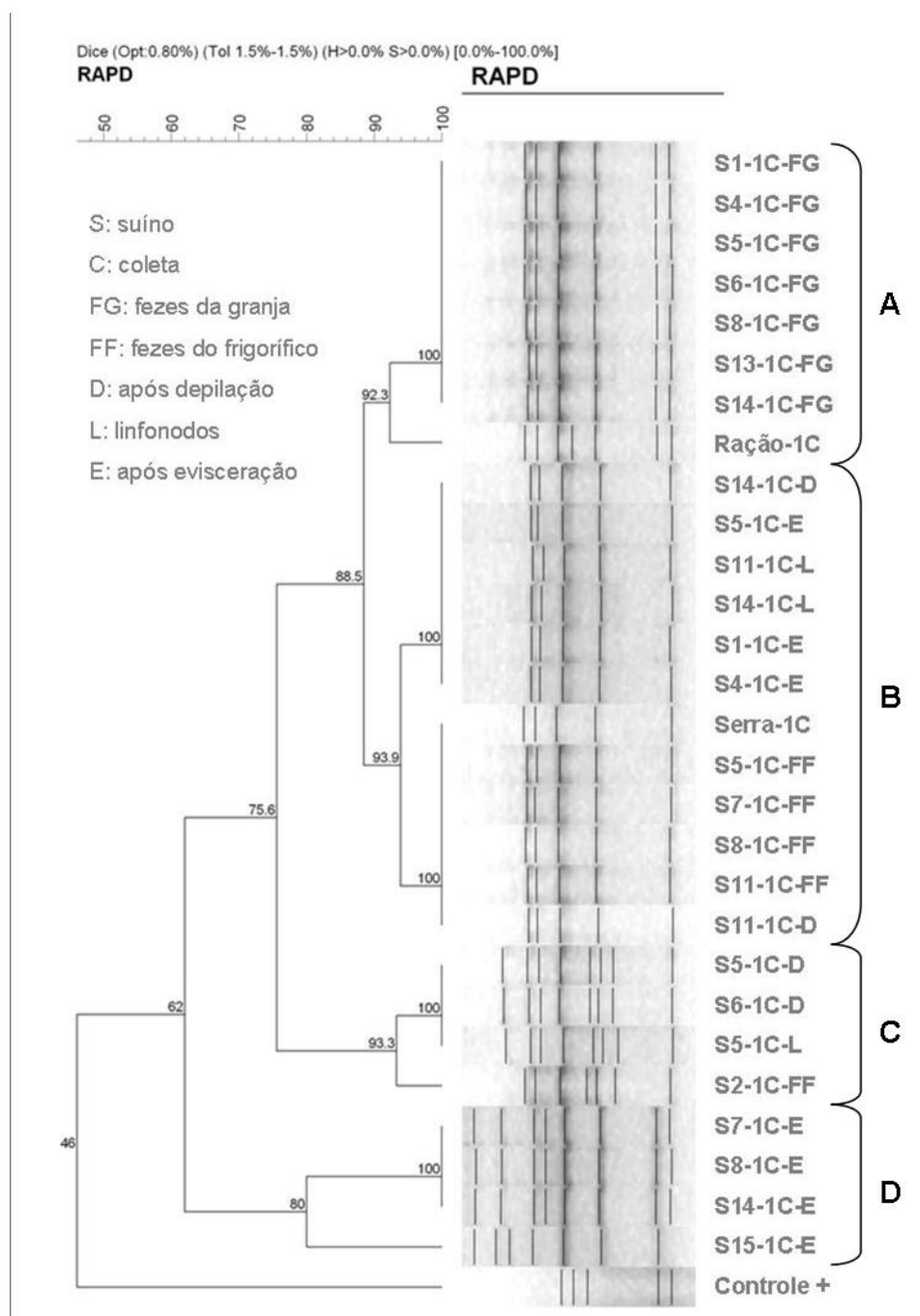


Figura 2. Dendrograma comparativo dos isolados identificados como *S. Typhimurium*, utilizando coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 0,80%. Perfil A – *cluster* com 92,3% de homologia; Perfil B – *cluster* com 93,9% de homologia; Perfil C – *cluster* com 93,3% de similaridade; Perfil D – *cluster* com 80% de similaridade.

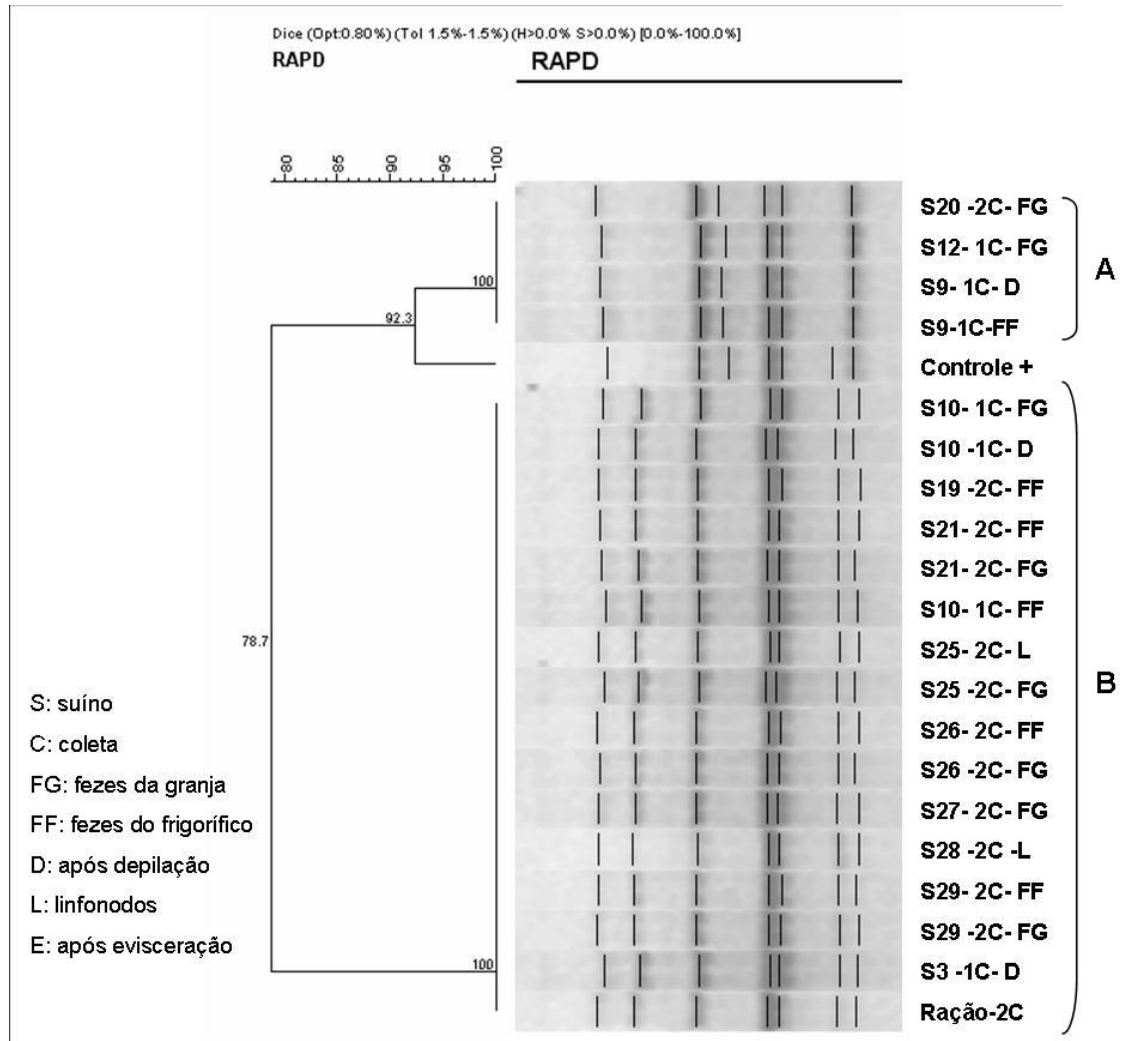


Figura 3. Dendrograma comparativo dos isolados identificados como *S. Agona* utilizando coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 0,80%. Perfil A e B – diferentes grupos clonais.

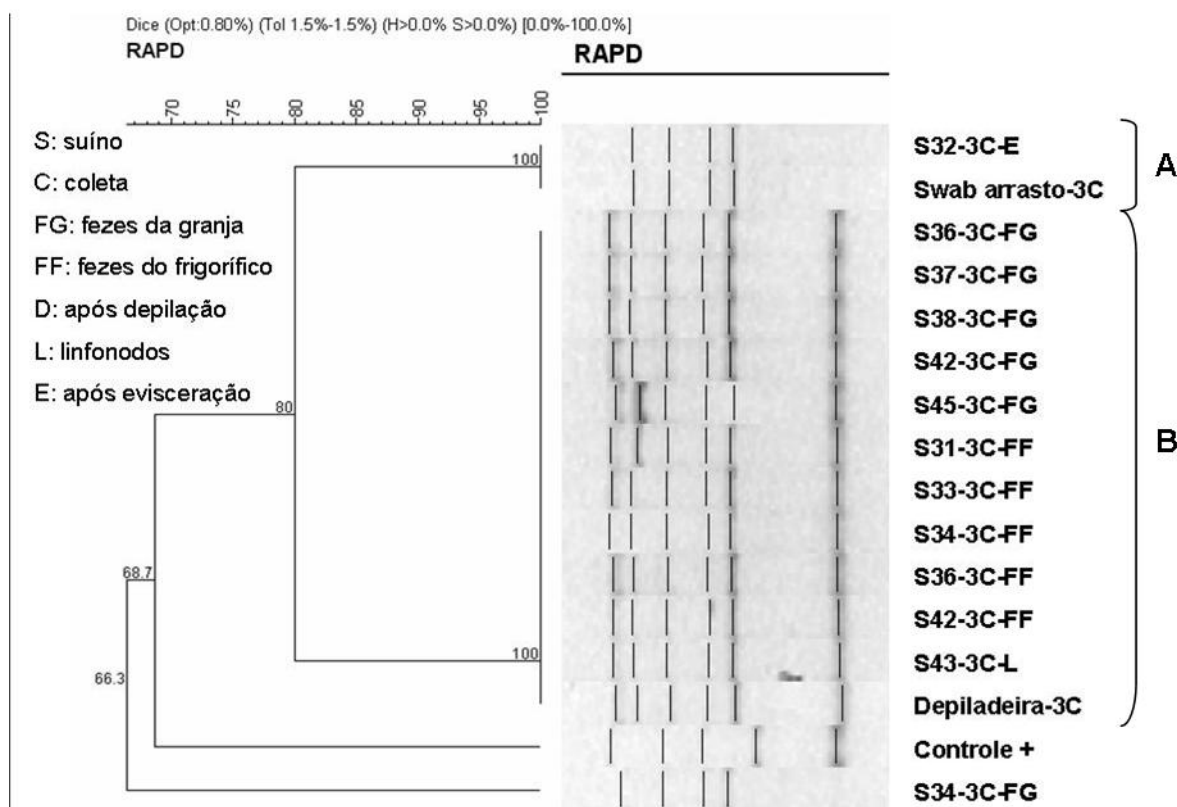


Figura 4. Dendrograma comparativo dos isolados identificados como *S. Minnesota* utilizando coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 0,80%. Perfil A e B – diferentes grupos clonais, pertencentes ao *cluster* com homologia de 80%.

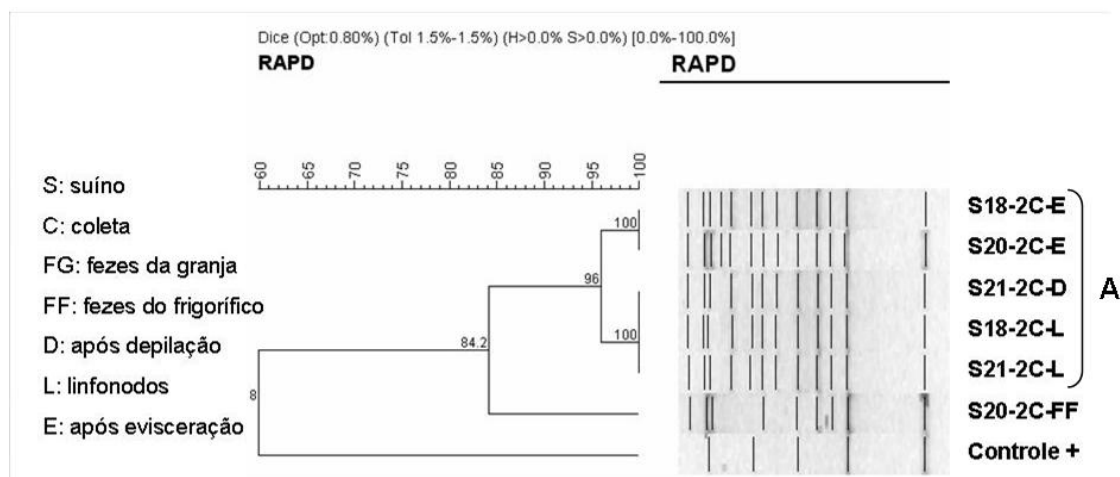


Figura 5. Dendrograma comparativo dos isolados identificados como *S. Panama* utilizando coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 0,80%. Perfil A – *cluster* de dois grupos clonais com 96% de similaridade.

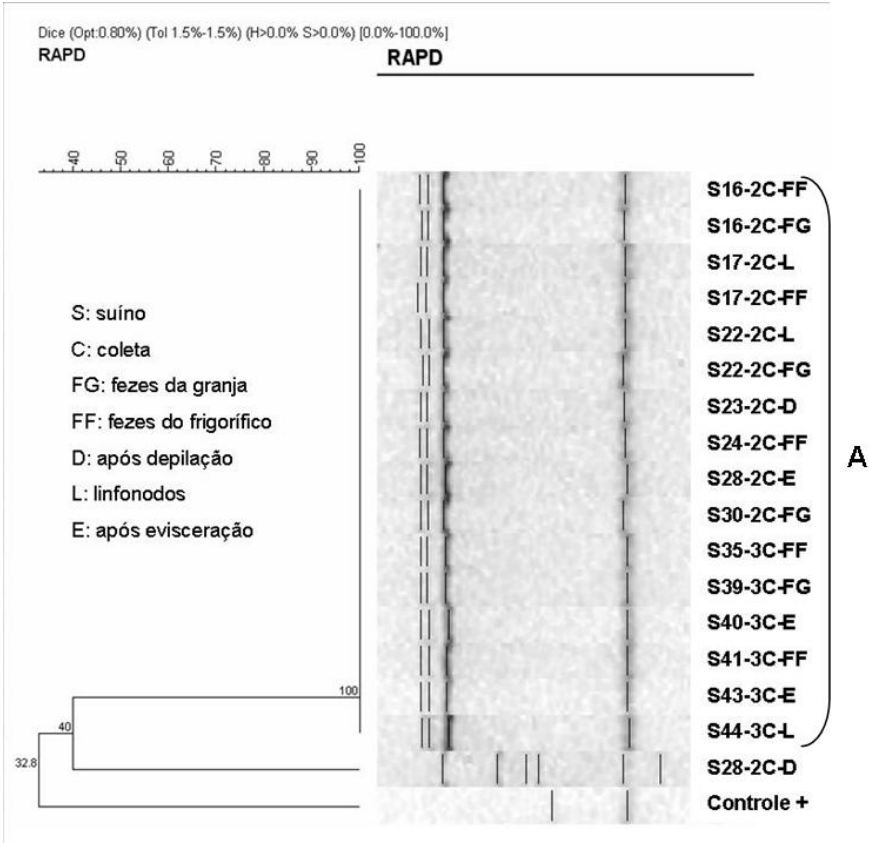


Figura 6. Dendrograma comparativo dos isolados identificados como *S. Infantis* utilizando coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 0,80%. Perfil A – grupo clonal.

Os géis originais utilizados para a construção dos dendrogramas estão representados na Figura 7.

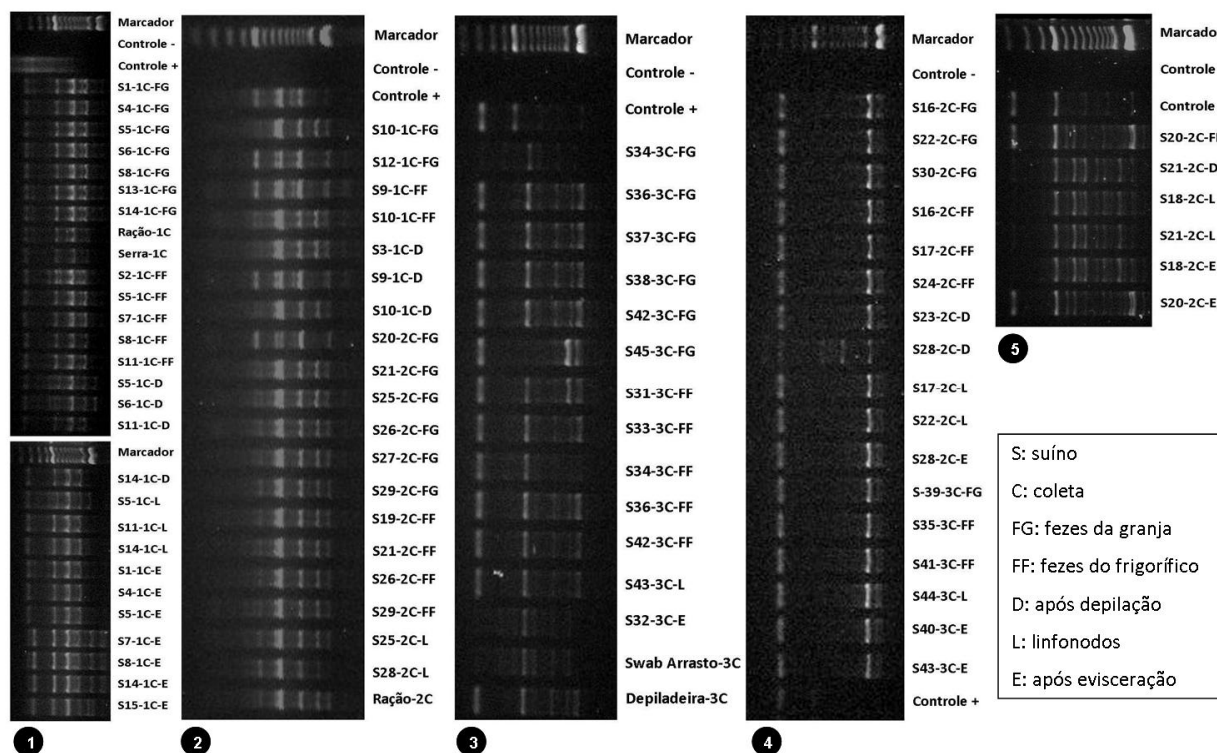


Figura 7. Géis de RAPD para *S. Typhimurium* (1), *S. Agona* (2), *S. Minnesota* (3), *S. Infantis* (4) e *S. Panama* (5).

A análise dos dendrogramas demonstrou as porcentagens de similaridade entre isolados que foram agrupados em *clusters*. A similaridade entre espécimes foi independente do local de isolamento, ou seja, carcaças ou fezes, com exceção do sorovar Panama, onde foi observado um grupo com cinco isolados provenientes de carcaça e uma amostra proveniente de fezes com perfil distinto.

Foram discriminados cinco grupos clones em *S. Typhimurium* e três isolados apresentaram perfil distinto, todos da primeira coleta, porém com similaridade maior que 80% com pelo menos um dos clones (Figura 2). Observou-se a formação de quatro *clusters*, com homologia maior ou igual a 80%. Os resultados indicam que animais positivos nas fezes com *S. Typhimurium* contribuem para um produto final contaminado e demonstra que medidas de controle no campo, se eficientes na redução da presença deste patógeno no conteúdo intestinal dos animais, também auxiliam na diminuição do mesmo durante as etapas de abate e no risco de transmissão de doença aos seres humanos. Esse fato pode ser evidenciado ao

analisar o suíno de número cinco, em que *S. Typhimurium* foi identificado ao longo de toda cadeia produtiva.

S. Agona foi agrupada em dois grupos clonais distintos com similaridade de 78,7%, um com quatro e outro com 16 isolados, provenientes da primeira e segunda coleta (Figura 3). Apesar de este sorovar ter sido isolado tanto de animais vivos como de carcaças, não foi identificado após evisceração. É provável que as condições de processamento pós-abate tenham limitado sua sobrevivência e multiplicação, e isso explica, em parte, sua ausência nas carcaças após a serragem.

Das amostras ambientais, *S. Typhimurium* e *S. Agona* foram isoladas de ração na primeira e segunda coleta, respectivamente. A análise do dendrograma indica que possivelmente esta foi a fonte primária de infecção dos animais na granja, pois *S. Typhimurium* isolado da ração apresentou homologia de 92,3% com sete amostras isoladas de fezes (Figura 2). No caso do sorovar *Agona*, a amostra de ração está inserida no perfil B (grupo clonal), com mais 15 isolados, sendo 11 provenientes de fezes (Figura 3). As amostras de ração, das quais foram isolados os sorovares identificados neste estudo foram originalmente coletadas por Pacheco (2009), imediatamente após a saída do silo, sem contato com os animais ou seus excrementos. A importância da ração como veículo de infecção para os suínos concorda com resultados de estudos de vários pesquisadores (STÄRK *et al.*, 2002; LO FO WONG *et al.*, 2004; KICH *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006).

A classificação dentro de um mesmo grupo clonal de *S. Agona* isolados de fezes de lotes sucessivos de animais alojados na granja (primeira e segunda coletas) sugere negligência a normas de biossegurança, que podem contribuir para a manutenção do microrganismo no ambiente. Porém, este comportamento não se repetiu para *S. Typhimurium*, o mais prevalente na primeira coleta. Assim, é possível que os animais amostrados já estivessem infectados com *S. Agona* em etapas de criação anteriores como desmame e creche. Esta hipótese concorda com Muller *et al.* (2009), que relataram que, entre as fontes mais importantes de contaminação por *Salmonella* na produção de suínos, podem ser destacadas o alojamento de animais portadores que sofreram a infecção na fase de creche, e a contaminação residual das instalações.

A alta porcentagem de isolados de *S. Typhimurium* durante todas as etapas de abate concorda com o fato de este ser o sorovar mais isolado em alimentos de origem suína no Brasil (SPRICIGO *et al.*, 2008). Porém, outros fatores parecem influenciar na disseminação do sorovar Agona. Apesar de ser o segundo mais frequente neste estudo, a positividade concentrou-se nas amostras de fezes, com baixo isolamento durante as etapas de abate.

A contaminação cruzada também parece ser importante na disseminação de *S. Typhimurium* ao longo da cadeia de produção. O espécime identificado na serra pertence ao mesmo grupo clonal que quatro isolados de fezes provenientes da pocilga do frigorífico e 93,9% com outro grupo clonal que envolve seis estirpes isoladas de amostras coletadas após depilação, em linfonodos ou após evisceração, inserido no *cluster* B.

S. Minnesota apresentou dois grupos clonais com similaridade de 80%, um agrupando 12 isolados e outro dois. Um isolado apresentou padrão distinto dos demais (Figura 4). Entre as seis amostras ambientais da segunda coleta, este sorovar foi identificado em duas ocasiões, uma de *swab* de arrasto da pocilga no frigorífico e uma da superfície da depiladeira. A homologia de 100% da amostra isolada na superfície da depiladeira com 10 isolados de fezes demonstra que a infecção dos animais é a fonte de contaminação do ambiente do abate. Porém, o número de isolamentos deste sorovar foi baixo durante o abate, com positividade somente em uma amostra de linfonodo (suíno 43) e uma de carcaça após evisceração (suíno 32). Isto sugere que, apesar da boa adaptação ambiental que permite sua permanência no ecossistema, o perfil que englobou o maior número dos isolados deste sorovar não permanece nas carcaças ou sofre injúria durante o processo de abate, permanecendo em números não detectáveis na técnica de isolamento tradicional utilizada neste estudo.

Outra hipótese para explicar o baixo número de isolamentos de *S. Minnesota* nas etapas de abate é a possibilidade de que algum evento especificamente ligado a este abate tenha influenciado nos resultados, como o número de animais abatidos, a ordem de abate dos animais amostrados em relação aos demais ou mudanças dos procedimentos internos. Não havia controle por parte dos pesquisadores com relação à estes eventos ou informação sobre mudanças na

concentração de cloro da água de lavagem ou quantidade/tipo de agentes químicos utilizados para a limpeza e desinfecção. Assim, não foi possível determinar se houve alguma mudança nos procedimentos em relação aos outros procedimentos de abate.

Os seis isolados identificados como *S. Panama* formaram um *clusters* com 96% de similaridade e um isolado não foi agrupado em nenhum deles. Todos os isolados eram provenientes da segunda coleta. Dos seis isolamentos, somente uma amostra foi proveniente de fezes (suíno 20) e apresentou 84,2% de homologia com as demais. Estes resultados demonstram que a contaminação da carcaça durante as etapas de abate provavelmente não está relacionada à infecção prévia dos animais como sugere a observação dos suínos 18, 20 e 21 (Figura 5).

A maior similaridade entre os isolados foi observada para *S. Infantis*, com 16 espécimes da segunda e terceira coleta pertencentes a um mesmo grupo clonal. A exceção foi um espécime com perfil distinto, isolado do suíno 28, que era proveniente da segunda coleta (Figura 6).

É possível que a presença do sorovar *Infantis* nas amostras de fezes esteja relacionada à contaminação ambiental na granja ou infecção dos animais em etapas anteriores à terminação, já que os isolados da segunda e terceira coleta pertencem ao mesmo grupo clonal. Porém, este sorovar não foi isolado no *swab* de arrasto realizado na granja que alojava os animais. Esta correlação entre isolamento em amostra ambiental e nos animais deve ser analisada levando-se em consideração que somente uma amostra foi coletada, podendo não refletir com segurança a ausência do microrganismo no ambiente.

Os sorovares mais isolados nas amostras de carcaças na segunda coleta, *S. Infantis* e *S. Panama*, estão, segundo a ANVISA, incluídos entre os sorotipos mais frequentemente identificados em amostras humanas oriundas de surtos de doenças transmitidas pelos alimentos no Brasil (RODRIGUES, 2005). Spricigo *et al.* (2008) relatam que *S. Panama*, *S. Agona* e *S. Infantis* foram os sorovares mais identificados em amostras de linguiça suína em Santa Catarina, referendando a importância destes sorovares na saúde pública.

Os resultados obtidos neste estudo reforçam a necessidade de monitoramento da presença de *Salmonella*, já que vários autores relatam sua

suscetibilidade à contaminação de carcaças e risco de infecção aos lotes de suínos. Indicam também que o monitoramento e controle devem acontecer em todas as etapas de produção, pois diferentes fatores parecem influenciar a permanência ou não de determinados sorovares na carne.

Considerando somente as amostras de fezes *S. Agona* e *S. Typhimurium* foram os mais isolados. *S. Agona* também foi o sorovar mais prevalente em amostras de fezes suínas em trabalho realizado por Weiss (2002) e a segunda mais prevalente em estudo conduzido por Bessa *et al.* (2004). Esse sorovar foi identificado em 7% dos isolamentos em propriedades criadoras e produtoras de suínos na Europa no ano de 2008 (EFSA, 2009).

5.2. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

A resistência/suscetibilidade a 11 antimicrobianos determinada no teste de difusão em discos para os 86 isolados de *Salmonella* spp. está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de 86 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de amostras ambientais, fezes e carcaças suínas

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
	N (%)	N (%)	N (%)
Lincomicina	0	0	86 (100)
Ceftiofur	0	2 (2,30)	84 (97,70)
Tetraciclina	3 (3,49)	2 (2,32)	81 (94,19)
Eritromicina	0	7 (8,10)	79 (91,90)
Neomicina	1 (1,20)	8 (9,30)	77 (89,50)
Gentamicina	6 (7,00)	5 (5,80)	75 (87,20)
Amoxicilina	1 (1,20)	13 (15,10)	72 (83,70)
Ácido nalidíxico	3 (3,5)	14 (16,3)	69 (80,2)
Enrofloxacina	4 (4,70)	17 (19,80)	64 (74,40)
Norfloxacina	12 (14,0)	27 (31,4)	47 (54,6)
Sulfazotrim	19 (22,1)	53 (61,6)	14 (16,3)

N (%) – número de amostras e porcentagem em relação ao total de identificados como *Salmonella* spp.

A característica de multirresistência aos antibióticos no gênero *Salmonella* é uma tendência mundial e apresenta conformidade com o presente trabalho, já que a maioria dos isolados demonstrou esse perfil. Dos isolados estudados, mais de 50% apresentaram resistência a nove dos 11 antibióticos testados. As drogas com maiores percentuais de sensibilidade foram o sulfazotrim e a norfloxacin, 22,1% e 14%, respectivamente. Porém, mesmo para estes antimicrobianos, os índices de sensibilidade intermediária observados foram considerados altos, o que pode indicar desenvolvimento de resistência em médio prazo.

No relatório da PREBAF (BRASIL, 2008), sobre monitoramento da resistência aos antimicrobianos de *Salmonella* e Enterococos isolados de carcaças de frango, comenta-se que o tratamento de infecções por enteropatógenos com o emprego de fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira geração tem “perspectiva sombria”. O perfil de resistência observado neste estudo confirma que esta é uma realidade também para infecção causada por *Salmonella* isolada de suínos. Nenhum espécime foi sensível ao ceftiofur (cefalosporina de terceira geração) e somente quatro (4,7%) isolados foram sensíveis à enrofloxacin (fluorquinolona). A norfloxacin (fluorquinolona de segunda geração), mesmo sendo a segunda droga mais efetiva neste estudo, teve somente 12 (14,0%) dos isolados classificados como sensível.

Vários autores e organizações têm relatado um aumento expressivo na identificação de microrganismos isolados de animais e alimentos que são resistentes aos antimicrobianos de (SCHMIDT, CARDOSO, 2003; TESSMANN *et al.*, 2008; HOPKINS *et al.*, 2010). Muitos afirmam que esta ocorrência é particularmente associada ao emprego de doses terapêuticas e subterapêuticas de antibióticos nos animais e ao uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana, tanto nos hospitais como na comunidade (SOLARI *et al.*, 1986; SCHMIDT e CARDOSO, 2003; BEGUM *et al.*, 2010).

A resistência determinada para cada um dos sorovares identificados (Tabela 8) demonstrou que houve variação de resistência aos antimicrobianos testados quando analisados pelo teste do quiquadrado.

Tabela 8. Resistência de *Salmonella* isolada de fezes e carcaças suínas aos antimicrobianos

Antimicrobiano	Sorovares (N=86)				
	Typhimurium	Agona	Infantis	Panama	Minnesota
	N=28	N=20	N=17	N=6	N=15
Amoxicilina	27 (96,4)	10 (50,0)	15 (88,2)	5 (83,3)	13 (86,7)
Gentamicina	27 (96,4)	14 (70,0)	15 (88,2)	6 (100,0)	13 (86,7)
Norfloxacina	20 (71,4)	7 (35,00)	11 (64,7)	6 (100,0)	4 (26,7)
Neomicina	28 (100,0)	14 (70,0)	15 (88,2)	6 (100,0)	14 (93,3)
Licomina	28 (100,0)	20 (100,0)	17 (100,0)	6 (100,0)	15 (100,0)
Ceftiofur	28 (100,0)	20 (100,0)	17 (100,0)	6 (100,0)	13 (86,7)
Tetraciclina	27 (96,4)	16 (80,0)	17 (100,0)	6 (100,0)	15 (100,0)
Sulfazotrim	0	2 (10,0)	4 (23,5)	0	8 (53,3)
Eritromicina	26 (92,9)	15 (75,0)	17 (100,0)	6 (100,0)	15 (100,0)
Ác. Nalidíxico	18 (64,3)	17 (85,0)	15 (88,2)	6 (100,0)	13 (86,7)
Enrofloxacina	28 (100,0)	14 (70,0)	12 (70,6)	6 (100,0)	5 (33,33)

N (%) – número de amostras e porcentagem em relação ao sorovar especificado.

S. Typhimurium foi o sorovar que mais demonstrou diferença em relação aos outros estudados, apresentando maior resistência à amoxicilina, à neomicina e à enrofloxacina quando comparado a *S. Agona* ($P<0,01$); à enrofloxacina em relação aos sorovares Minnesota ($P<0,01$) e Infantis ($P<0,05$) e à norfloxacina em comparação à Minnesota ($P<0,05$).

S. Typhimurium foi classificado como multiresistente, por apresentar resistência a três ou mais classes de antimicrobianos. Todos os isolados demonstraram resistência a neomicina (aminoglicosídeo), lincomicina (lincosamida), ceftiofur (cefalosporina) e enrofloxacina (fluorquinolona) e mais de 96% apresentaram resistência a amoxicilina (betalactâmico), gentamicina (aminoglicosídeo) e tetraciclina. Porém, todos foram sensíveis ao sulfazotrim. Neste estudo, a resistência do sorovar Typhimurium ao sulfazotrim foi significativamente menor que as observadas para os sorovares Infantis ($P<0,05$) e Minnesota ($P<0,01$).

A resistência à tetraciclina em 96,4% dos isolados de *S. Typhimurium* foi maior que o observado em outros trabalhos realizados no Brasil em amostras suínas, como Weiss (2002) que determinou 36,9% de resistência em fezes e linfonodos, Menin (2008) que observou 42,1% de resistência em isolados de

infecções entéricas e 41,67% em linguiça fresca por Spricigo (2008). Estudos na Europa com isolados de carne suína comercializadas nos países membros em que nem todos os sorovares foram identificados, mas incluía o *S. Typhimurium* também demonstraram resistência inferior aos deste estudo, com índices de variando de 36,05% a 59% (EFSA, 2006; EFSA, 2008b). Porém, concorda com análise deste sorovar isolado de cortes suínos coletados em feira livre de Pelotas, Rio Grande do Sul, no Brasil, que mostrou resistência de 100% à tetraciclina (TESSMANN, 2008). Schmidt et al. (2003) também observaram 99,4% de resistência a este antimicrobiano em *S. Typhimurium* isolada de sistema de tratamento de dejetos suínos. A resistência a tetraciclina é também o padrão observado na cepa epidêmica multiresistente DT 104 (EFSA, 2008b).

O aumento nos níveis de resistência à ampicilina, tetraciclina e cloranfenicol desde 1996 em *Salmonella* isoladas de humanos, suínos e frangos caracteriza a emergência de *S. Typhimurium* multi-resistente (BEGUM et al., 2010). Porém este autor relata que isolados com estas características são também resistentes à associação sulfa e trimetopim (sulfazotrim), que não foi observado neste estudo.

Não houve diferença entre a resistência determinada no sorovar Agona em relação aos outros isolados para os antimicrobianos: gentamicina, lincomicina, ceftiofur, tetraciclina, eritromicina, ácido nalidíxico e enrofloxacina. Porém, este sorovar demonstrou menor número de isolados resistentes a amoxicilina e neomicina em relação ao sorovar Typhimurium ($P<0,01$), à norfloxacina em relação ao Panama ($P<0,01$); e ao sulfazotrim em comparação ao Minnesota ($P<0,05$).

Apesar de ser frequentemente isolado de alimentos e ambiente e em algumas amostras clínicas, há poucos relatos sobre a resistência ou multiresistência em *S. Agona*. Neste estudo, este sorovar foi o que apresentou as menores porcentagens de isolados resistentes às drogas testadas.

S. Panama apresentou perfil semelhante ao observado para o sorovar Typhimurium, com 100% de resistência a nove dos antimicrobianos testados e 83,3% dos isolados resistentes à amoxicilina, mas 100% sensíveis ao sulfazotrim. Em relação aos outros sorovares, *S. Panama* mostrou-se mais resistente a enrofloxacina quando comparada a *S. Minnesota* ($P<0,05$) e à norfloxacina em

relação ao sorovar Agona ($P<0,01$). Houve menor resistência ao sulfazotrim pelos isolados quando comparados aos identificados como *S. Minnesota* ($P<0,05$).

O perfil de resistência determinado para o sorovar Panama neste estudo é diferente do observado por CASTAGNA *et al.* (2001) em isolados de fezes e linfonodos mesentéricos de suínos ao abate em três frigoríficos do sul do Brasil. Dos seis isolados identificados como *S. Panama* naquele estudo, somente foi observada resistência a ampicilina, tetraciclina e cotrimoxazol (um isolado cada) e à sulfonamida (cinco isolados). Aqueles autores também testaram os antimicrobianos: neomicina, gentamicina e ácido nalidíxo, porém ao contrário dos resultados obtidos neste estudo, os isolados foram 100% sensíveis. Os autores concluíram que *S. Panama* apresentou perfil de resistência estatisticamente menor que *S. Typhimurium*. Porém, Tessmann *et al.* (2008) também observaram perfil de multiresistencia (ampicilina, carbenicilina, cloranfenicol e tetraciclina) em *S. Panama* isolada de carne suína vendida em feiras livres no sul do país.

Isolados identificados como *S. Infantis* apresentaram menor percentual de resistência a enrofloxacin em relação ao sorovar Typhimurium, mas maior número de isolados resistentes ao sulfazotrim, em comparação a este mesmo sorovar ($P<0,05$). Todos os isolados foram resistentes a lincomicina, ceftiofur, tetraciclina e eritromicina. A resistência aos antimicrobianos de *S. Infantis* deste estudo foram superiores às observadas por TESSMANN (2008). Estes autores determinaram sensibilidade de 100% e 43% para o ácido nalídico e tetraciclina, respectivamente, em *S. Infantis* isoladas de cortes de carne suína de feiras-livres de Pelotas, RS.

Os isolados identificados como *S. Minnesota* foram menos resistentes a norfloxacin em relação a *S. Typhimurium* e à enrofloxacin em relação a *S. Panama* ($P<0,05$), mas apresentou maior resistência ao sulfazotrim em comparação ao sorovar Typhimurium ($P<0,01$). Este sorovar é considerado como um agente etiológico emergente da salmonelose humana (WHO, 2005)

No Brasil é permitido o uso dos antimicrobianos avilamicina, bacitracina, colistina clorexidina, flavomicina, clorohidroxiquinolina, tilosina, lincomicina e eritromicina como aditivos na alimentação de suínos em terminação (BRASIL, 1998). Destes, foram testados neste estudo os dois últimos. Com exceção de 8,1% dos isolados de *S. Typhimurium* e 25% de *S. Agona*, que apresentaram perfil

classificado como intermediário à eritromicina, todos os isolados foram 100% resistentes a estas drogas.

O conjunto de resultados deste estudo mostra que independente das diferenças identificadas entre os sorovares para alguns antimicrobianos, os isolados apresentaram perfil de multiresistência, principalmente para aquelas mais usadas em tratamentos clínicos nas granjas de produção, como enrofloxacin, lincomicina, amoxicilina, tetraciclina, eritromicina, norfloxacin, ceftiofur e sulfazotrim, sendo provável que as disparidades observadas sejam mais associadas à casuística que ao sorovar. A resistência é preocupante e demonstra que é necessária a redução do uso de antimicrobianos na produção animal como forma de reduzir a pressão de seleção a que estes microrganismos são submetidos. Alerta também para as dificuldades que pode representar o tratamento de infecções extra-intestinais e em grupos de risco, onde é necessária a antibiotecoterapia e para a necessidade de vigilância da resistência aos antimicrobianos em bactérias zoonóticas transmitidas por alimentos.

Iniciativas como o monitoramento da resistência de *Salmonella* isoladas de carcaças congeladas de frango em todo o país, realizada pela ANVISA no projeto PREBAF (BRASIL, 2008) fornecem dados importantes. As informações geradas permitem a visualização adequada do problema e fornece subsídio para as medidas de controle necessárias. Esta pesquisa deve ser ampliada para todos os produtos de origem animal.

6. CONCLUSÕES

A multiplicidade de sorovares de *Salmonella* identificados nos pontos analisados do processo produtivo, *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Minnesota* e *S. Panama* indica que diferentes fatores influenciam na infecção dos suínos e na presença e persistência destes microrganismos na cadeia produtiva. Isto reforça a importância de um monitoramento rigoroso que permita subsidiar ações que promovam o controle adequado destes patógenos desde a granja até as etapas de abate e garantam a saúde do consumidor.

A relação filogenética entre os isolados indicou que o consumo de ração contaminada é uma fonte de infecção dos animais pelos sorovares *Agona* e *Typhimurium*. A contaminação cruzada também contribuiu para a disseminação de *S. Typhimurium* durante as etapas de abate, aumentando o risco de contaminação da carne e de infecções em humanos.

O padrão de multirresistência determinado para os diferentes sorovares alerta para a necessidade de implantação de monitoramento sistemático da resposta aos antimicrobianos em bactérias zoonóticas transmitidas pelos alimentos. Deve-se ampliar os programas institucionais como o Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango para alimentos de origem suína, para subsidiar a discussão e instituição de políticas públicas sobre o uso de antimicrobianos na produção animal.

7. TRABALHOS FUTUROS

A técnica de RAPD-PCR é uma ferramenta amplamente utilizada nos estudos de tipagem molecular de microrganismos patogênicos e já foi testada para *Salmonella* spp. com poder de discriminação semelhante à ribotipagem. Pretende-se realizar técnicas como REP (*Repetitive Extragenic Polindromic*) e ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) para comparar aos resultados obtidos neste estudo.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, R.; ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I. Estudo da ocorrência de salmonelas em ingredientes, rações e suabes de pó colhidos em uma fábrica industrial de ração. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 6, 1999.
- ALMEIDA, I. A. Z. C.; PERESI, J. T. M.; CARVALHO, I. S.; RODRIGUES, E. C. A.; MARQUES, D. F.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A. *Salmonella*: sorotipos identificados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de 1990 – 1999. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 59, n. 1/2, p. 33-37, 2000.
- AYRES, M. I.; AYRES Jr, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá: MCT-CNPq, 2007.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; OLIVEIRA, S. J.; BOROWSKI, S. M. Infecção de suínos pelo *Streptococcus suis* tipo II em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 4, p. 128-129, 1984.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single method. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 45, p. 493-496, 1996.
- BEGUM, K.; REZA, T. A.; HAQUE, M.; HOSSAIN, A.; HASSAN, F. M. K.; HASAN, S. N.; AKHTER, N.; AHMED, A.; BARUA, U. Isolation, identification and antibiotic resistance pattern of *Salmonella* spp. from chicken eggs, intestines and environmental samples. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**, Bangladesh, v. 13, n. 1, p. 23-27, 2010.
- BESSA, C. M.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 80-84, 2004.
- BETANCOR, L.; SCHELOTTO, F.; MARTINEZ, A.; PEREIRA, M.; ALGORTA, G.; RODRÍGUEZ, M.A.; VOGNOLI, R.; CHABALGOITY, J.A. Random Amplified Polymorphic DNA and Phenotyping Analysis of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 1155-1162, 2004.

BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 1/2, p. 9-25, 1996.

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). Janeiro/2008.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Portaria Ministerial nº 193**, de 19 de Setembro de 1994. Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>>. Acesso em: Outubro 2009.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Of. Circular DFPA nº 047/98**, 1998. Departamento de Fiscalização de Insumos Agropecuários (DFIP). Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>>. Acesso em: Outubro 2009.

CASTAGNA, S. M. F.; SCHWARZ, C. W.; CARDOSO, M. Presença de *Salmonella* sp. no trato intestinal e em tonsilas/linfonodos submandibulares de suínos ao abate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 3, p. 300-306, 2004.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. 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.

DE LA TORRE, E.; TELLO, M.; MATEU, E. M.; TORRE, E. Use of Biochemical Kinetic Data to Determine Strain Relatedness among *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43. n. 11, p. 5419-5424, 2005.

Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* em um evento científico, São Paulo, 2004 CVE/CCD-SES. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 515-518. 2005.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – 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, **The EFSA Journal**. Italy, v. 8, n. 3, p. 1503, 2010.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007, **The EFSA Journal**. Italy, p.223, 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - 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, p. 1–111, 2008a.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - For citation purposes: 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, n. 765, p. 1-87, 2008b.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - Report of the Task Force of Zoonoses Data Collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella* in fowl (*Gallus gallus*), turkeys and pigs and *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broilers. **The EFSA Journal**. Italy, v. 403, p. 1-16, 2006.

FEDORKA-CRAY, P. J.; GRAY, J. T. Current state of *Salmonella* in swine, p. 15-26. In: **The Allen D. Lemam Swine Conference**, Minnesota, USA. 1996.

FEDORKA-CRAY, P.J. The connection between *Salmonella*, swine, and food safety. In: PROCEEDINGS OF SWINE CONFERENCE, 1996, Nebraska. **Anais...** Nebraska: Lincoln, 1996. p.25-45.

FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; NEME, S. N.; CALZADA, C. T.; DIAS, A. M. G.; NAKAHARA, L. K.; de OLIVEIRA, J. C.; IRINO, K.; TAUNAY, A. E. Marcadores Epidemiológicos de *Salmonella typhimurium* e *Salmonella agona*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 91-98, 1992.

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.

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**. 11ed. St. Louis: Mosby, 2002. p. 509-526.

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.

GUTIÉRREZ-COCCOL; MONTIEL-VAZQUEZ, E.; AGUILERA-PEREZ, P.; GONZALEZ-ANDRADE, M. C. Serotipos identificados em los servicios de salud de México. **Salud Pública de México**, México, v. 42, p. 490-495, 2000.

HALD, T.; DANILO, M. A.; LO FO WONG, D. M.; AARESTRUP, F. M. The attribution of human infections with antimicrobial resistant *Salmonella* bacteria in Denmark to sources of animal origin. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, NY. v. 4, n. 3, p. 313–326, 2007.

HILL, A. A.; SNARY, E. L.; ARNOLD, M. E.; ALBAN, L.; COOK, A. J. Dynamics of *Salmonella* transmission on a British pig grower-finisher farm: a stochastic model. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 136, n. 3, p. 320-333, 2008.

HOPKINS, K. L.; KIRCHNER, M.; GUERRA, B.; GRANIER, S. A.; LUCARELLI, C.; PORRERO, M. C.; JAKUBCZAK, A.; THRELFALL, E. J.; MEVIUS, D. J. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? **Eurosurveillance**, Stockholm, v. 15, n. 22, 2010.

HUDSON, C. R.; GARCIA, M.; GAST, R. K.; MAURER, J. J. Determination of close genetic relatedness of the major *Salmonella enteritidis* phage types by pulsed-field gel electrophoresis and DNA sequence analysis of several *Salmonella* virulence genes. **Avian Diseases**, v. 48, p. 875-886, 2001.

HURD, H. S.; GAILEY, J. K.; MCKEAN, J. D.; ROSTAGNO, M. H. Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 62, n. 8, p. 1194-1197, 2001.

KICH, J. D.; MORES, N.; PIFFER, I. A.; COLDEBELLA, A.; AMARAL, A.; RAMMINGER, L.; CARDOSO, M. Fatores associados à soroprevalência de *Salmonella* em rebanhos comerciais suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 398-405, 2005.

LE MINOR, L.; POPOFF, M. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. nom. rev. as the type and only species of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, Inglaterra, GB: Society for General Microbiology v. 37, n. 4, p. 465–468, 1987.

LIN, A. W.; USERA, A.M.; BARRET, T.J.; GOLDSBY, R.A. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 870-876, 1996.

LO FO WONG, D. M. A.; DAHL, J.; WINGSTRAND, A.; VAN DER WOLF, P. J.; VON ALTROCK, A.; THORBERG, B. M. A European longitudinal study in *Salmonella* seronegative and seropositive-classified finishing pig herds. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 132, n. 5, p. 903-914, 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.

MAGISTRALI, C.; CURTIS, P. De; CUCCO, L.; VISCHI, O.; SCUOTA, S.; ZICAVO, A.; PEZZOTTI, G. Study on the diffusion of *Salmonella* spp. in a finishing herd, from the introduction of animals till the slaughterhouse. **Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini**, Montichiari, v. 32, p. 391-398, 2006.

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, Março, 2006.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1687-1693, 2008.

MOLBAK, K.; BAGGESEN, D. L.; AARESTRUP, F. M.; EBBESEN, J. M.; ENGBERG, J.; FRYDENDAHL, K.; GERNER-SMIDT, P.; PETERSEN, A. M.; WEGENER, H. C. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 341, n. 19, p. 1420-1425, 1999.

MORROW, W. E. M.; DAVIES, P. R. The prevalence of *Salmonella* spp. in feces on the farm and in ceca at slaughter. In: **16th International Pig Veterinary Society Congress**, Melbourne, Austrália, p. 207, 2000.

MÜLLER, M.; SCHWARZ, P.; KICH, J. D.; CARDOSO, M. Perfil sorológico e de isolamento de *Salmonella* sp. em suínos no início da terminação e ao abate. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 3, p. 931-937, 2009.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. **Salmonellosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for for terrestrial animals**, 5. ed., 2004. Disponível em: <<http://oie.int>> Acesso em: Outubro 2009.

OLIVEIRA, C. J. B.; CARVALHO, L. F. O. S. Infecções por *Salmonella* em suínos: panorama e perspectivas. **Suinocultura Industrial**, Porto Feliz, n. 3, p. 35-39, 2003.

OLIVEIRA, F. A.; FRAZZON, A. P. G.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella enteritidis* involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 1, n. 2, p. 170-176, 2007.

PACHECO, M. T. N. ***Salmonella* sp em rebanho comercial de suínos e em suas carcaças processadas no frigorífico**. 2009. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

REEVES, M.; EVINS, G.; HEIBA, A.; PLIKAYTIS, B.; FARMER, J. 3rd. Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other *Salmonella* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n. 2, p. 313-320, 1989.

RODRIGUES, D. P. Vigilância de *Salmonella*. In: **Capacitação e Controle de *Salmonella*** - WHO - Global Salmonella Surveillance. Aula ministrada na FIOcruz, Rio de Janeiro, 26 de set. de 2005.

SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. R. I. Sobrevivência e perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* sp. isoladas em um sistema de tratamento de dejetos de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 881-888, 2003.

SCHROETER, A.; HOOG, B.; HELMUTH, R. Resistance of *Salmonella* isolates in Germany. **Journal of Veterinary Medicine/Series B**, Berlin, v. 51, p. 389–392, 2004.

SEIXAS, F. N.; TOCHETTO, R.; FERRAZ, S. M. Presença de *Salmonella* sp. em carcaças suínas amostradas em diferentes pontos da linha de processamento. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 2, p. 634-640, 2009.

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, L. E.; GOTARDI, C.; VIZZOTTO, R.; KICH, J. D.; CARDOSO, M. Infecção por *Salmonella* sp. em um sistema integrado de produção de suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 455-461, 2006.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, N.; OLIVEIRA, S. J.; CARVALHO, L. F. O. S.; MORENO, A. M. **Clínica e Patologia Suína**. Art 3 Impressos Especiais, Goiânia, p.383-387, 1999.

SOLARI, C. A.; REIS, E. M. F.; DIAS, J. C. A. R.; HOFER, E. Resistência antimicrobiana de *Salmonella agona* oriundas de várias regiões do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 1, p. 7-14, 1986.

SPRICIGO, D. A.; MATSUMOTO, S. R.; ESPÍNDOLA, M. L.; VAZ E. K.; FERRAZ, S. M. Prevalência e perfil de resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguiças suínas tipo frescal em Lages, SC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 517-520, 2008.

STÄRK, K. D. C.; WINGSTRANDA, A.; DAHLA, J.; MOGELMOSEA, V.; DANILO, M. A.; WONG, L. F. Differences and similarities among experts' opinions on *Salmonella*

enteric dynamics in swine pre-harvest. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 7-20, 2002.

TESSMANN, C.; ZOCHE, F.; LIMA, A. S.; BASSANI, M.; LOPES, G. V.; SILVA, W. P. Ocorrência e Perfil de sensibilidade a antibióticos de *Salmonella* spp isolada em cortes de carne suína comercializados em feiras livres de Pelotas (RS). **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 307-313, 2008.

THRELFALL, E. J.; TEALE, C. J.; DAVIES, R. H.; WARD, L. R.; SKINNER, J. A.; GRAHAM, A.; CASSAR, C.; SPEED, K. A comparison of antimicrobial susceptibilities in nontyphoidal salmonellas from humans and food animals in England and Wales in 2000. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 9, n. 2, p. 183–189, 2003.

THRELFALL, E. J.; WARD, L. R.; SKINNER, J. A.; GRAHAM, A. Antimicrobial drug resistance in non-typhoidal salmonellas from humans in England and Wales in 1999: decrease in multiple resistance in *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium, Virchow, and Hadar. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 6, n. 4, p. 319-25, 2000.

TOZETTO, S. M. **Sorotipos e Tipagem Molecular de Isolados de *Salmonella* entérica no Paraná no período de Outubro de 2002 a Maio de 2004**. 2006. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

VAN DER GAAG, M. A.; VOS, F.; SAATKAMP, H.W.; VAN BOVEN, M.; VAN BECK, P.; HUIRNE, R.B.M. A state-transition simulation model for the spread of *Salmonella* in the pork supply chain. **European Journal of Operational Research**, Amsterdam, v. 156, p. 782-798, 2004. Disponível em: <<http://www.scirus.com>>. Acesso em: 12 mai 2010.

VARMA, J. K.; MARCUS, R.; STENZEL, S. A.; HANNA S. S.; GETTNER, S.; ANDERSON, B. J.; HAYES, T.; SHIFERAW, B.; CRUME, T. L.; JOYCE, K.; FULLERTON, K. E.; VOETSCH, A. C.; ANGULO, F. J. Highly resistant *Salmonella* Newport-MDRampC transmitted through the domestic U.S. food supply: A foodnet case-control study of sporadic *Salmonella* Newport infections, 2002–2003. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 194, n. 2, p. 222–230, 2006.

WALKER, R. A.; LAWSON, A. J.; LINDSAY, E. A.; WARD, L. R.; WRIGHT, P. A.; BOLTON, F. J.; WAREING, D. R. CORKISH, J. D.; DAVIES, R. H.; THRELFALL, E.

J. Decreased susceptibility to ciprofloxacin in outbreak-associated multiresistant *Salmonella* Typhimurum DT104. **Veterinary Record, London**, v. 147, p. 395-396, 2000.

WEGENER, H. C.; AARESTRUP, F. M.; GERNER-SMIDT, P.; BAGER, F. Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. **Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum**, Kobenhavn, v. 92, n. 1, p. 51–57, 1999.

WEISS, L. H. N.; NONIG, R. B.; CARDOSO, M.; COSTA, M. Ocorrência de *Salmonella* spp. em suínos de terminação no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, p.104-108, 2002.

WILCOCK, B. P.; SCHWARTZ, K. J. 1993. **Salmonellosis**, p. 570-583. In: LEMAN, A. D.; STRAW, B. E.; MENGELING, W. L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (ed.) Diseases of Swine. 7th ed. Iowa State University, Ames, USA.

WRAY, C. W.; SOJKA, W. J. Reviews of the progress of dairy science: bovine salmonellosis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 44, n. 2, p. 383-425, 1977.