

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HIGIENE
VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE
PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

THIAGO SILVA FARIA

**PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E
SUBTIPAGEM DE Salmonella Minnesota ISOLADAS NO
PRÉ-ABATE E EM CARÇAÇAS DE FRANGOS**

Niterói
2014

THIAGO SILVA FARIA

**PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E SUBTIPAGEM DE
Salmonella Minnesota ISOLADAS NO PRÉ-ABATE E EM
CARCAÇAS DE FRANGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Virginia Léo de Almeida Pereira

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Dayse Lima da Costa Abreu

Niterói
2014

F224p Faria, Thiago Silva

Perfil de resistência antimicrobiana e subtipagem de *Samonella Minnesota* isoladas no pré-abate e em carcaças de frangos/ Thiago Silva Faria; orientadora Virginia Léo de Almeida Pereira. - 2014.

40f.

Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal)- Universidade Federal Fluminense, 2013.

Orientadora: Virginia Léo de Almeida Pereira

1. Carcaça de frango de corte. 2. Contaminação de frango de corte. 3. Salmonella. 4. Resistência microbiana a medicamento. I. Título.

CDD 664.939

THIAGO SILVA FARIA

**PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E SUBTIPAGEM DE *Salmonella*
Minnesota ISOLADAS NO PRÉ-ABATE E EM CARÇAÇAS DE FRANGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 29 de agosto de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA - Orientadora - UFF

Profa. Dra. DAYSE LIMA DA COSTA ABREU – UFF

Profa. Dra. DÁLIA DOS PRAZERES RODRIGUES - FIOCRUZ

Niterói - RJ
2014

SUMÁRIO

RESUMO, p.6

ABSTRACT, p.7

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p.8

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p.9

1 INTRODUÇÃO, p. 10

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 12

2.1 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DA CARNE DE FRANGOS, p. 12

2.2 SALMONELOSE , p.13

2.2.1 Nomenclatura, taxonomia e características bacteriológicas, p.13

2.2.2 Salmonelose no homem, p.15

2.2.3 Salmonelose aviária , p.16

2.2.4 Diagnóstico de *Salmonella* spp. em aves, p.18

2.2.5 *Salmonella* sor. Minnesota, p. 21

2.3 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA, p.22

3. MATERIAL E MÉTODOS, p.24

3.1 AMOSTRAS, p.24

3.2 PULSED-FIELD GEL ELETROPHORESIS, p.25

3.3 ANTIBIOGRAMA, p.26

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p.28

5 CONCLUSÃO, p.34

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.35

DEDICATÓRIA

A minha esposa Bianca, que me apoiou, incentivou e acompanhou nessa caminhada, de forma incondicional, apesar dos vários contratempos.

Aos meus pais Marize e Toninho, exemplos de dedicação e trabalho, que se orgulham de mim e me apoiaram em mais este sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus amados familiares, minha esposa Bianca, meus pais Marize e Toninho e meus avós Maria Dulce e Zelio por todo apoio e compreensão durante este processo.

A minha orientadora, Virginia Léo de Almeida Pereira, por ter me acolhido e acreditado no meu potencial e por todo aprendizado que me proporcionou com sua imensa sabedoria.

A Dayse Lima da Costa Abreu, por todo o apoio oferecido nos diversos momentos.

Aos meus professores na Universidade Federal Fluminense, que me guiaram e me enriqueceram como aluno e pesquisador.

Aos amigos Cátia Cardoso da Silva, Felipe Faccini dos Santos e Mariza Dinah Manes Brandão pela recepção e apoio na adaptação ao novo ambiente.

Aos meus colegas de curso, que estiveram presentes dando apoio dentro e fora de laboratório.

A todas aquelas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram com este trabalho e me incentivaram a continuar caminhando.

A Universidade Federal Fluminense, pela oportunidade na realização da pesquisa.

RESUMO

O Brasil é o terceiro maior produtor e o maior exportador de carne de frango do mundo, portanto restrições sanitárias aos produtos avícolas brasileiros podem ter grande impacto econômico. O objetivo desse trabalho foi investigar cepas de *Salmonella sor.* Minnesota isoladas de frangos de corte no pré-abate e de carcaças desses frangos pelo perfil de sensibilidade antimicrobiana e eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-field Gel Eletrophoresis* - PFGE). Foram coletadas amostras de dez lotes diferentes de frangos de corte, sendo cinco lotes provenientes de ambiente positivo para *Salmonella* spp. e cinco, de ambiente negativo, testados previamente a partir de propés arrastados na cama dos galpões e submetidos a isolamento bacteriológico. Foram obtidos 29 pools positivos para cepas de *Salmonella* spp, a partir de suabes cloacais, agrupados em 100 pools de 5 suabes.; e 20 carcaças positivas, a partir de 250 carcaças de frangos após a passagem pelo chiller, totalizando 49 isolados. Essas 49 cepas de *Salmonella* spp. obtiveram diagnóstico presuntivo para o sorotipo Minnesota e foram submetidas à sorotipificação pelo método Kaufmann- White, à PFGE e ao antibiograma pela técnica de difusão em disco. Todas as 49 cepas de *Salmonella* spp isoladas de frangos vivos e carcaças foram confirmadas como *Salmonella enterica* enterica sorovar Minnesota pela sorotipificação e apresentaram característica de multirresistência. Dessas cepas, 59,17% apresentaram resistência a pelo menos cinco antimicrobianos diferentes. Foram obtidos 17 perfis de resistência antimicrobiana para análise e comparação entre estas cepas. Todas as amostras estudadas apresentaram resistência aos antibióticos tetraciclina e sulfonamidas e 87,76 % para a doxiciclina. Em contrapartida, ciprofloxacina, enrofloxacina, gentamicina e norfloxacina se mostraram bastante eficientes, com poucas cepas apresentando resistências. Não houve diferença significativa entre a frequência de cepas de *Salmonella sor.* Minnesota resistentes aos antibióticos estudados de frangos vivos e das carcaças (Teste-G: independência, $p = 1,000$). Também não foi observada uma diferença significativa pelo teste binomial de duas proporções para a correlação unilateral da presença de *Salmonella* spp. nos frangos vivos ($p = 0,2543$) e nas carcaças ($p=0,1755$), de ambientes previamente avaliados como positivos ou como negativos no teste em propés que antecedeu a coleta de material para análise. A PFGE mostrou um grau de semelhança de pelo menos 85% entre todas as cepas analisadas, indicando que todas tiveram a mesma origem clonal, mesmo sendo de diferentes lotes e apresentando variados perfis de resistência a antimicrobianos.

Palavras- chave: Avicultura, carne de frango, *Salmonella*, antimicrobiano, resistência

ABSTRACT

Brazil is the third largest producer and the largest exporter of chicken in the world, so sanitary restrictions on Brazilian poultry products can have a significant economic impact. This study's objective was to investigate strains of *Salmonella* serotype Minnesota isolated from broilers in pre-slaughter and carcass of these chickens by antimicrobial susceptibility and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Samples of ten different batches of broilers were collected, five lots from positive environment for *Salmonella* spp. and five from negative environment, pre-tested with shoe covers dragged on the sheds' floor and subjected to bacterial isolation. 29 positive pools for strains of *Salmonella* from cloacal swabs were obtained coming from 100 pools of five swabs each and 20 positive carcasses from 250 broiler carcasses after passing through the chiller, totaling 49 isolates. These 49 strains of *Salmonella* spp. had presumptive diagnosis for serotype Minnesota and underwent serotyping by Kaufmann-White method, PFGE and antibiotic susceptibility by disk diffusion technique. All 49 strains of *Salmonella* spp. isolated from live chickens and carcasses were confirmed as *Salmonella enterica* serovar Minnesota by the Serotyping and showed characteristic of multidrug resistance. Of these strains, 59,17% were resistant to at least five different antimicrobials. 17 antimicrobial resistance profiles were obtained for analysis and comparison of these strains. All samples exhibited resistance to the antibiotics tetracycline and sulfonamide and 87.76% for doxycycline. In contrast, ciprofloxacin, enrofloxacin, gentamicin and norfloxacin proved quite efficient, with few strains showing resistance. There was no significant difference between the frequency of *Salmonella* strains of Minnesota live chickens and carcasses resistant to antibiotics studied (G-test: independence, $p = 1.000$). And also a significant difference by the binomial test of two proportions for unilateral correlation of the presence of *Salmonella* spp. was not observed. In live chickens ($p = 0, 2543$) or the carcasses ($p = 0.1755$), in environments previously evaluated as positive or as negative test shoe covers that preceded the collection of material for analysis. PFGE showed a degree of similarity of at least 85% of all strains examined, indicating that all had the same clonal origin, even when from different lots and presenting various resistance profiles to antibiotics.

Key Words: Poultry, chicken meat, *Salmonella*, antimicrobial, resistance

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Tabela 1. Número de cepas de *Salmonella* spp. isoladas em frangos vivos e carcaças provenientes de ambientes positivo e negativo pelo teste de análise de propé, p. 24
- Quadro 1. Classes e espectro de ação de antimicrobianos utilizados em estudo de resistência antimicrobiana em *Salmonella sor. Minnesota*, p.27
- Quadro 2. Perfis de Resistência antimicrobiana de *Salmonella sor. Minnesota* isoladas de frangos vivos e carcaças após a passagem pelo chiller, p.29
- Tabela 2. Frequência de resistência de cepas de *Salmonella sor. Minnesota*, de 29 isolados de frangos vivos e 20 isolados de carcaças, a diferentes antimicrobianos, p.30
- Tabela 3. Frequência de cepas de *Salmonella sor. Minnesota* provenientes de frangos vivos e carcaças, de ambientes positivos e negativos ao isolamento a partir de análise de propés frente aos perfis de resistência antimicrobiana, p.31
- Figura 1. Dendograma de cepas de *Salmonella sor. Minnesota* escolhidas aleatoriamente dos diferentes lotes positivos e negativos, p.33

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Amo	Amoxicilina
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	Centers of Disease Control
Cfl	Cefalotina
Cip	Ciprofloxacina
Clo	Cloranfenico
Ctf	Ceftiofur
Dox	Doxiciclina
Eno	Enrofloxacina
Gen	Gentamicina
IBGE	Instituto Brasileiro Geográfico e Estatística
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
Nor	Norfloxacina
PFGE	Eletoforese em campo pulsado (<i>Pulsed-field Gel Eletrophoresis</i>)
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Sul	Sulfonamidas
Tet	Tetraciclina
Tri	Trimetroprima
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
WHO	World Health Organization

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor e o maior exportador de carne de frango. Comercializa para 142 países e tem previsão de suprir 48,1% das exportações de frango até 2020. Doenças transmitidas por alimentos podem ter grande impacto econômico para a balança comercial brasileira pela imposição de restrições sanitárias à importação de carnes brasileiras pelos países importadores (UBABEF, 2014).

Os produtos de origem avícola são os principais incriminados em surtos de salmonelose humana, porém na maioria dos casos não se tem um rastreamento do microrganismo presente na infecção comprovando a sua origem. Os sorotipos Enteritidis e Typhimurium tem sido os mais frequentemente envolvidos em surtos de infecção alimentar, entretanto alguns relatos recentes demonstram um aumento percentual da contaminação por *Salmonella sor. Minnesota* na avicultura (BAÚ et al., 2001; JAY, 2005; CARVALHO e CORTEZ, 2005; MUNIZ, 2012).

O gênero *Salmonella* é considerado como importante causador de surtos de infecções alimentares em todo o mundo. Seu estudo tem grande importância para a saúde coletiva pelo fato de causar enfermidade de difícil controle, por de se apresentar distribuído amplamente na natureza, possuir uma grande variedade de reservatórios, ser extremamente patogênico para o homem e para muitas espécies animais e ter sua disseminação favorecida por indivíduos portadores assintomáticos (BERSOT, 2006).

As infecções por *Salmonella* spp. causam grande perda econômica, tanto pelos custos para o seu controle quanto pelas perdas na produção. Surtos de salmonelose humana também causam impacto à Saúde Pública, e podem gerar barreiras sanitárias para a exportação dos produtos (LISTER, 2003).

Salmonella enterica sub. *enterica* sorotipo Minnesota é considerado emergente na avicultura. Este fato tem sido creditado às medidas de controle voltadas para os sorotipos Enteritidis e Typhimurium, propiciando o aparecimento de outros sorotipos (PICKLER, 2011). Segundo Pickler (2011), o controle de salmonelas utilizando ácidos orgânicos na ração e água, não se mostrou eficiente no

controle do sorotipo Minnesota, sendo esse um mecanismo de seleção em detrimento de sorotipos susceptíveis como o Enteritidis.

Estudos das cepas de *Salmonella* spp. presentes na produção avícola e na indústria de processamento dos produtos derivados se fazem necessários para estabelecer uma correlação entre elas e avaliar a prevalência dos sorotipos. Essas informações auxiliam na avaliação dos pontos críticos a serem controlados na cadeia produtiva

O objetivo desse trabalho foi investigar cepas de *Salmonella* sor. Minnesota isoladas de frangos de corte no pré-abate e de carcaças desses frangos pelo perfil de sensibilidade antimicrobiana e eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-field Gel Electrophoresis* - PFGE)

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DA CARNE DE FRANGOS

O Brasil é o maior exportador de carne de frango desde o ano de 2004 e , com um volume de produção de 12,3 milhões de toneladas em 2013, ocupa a terceira colocação em produção mundial, ficando atrás somente da China e dos Estados Unidos. O consumo de carne de frango no Brasil também é bastante elevado e, em 2013, foi de 41,8 kg por habitante (UBABEF, 2014).

Diante deste panorama, o mercado internacional exige o monitoramento sanitário dos plantéis avícolas, além do controle da qualidade da carne de frango e seus derivados. Além disso, o mercado interno exige alto padrão de qualidade e segurança dos produtos fornecidos (VON RÜCKERT, 2006).

Considerando a importância da avicultura nacional, seu posicionamento no mercado internacional de carne de aves e sua situação sanitária, doenças como as salmoneloses, causadas pelos sorotipos Pullorum, Gallinarum, Enteritidis e Typhimurium são de controle obrigatório na produção de aves e são priorizadas pelo Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituído pela Portaria nº193, de 19 de setembro de 1994 (BRASIL, 1994). O PNSA tem como objetivo garantir a saúde dos plantéis e a qualidade dos produtos avícolas brasileiros.

Quanto aos padrões microbiológicos nacionais para alimentos a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº12 de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece que *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25g de ovos e derivados. Para carnes de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes) resfriadas ou congeladas, *in natura*, não há padrões para *Salmonella* spp. Há padrões somente para coliformes termotolerantes a 45°C/g (BRASIL, 2001a). Considerando que existe a contaminação por *Salmonella* nos produtos avícolas, que os processos tecnológicos utilizados pelas indústrias ainda não asseguram sua

eliminação completa e que sua presença significa um risco à saúde do consumidor caso o produto não seja adequadamente conservado e preparado, a ANVISA instituiu pela RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC nº 13 de 2001 que, obrigatoriamente, sejam incluídas na rotulagem de carnes de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados, recomendações de uso, preparo e conservação. Essa medida visa o controle dos riscos quanto ao consumo de alimentos em relação à infecção por *Salmonella* spp. (BRASIL, 2001b)

2.2 SALMONELOSE

2.2.1 Nomenclatura, taxonomia e características bacteriológicas

A nomenclatura dada à *Salmonella* foi inicialmente, baseada na doença e/ou no animal no qual se isolou a bactéria como: *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. abortusovis*. Esse tipo de nomenclatura foi abandonado por não representar verdadeiramente a doença promovida pela bactéria, nem seus hospedeiros, e passou-se a aplicar nomes de cidades, regiões ou países onde a *Salmonella* foi primeiramente isolada, como exemplos podem ser citadas *S. london* e *S. panama* (HOLT et al., 1994).

Após várias alterações na taxonomia a classificação atual, baseada em estudos moleculares, divide o gênero em *S. enterica* e em *S. bongori*. *S. enterica* é subdividida em seis subespécies, a saber: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* and *S. enterica* subsp. *indica* (FERREIRA; CAMPOS, 2008). Já foram identificados 2659 sorotipos de *Salmonella* spp. Destas, 2636 pertencem à espécie *Salmonella enterica* e apenas 23 à *Salmonella bongori* (ISSENHUTH-JEANJEAN et al, 2014) A subespécie *enterica* engloba os sorotipos clinicamente mais importantes para humanos e animais.

Salmonella spp. pertence à família Enterobacteriaceae que constitui um grande grupo de bactérias Gram-negativas de grande difusão no ambiente (KONEMAM et al., 2001). Ao contrário de muitas espécies pertencentes a essa família, não fermenta lactose. Todavia, algumas salmonelas, a partir da aquisição de plasmídeos transportadores de genes codificadores de enzimas que permitem a fermentação da lactose (plasmídeos lac+), podem produzir colônias lactose positivas (FERREIRA; CAMPOS, 2008).

A maioria dos sorotipos é móvel, por meio de flagelos peritríquios, com exceção de *Salmonella sor. Gallinarum* e *Salmonella sor. Pullorum*, que são imóveis (HOLT et al., 1994). Os sorotipos móveis, também conhecidos como paratíficos, tem como característica colonizar o trato digestivo de animais e não terem especificidade de hospedeiro.

As salmonelas são bacilos não formadores de esporo, com medidas de 0,7–1,5 a 2, 0–5,0 µm. Têm capacidade de crescimento dentro e fora do hospedeiro, não têm necessidade de cloreto de sódio, mas conseguem sobreviver em concentrações de até 4%. Conseguem se desenvolver entre 5°C e 45°C, com temperatura ótima de 35°C a 37°C. São sensíveis ao calor, normalmente sendo eliminadas com aquecimento de 70°C. Se desenvolvem em pH entre 4 e 9, com pH ótimo entre 6,5 e 7,5. Precisam de alta atividade de água, entre 0,99 e 0,94. São microrganismos anaeróbios facultativos, têm a capacidade de reduzir nitratos a nitritos e produzem gás a partir da fermentação da glicose. (REZENDE et al., 2001; SAIF et al., 2008; THAYER et al., 1987).

As infecções por *Salmonella* spp. causam grande perda econômica, tanto pelos custos para o seu controle quanto pelas perdas na produção. Surto de salmonelose humana também causam impacto na saúde pública e afetam a comercialização de produtos avícolas tanto pela má propaganda gerada pela sua contaminação quanto por estabelecimento de barreiras sanitárias para a exportação destes produtos (LISTER, 2003).

2.2.2 Salmonelose no homem

Salmonella spp. pode causar dois tipos de doença no homem, dependendo do sorotipo: febre tifóide e salmonelose não tifóide.

A febre tifóide é causada comumente pelos sorotipos Typhi e Paratyphi, encontrados somente em humanos (FDA, 2012) e ocasionalmente pode ser causada por outros sorotipos (FERREIRA; CAMPOS, 2008). Trata-se de uma infecção sistêmica que se inicia na mucosa intestinal. A bactéria se dissemina através do sangue, podendo ser cultivada apenas na fase sintomática da doença. É uma infecção de longa duração que causa constipação no início e, com a evolução do quadro, leva a diarreia hemorrágica, febre, hepatomegalia e esplenomegalia. Essa doença tem uma taxa de mortalidade de 10 a 15% (BROOKS et al., 2007).

A salmonelose não tifóide é causada por outros sorotipos de *Salmonella enterica* que não os Typhi e Paratyphi. Os sorotipos não tifóides estão amplamente distribuídos na natureza, sendo o trato intestinal do homem e dos animais o seu habitat primário (FDA, 2012). A infecção é limitada ao intestino e geralmente é autolimitante. As bacteremias acontecem em pacientes imunodeprimidos (FERREIRA; CAMPOS, 2008). Após a infecção o paciente desenvolve náusea, vômito, dores de cabeça e diarreia profusa, podendo ter febre baixa. A doença se resolve em 2 a 3 dias. Pode ser diagnosticada com isolamento do microrganismo de amostras fecais que podem se apresentar positivas por várias semanas após a infecção. No caso de septicemia pode-se isolar o microrganismo de amostras de sangue assim como na febre tifóide (SIQUEIRA-BATISTA; GOMES, PESSOA-JÚNIOR, 2009).

As salmoneloses humanas são contraídas por via oral, normalmente envolvendo o consumo de produtos de origem animal, contaminados. A dose infectante de *Salmonella* spp. para humanos depende da idade do hospedeiro e de seu estado e higiene e do sorotipo envolvido (FDA, 2012). Alimentos de origem vegetal também podem ser veiculadores de *Salmonella* spp. para seres humanos, por contaminação destes alimentos com produtos de origem animal, por falhas higiênico-sanitárias durante o seu processamento ou no preparo do alimento pronto

para o consumo nas cozinhas comerciais e residenciais. Os grandes surtos se devem, na maioria das vezes, ao manejo inadequado do alimento pronto (OPS, 2003).

Dados epidemiológicos da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008), sobre surtos de doenças transmitidas pela ingestão de alimentos (DTA) ocorridos no Brasil entre 1999 e 2008, mostraram a ocorrência de 6.062 surtos, com 117.330 doentes e 64 mortes. A maioria dos surtos registrados foi causada por *Salmonella* spp. e os estados com maior ocorrência foram o Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraná. No entanto, os números não traduzem a real situação em todas as Unidades Federativas, pois as notificações se concentram nos Estados onde a vigilância epidemiológica das DTA está melhor implantada, ou seja, nos Estados do Sul e Sudeste (BRASIL, 2008).

Os sorotipos mais comumente encontrados em frangos também são os que mais causam infecção em humanos, sendo esse um indicativo da alta implicação dos produtos avícolas nesses surtos (BERCHIERI JÚNIOR; et al, 2009). Costa et al (2013) em um estudo em diferentes regiões do Brasil, entre os anos de 2007 e 2011, destacaram Enteritidis, Minnesota, Typhimurium, Schwarzengrund e Mbandaka como sorotipos de *Salmonella enterica* mais prevalentes em carcaças de frango e produtos avícolas.

2.2.3 Salmonelose aviária

A salmonelose nas aves decorre, na maioria dos países, do grande crescimento da indústria avícola, dentro da visão econômica típica de produção. Em virtude do desenvolvimento do setor industrial, a avicultura passou a produzir volumes muito superiores e em menor espaço de tempo e, para isto, foi preciso concentrar um número maior de aves por metro quadrado, o que favoreceu a instalação, multiplicação e disseminação de agentes patogênicos como a *Salmonella* spp. (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1997; BERCHIERI JR; OLIVEIRA, 2006),

As salmonelas podem causar três tipos de doenças nas aves: a Pulorose e o Tifo Aviário, causadas respectivamente pelos sorotipos não moveis e espécie-específicos, *Salmonella sor. Pullorum* e *Salmonella sor. Gallinarum*, e o Paratifo aviário, causado por todos os outros sorotipos, exceto *Pullorum* e *Gallinarum*.

A Pulorose e o Tifo Aviário provocam grande impacto econômico, com alta mortalidade por septicemia, mas que tem se tornado raras com a implantação de programas de erradicação. Tem pouca relevância para a Saúde Pública por serem restritas às aves e causarem pouco ou nenhum sintoma em humanos (SAIF et al., 2008). A Pulorose é caracterizada por acometer mais comumente as aves jovens, tem elevada mortalidade, principalmente entre a segunda e a terceira semana de vida e sua principal transmissão é a vertical. O tifo aviário acomete com mais frequência aves adultas, no entanto, pode determinar alta mortalidade em aves jovens no primeiro mês de vida (BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2006). As aves que porventura sobrevivem à doença, podem se tornar portadoras e disseminar a bactéria pela via transovariana e/ou pela transmissão horizontal. Desde 2013, o Tifo Aviário tem ocorrido em criações de poedeiras comerciais e reprodutoras, tornando-se motivo de grande preocupação para o setor avícola brasileiro.

A mortalidade e a morbidade em ambas as salmoneloses aviárias são variáveis e são influenciadas pela idade, nutrição, manejo, doenças concomitantes e pela dose bacteriana (GAST, 2003). As perdas podem ser altas nos quadros graves, onde a consequência, em sua maioria, é a eliminação das aves infectadas (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1997).

O paratifo aviário é causado pela infecção de hospedeiros, animais e humanos, por sorotipos referidos coletivamente como paratíficos. As salmonelas paratíficas são praticamente onipresentes nas criações avícolas industriais e em aves silvestres (LISTER, 2003). Sua presença nas aves pode ser tanto sintomática como assintomática, causando morte em animais muito jovens, mas normalmente não sendo perceptível e se mantendo por longos períodos de tempo em aves acima de uma semana (SAIF et al., 2008). Essa infecção pode ser agravada por outros patógenos e também deixa os animais mais susceptíveis a outras doenças. Como colonizam o trato digestivo, podem, por isso, contaminar carne e órgãos comestíveis no abate (LISTER, 2003). A capacidade das salmonelas paratíficas de causarem

doenças nas aves se deve a vários fatores. Além da idade, como anteriormente citado, a linhagem e a via e inoculação também são fatores relevantes para a instalação da Salmonelose (ANDRADE et al, 2009).

Nas aves, o paratifo aviário pode ocorrer em decorrência da transmissão transovariana ou da transmissão horizontal (BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2006). A transmissão horizontal pode decorrer, dentre outros fatores, por canibalismo e ingestão de ovos e rações contaminadas com *Salmonella* spp. (BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2006; OPS, 2003). Os insetos podem participar como vetores mecânicos em ambientes muito contaminados (OPS, 2003) e, da mesma forma, os animais silvestres e de estimação podem contribuir para a infecção (BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2006).

A ocorrência e a quantidade deste gênero presente na carne de frango ao abate variam em função das condições de manejo na criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate e manipulação das carcaças (CARVALHO; CORTEZ, 2005). A manipulação inadequada do alimento pronto para o consumo pode permitir a multiplicação de *Salmonella* spp. em níveis passíveis de ocasionar surtos de infecção alimentar (GAST, 2003), os quais podem ocorrer ainda do contato do produto pronto com o alimento cru, ou por meio do consumo da carne ou alimento mal cozidos, da manutenção do alimento por muitas horas fora de refrigeração e do aquecimento inadequado antes de servi-lo (OPS, 2003).

2.2.4 Diagnóstico de *Salmonella* spp. em aves

O diagnóstico da salmonelose no plantel se dá por isolamento do agente. Quando aves jovens morrem por septicemia, o microrganismo pode ser isolado do fígado, vesícula biliar e saco da gema. Em aves adultas o local de coleta mais comum é o ceco. É possível fazer um diagnóstico indireto de grupos grandes de aves por suabes de arrasto ou de propés (BERCHIERI JÚNIOR; et al., 2009). O diagnóstico sorológico não é confiável, pois somente cepas invasivas geram resposta imune detectável, e essa resposta pode demorar semanas para aparecer e

se manter após o término da doença, além do que anticorpos vacinais não são distinguíveis de anticorpos por infecção (LISTER, 2003).

O método convencional de isolamento e identificação bacteriológica de *Salmonella* spp. é amplamente empregado e prescrito em legislações específicas. Consiste nas etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento e seleção, identificação bioquímica e prova de soro-aglutinação (BRASIL, 1995a; 1995b; 2003b). No entanto, esses testes geralmente demandam um tempo mínimo de cinco dias podendo alcançar até sete dias, se forem realizadas provas bioquímicas e sorologia (DICKEL, 2004). Além disso, muitas vezes, não são suficientemente específicos (LÖFSTRÖM et al., 2004). A técnica é demorada e trabalhosa, pois, necessita de muitos reagentes e vidraria, principalmente quando no processamento de um grande número de amostras, como as que são exigidas nas indústrias de alimentos. Portanto, métodos de diagnósticos mais rápidos são extremamente necessários para a tomada de decisões em tempo real nas indústrias de alimentos, principalmente quando se trata de produtos perecíveis (VON RÜCKERT, 2006.).

O controle das salmoneloses depende de um incremento na velocidade e precisão dos testes diagnósticos, principalmente no monitoramento da produção zootécnica e de alimentos (SANTOS et al., 2001). Métodos para detecção rápida de *Salmonella* spp. têm sido desenvolvidos, nos últimos anos, tais como ensaio imunoenzimático (“Enzyme-linked Immunosorbent Assay” - ELISA), imunodifusão, hibridização do DNA e aglutinação em látex, porém, muitos desses métodos apresentam problemas de sensibilidade e/ou especificidade, que limitam a sua aceitação (BLACKBURN, 1993).

A rapidez na identificação de agentes etiológicos pela detecção do seu DNA, em comparação ao método bacteriológico, torna a PCR uma alternativa prática, além da sua alta sensibilidade e especificidade, dentre os métodos de diagnóstico das salmoneloses. No trabalho de Löfström et al. (2004), o tempo total necessário para detecção de *Salmonella* spp. em 14 tipos de alimentos para animais, através da técnica de PCR, foi inferior a 24 horas.

Flores et al. (2003) realizaram análise bacteriológica convencional, preconizada pela Portaria nº8, de 23 de janeiro de 1995, do MAPA (BRASIL, 1995a)

e compararam com a técnica da PCR em amostras de ovos obtidos diretamente de produtores rurais de Santa Maria, no Estado do Rio Grande do Sul. Como resultado do estudo, a PCR foi tão eficiente quanto o método bacteriológico, com custo e tempo de análise significativamente inferior e concluíram que, através da técnica de PCR, é possível identificar lotes infectados com rapidez sem haver a necessidade de coletas de sangue, o que poderia facilitar a disseminação das bactérias.

Apesar de não ser o método mais rápido, a legislação do PNSA recomenda o cultivo bacteriológico para o monitoramento e o diagnóstico de *Salmonella* spp. em aves de produção e outros métodos só serão considerados para medidas oficiais se tiverem autorização prévia do MAPA (BRASIL, 2003b).

Para estabelecer a relação clonal entre os isolados e assim correlacionar a origem de uma infecção, a genotipagem das cepas pode ser feita por varias técnicas, como PFGE, ribotipagem, amplificação de DNA polimórfico e pesquisa de plasmídeos (SAIF et al., 2008). Dentre esses métodos, a PFGE tem se mostrado um método confiável, tornando-se o padrão ouro para a identificação de patógenos alimentares (RIBOT, 2006).

A PFGE gera a separação de faixas de DNA utilizando sua reorientação por campos elétricos alternados. Os resultados podem variar com diferenças na técnicas, como Voltagem, concentração de agarose, temperatura, solução tamponante, tempo de pulso e de corrida eletroforética (MAGALHÃES et al., 2005)

Em 1996 o Center for Disease Control and Prevention (CDC) criou o PulseNet, uma rede pela qual laboratórios cadastrados podem trocar dados sobre patógenos identificados através de métodos padronizados de PFGE para se ter uma informação mais completa dos organismos envolvidos em diferentes surtos (RIBOT, 2006). Neste mesmo ano, houve um surto de *E. coli* O157:H7 nos Estados Unidos e Canadá envolvendo suco de maçã não pasteurizado. Através de identificação do mesmo patógeno nos pacientes e no suco através de PFGE, permitiu-se uma ação rápida de recolhimento do suco de maçã contaminado das prateleiras (SWAMINATHAN et al., 2001).

A PFGE, realizado de forma padronizada, obtém resultados altamente reproduzíveis. Isso em conjunto com uma base de dados alimentada por diferentes

fontes se mostra eficiente em correlacionar surtos em diferentes localidades com fontes comuns (SWAMINATHAN et al., 2001). Podem ser citados como exemplo, o estudo feito em 2010 na Nigéria, onde foram testadas amostras de *Salmonella* provenientes de um surto de 2004/2005, comparando-as com amostras históricas e ambientais de fontes de água e esgoto, mostrando genótipos muito próximos nos pacientes, esgoto e fontes de água, apontando para a falta de saneamento como causa do surto (AKINYEMI et al, 2010). E na Austrália, em 2011, um surto causado por *Salmonella sor. Typhimurium*, em que foi determinado que o alimento mais provável como fonte da infecção era carne de frango, pela análise comparativa dos resultados obtidos por PFGE dos pacientes e de amostras de carne de frango obtidas do comércio (GOVERNMENT OF WESTERN AUSTRALIA, 2012).

2.2.5 *Salmonella sor. Minnesota*

O sorotipo de *Salmonella sor. Minnesota* foi inicialmente isolado em 1936 em um peru no estado de Minnesota (EDWARDS; BRUNER, 1938).

O sorotipo Minnesota é emergente na avicultura, isso pode ser explicado pelos cuidados que se tem dado aos sorotipos Enteritidis e Typhimurium, abrindo espaço para que outros como a Minnesota cresçam. O controle de salmonelas utilizando ácidos orgânicos na ração e água, não se mostrou eficiente para *Salmonella sor. Minnesota*, sendo este um mecanismo para ela substituir sorotipos susceptíveis como Enteritidis (PICKLER, 2011). Vários estudos indicam o sorotipo Enteritidis como o mais comum na avicultura (SILVA; DUARTE; 2002), porém Minnesota foi o mais comumente encontrado em suabes de arrasto de aviários por Voss-Rech et al. (2011). Muniz (2012) mostrou aumento percentual na identificação de Minnesota na avicultura por ribotipagem, sendo este o 10º sorotipo mais identificado em salmonelose aviária entre os anos de 2004 e 2008 passando a segunda posição entre 2009 e 2010. Esses resultados podem indicar uma mudança na frequência dos sorotipos contra os quais a avicultura comercial deve adotar medidas preventivas.

Entre os anos de 2001 e 2011, o sorotipo Minnesota não se mostrou um dos principais causadores de doenças em humanos nos Estados Unidos, porém ocorreram surtos por esse sorotipo todos os anos ao longo desses dez anos, com picos entre 2005 e 2006 e média de 34,7 casos por ano (CDC, 2013c).

Sorotipos de *Salmonella enterica*, como Typhimurium, Minnesota seguidos de Mbandaka, Senftenberg, Agona, Schwarzengrund, Infantis e Panama vem se destacando como os mais frequentes em casos de doenças de transmissão alimentar nos países desenvolvidos, a partir da redução de *Salmonella* Enteritidis. No Brasil, estes sorovares encontram-se entre os mais prevalentes isolados nas duas últimas décadas, sendo notória sua participação em surtos de origem alimentar e isolados de origem humana (RODRIGUES, 2013).

2.3 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

O uso de antimicrobianos na avicultura se faz necessário, tanto para o controle de doenças infecciosas como para melhorar o desempenho das aves, promovendo maior ganho de peso, conversão alimentar e produtividade. Entretanto, resíduos dessas substâncias presentes no alimento de origem animal podem causar agravos ao homem, tais como reações de hipersensibilidade, efeitos teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos. Além disso, o uso de antimicrobianos na ração animal poderia facilitar a ocorrência de resistência bacteriana, interferindo na microbiota intestinal do homem. A principal preocupação, no entanto, seria quanto à contribuição da resistência bacteriana de patógenos do animal e do homem (ALMEIDA; PALERMO NETO, 2005).

A resistência bacteriana é um fenômeno biológico que vem sendo observado desde a introdução dos agentes antimicrobianos na área médica e médico-veterinária. Estudos recentes têm detectado um aumento considerável na proporção de microrganismos resistentes a um ou mais antimicrobianos. E, nos últimos anos este problema vem se agravando (AKINYEMI et al, 2010), em comparação ao ocorrido em décadas anteriores. Nesse contexto, a possibilidade dos

antimicrobianos usados em avicultura induzirem a seleção de bactérias resistentes que possam comprometer a terapêutica de doenças infecciosas aviárias é aspecto de extrema relevância. Sob esse enfoque, *Salmonella* spp. está entre as bactérias que mais demandariam preocupações por serem patogênicas ao homem e serem frequentemente encontradas no trato intestinal das aves (PALERMO NETO, 2003).

A identificação da resistência antimicrobiana dos sorotipos de *Salmonella* é de importância para a Saúde Pública. Na maior parte dos estudos epidemiológicos de surtos de *Salmonella* não é feito um isolamento com subtipagem para identificação do alimento causador. Esse tipo de rastreamento pode ser o primeiro passo para a implantação do sistema de análise de pontos críticos de controle para a *Salmonella* (MUNIZ, 2012).

O tratamento no homem é sintomático com utilização de reidratação e reposição de eletrólitos. Tratamento com antimicrobianos geralmente não é indicado, pois prolonga o período de eliminação da bactéria pelas fezes e pode determinar o aparecimento de cepas multirresistentes. Contudo, o tratamento pode ser indicado nos casos de salmoneloses com complicações sistêmicas, na febre tifoide e em pacientes imunodeprimidos, sendo indicado a realização de antibiograma para seleção do medicamento a ser usado. Os grupos de antimicrobianos indicados para o tratamento humano são as fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração (WHO, 2013; CDC, 2013b).

Bactérias com fenótipos de multirresistentes têm sido cada vez mais descritas entre os sorotipos de *Salmonella* no mundo. Estudos comprovando aumento de resistência de cepas de *Salmonella* à ampicilina, à tetraciclina ao cloranfenicol ao ácido nalidíxico tem sido realizados na Espanha, Alemanha, Grã-Bretanha e EUA (WHITE et al., 2002). Por causa disso, o uso desses medicamentos não tem sido bem visto, como por exemplo na União Europeia, onde o uso de antibióticos como promotores de crescimento é proibido desde 2006, levando a busca de alternativas, como os probióticos, prebióticos e fitoterápicos (MUNIZ et al, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Para este estudo foram coletadas amostras de dez lotes diferentes de frangos de corte, sendo cinco provenientes de ambientes (galpões) positivos para *Salmonella* spp. e cinco de ambientes negativos (Tabela 1). Os galpões foram testados previamente a partir de propés arrastados na cama 15 dias antes das coletas nos frangos. Os propés foram submetidos a isolamento bacteriológico realizado no Controle de Qualidade da empresa avícola estudada, no município de Sidrolândia, Mato Grosso do Sul, seguindo a orientação da Instrução Normativa no 62 de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003a).

Foram coletados 10 *pools* de 5 suabes de cada lote, totalizando 100 *pools*, dos quais foram obtidos 29 *pools* positivos para *Salmonella* spp. Foram coletados também 25 suabes de carcaça de cada lote, totalizando 250 carcaças de frangos, após a passagem pelo chiller, a partir dos quais foram obtidas 20 carcaças positivas para *Salmonella* spp, totalizando 49 isolados. Todas as 49 cepas de *Salmonella* spp. isoladas obtiveram diagnóstico presuntivo para o sorotipo Minnesota. Esses isolados foram semeados em ágar estoque e enviados ao Laboratório de Sanidade Avícola da UFF.

Tabela 1. Número de cepas de *Salmonella* spp. isoladas em frangos vivos e carcaças provenientes de ambientes positivo e negativo pelo teste de análise de propé

Lote de origem dos frangos	Ambiente positivo		Ambiente negativo	
	vivo	carcaça	vivo	Carcaça
1	0/10	0/25	0/10	0/25
2	8/10	7/25	4/10	3/25
3	0/10	0/25	6/10	9/25
4	7/10	1/25	1/10	0/25
5	1/10	0/25	2/10	0/25
TOTAL	16/50	8/125	13/50	12/125

Após o recebimento das cepas, àquelas sugestivas de *Salmonella sor.* Minnesota foram semeadas em água peptonada a 1%, novamente semeadas em ágar nutriente e transportadas ao Laboratório de Enterobacterias do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) onde foram realizadas a sorotipificação pelo método Kaufmann-White (GRIMOND; WEILL, 2007) e a PFGE. O antibiograma foi realizado pelo método de difusão em disco no Laboratório de Sanidade Avícola.

3.2 PULSED-FIELD GEL ELETROPHORESIS

Das 49 cepas de *Salmonella sor.* Minnesota trabalhadas foram selecionadas aleatoriamente 11 amostras, para análise pela PFGE, sendo sete provenientes de frangos no pré-abate e quatro de carcaças. A PFGE foi realizada seguindo o procedimento proposto pelo “Centers Of Disease Control” para a rede Pulsenet (CDC, 2013a).

As amostras de *Salmonella sor.* Minnesota foram recultivadas em ágar nutriente e incubadas por 24 horas em temperatura de 37° C. após a incubação, as bactérias que cresceram no ágar foram diluídas em uma Solução Tampão de Suspensão Bacteriana (Cell Suspension Buffer- CBS) até atingir a turbidez ideal. Dessa suspensão, 400µL foram transferidos para tubos de 1,5 mL, onde foram adicionados 20µL de proteinase K, e em seguida 400µL de agarose. Essa mistura foi imediatamente pipetada em moldes de preparo de plugs.

Após os plugs esfriarem, foram colocados em tubos de 50mL juntamente com 5mL de mistura de solução de lise (cell lysis buffer) e proteinase K. Os tubos foram colocados em banho-maria com agitação a 55°C por um período de 2 horas. Após esse tempo, os tubos foram retirados do banho-maria, a solução de lise foi descartada e foram adicionados 5mL de água tipo 1, retornando os tubos para o banho-maria por 15 minutos. Em seguida, a água tipo 1 foi descartada. O procedimento foi repetido uma vez e foram adicionados 5mL de solução TE ao tubo, que voltou para o banho-maria por mais 15 minutos. Após esse tempo, a solução TE foi descartada e esse processo repetido três vezes.

Os plugs que foram usados foram então colocados em tubos de 1,5mL, junto com 200µL de enzima XbaI e incubados em temperatura ambiente por 15 minutos. A enzima foi então descartada. A enzima de restrição foi adicionada e os tubos incubados em banho-maria a 37° C por 2 horas. Os tubos foram então retirados do banho-maria, a enzima de restrição foi retirada e 200µL de uma solução de TBE foi adicionada aos tubos que foram incubados por 5 minutos.

Os plugs então foram retirados dos tubos e colocados em um pente para fazer a placa de agarose. O pente com os plugs foi colocado no molde da placa e a agarose foi adicionada cuidadosamente. Após o resfriamento da agarose, o pente foi retirado cuidadosamente e a placa foi levada ao aparelho de PFGE (Chef DR III) para o processo de eletroforese que durou 18 horas. As imagens foram obtidas com fotodocumentador Image Quant 300 sob a iluminação ultravioleta, após o gel ser corado com brometo de etídio (1µg/mL, Sigma). Os fragmentos obtidos para cada isolado foram analisados em comparação com a cepa padrão, sendo construída uma matriz binária, a partir da qual os isolados foram agrupados de acordo com a sua similaridade utilizando o programa BioNumerics v4 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

3.3 ANTIBIOGRAMA

A resistência das 49 amostras sugestivas de *Salmonella sor.* Minnesota foi testada para 12 antibióticos, de acordo com suas classes e espectro de ação (QUADRO 1) Amoxicilina (10 µg - Amo), Cefalotina (30 µg - Cfl), Ceftiofur (30 µg - Ctf), Ciprofloxacina (5 µg - Cip), Cloranfenicol (30 µg - Clo), Doxiciclina (30 µg - Dox), Enrofloxacin (5 µg - Eno), Gentamicina (10 µg - Gen), Norfloxacina (10 µg - Nor), Tetraciclina (30 µg - Tet), Trimetoprima (5 µg - Tri) e Sulfonamidas (300 µg - Sul), pelo método de difusão em disco (CLSI, 2010).

As amostras foram reativadas em água peptonada a 1,0% a 35°C até atingir uma turbidez equivalente a uma solução padrão de McFarland 0,5. A partir dessa cultura, o inóculo foi distribuído uniformemente em placas contendo Ágar Mueller-Hinton. Após a absorção do inóculo, foram aplicados os discos impregnados com os

antibióticos selecionados, utilizando pinça estéril, pressionando suavemente sobre a superfície do meio. Em seguida as placas foram levadas a estufa por 24 horas a 35°C. A leitura foi feita com a medição, em milímetros, dos halos de inibição com auxílio de régua e interpretados, classificando as cepas em sensíveis, intermediárias ou resistentes para cada antibiótico testado. A partir dos resultados de resistência e sensibilidade foram criados perfis das cepas isoladas para comparação entre elas.

QUADRO 1 . Classes e espectro de ação de antimicrobianos utilizados em estudo de resistência antimicrobiana em *Salmonella sor.* Minnesota

Antibióticos	Classes	Sítio de Ação
Ciprofloxacina	Fluoroquinolona	biosíntese da ácidos nucléicos
Enrofloxacina		biosíntese da ácidos nucléicos
Norfloxacina		biosíntese da ácidos nucléicos
Trimetroprima	Análogos do ácido fólico	biosíntese da ácidos nucléicos
Sulfonamidas	Sulfas	biosíntese da ácidos nucléicos
Amoxicilina	β -lactâmico	biosíntese da parede bacteriana
Cefalotina	Cefalosporina 1 ^a geração	biosíntese da parede bacteriana
Ceftiofur	Cefalosporina 3 ^a geração	biosíntese da parede bacteriana
Tetraciclina	Tetraciclina	síntese proteica bacteriana
Doxiciclina		síntese proteica bacteriana
Gentamicina	Aminoglicosídeo	síntese proteica bacteriana
Cloranfenicol	Cloranfenicol	síntese proteica bacteriana

(Adaptado de SPINOSA et al., 2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 49 cepas de *Salmonella* spp isoladas de frangos vivos e carcaças foram confirmadas como *Salmonella enterica* enterica sorovar Minnesota pela sorotipificação.

Todas as cepas de *Salmonella* sor. Minnesota apresentaram características de multirresistência com 59,17% dessas cepas apresentando resistência a pelo menos cinco antimicrobianos diferentes. Foram obtidos 17 perfis, identificados por letras de “A” a “Q”, para análise e comparação entre estas cepas (QUADRO 2).

Dentre esses padrões se destacaram o padrão B, em que foram agrupadas 28,57% (14/49) das cepas de *Salmonella* sor. Minnesota e que apresentaram resistência a doxiciclina, tetraciclina e sulfonamidas; e 28,57% (14/49) no padrão I, em que foram agrupadas cepas com resistência a amoxicilina, clorafenicol, ceftiofur, doxiciclina, tetraciclina e sulfonamidas. O somatório das cepas que apresentaram resistência a doxiciclina, tetraciclina e sulfonamidas nos padrões B e I, totalizou então 57,14% (28/49) das cepas estudadas. Estes resultados estão de acordo com o aumento relatado por White et al. (2002), de resistência de cepas de *Salmonella* spp a antimicrobianos como cloranfenicol, tetraciclinas e sulfonamidas. Esses autores citaram as fluoroquinolonas e cefalosporinas de amplo espectro como tratamento de escolha nos casos de salmonelose por cepas multirresistentes, embora também esteja aumentando o número de cepas resistentes a essas drogas, como encontramos no presente estudo.

Todas as amostras estudadas (100%) apresentaram resistência aos antibióticos tetraciclina e sulfonamidas e 87,76 % (43/49) para a doxiciclina. Em contrapartida, ciprofloxacina, enrofloxacina, gentamicina e norfloxacina se mostraram bastante eficientes, com poucas cepas apresentando resistências. Quando analisados os antibióticos recomendados pelo CDC para o tratamento em humanos (CDC,2013b), as fluoroquinolonas se mostraram boas opções, assim como no relato de White et al. (2002).

Quadro 2. Perfis de Resistência antimicrobiana de *Salmonella sor.* Minnesota isoladas de frangos vivos e carcaças após a passagem pelo chiller

Perfis antibiograma	Antimicrobianos*												Nº	%
	Amo*	Cfl*	Ctf*	Cip*	Clo*	Dox*	Eno*	Gen*	Nor*	Tet*	Tri*	Sul*		
A	S*	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R*	1	2,04%
B	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	14	28,57%
C	S	S	S	S	S	R	I*	S	S	R	S	R	1	2,04%
D	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	2	4,08%
E	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R	1	2,04%
F	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	1	2,04%
G	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	2	4,08%
H	R	R	R	S	S	I	S	S	S	R	S	R	1	2,04%
I	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	14	28,57%
J	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	1	2,04%
K	R	R	R	S	S	R	I	S	S	R	S	R	1	2,04%
L	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	4	8,16%
M	R	R	R	S	S	S	I	S	R	R	R	R	1	2,04%
N	R	R	R	S	S	R	S	S	I	R	R	R	2	4,08%
O	R	R	R	I	S	R	S	S	S	R	R	R	1	2,04%
P	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	1	2,04%
Q	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	1	2,04%

* **Amo** – Amoxicilina; **Cfl** – Cefalotina; **Ctf** – Ceftiofur; **Cip** – Ciprofloxacina; **Clo** – Cloranfenicol; **Dox** – Doxiciclina; **Eno** – Enrofloxacina; **Gen** – Gentamicina; **Nor** – Norfloxacina; **Tet** – Tetraciclina; **Tri** – Trimetoprima; **Sul** – Sulfonamidas

** S- sensível; R- resistente; I – intermediário

Cardoso et al (2006), em estudo com *Salmonella sor.* Enteritidis isoladas de carcaças de frango, obtiveram resultados de resistência semelhantes aos do presente estudo, com 100% de resistência a tetraciclina, alta resistência a sulfonamidas, e alta sensibilidade a ciprofloxacina, norfloxacina, enrofloxacina e gentamicina. Palmeira (2007) também apresentou resultados de baixa resistência a cloranfenicol, ciprofloxacina, enrofloxacina e norfloxacina estudando *Salmonella* spp. isoladas de frangos e perus, porém para cefalotina, ceftiofur, sulfonamidas e tetraciclina foi obtida baixa resistência, o que divergiu dos achados neste trabalho. Akinyemi et al em 2010 também encontraram resistência de 100% de suas amostras de *Salmonella* spp. à tetraciclina e resistência alta à sulfamethoxazole-trimethoprim.

Tabela 2. Frequência de resistência de cepas de *Salmonella sor. Minnesota*, de 29 isolados de frangos vivos e 20 isolados de carcaças, a diferentes antimicrobianos.

Antimicrobianos testados	Frango vivo (suabe de cloaca)		Carcaça de frangos		Total	
	n	%	n	%	n	%
Amoxicilina	14	48,28%	15	75,00%	29	59,18%
Cefalotina	14	48,28%	15	75,00%	29	59,18%
Ceftiofur	14	48,28%	15	75,00%	29	59,18%
Ciprofloxacina	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cloranfenicol	1	3,45%	0	0,00%	1	2,04%
Doxiciclina	27	93,10%	16	80,00%	43	87,76%
Enrofloxacina	1	3,45%	1	5,00%	2	4,08%
Gentamicina	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Norfloxacina	1	3,45%	2	10,00%	3	6,12%
Tetraciclina	29	100,00%	20	100,00%	49	100,00%
Trimetroprima	6	20,69%	5	25,00%	11	22,45%
Sulfonamidas	29	100,00%	20	100,00%	49	100,00%

Não houve diferença significativa entre a frequência de cepas de *Salmonella sor. Minnesota* de frangos vivos e das carcaças (Tabela 2) resistentes aos antibióticos estudados (Teste-G: independência, $p = 1,000$). Também não foi observada uma diferença significativa pelo teste binomial de duas proporções para a correlação unilateral da presença de *Salmonella spp.* nos frangos vivos ($p = 0,2543$) e nas carcaças ($p = 0,1755$), de ambientes previamente avaliados como positivos ou negativos no teste em propés que antecedeu a coleta de material para análise (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de cepas de *Salmonella sor.* Minnesota provenientes de frangos vivos e carcaças, de ambientes positivos e negativos ao isolamento a partir de análise de propés frente aos perfis de resistência antimicrobiana

Perfis de resistência antimicrobiana	Ambiente Positivo				Ambiente Negativo			
	Frango vivo (suabe de cloaca)		Carcaça		Frango vivo (suabe de cloaca)		Carcaça	
	n	%	N	%	n	%	n	%
A	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	8,33%
B	4	25,00%	3	37,50%	7	53,85%	0	0,00%
C	1	6,25%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
D	1	6,25%	0	0,00%	0	0,00%	1	8,33%
E	0	0,00%	0	0,00%	1	7,69%	0	0,00%
F	1	6,25%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
G	0	0,00%	0	0,00%	1	7,69%	1	8,33%
H	1	6,25%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
I	3	18,75%	3	37,50%	2	15,38%	6	50,00%
J	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	8,33%
K	1	6,25%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
L	2	12,50%	1	12,50%	1	7,69%	0	0,00%
M	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	8,33%
N	0	0,00%	0	0,00%	1	7,69%	1	8,33%
O	1	6,25%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
P	0	0,00%	1	12,50%	0	0,00%	0	0,00%
Q	1	6,25%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
total	16	100,00%	8	100,00%	13	100,00%	12	100,00%

A PFGE mostrou semelhança de pelo menos 85% entre todas as cepas analisadas, indicando que todas as *Salmonella sor.* Minnesota encontradas tiveram a mesma origem clonal, mesmo sendo de diferentes lotes e apresentando perfis de resistência a antimicrobianos variados. Esses resultados sugerem a contaminação entre lotes e das carcaças. Segundo Magalhães et al. (2005), considera-se que um mínimo de 10 fragmentos de DNA, conseqüentemente 10 bandas no gel, devem ser obtidos para que a técnica tenha poder discriminatório relevante entre as bactérias estudadas. Uma linhagem é considerada semelhante à outra quando ocorre um único evento genético como uma mutação, uma inserção ou deleção, que altere o padrão de bandas. Qualquer um destes eventos altera o padrão da linhagem epidêmica em duas ou três bandas. Uma bactéria é considerada possivelmente

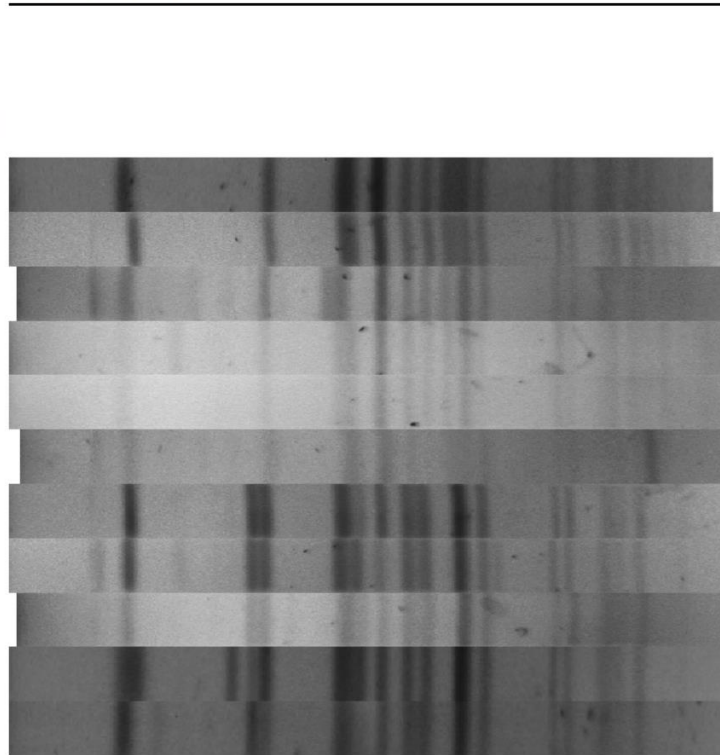
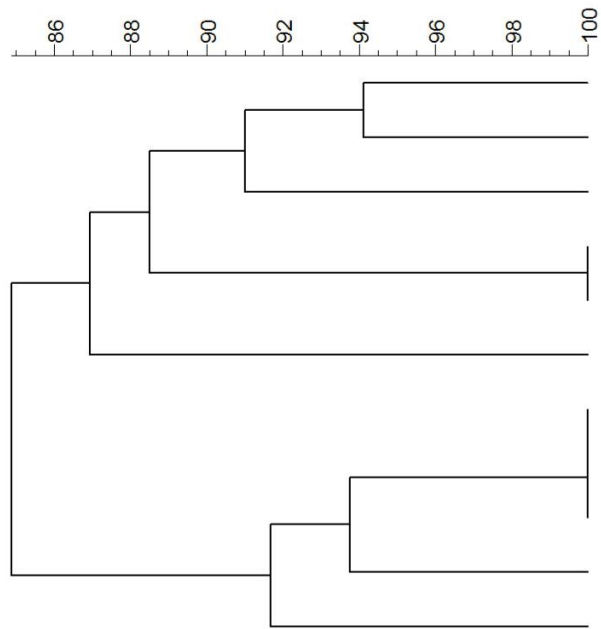
relacionada quando as mudanças de padrão de restrição forem compatíveis com dois eventos genéticos, resultando em alterações envolvendo entre 4 e 6 bandas. Quando o padrão da linhagem epidêmica possuir mais da metade das bandas diferentes em relação ao padrão de outras bactérias, estas devem ser consideradas não relacionadas geneticamente.

Figura 1. Dendograma de cepas de *Salmonella sor.* Minnesota escolhidas aleatoriamente dos diferentes lotes positivos e negativos **COMPLETAR O PERFIL E COLOCAR AS LETRAS MAIUSULAS DOS PERFIS**

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PFGE-Xbal

PFGE-Xbal



Lote	Fonte	Perfis de resistência antimicrobiana
N2	Carçaça	M
N4	Animal vivo	B
P2	Animal vivo	B
P4	Carçaça	B
P4	Animal vivo	D
N2	Animal vivo	B
N3	Animal vivo	L
N3	Carçaça	I
N5	Animal vivo	N
P2	Animal vivo	H
P2	Carçaça	I

*P- Lote positivo
N- lote negativo

5 CONCLUSÃO

O exame prévio de ambiente não foi preditivo da frequência de *Salmonella sor. Minnesota* no frango vivo ou na carcaça. A multirresistência estava presente em todas as cepas de *Salmonella sor. Minnesota* e a maioria das amostras estudadas apresentou os mesmos perfis frente aos antimicrobianos estudados. Todas as cepas de *Salmonella sor. Minnesota* apresentaram semelhança genética de pelo menos 85% o que confirmou a homologia dessas cepas, mesmo sendo de diferentes lotes e apresentando variados perfis de resistência a antimicrobianos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINYEMI, K.O.; PHILIPP, W.; BEYER, W. ; BÖHM, R. Application of phage typing and pulsed-field gel electrophoresis to analyse *Salmonella* enterica isolates from a suspected outbreak in Lagos, Nigeria. *J Infect Dev Ctries*; v.4 n.12 p. 828-834, 2010.

ALMEIDA, R.T., PALERMO NETO, J. Uso de antimicrobianos em avicultura e o desenvolvimento de resistência bacteriana. In: PALERMO NETO, J., SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L. *Farmacologia aplicada a avicultura*. São Paulo: Roca, 2005. 366 p. cap. 10. p. 161 – 173.

ANDRADE M.A; ALBENONES, J, M; STRINGHINI, J.H.; BRITO, L.A.B.;CHAVES, L.S.; MATTOS, M.S. Aspectos clínicos e anatomo-histopatológicos de pintos de corte oriundos de ovos inoculados experimentalmente com *Salmonella* enteritidis fagotipo 4. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 3, p. 909-917, jul./set. 2009

BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v.31, n.2, p.303-307, 2001.

BERCHIERI JÚNIOR A, SILVA EN, DI FÁBIO J, SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F.. *Doença das aves*. 2ed. Campinas, FACTA, 2009.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, G. H. Saúde Aviária e Doenças. In: ANDREATTI FILHO, R. L. *Salmoneloses Aviárias*. São Paulo: Roca, 2006, seção 2, cap.9, p.84-111.

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

BLACKBURN, C. W. A review, rapid and alternative methods for the detection of *Salmonella* in food. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, n.75, v.3. p.199-214, 1993.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº193, de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da DAS e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.14309, 22 set. 1994, Seção 1.

_____. _____. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Análise Epidemiológica de Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/DTA.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2009.

_____. _____. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Aprova os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.14, 18 set. 2003, Seção 1, 2003a.

_____. _____. Instrução Normativa nº78, de 3 de novembro de 2003. Aprovar as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium, em anexo.. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 3 nov. 2003b.

_____. _____. Portaria nº8, de 23 de janeiro de 1995. Aprova as alterações introduzidas no método analítico de carcaças de aves e pesquisa de *Salmonella* conforme normas anexas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.1182, 27 jan. 1995, Seção 1, 1995a.

_____. _____. Portaria nº126, de 03 de novembro de 1995. Aprova as “Normas de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (S. Enteritidis, S. Gallinarum, S. Pullorum e S. Typhimurium)”. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.17694, 06 nov. 1995, Seção 1, 1995b.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus Anexos I e II. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, n.7-E, p.45-53, 10 jan. 2001a, Seção 1.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº13, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados. *Diário Oficial [da] União, Brasília*, DF, 10 jan. 2001b.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K.C.; BUTEL, J.S. ; MORSE, S.A.; *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. 24ed. San Francisco, 2007.

CARDOSO, M. O.; RIBEIRO, A. R.; DOS SANTOS, L. R.; PILOTTO, F.; DE MORAES, H. L. S.; SALLA, C. T. P.; ROCHA, S. L. S.; NACIMENTO, V. P. Antibiotic resistance in *Salmonella* enteritidis isolated from broiler carcasses *Brazilian Journal of Microbiology* v.37 p.368-371 2006.

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

CENTERS OF DISEASE CONTROL - CDC. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* [documento na Internet] . Atlanta, 2013a. [acesso em 20 jan 2014]. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>>.

_____. *Salmonella Diagnosis and Treatment* 2013b < <http://www.cdc.gov/salmonella/general/diagnosis.html>> Acesso em: 20 Julho, 2014

_____. *National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Annual Report*, 2011. Atlanta, Georgia: US Department of health and Human Services, 2013c, 101p.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. In: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement. CLSI. Wayne, Pennsylvania. 2010.

COSTA RG, FESTIVO ML, ARAÚJO MS; REIS EM, LÁZARO NS, RODRIGUES DP. Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil. *Journal of Food Protection*, n.76 v.12 2013

DICKEL, E. L. *Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de (Salmonella) em carcaças de frango para o controle higiênico-sanitário do processo de abate*. Porto Alegre, 2004. 137f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

EDWARDS, P.R.; BRUNER, D.W. Two new *Salmonella* isolated from Fowls. *Journal of Hygiene*, v.38, n.6, p.716-720, 1938.

FERREIRA, E.O.; CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, M. B. M.; *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p., cap.43, p. 329-338. 5ª ED

FLORES, M. L.; NASCIMENTO, V. P.; KADER, I. I. T. A.; CARDOSO, M.; SANTOS, L. LOPES, R. F. F.; WALD, V. B.; BARBOSA, T. M. C.. Análise da contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial através da Reação em Cadeia da Polimerase. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v.33, n.3, maio 2003.

Food and Drug Administration (FDA). Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. 2 ed. <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodbornellnessContaminants/UCM297627.pdf> Acesso em: 30 março, 2014

GAST, R. K. Paratyphoid infections. In: BARNES, H. J.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MC DOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. *Diseases of Poultry*. 11. ed. Iowa, EUA: Iowa State Press, p. 567-583, 2003.

GOVERNMENT OF WESTERN AUSTRALIA. Department of health. *Salmonella* Typhimurium outbreak linked to chickens. Disease WAtch v.16 n.2 2012 Disponível em: <http://www.health.wa.gov.au/diseasewatch/vol16_issue2/all.cfm> Acesso em 08 outubro 2013.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. R. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.17, n.2, p. 55-62, 1997.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9ed. Ed. Holt, J. G. Baltimore, Maryland. Williams e Wilkins, v.1, 1994.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. ; ROGGENTIN, P. ; MIKOLEIT, M. ; GUIBOURDENCHE, M. ; PINNA, E. ; NAIR, S. ; FIELDS, P. I. ; WEILL, F. X.

Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology* v.165, p. 526-530, 2014.

JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. 6ed. Porto Alegre, RS, Artmed, 2005.

LISTER, S. A. Enterobacteriaceae. In: BARNES, H. J.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MC DOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. *Diseases of Poultry*. 11. ed. Iowa, EUA: Iowa State Press, p. 567-583, 2003.

LÖFSTRÖM, C.; KNUTSSON, R.; AXELSSON, C. E.; RÅDSTRÖM, P. Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. *Applied and Environmental Microbiology*, Lidköping, Suécia, v.70, n.1, p. 69-75, 2004.

MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A.L.C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica *Rev Inst Adolfo Lutz*, n.64 v.2 p.155-161, 2005

MUNIZ E.C. Atualidades no estudo das salmoneloses aviárias, IN: *xiii simpósio brasil sul de avicultura e iv brasil sul poultry fair*, Chapecó, SC. abr, 2012.

MUNIZ, E. C.; PICKLER, L.; LOURENÇO, M. C.; WESTPHAL, P.; KURITZA, L. N.; SANTIN, E. Probióticos na ração para o controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. *Archives of Veterinary Science*, v.18, n.3, p.58-60, 2013.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales: bacteriosis y micosis. *Publicación científica y técnica*. 3ed., v.1, n.580, p. 240-253, 2003.

PALERMO NETO, J. A questão dos resíduos de antimicrobianos em avicultura: verdade ou protecionismo europeu? *Revista CFMV*, v.28, p.25-32, 2003.

PALMEIRA, A. L. B.; *Prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos dos sorovares de Salmonella sp isolados das carcaças de frango e peru na Região Sul do Brasil no período de 2004 a 2006*. Porto Alegre. UFRGS Dissertação (mestrado), 2007

PICKLER, L. *Acidos organicos via agua e via racao para controlar Salmonella enterica enterica sorovares Enteritidis e Minnesota em frangos*, Curitiba, 2011. 67 f. Dissertação (mestrado), - Setor de Ciencias Agrarias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

REZENDE, C.L.E.; MALLINSON, E.T.; GUPTE, A.; JOSEPH, S.W.; *Salmonella* spp. Are affected by different levels of water activity in closed microcosms. *Journ. Indust Microbiol and Biotech*. v. 26, n.4, p. 222-225, 2001.

RIBOT, E.M.; FAIR, M.A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D.N.; HUNTER, S.B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis*. v. 3, n.1 p. 59-67. 2006

RODRIGUES, D.P. Dinâmica dos sorovares de Salmonella no Brasil. In: *Anais da Conferência FACTA de Ciência e Tecnologia Avícolas 2013*. Campinas, SP, p. 165-177, 2013.

SAIF, Y. M. (Ed.) CALNECK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; McDOUGALD, L. R.; *Diseases of poultry*. 12.ed. Ames: Iowa Blackwell Publishing Professional, 2008.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Identificação de *Salmonella* através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, Porto Alegre, RS, v.29, n.2, p.87-92, nov. 2001.

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

SIQUEIRA-BATISTA R, GOMES AP, PESSOA-JÚNIOR VP. Sepsis. In: ROCHA MOC, PEDROSO ERP. *Fundamentos em infectologia*. Rio de Janeiro: Rubio; 2009

SPINOSA HS, ITO NMK, MIYAGI CI, LIMA EA E OKABAYASHI S.: Antimicrobianos: Considerações gerais. In: PALERMO-NETO J, SPINOSA HS E GÓRNIAC SL.: *Farmacologia Aplicada à Avicultura*. Roca Ed. 1ed. 2005.

SWAMINATHAN B., BARRETT T.J., HUNTER S.B., TAUXE R.V. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, *United States. Emerging Infectious Diseases*, n. 7: p. 382–389, 2001.

THAYER, D.W.; MULLER, W.S.; BUCHANAN, R.L.; PHILIPS, J.G.; Effect of NaCl, pH, temperature, and atmosphere on growth of *Salmonella typhimurium* in glucose-mineral salts medium. *Appl Environ Microbiol*. v. 53, n.6, p. 1311-1315, 1987.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA - UBABEF. Relatório Anual 2013. Disponível em:<<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=3293>>. Acesso em: 4 jun. 2014

VON RÜCKERT, D. A. S. *Comparação dos métodos microbiológico convencional, imunoanálise e reação da polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de (Salmonella) spp. em frangos de corte durante o abate*. Viçosa, 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2006.

VOSS-RECH, D., VAZ C.S.L., ALVES L., COLDEBELLA A., LEÃO J.A., RODRIGUES D., BACK A.,. Caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella* spp. Isoladas de aviários de frangos de corte no Brasil entre 2009 e 2010. IN: *Conferência facta de ciência e tecnologia avícolas, 2011*, Santos, SP. Anais... Santos: FACTA, 2011.

WHITE, D. G., ZHAO, S.; SIMJEE, S.; WAGNER, D. D.; MCDERMOTT, P. F. *Antimicrobial resistance of foodborne pathogens* *Microbes and Infection* , v. 4, p. 405–412, 2002

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Salmonella* (non-typhoidal).
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>> Acesso em: 20 Julho, 2014