

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

TESE

**Avaliação da Resistência Antimicrobiana em Sorovares de *Salmonella*
Caracterizados em Carcaças de Frango Congeladas e Resfriadas,
Provenientes de Diferentes Regiões do Brasil**

Renata Garcia Costa

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM
SOROVARES DE *SALMONELLA* CARACTERIZADOS EM CARÇAÇAS
DE FRANGO CONGELADAS E RESFRIADAS, PROVENIENTES DE
DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

RENATA GARCIA COSTA

Sob a orientação da professora:

Dalia dos Prazeres Rodrigues

e co-orientação da professora:

Norma dos Santos Lázaro

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2013

636.513

C837a

T

Costa, Renata Garcia, 1971-

Avaliação da resistência antimicrobiana em sorovares de *Salmonella* caracterizados em carcaças de frango congeladas e resfriadas, provenientes de diferentes regiões do Brasil / Renata Garcia Costa. - 2013.

129 f.: il.

Orientador: Dalia dos Prazeres Rodrigues.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2013.

Bibliografia: f. 85-112.

1. Frango de corte - Microbiologia - Teses. 2. Salmonelose em frango de corte - Teses. 3. Salmonela - Teses. 4. Alimentos de origem animal - Contaminação - Teses. 5. Drogas - Resistência em microorganismos - Teses. 6. Tecnologia de alimentos - Teses. I. Rodrigues, Dalia dos Prazeres, 1950-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

RENATA GARCIA COSTA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciências de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ____/____/____.

Dália dos Prazeres Rodrigues PhD. FIOCRUZ
Orientadora

Ernesto Hofer Dr. L.Doc. FIOCRUZ

Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira. PhD. UFC

Pedro Paulo Oliveira e Silva PhD. UFRRJ

Paulo César Augusto de Souza PhD. UFRRJ

“Quando a noite apaga a luz... Deus acende as estrelas.”

Padre Fábio de Melo

“Dedico esta conquista ao meu filho Daniel Garcia Costa, que em todo momento me incentivou com sua riqueza profunda e admirável... meu amor e motivação de vida!”

AGRADECIMENTOS

O sonho foi meu, mas o veredito da realização, quem me deu foi Deus. Por isso, devo ser grata a ele por me conceder a cada dia, uma página nova no livro do tempo. Sem ele, não seria capaz de enxergar os pequenos detalhes, pois o segredo para toda uma vida, seja pessoal ou profissional, está em descobri-lo em todas as miudezas e valorizar o que nos tornam “grandes” como o amor da minha família e dos meus amigos.

Agradeço aos meus queridos pais João Garcia Filho e Nica Danz Jan Garcia pela base sólida de respeito, humildade e de amor sempre presentes em minha vida. Sei que de algum plano espiritual, me protegem e certamente se sentem felizes e orgulhosos por mais esta minha conquista.

Pelo reconhecimento e palavras de incentivo da minha família, meus amados irmãos e sobrinhos, que mesmo não entendendo o significado dessa tal “*Salmonella*”, me apoiaram e apoiam incondicionalmente em todas as minhas decisões e compreendem meus momentos de fragilidade e ausência.

O agradecimento especial ao meu filho Daniel Garcia Costa, minha razão maior, pelo exemplo de doçura e momentos onde com palavras sábias me fortaleceram para a realização deste trabalho. Foi por ele e para ele toda a minha dedicação.

À minha orientadora, Dra. Dalia dos Prazeres Rodrigues, profissional a quem tenho enorme carinho e admiração, que em algum momento da minha vida, me segurou pelas mãos e me ensinou a dar os primeiros passos, com palavras firmes e exemplos de determinação, mudando minha conduta e despertando em mim a coragem de encarar desafios. Sem seu exemplo de dedicação, comprometimento e seriedade, nada disso seria possível.

À minha co-orientadora, Dra. Norma dos Santos Lázaro, pessoa iluminada por quem sempre tive muito afeto, respeito e amizade, meu agradecimento por sua presteza em ajudar em todos os momentos que precisei.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional, sempre demonstrando carinho pela minha pessoa e me ensinando a agir com ética e dignidade, em especial Dr. Ernesto Hofer, nosso mestre, dono de uma invejável propriedade intelectual e competência científica, e as pesquisadoras Ana Luzia Lauria Filgueiras e Eliane Moura Falavina dos Reis, pessoas essenciais para o meu egresso no campo científico, com quem tive a honra de estagiar e aprender as primeiras lições de bacteriologia, me tornando parte do que sou hoje.

À minha querida amiga, parceira inseparável, Marcia Lima Festivo, pelas palavras de estímulo que me motivam a alcançar todas minhas realizações.

À Elizabeth dos Prazeres Rodrigues, pela amizade, companheirismo, incentivo e perseverança.

Aqueles amigos que acompanham minha trajetória profissional desde o início, Liliane Miyuki Seki, Joseli Maria da Rocha Nogueira, Wagner Thadeu Cardoso Esteves, Roseli Vigio Ribeiro, Eglaise de Miranda Esposto e Gisele Peirano, com quem de uma forma muito especial tenho dividido minhas dúvidas, experiências e aprendizado.

A toda a equipe do LABENT, bons amigos e parceiros, que dividem comigo o meu “dia a dia” e compartilharam comigo todas as minhas ansiedades até alcançar esse objetivo, em especial: Ingrid Annes de Pereira, Maiara dos Santos Araújo, Bruno Rocha Pribul, Luisa Lima Festivo Iasbik, Roberta Laine de Souza, Emily Moraes Roges, Gutierre de Andrade, Elso Onofre da Silva, Laura Fabiana Vieira do Amparo, Esther Helena Rondon Barretto Prado e Rossiane de Moura Souza, pessoas com quem quero dividir o mérito desta conquista, pelos momentos alegres de convivência que tornaram tudo mais fácil mesmo quando parecia ser muito complicado.

À mascotinha Rafaelle da Silva Motta, aluna de Iniciação Científica, que me ajudou com muito empenho nas análises moleculares deste trabalho.

Ao meu amigo André Felipe das Mercês Santos, por sua capacidade de entender a minha falta de habilidade computacional e sua presteza em nos ajudar a formatar as imagens adicionadas neste trabalho.

As Secretárias Viviane da Silva Cruz e Giselle Marques Correa do Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz e Lucimar Storck Teixeira, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRRJ, pelo apoio logístico e demonstração de carinho e amizade.

Ao meu amigo Evaldo Soares da Silva, “*meu adorado Dudu*”, responsável pelo Setor de Meios de Cultura, que sempre de forma gentil e talento técnico, vem contribuindo para a execução de todos os experimentos realizados no LABENT.

Aos profissionais do Departamento de Apoio Técnico e Tecnológico (DATT/IOC), pelo apoio nas atividades de esterilização e lavagem.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRRJ, representado pela coordenação da Dra Simone Pereira Mathias, por me acolher na Universidade Rural e permitir que eu realizasse este sonho.

Ao corpo docente do PPGCTA, em especial os professores Stella Regina Reis da Costa, Rosa Helena Luchese e Armando U.O. Sabaa Srur, que de forma inesquecível ficarão para sempre em meu coração como exemplos de competência.

A Diretora do Instituto Oswaldo Cruz, Dra. Tânia Araújo Jorge pela infra-estrutura e possibilidade de fortalecer meu conhecimento.

À Fundação Oswaldo Cruz, representada pelo seu presidente Dr. Paulo Ernani Gadelha Vieira, pelos recursos técnicos científicos ofertados para a execução deste trabalho.

RESUMO

COSTA, Renata Garcia. **Avaliação da Resistência Antimicrobiana em Sorovares de *Salmonella* Caracterizados em Carcaças de Frango Congeladas e Resfriadas, Provenientes de Diferentes Regiões do Brasil.** 2013. 129p. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos). Instituto de Tecnologia. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Entre os patógenos de natureza zoonótica, *Salmonella* ssp. é reconhecida por sua elevada casuística em doenças de transmissão alimentar em todo o mundo, tendo na atualidade interesse especial por sua resistência aos antimicrobianos, uma vez que esta característica pode comprometer a eficácia do tratamento de infecções humanas. Neste sentido, a presente investigação visa avaliar os sorovares de *Salmonella* circulantes em cepas isoladas de carcaças de frango, a emergência de cepas multirresistentes aos antimicrobianos, assim como reconhecer os mecanismos envolvidos na disseminação de clones resistentes à drogas de última geração utilizadas na terapêutica humana e veterinária. Foram avaliadas 243 cepas isoladas de carcaças de frango congeladas (n.84) e resfriadas (n.159), comercializadas em diferentes regiões do País e encaminhadas no período de 2009 a 2011 ao LRNEB para a caracterização antigênica conclusiva. Foram identificados nove sorogrupos distintos, com a prevalência do sorogrupo O:4 (B) em carcaças resfriadas (32,7%) e O:4 (B), O:7 (C₁) e O:8 (C₂-C₃) com percentuais semelhantes em torno de 20% nas congeladas. Foi possível reconhecer 33 sorovares, entre os quais os cinco prevalentes foram *Salmonella* ser. Mbandaka (10,3%), Minnesota (7,4%), Enteritidis (7,4%), Typhimurium (7,0%) e Infantis (6,2%). O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos avaliado em 194 cepas apontou 70% de resistência a uma ou mais drogas, distribuídas em 57 perfis distintos com variação entre 1 a 7 marcos de resistência. Os índices individuais apontaram para cefalosporinas de 3ª geração, uma elevação acentuada em cepas isoladas de carcaças de frango resfriadas, com índices correspondentes a 7% em 2009, 21% em 2010 e 20% em 2011. Nas congeladas, somente foi observado em 2011 com um percentual de 22,2%. Para as quinolonas os percentuais mostraram-se semelhantes em ambas as fontes (13 a 15%), com índices mais elevados em 2009 nas resfriadas e em 2010 em congeladas. Particularmente para fluoroquinolonas, a resistência foi somente detectada em resfriadas em 7% de cepas isoladas em 2009 e 1% em 2011. Os percentuais detectados para os aminoglicosídeos variaram entre 9 a 15%. Para drogas proibidas pelo MAPA, houve redução acentuada (37% em 2009 e 4% em 2011) para os nitrofuranos. Para tetraciclina e cloranfenicol, os percentuais mantiveram-se entre 27% e 4% respectivamente, durante todo período de análise. A totalidade das cepas apresentou sensibilidade os carbapenemas. A caracterização de genes de resistência avaliada pela PCR detectou percentual de positividade para *bla*_{CMY} (≈50%) entre as cepas resistentes aos beta-lactâmicos isoladas das duas fontes e 2,9% entre aquelas com sensibilidade reduzida, isoladas a partir de carcaças congeladas. Índices de 21,2% e 9% foram obtidos para *bla*_{CTX-M} em cepas isoladas de carcaças congeladas e resfriadas, respectivamente. Resistência às quinolonas codificada pelo gene *qnrB* foi observado em 13% das cepas de ambas as fontes, das quais 2% com resistência aos aminoglicosídeos foram positivas para *aac*(3'')IIa. Integrons de classe 1 foram detectados em 20 (18%) das cepas. A caracterização destes elementos em cepas isoladas da cadeia alimentar representa uma base útil para o conhecimento quanto à disseminação da multirresistência em *Salmonella* spp. possibilitando adoção de ações profiláticas e de controle em medicina humana e veterinária.

Palavras-chaves: *Salmonella*, Sorovares, Resistência Antimicrobiana, Genes de Resistência.

ABSTRACT

COSTA, Renata Garcia. 2013. **Evaluation of Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Serovars Characterized from Frozen and Refrigerated Poultry Carcasses, from Different Regions of Brazil.** 129p. Tesis (Doctor in Food Science) Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Salmonella spp. is recognized, among pathogens of zoonotic nature, for its high incidence in food borne diseases around the world. It currently receives special interest because of resistance to antimicrobials since this feature might compromise the effectiveness of treatments in human infections. The aims of the present study were to detect the *Salmonella* serotypes isolated from poultry carcasses, evaluate the emergence of antimicrobial resistant strains and recognize the mechanisms involved in the spread of resistant clones, mainly in last generation drugs, used in human and veterinary medicine. From 2009 to 2011, 243 *Salmonella* spp., isolated from frozen (n=84) and refrigerated (n=159) poultry carcasses commercialized in Brazil were received by LRNEB for antigenic characterization. Nine serogroups were identified, being O:4 (B) in refrigerated carcasses (32.7%) and O:4 (B), O:7 (C₁), O:8 (C₂-C₃) with similar percentual in frozen carcasses (≈20%). Thirty-three *Salmonella* serotypes have been recognized and, *Salmonella* ser. Mbandaka (10.3%), Minnesota (7.4%), Enteritidis (7.4%), Typhimurium (7.0%) and Infantis (6.2%) the five most prevalent. The antimicrobial susceptibility evaluated in 194 strains showed 70% resistance up to seven antimicrobial drugs, with 57 distinct patterns. From 2009 to 2011 increase the resistance to 3rd generation cephalosporins (from 7% to 20%) in refrigerated carcasses while in frozen, was observed from 2011 in 22.2% of strains. Percentages for quinolones resistance were similar in both sources (13 to 15%). Particularly for fluoroquinolones this was only detected in refrigerated carcasses in 7% of strains (2009) and 1% (2011). Percentages detected to aminoglycosides varied between 9 to 15%. Discontinued drugs (MAPA resolution, 1998 and 2003) showed that decreased resistance to nitrofurans (from 37% in 2009 to 4% in 2011). Resistance to tetracyclines and phenicols was observed in 3 and 9% during the period. All strains were sensitive to carbapenems. The genes *bla*_{CMY} were detected by PCR in strains resistant to beta-lactams isolated from refrigerated and frozen carcasses (50%) and from 2.9% strains which showed reduced susceptibility zone diameter isolated from frozen. The gene *bla*_{CTX-M} was obtained in 21.2% and 9% of *Salmonella* strains isolated from both sources. Among strains resistant to quinolones, *qnrB* was observed in 13% and, *aac*(3')IIa and *integrase* was characterized in 2% and 18%, respectively. The occurrences of food-borne diseases represent an important public health problem, and continuous surveillance to assess the risk of different pathogens and implement actions for its control it is necessary to monitor, act by the prevention in the entry or export of pathogenic microorganisms.

Key words: *Salmonella*, Serovars, Antimicrobial Resistance, Resistance Genes

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos sorovares de <i>Salmonella</i> identificados em carcaças de frango congeladas e resfriadas.	46
Tabela 2 - Perfis de resistência detectados em <i>Salmonella</i> spp. isoladas de carcaças de frango congeladas e resfriadas, no período de 2009-2011.	48
Tabela 3 - Distribuição dos sorovares de <i>Salmonella</i> multirresistentes de acordo com ano e fonte de isolamento.	51
Tabela 4 - Distribuição dos perfis de multirresistência detectados nos diferentes sorovares de <i>Salmonella</i> , de acordo com ano e fonte de isolamento.	52
Tabela 5 - Distribuição dos sorovares de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> isoladas de carcaças congeladas e resfriadas de frango resistente a cefalosporinas de uso humano e veterinário.	53
Tabela 6 - Avaliação do padrão molecular de genes de resistência em <i>Salmonella</i> spp. pelo método da PCR	55
Tabela 7 - Avaliação comparativa da presença de genes codificantes de resistência à cefalosporinas de 3ª geração em sorovares de <i>Salmonella</i> spp.	57
Tabela 8 - Caracterização dos genes <i>gyrB</i> , <i>qnr(B,S)</i> , <i>aac(3'')IIa</i> e <i>integrase</i> em <i>Salmonella</i> spp.	60
Tabela 9 - Distribuição dos sorovares de <i>Salmonella</i> spp. positivas para o gene <i>integrase</i> , de acordo com perfil de suscetibilidade e estado de origem.	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Aditivos de uso proibido na alimentação animal e legislação correspondente, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1998; 2003).	11
Quadro 2 - Características diferenciais das espécies e subespécies de <i>Salmonella</i> , segundo Grimont e Weill, 2007.	13
Quadro 3 - Exemplo do Esquema Kaufmann e White, segundo Grimont e Weill (2007) para classificação de <i>Salmonella</i> .	14
Quadro 4 - Distribuição e frequência dos sorovares de <i>Salmonella</i> , de acordo com a espécie e subespécies, segundo Grimont e Weill (2007) e Guibourdenche et al. (2010).	14
Quadro 5 - Distribuição geográfica de cepas de <i>Salmonella</i> spp. avaliadas no período de 2009 a 2011.	32
Quadro 6 - Perfil bioquímico de <i>Salmonella</i> spp., segundo Costa e Hofer (1972); Edwards e Ewing (1986).	33
Quadro 7 - Drogas antimicrobianas (MARCA OXOID) utilizadas na avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana.	35
Quadro 8 - Padrão de interpretação do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, pelo método de difusão de disco em Agar, segundo CLSI (2011).	36
Quadro 9 - Solvente e diluente utilizado no preparo da solução antimicrobiana, de acordo com o CLSI (2011).	36
Quadro 10 - Padrão de interpretação do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de microdiluição, segundo CLSI (2011).	37
Quadro 11 - Cepas padrão utilizadas no controle de qualidade do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, CLSI (2009/2010/2011).	38
Quadro 12 - Limites aceitáveis em cepas padrão utilizadas no controle de qualidade do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, CLSI (2009/2010/2011).	39
Quadro 13 - Sequência de nucleotídeos empregados na caracterização de genes de resistência em <i>Salmonella</i> spp.	40
Quadro 14 - Componentes e concentrações utilizadas no preparo do MIX para PCR.	41
Quadro 15 - Condições de amplificação empregadas na caracterização de genes de resistência.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição geográfica dos sorovares de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isoladas de carcaças de frango resfriadas e congeladas, no período de 2009-2011. 47
- Figura 2** - Produto da amplificação do gene *bla_{CMY}* obtido através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella* spp. 58
- Figura 3** - Produto da amplificação do gene *bla_{CTX-M}* obtido através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella* spp. 58
- Figura 4** - Produto da amplificação do gene *gyrB* obtido através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella* spp. 61
- Figura 5** - Produto da amplificação dos genes *qnrB* e *qnrS* obtidos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – Multiplex em *Salmonella* spp. 61
- Figura 6** - Produto da amplificação da região conservada do integron através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella* spp. 63
- Figura 7** - Produto da amplificação da região variável do integron através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella* spp. 63

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Sorogrupos de <i>Salmonella</i> identificados em carcaças de frango congeladas e resfriadas, no período de 2009-2011.	43
Gráfico 2 – Frequência anual dos sorogrupos de <i>Salmonella</i> identificados em carcaças de frango congeladas e resfriadas, no período de 2009-2011.	44
Gráfico 3 – Frequência dos 5 sorogrupos de <i>Salmonella</i> mais prevalentes em carcaças de frango congeladas e resfriadas.	44
Gráfico 4 – Perfil de suscetibilidade de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de carcaças de frango congeladas e resfriadas, no período de 2009 a 2011.	49
Gráfico 5 – Evolução da resistência antimicrobiana em <i>Salmonella</i> spp. isoladas de carcaças de frango congeladas e resfriadas, no período de 2009 a 2011.	49
Gráfico 6 - Suscetibilidade antimicrobiana em <i>Salmonella</i> spp. isoladas de carcaças de frango congeladas e resfriadas no período de 2009 a 2011.	50
Gráfico 7 – Evolução da resistência à cefalosporinas de 3 ^a geração em cepas de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de carcaças de frango congeladas e resfriadas, no período de 2009 a 2011.	54

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

<i>aac(3'')</i> IIa	Gene para pesquisa da resistência aos Aminoglicosídeos
<i>aac(6')</i> Ib	Gene para pesquisa da resistência aos Aminoglicosídeos
AACs	Aminoglicosídeo-N-acetiltransferase
ACSSut	Ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina
AFSCA	Federal Agency for the safety of the food chain
AMP	Ampicilina
Antígeno H	Antígenos flagelares
Antígeno O	Antígenos somáticos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise dos perigos e pontos Críticos de Controle
ATCC	American Type Culture Collection
BA	Bahia
BHI	Caldo Brain Heart Infusion
Bla	Gene para pesquisa da resistência aos Beta-lactâmicos
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
BPP	Boas Práticas de Produção
Caldo CAMHB	Caldo Mueller-Hinton
CAZ	Ceftazidima
CC	Carcaças de Frango Congeladas
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEP	Cefalotina
CFT	Ceftiofur
CHL	Cloranfenicol
CIP	Ciprofloxacina
CIPARS	Programa Integrado para Vigilância Antimicrobiana do Canadá
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CODA-CERVA	Centrum voor Onderzoek in de Diergeneeskunde en Agrochemie – Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques
CR	Carcaças de Frango Resfriadas
CRO	Ceftriaxona
DEVEP	Departamento de Vigilância Epidemiológica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DT	Fagotipo definitivo

DTA	Doença de Transmissão Alimentar
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
ESBL	Beta-Lactamases de espectro estendido
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FEP	Cefepime
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOX	Cefoxitina
GEN	Gentamicina
GO	Goiás
I	Perfil Intermediário
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPM	Imipenem
LRNEB	Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas
MA	Maranhão
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	Multirresistência
MG	Minas Gerais
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MLVA	Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
NAL	Ácido Nalidíxico
NARMS	National Antimicrobial Resistance Monitoring System
NIT	Nitrofurantoína
OIE	Escritório Internacional de Epizootias
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pará
pb	Pares de Base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Eletroforese de Campo Pulsado
PMQR	Plasmid Mediated Quinolone Resistance
PR	Paraná

PREBAF	Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango
PT	Fagotipo
<i>qnr</i>	Gene para pesquisa da resistência à quinolonas
R	Perfil Resistente
RAPD	Randon Amplified Polymorphic DNA
RDC	Resolução da Diretoria do Colegiado
REP	Repetitive Sequence Extragenic Palindromic
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
<i>rrs</i>	Gene para controle do PCR <i>qnr</i> Multiplex
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SP	São Paulo
Sr	Sensibilidade reduzida
STR	Estreptomicina
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima da PCR)
TBE	Tris Base
TCY	Tetraciclina
TSB	Caldo Trypticase Soja
UBABEF	União Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Desenvolvimento da Avicultura	4
3.2 A Prática do uso de Antimicrobianos na Avicultura	9
3.3 Gênero <i>Salmonella</i>	12
3.3.1 Considerações Gerais	12
3.3.2 Nomenclatura e Classificação	12
3.3.3 Etiologia e Patogenicidade	15
3.3.4 Ecologia	17
3.3.5 Epidemiologia	19
3.4. Métodos de Subtipagem em <i>Salmonella</i>	23
3.5. Resistência Antimicrobiana	26
3.6 Mecanismos de Resistência Antimicrobiana	28
3.6.1 Mecanismo de Resistência aos Beta-lactâmicos	28
3.6.2 Mecanismo de Resistência as Quinolonas	29
3.6.3 Mecanismo de Resistência mediado por Integrons	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Amostragem	32
4.2 Recuperação das cepas	32
4.3 Confirmação do Perfil Bioquímico	33
4.4 Diagnóstico Antigênico Conclusivo	33
4.5 Manutenção de Cepas	33
4.6 Confirmação e Determinação do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos	34
4.6.1 Método de Difusão de Disco em Agar	34
4.6.1.1 Preparo do Inóculo	34
4.6.1.2 Meio de Cultura	34
4.6.1.3 Drogas Antimicrobianas	34
4.6.1.4 Execução da Técnica	35
4.6.1.5 Leitura e Interpretação dos Resultados	35

4.6.2 Método de Microdiluição	36
4.6.2.1 Preparo da Solução Antimicrobiana	36
4.6.2.2 Preparo das Placas de Microtitulação	37
4.6.2.3 Preparo do Inóculo	37
4.6.2.4 Execução da Técnica de Microdiluição	37
4.6.2.5 Interpretação e divulgação dos resultados	37
4.6.3 Controle de Qualidade do Teste	38
4.7 Detecção de Genes de Resistência pelo Método de PCR	39
4.7.1 Amostragem	39
4.7.2 Extração e Quantificação do DNA	39
4.7.3 Primers empregados na caracterização de genes de resistência	40
4.7.4 Preparo do MASTER MIX	41
4.7.5 Condições de Amplificação	41
4.7.6 Corrida e Visualização do Perfil Molecular	41
5 RESULTADOS	43
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÕES	84
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1 INTRODUÇÃO

A avicultura representa uma atividade de contínua expansão no setor de agronegócios no Brasil, na qual vem sendo consolidada pela implementação de novas tecnologias com alto grau de automação e investimentos em equipamentos, instalações e insumos. Conseqüentemente, o fortalecimento da cadeia produtiva resultou no aumento de produtividade e competitividade, fazendo com que o Brasil ocupasse o primeiro lugar em produção e exportação de aves em nível mundial. Paralelamente, o consumo interno pela população brasileira veio aumentando gradativamente nos últimos anos, especialmente pela carne de ave representar uma fonte proteica de boa qualidade e de baixo custo em relação a outras fontes de origem animal.

Por outro lado, para atender as demandas de produção, exportação e consumo, a manutenção desta atividade no mercado competitivo está aliada à implementação de programas de qualidade e segurança alimentar, exigindo um controle rigoroso em todas as etapas de produção para garantir a inocuidade dos produtos que são ofertados aos consumidores.

A exigência de um produto seguro intensifica-se nos países desenvolvidos onde particularmente, as doenças de origem alimentar, normalmente são detectadas de forma mais eficiente, ampliando assim a busca constante de um alimento livre de patógenos.

Entre os patógenos associados a doenças de transmissão alimentar, alguns apresentam características zoonóticas e facilidade de se disseminar indistintamente na cadeia alimentar, representando um problema significativo para a saúde e economia.

Neste particular, o gênero *Salmonella* assume papel importante sendo uma das principais causas de infecção transmitida por alimentos tanto nos países desenvolvidos quanto nos emergentes. Reconhecida atualmente como um dos patógenos de alta relevância em quadro das enteroinfecções, são responsáveis pelo impacto na saúde das populações e atuam como indicativos da qualidade dos alimentos. Seu ciclo de transmissão envolve todas as fontes de isolamento e sua veiculação está associada à ingestão de alimentos, dos quais os de origem animal são os mais incriminados na transmissão de *Salmonella* spp. para o homem.

Entretanto o aspecto de sanidade exige ações contínuas no controle da salmonelose, zoonose de epidemiologia complexa, cujos padrões diferem de uma região para outra. Embora esta flutuação seja passível de ocorrência, uma contínua ação de monitoramento deve ser ponto pacífico nas ações, tendo em vista o risco à Saúde Pública.

Entre as características do gênero, sua condição ubíqua favorece a implantação em diferentes nichos ecológicos, determinando dificuldade em seu controle. Particularmente, entre animais de produção, a contaminação pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva, na comercialização, inclusive durante o preparo final pelo consumidor. Em geral, os riscos são aumentados quando há ausência ou falhas nos procedimentos tecnológicos dentro das diferentes etapas da produção, incluindo o processo de abate e processamento, bem como nos ambientes das plantas avícolas.

Sua permanência e distribuição na natureza estão vinculadas a sua facilidade de adaptação. Desta forma, sua disseminação na cadeia alimentar é contínua e representa um fator relevante pela resistência à pressão seletiva imposta pelas condições ambientais em que se encontram. Somam-se neste contexto, a capacidade de desempenhar um papel importante como receptor ou doador de genes de resistência aos antimicrobianos, favorecendo a difusão destes elementos através da cadeia alimentar, no qual constitui um objeto de preocupação para Saúde Pública, pelas implicações que podem resultar no tratamento de infecções humanas

(BUTAYE et al., 2006; CATTOIR et al., 2007; KRAULAND et al., 2009; STRAHILEVITZ et al., 2009; FIROOZEH et al., 2012).

Este panorama pode ser evidenciado, quando detectamos a circulação e emergência de clones com resistência em todos os níveis da cadeia alimentar, representando um problema que vem sendo impactado pelo uso imprudente destas drogas em diversos segmentos da clínica humana e veterinária e na produção animal e vegetal. Estes são transmitidos por bactérias, a partir de outros produtos de origem animal ou mesmo pelo contato direto, onde características zoonóticas das salmonelas representam um fator de elevada relevância.

Esta assertiva corresponde à propagação desse micro-organismo em infecções alimentares e sublinham sobre adoção de programas sanitários e de segurança alimentar por órgãos competentes, visando o controle e/ou redução de patógenos durante o processamento industrial. No Brasil, os padrões microbiológicos em alimentos, são estabelecidos pela ANVISA, através da RDC nº12 (ANVISA, 2001a). No entanto, este regulamento técnico não exige o “parâmetro *Salmonella* spp.” em carne de aves *in natura* (ausência em 25 gramas) e estabelece “10⁴” como limite máximo aceitável para coliformes termotolerantes. No entanto, por considerar que os processos tecnológicos utilizados pelas indústrias produtoras de carne de aves não assegura a eliminação completa de *Salmonella* spp., e que sua presença pode significar risco à saúde do consumidor, caso o produto não seja adequadamente conservado e preparado, a ANVISA estabeleceu através da RDC nº13 (ANVISA, 2001b), o regulamento técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus subprodutos.

Considerando os riscos que *Salmonella* spp. pode causar à Saúde Pública, o objetivo deste estudo foi avaliar a dinâmica populacional dos sorovares de *Salmonella* circulantes em carcaças congeladas e refrigeradas de frango comercializadas no Brasil, assim como o reconhecimento quanto à emergência de cepas que apresentem resistência múltipla aos antimicrobianos, principalmente à drogas de última geração utilizadas na medicina humana e veterinária, cujo conjunto de informações visa ofertar subsídios para auxiliar seu controle na cadeia produtiva e conseqüentemente contribuir para a melhoria da saúde humana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Determinar entre os sorovares circulantes de *Salmonella* em carcaças de frangos congeladas e resfriadas, o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, reconhecendo a distribuição dos clones resistentes, através da avaliação quanto ao mecanismo genético de resistência às drogas de última geração.

2.2 Objetivos específicos:

- Reconhecer os sorovares de *Salmonella* ocorrentes em carcaças de frango congeladas e resfriadas, estabelecendo a correlação de acordo com a região do país.
- Determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos que são empregados nas áreas humana e veterinária.
- Confirmar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos obtidos a partir das atividades de monitoramento do LRNEB.
- Determinar o papel representado pelos sorovares prevalentes para a disseminação da multirresistência.
- Investigar a ocorrência e a diversidade de genes que codificam resistência às drogas de última geração empregadas na terapia humana e veterinária.
- Determinar a natureza genética em cepas multirresistentes e correlacionar o seu papel na cadeia alimentar para a transmissão de integrons e diferentes genes de resistência.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Desenvolvimento da Avicultura

A avicultura industrial constitui atualmente uma atividade dotada de eficácia produtiva, cujo desenvolvimento crescente representa um diferencial oriundo da combinação de contínuos progressos em genética, nutrição, ambiência e sanidade.

No mundo, de acordo com o Relato Setorial (BNDES, 2005), a avicultura industrial se desenvolveu a partir da segunda grande guerra, com a necessidade de destinar oferta de carnes vermelhas para os soldados em combate, sendo preciso aumentar a produção de carnes alternativas e de animais de pequeno porte que estivessem prontos para consumo num curto espaço de tempo. Assim, os EUA começaram a desenvolver pesquisas no sentido de obter novas linhagens de frangos, fórmulas de rações e alimentos que atendiam aos requerimentos nutricionais das aves e medicamentos específicos para a avicultura, o mesmo ocorreu no pós-guerra, nos países da Europa.

A partir da sua introdução em 1950, a avicultura veio sofrendo reestruturação, com a implantação de novas tecnologias no manejo, equipamentos, nutrição e sanidade das aves, se tornando responsáveis por gerar a redução de custos de forma gradativa, aumentando a competitividade comercial e ganhos de produtividade, o que a configura como uma atividade econômica mundialmente reconhecida (LAGE et al., 2007).

No Brasil, a partir da década de 60 ocorreram transformações na organização dos sistemas agroindustriais aliadas a crescente participação do capital industrial. Estas resultaram no implemento dos setores produtivos, entre eles o avícola de corte brasileiro, os quais lograram expressivas taxas de crescimentos ao longo das últimas décadas. Isso foi possível porque tais setores experimentaram crescentes ganhos tecnológicos reunindo as pré-condições para conquistar mercados externos (TALAMINI et al., 2005).

Nos meados da década de 80 quase a totalidade da produção era absorvida internamente. Diante disso, os investidores perceberam que a atividade avícola de corte representava uma importante alternativa de remuneração de capitais e com isso, a partir de vultosos investimentos, a atividade se desenvolveu e se consolidou em diversos países do mundo, despertando o grau de competição entre os produtores mundiais, como os Estados Unidos, França e a China (UBABEF, 2012).

Particularmente no Brasil, o início da chamada avicultura industrial, se caracterizou em um primeiro estágio, pela importação de linhagens híbridas americanas, mais resistentes e produtivas. Mais tarde, devido aos investimentos nacionais, o setor se estruturou com base na melhoria genética das aves, desenvolvimento de vacinas contra doenças, introdução de novas tecnologias, uso de instalações mais apropriadas e de uma alimentação racional. Desta forma, passou a ter caráter industrial, impulsionada pela intensidade no seu processo de produção deixando de ser uma atividade de subsistência, para se tornar um verdadeiro complexo agroindustrial impulsionado por uma coordenação coesa estabelecida entre os segmentos da cadeia produtiva e, caracterizado também, pela elevada escala de produção industrial (BERTOGLIO, 2006; TAVARES e RIBEIRO, 2007).

Consequentemente, o Brasil alcançou de forma muito rápida o cenário internacional, tendo em vista os resultados expressivos obtidos em suas exportações nos últimos anos. Atualmente, a avicultura de corte representa um dos principais segmentos do complexo agroindustrial brasileiro, ocupando o terceiro lugar em produção e primeiro em exportação de aves no mundo. (UBABEF, 2012).

Dados gerados no último relatório anual da Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango (UBABEF, 2012) reconheceram que em 2011, a produção de carne de frango no Brasil, atingiu cerca de 13.058 milhões de toneladas, representando um aumento de 6,8% em relação ao ano anterior.

Segundo a UBABEF (2012), do volume total de frangos produzidos pelo país em 2011, 30,2% foi destinado para exportações, totalizando 3.943 milhões de toneladas dos quais representaram um aumento significativo de 3,2% em relação a 2010, atingindo recorde histórico no setor. Pelas projeções da União Brasileira de Produção e Exportação de Frango, em 2013 a avicultura brasileira deve produzir cerca de 16,9 milhões de toneladas de carne de frango, volume que corresponde a um incremento médio de 6,25% desde 2004.

Em relação ao consumo interno, os índices alcançaram 9.010 milhões de toneladas em 2011, equivalendo 69,8% da produção. Possivelmente, esta demanda foi estimulada pela mudança de hábitos alimentares, para carnes consideradas mais saudáveis e pelo preço mais competitivo, o que contribuiu para popularizar a carne de frango como parte da dieta de grande parcela da população (UBABEF, 2012).

Estima-se que o consumo médio anual em todo o Brasil, está em torno de 47,4 kg/hab/ano, impactando em um aumento de mais de 60% nos últimos 10 anos (UBABEF, 2012). Apesar do Estado do Rio de Janeiro não se encontrar entre os maiores produtores, alguns levantamentos realizados o colocam entre os maiores consumidores no Brasil.

A manutenção da competitividade do Brasil no mercado de carne de aves parece ser reforçada pelas atividades em parceria de entidades públicas e privadas, que simultaneamente, desenvolvem as condições necessárias colaborando para o fortalecimento deste setor. Oliveira et al. (2012) admitem que a garantia de manutenção no mercado competitivo está vinculada ao fornecimento de produtos com padrão de qualidade estável, que devem atender à satisfação das exigências a matéria prima e seus produtos, além da segurança do consumidor.

No entanto, Tessari et al. (2008) admite que o alto índice de produção, comercialização e consumo tornaram-se atividades passíveis de risco à saúde, tendo em vista os inúmeros fatores que podem comprometer a inocuidade desses alimentos.

Oliveira et al. (2012) consideram que se por um lado, o sistema de criação sob confinamento foi um dos responsáveis pelo aumento na produtividade, gerando carne suficiente para suprir a demanda mundial, por outro apresentou alguns inconvenientes especialmente àqueles relacionados ao comportamento, bem-estar animal, população ambiental e disseminação de patógenos.

Esta assertiva reafirma que a prática de confinamento favorece a introdução, multiplicação e disseminação de agentes patogênicos, especialmente micro-organismos da microbiota intestinal dos animais, como por exemplo, *Salmonella*.

Acredita-se que as infecções são comumente associadas ao sistema de criação intensiva, atingindo aves jovens (até duas semanas de idade), sendo os adultos portadores assintomáticos, por longo período (MEDEIROS, 2006; HOFER et al., 1997).

Embora todas as salmonelas possam ser reconhecidas como patógenos potenciais, algumas, responsáveis por infecções no homem, estão presentes no intestino de aves saudáveis, sendo capazes de contaminar o meio ambiente e outras aves, através das fezes (POPPE, 2000). Isso corrobora para um aumento no custo financeiro nos sistemas de criação intensiva de animais para consumo, devido ao aumento na morbidade e mortalidade animal, influenciando diretamente nos valores gastos com programas de controle e redução dos produtos contaminados.

Especialmente as aves de corte estão entre os principais carreadores deste patógeno em abatedouros, constituindo importante reservatório e apresentando alta correlação com contaminação cruzada, sendo indispensável à avaliação do estado sanitário dos plantéis, bem como seu reflexo para a produção de alimentos (OLIVEIRA et al., 2012).

Bersot (2006) salienta que muitas vezes, a presença de patógenos não se manifesta clinicamente nos animais alojados nas granjas, no entanto pode ser veiculado pelo trato gastrointestinal e possibilitar a contaminação da carcaça. Este mecanismo de contaminação envolve inicialmente a retenção das bactérias na camada líquida sobre a pele. Nas operações de abate, os pontos críticos como depenação, evisceração, pré-resfriamento e o resfriamento constituem fatores primordiais para controle, pois as salmonelas possuem a capacidade de se aderir firmemente a fibras de colágeno da superfície externa da pele do frango, após a imersão em água.

No sistema atual de integração, a contaminação das aves ou o produto final podem ocorrer desde a indústria, durante o transporte até no armazenamento na granja, através de aves de reposição, incubatório, ambiente de criação, abatedouro, pessoas, pássaros, falta de biossegurança, manejo e instalações (CARDOSO e TESSARI, 2008). Particularmente, durante o processamento industrial, falhas nas diferentes etapas permitem a contaminação da carcaça e subprodutos. O quantitativo de micro-organismos presentes nas aves é influenciado pelas condições higiênicas de abate e processamento (SCARCELLI e PIATTI, 2002).

Leitão (2002) admite que as aves encaminhadas para o abate, constituem fonte inicial de contaminação. Em condições de pré-abate, os contaminantes estão concentrados nas vísceras, pele e penas, no entanto, em função do processamento industrial os micro-organismos se disseminam rapidamente entre as carcaças, seja por veiculação, contaminação cruzada da carcaça ou até mesmo contaminação da carcaça pelas vísceras.

Isto faz com que a cadeia produtiva dependa da qualidade e da inocuidade dos produtos que são ofertados à população, os quais requerem o controle e monitoramento em todas as etapas, tanto em nível de abatedouro quanto de produção, com a finalidade de garantir a ausência de patógenos que ofereçam riscos aos consumidores.

Abordagens neste sentido vêm sendo constatadas em diversas partes do mundo através da avaliação do isolamento de *Salmonella* spp. em carcaças de frango industrialmente processadas, evidenciando um percentual considerável nas amostragens avaliadas. Em Portugal, Bernardo e Machado (1989) encontraram 55% das carcaças aprovadas para consumo, positivas para *Salmonella* spp., na Argentina, Benassi et al. (1998) observaram que 12,5% das carcaças examinadas foram positivas para *Salmonella* spp.. Tibaijuka et al. (2003), determinaram a presença e prevalência de salmonelas em carne de frango crua à varejo e miúdos de aves (moela e fígado) comercializados na Etiópia, reconhecendo em 301 amostras, 17, 9% contaminadas com *Salmonella* spp., assim como Cy et al. (2008), na Coreia, ao analisarem 27 amostras obtiveram a frequência de 25,9%.

Particularmente, entre os inquéritos nacionais, são apontados índices significativos ao longo dos anos, como os evidenciados por Santos et al. (2000), que ao analisarem 150 carcaças de frango congeladas, em um comércio varejista em Jaboticabal, São Paulo, constataram a presença de *Salmonella* spp. em 32% da amostragem, com evidência para *Salmonella* ser. Enteritidis em 60,4%.

Dados similares foram obtidos por Fuzihara et al. (2000), que obtiveram 42% de positividade em amostras de carcaças de frango processadas industrialmente, com 30% de *Salmonella* ser. Enteritidis entre os isolados.

Percentuais superiores foram encontrados por Silva et al. (2002), equivalendo a 71 % de *Salmonella* spp. em cortes de carcaças acondicionados em bandejas e exposto à venda sob-refrigeração, na cidade de João Pessoa, na Paraíba. No mesmo ano, Salles et al. (2002) ao avaliarem carcaças de frango, oriundas de abatedouros do município de Uberlândia/MG, detectaram um percentual de 23,9%.

Almeida Filho et al. (2003) analisaram carcaças de frango frescas, comercializadas em feiras livres e carcaças congeladas submetidas à inspeção federal, comercializadas em supermercados, no Município de Cuiabá - MT, evidenciando a presença de *Salmonella* spp. em 40% e 50% respectivamente.

Silva et al. (2004) detectaram a presença de *Salmonella* spp. em 13 das 30 amostras de carcaças de frango comercializadas em Maceió/AL; Tirolli e Costa (2006) constataram a ocorrência de *Salmonella* spp. em 60 carcaças de frangos recém-abatidas em feiras e mercados da cidade de Manaus/AM, com prevalência de *Salmonella* ssp. em 50% da amostragem.

Em São Paulo, Carvalho e Cortez (2005) avaliaram *Salmonella* spp. em 165 amostras de carne de frango e derivados, evidenciando 13,3% (6/45) em carcaças, 25% (15/60) em carne mecanicamente separada, 16% (4/25) em linguças, 30% (6/20) em peitos e 13,3% (2/15) em coxas e sobrecoxas. Tessari et al. (2008) pesquisaram em carcaças de frango prontas para distribuição no comércio e procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, constatando em 116 amostras, 2,5% de contaminação, assim como Rall et al. (2009), avaliaram as condições sanitárias de frango e diversos tipos de linguças comercializados na cidade de Botucatu/SP e determinaram em 50 amostras de carcaças de frango e 75 de linguças do tipo frescal, a positividade para *Salmonella* em 54% e 40% respectivamente.

Moreira et al. (2008) ao avaliarem a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás, verificaram que de 363 amostras, 14,3% estavam contaminadas com *Salmonella* spp., em semelhança com os resultados obtidos por Boni et al. (2011) em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul que detectaram 11,28% de 257 amostras avaliadas.

No cômputo geral, em todas as investigações acima apontadas, os autores admitem ainda, que a contaminação das carcaças de frango pode ocorrer pela presença do micro-organismo no ambiente de criação e conseqüente disseminação às carcaças durante as operações de abate, mesmo quando os abatedouros são dotados de boas práticas de higienização e processamento.

Esta afirmação pode ser fortalecida por Reiter et al. (2007) quando em estudo comparativo entre diferentes fontes de um abatedouro avícola, localizado na cidade de Blumenau/SC, determinaram a incidência de *Salmonella* spp. em 16,7% a partir do isolamento de gaiolas de transporte, 10% de caixas, 6,7% de água gelada, 6,7% de carcaças antes da evisceração, 3,3% de carcaças após arrefecimento, 13,3% de asa congelada, 13,3% em coxa congelada, 6,7% de intestino de frango, 10% de pele do peito e da coxa e 6,7% de pele do pescoço, demonstrando sua prospecção na cadeia produtiva.

Lopes et al. (2007) pesquisando *Salmonella* spp. e micro-organismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves, evidenciaram que não houve redução da carga microbiana durante a passagem pelos tanques.

Tessari et al. (2008) admitem que embora possa haver flutuações entre os percentuais encontrados nas análises de diversos eixos da cadeia produtiva, *Salmonella* sempre representará um risco potencial para a saúde da população consumidora. Esta assertiva é também fortalecida por Pires et al. (2009) apontando a necessidade de programas sanitários e de segurança alimentar objetivando a redução de patógenos circulantes.

Sobretudo no controle de *Salmonella* spp. em aves, a adoção desses programas garantem a saúde animal e, conseqüentemente, reduzem a contaminação de produtos de origem avícola, que podem servir de veículo de transmissão para o homem (BERCHIERI JÚNIOR e OLIVEIRA, 2006).

A implementação de programas que estabeleçam controle efetivo em toda a cadeia desde a produção, armazenagem e distribuição, prepara o setor produtivo brasileiro para atender às exigências dos países importadores quanto aos termos de segurança referentes à exportação.

Internacionalmente, segue-se o *Codex Alimentarius*, que é um Programa Conjunto entre a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação – FAO e a Organização Mundial da Saúde - OMS onde constam as normas, diretrizes, padrões e recomendações relacionados à qualidade e inocuidade dos alimentos. Para o *Codex*, este sistema deve ser aplicado desde a criação dos animais até o momento do alimento ser consumido.

No Brasil, os Ministérios da Saúde e da Agricultura estabeleceram, através da portaria nº1428/93, a utilização dos programas de Boas Práticas de Produção (BPP) e Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) como ferramentas para inspeção de todo o processo de produção da indústria de alimentos. O programa BPP é recomendado para fabricação dos produtos sob condições sanitárias adequadas e como rotina de inspeção. Contempla aspectos higiênicos sanitários, incluindo a eliminação ou redução dos riscos de contaminação microbiológica, química e física. Já o sistema APPCC foi desenvolvido para garantir a inocuidade dos alimentos para o consumidor final frente aos perigos microbiológicos, químicos e físicos, buscando estabelecer o controle em todo o processo produtivo, considerando a matéria-prima, o processamento e ambiente até os operadores envolvidos na produção.

3.2 A Prática do Uso de Antimicrobianos na Avicultura

A utilização de antibióticos e quimioterápicos representa atualmente uma prática imprescindível em qualquer atividade avícola rentável (SANTANA et al., 2011). Sua introdução às rações, visando benefícios para o crescimento, iniciou-se a partir dos trabalhos de Moore et al. (1946) e Stokstad e Jukes (1950). A utilização de antimicrobianos com intuito comercial, além da eficiência na nutrição animal, também apresentou resultados positivos no controle de infecções prevalentes em fazendas e nas estações experimentais de criação.

Sob o ponto de vista histórico, o sucesso da alimentação dos animais com antibióticos foi descoberto em 1948, durante os estudos de identificação e isolamento da vitamina B12 em culturas fúngicas. A partir do conhecimento inicial de que a massa micelas obtida nessas culturas apresentavam uma potencial ação promotora de crescimento, as evidências da atuação de antibióticos em baixas dosagens como promotores de crescimento foram se sucedendo, de tal forma que em 1951 o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso de produtos antibióticos na alimentação animal sem prescrição veterinária (JONES e RICKE, 2003).

Os estudos iniciais que demonstraram os efeitos benéficos dos antibióticos como profiláticos foram realizados em 1946, quando foi relatada uma resposta positiva no crescimento de frangos de corte com o uso de estreptomicina. Em 1949, avaliações obtidas a partir do uso de clortetraciclina em níveis subterapêuticos em aves, demonstraram resultados semelhantes. Desde então, um número muito grande de antibióticos vem sendo utilizado com essa finalidade (LANGHOUT, 2005; ARAÚJO et al., 2007).

Em 1991, Waibel et al. comprovaram sua eficiência sobre o desempenho de animais sob condições experimentais e de campo, reconhecendo que o uso de antimicrobianos na nutrição animal, favorece uma produtividade mais adequada a animais criados de forma intensiva. Os autores admitem ainda, que essas evidências constituíram um fator preponderante para a inclusão destes aditivos na ração como prática rotineira e com amplo sucesso nos atuais modelos de produção.

No Brasil, os aditivos antimicrobianos vêm sendo usados há mais de 50 anos e estes além de melhora na conversão alimentar e consequente ganho de peso dos animais, evita o risco de aparecimento e disseminação de processos infecciosos no plantel. É reconhecido que a presença de um único animal doente, poder resultar em consequências para o produtor, refletindo na qualidade dos alimentos produzidos (PALERMO NETO e ALMEIDA, 2006; ARAÚJO et al., 2007).

A fiscalização de produtos de uso veterinário está prevista na legislação brasileira desde o final da década de 60 e regulamentada no que diz respeito à utilização, fabricação e comercialização.

Rosen (1995) realizou uma grande revisão acerca do uso de aditivos antimicrobianos, tendo sumarizado os resultados de 12.153 experimentos em que esses produtos foram utilizados em avicultura, tendo verificado que 72% apresentaram respostas positivas no desempenho dos animais.

A utilização de antimicrobianos tem como base informações científica e técnicas respeitando as boas práticas no uso de medicamentos veterinários. Na escolha destes, considera-se a eficácia, a aplicabilidade, a segurança e o custo (JUNIOR et al., 2010).

De acordo com Bottezini et al. (2003), os antibióticos são também estimulantes do crescimento, atuando no intestino selecionando a microbiota e eliminando micro-organismos produtores de toxinas, além de melhorar o aproveitamento dos alimentos.

Junior et al. (2010) reconhecem que alguns fármacos como bacitracina, clortetraciclina, oxitetraciclina, penicilina, estreptomicina, eritromicina, oleandomicina, virginamicina, flavomicina e lincomicina, favorecem em ganho de peso em torno de 10%. Linzmeier et al. (2009) afirmam que usualmente as rações avícolas contêm 2, 4, 10 ou 40 gramas por tonelada de algum tipo de antibiótico, para estimular o crescimento e melhorar a conversão alimentar.

Sob o ponto de vista terapêutico, a utilização de antimicrobianos também requer o conhecimento ou suspeita quanto ao agente infeccioso e seu perfil de suscetibilidade, assim como a avaliação das condições clínicas do animal. Contempla um regime posológico, cuja dosagem e duração possibilitam o controle do processo infeccioso, reduzindo-se riscos do desenvolvimento de resistência bacteriana.

Costa (2002) reconhece que o uso intensivo de antibióticos é uma peça essencial para a otimização dos resultados zootécnicos e econômicos, principalmente na cadeia de produção avícola. Segundo o autor, a enorme pressão seletiva em avicultura é função das quantidades de antibióticos usadas, da diversidade de moléculas empregadas e do próprio modo de administração, geralmente oral e por tempo prolongado em concentrações sub-terapêuticas. Este regime é reconhecido como principal impulsionador da resistência antimicrobiana, exercendo uma potente pressão seletiva a favor da emergência de clones resistentes, eventualmente já existentes dentro da população bacteriana (NUNES, 2008).

Desta forma, os antimicrobianos utilizados desordenadamente na cadeia de produção de alimentos de origem animal, especialmente pela sua incorporação às rações, favorece a seleção de um pool de genes, transferíveis para bactérias da microbiota normal, presentes no trato digestivo, levando a uma pressão seletiva, que favorece a sobrevivência e disseminação através da cadeia alimentar (HASMÁN et al, 2005).

PALERMO NETO e ALMEIDA (2006) consideram o fato de que o uso contínuo de antibióticos como promotores de crescimento apresenta riscos potenciais, podendo causar entre outros aspectos, a emergência de resistência cruzada entre o promotor de crescimento e o fármaco de uso terapêutico.

Nesta perspectiva, a União Europeia vem restringindo cada vez mais sua utilização na produção animal e os Estados Unidos ampliando seu programa de uso prudente de antibióticos (NARMS, 2006).

Em 1995, as autoridades dinamarquesas passaram a controlar com mais cautela, o uso de aditivos antimicrobianos como promotores de crescimento. Em consequência dos elevados índices de resistência, foi proibido o uso de avoparcina, supostamente por selecionar enterococos resistentes à vancomicina. Em 1997, a proibição estendeu-se para todos os países, alcançando o Brasil em 2008.

O Brasil, como grande produtor e exportador, efetivamente consolidou a prática prudente do uso de aditivos antimicrobianos visando um melhor desempenho zootécnico em 2004.

A publicação da instrução normativa nº. 13, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1998; MAPA, 2003) aprovou o regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados a alimentação animal. Este regulamento estabeleceu regras para o uso, o registro e a comercialização dos aditivos. A lista de aditivos proibidos na alimentação animal e legislação correspondente encontram-se no **Quadro 1**.

Quadro 1 - Aditivos de uso proibido na alimentação animal e legislação correspondente, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1998; 2003).

ADITIVO	LEGISLAÇÃO
Espiramicina e Eritromicina	Instrução Normativa 14, 17/05/2012
Avoparcina	Of. Circular DFPA N° 047/98
Cloranfenicol e Nitrofuranos	Instrução Normativa 09, 27/06/2003
Arsenicais e antimoniais	Portaria 31, 29/01/2002
Penicilinas, Tetraciclina, Sulfonamidas sistêmicas	Portaria 193, 12/05/1998
Olaquinox	Instrução Normativa 11, 24/11/2004
Violeta Genciana	Instrução Normativa 34, 13/09/2007
Carbadox	Instrução Normativa 35, 14/11/2005
Anabolizantes para bovinos	Instrução Normativa 10, 27/04/2001
Hormônios como aditivos alimentar em aves	Instrução Normativa 17, 18/06/2004

Posteriormente, em novembro de 2006 foi publicada a Instrução Normativa n°. 65, que aprovou os procedimentos para a fabricação e o emprego de medicamentos para os animais de produção, via alimentação animal. Esta Instrução estabelece que as empresas fabricantes de alimentos para animais, sejam de rações ou suplementos, premixes, núcleos ou concentrados, deverão receber do MAPA uma autorização para este tipo de produção.

3.3 Gênero *Salmonella*

3.3.1 Considerações Gerais

O gênero *Salmonella* constitui um vasto grupo da família Enterobacteriaceae que inclui atualmente 2610 sorovares (GRIMONT e WEILL, 2007; GUIBOURDENCHE et al., 2010) capazes de infectar o homem e inúmeros animais de sangue quente e frio, posicionados na cadeia epidemiológica como doente, portador e/ou reservatório (GERMANO e GERMANO, 2008).

A denominação do gênero *Salmonella* foi criada por LIGNIÈRES em 1890, como uma homenagem ao patologista Daniel Salmon, que descreveu junto com Theobald Smith, em 1886, a espécie *cholerae-suis* (LE MINOR, 1984).

Por definição, são classificados como bacilos não esporulados, que se apresentam na forma de bastonetes curtos que medem em geral 0.7-1.5 x 2.0-5µm, Gram negativos, catalase positivos, oxidase negativos, e geralmente móveis por flagelos peritríquios, com exceção dos sorovares Gallinarum e Pullorum (FRANCO e LANDGRAF, 2005). Não apresentam exigências nutricionais, se desenvolvendo bem nos meios usuais. No entanto, preferencialmente são utilizados meios seletivos diferenciais, pela sua capacidade de se desenvolver na presença de impedimentos como, por exemplo, sais biliares, verde brilhante, desoxicolato de sódio e sulfito de bismuto (meio de alta seletividade para *Salmonella* ser. Typhi). Sua adaptabilidade fisiológica é demonstrada pela habilidade de alguns sorovares sobreviverem em condições ambientais variáveis como pH entre 7,0 a 7,5 (extremos 3,8 a 9,5), temperatura de 35 a 43°C (extremos 7 a 49.5°C), na presença ou ausência de O₂, inclusive em atmosfera com 20 a 50% de CO₂ e atividade hídrica de ≥ 0,94 (SVS, 2011).

Segundo Edwards e Ewing (1986), a maioria dos sorovares produz ácido e gás a partir da glicose (com exceção da *Salmonella* ser. Typhi e Gallinarum), raramente fermentam a sacarose, lactose ou adonitol. São vermelho de metila positivos, Voges-Proskauer negativos, não hidrolisam a uréia e não produzem indol. Apresentam ainda como características metabólicas bem definidas, a capacidade de descarboxilar o aminoácido lisina, produzir gás sulfídrico profusamente e utilizar o citrato como única fonte de carbono.

3.3.2 Nomenclatura e Classificação

Segundo Germano e Germano (2008), a classificação das salmonelas é muito complexa e, apesar das inúmeras discussões ao longo de vários anos, só aproximadamente a partir de 1970, com o uso de métodos moleculares de homologia de DNA pode se definir mais claramente o quadro taxonômico deste gênero.

Seu histórico foi marcado inicialmente na década de 50, quando Kauffmann e Edwards (1952) propuseram a divisão do gênero em três espécies: *S. typhosa*, *S. choleraesuis* e *S. enterica*. Posteriormente, Ewing em 1963 alterou essas designações, substituindo a *S. typhosa* por *S. typhi*, e *S. enterica* por *S. enteritidis*, englobando nesta última todos os demais sorotipos que compunham o gênero.

No entanto, considerando o perfil metabólico frente a alguns substratos, Kauffmann (1980) sugeriu que o gênero *Salmonella* fosse dividido em quatro subgêneros e de acordo com o comportamento bioquímico classificou em: I, II, III (englobando o Gênero Arizona) e IV. Em 1994, Le Minor estabeleceu que o subgênero III, fosse dividido em duas subsespécies: IIIa

incluindo todos os sorovares monofásicos (que apresentavam uma única fase flagelar) não fermentativos da lactose e IIIb os sorovares com duas fases flagelares e fermentativos da lactose.

As edições mais atuais consideram a classificação da *Salmonella* baseada na caracterização de seus antígenos de superfície (O) e flagelares (H), que intimamente relacionados uns aos outros, determinam uma variedade de sorovares distintos, apresentados por Popof e Le Minor nos esquemas de Kauffmann-White em 2001 e 2004.

A versão recente descrita por Grimont e Weill (2007), fundamentada em estudos de hibridização do DNA, divide o gênero *Salmonella* em duas espécies geneticamente distintas: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (GRIMONT e WEILL, 2007). Particularmente *Salmonella enterica*, de acordo com seu perfil bioquímico e a capacidade de lise do fago O1, se divide em seis subespécies: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I), *Salmonella enterica* subsp. *salamae* (II), *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (IIIB), *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* (IV) e *Salmonella enterica* subsp. *indica* (VI), conforme apresentado no **Quadro 2**:

Quadro 2 – Características diferenciais das espécies e subespécies de *Salmonella*, segundo Grimont e Weill, 2007.

Espécies	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Características							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Crescimento KCN	-	-	-	-	+	-	+
L (+) tartarato ^(a)	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonato	-	+	-	+	+	+	+
γ-glutamil transferase	+ ^(*)	+	-	+	+	+	+
B-glucosidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucato	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	-(75%)	+(75%)	-	d	-
Lise – fago O1	+	+	-	+	-	+	D
Habitat normal	Animais de sangue quente			Animais de sangue frio e meio ambiente			

a:d-tartarato, (*): *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (d), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin (-) +: ≥90% reações positivas, -: ≥90% reações negativas, **d**: diferentes reações (sorovares).

Com base na expressão antigênica, o esquema de Kauffmann e White, segundo Grimont e Weill (2007), permite reconhecer 2610 sorovares distribuídos em grupos sorológicos e definidos em sorogrupos por antígenos específicos (**Quadro 3**).

Estes sorovares se distribuem nas diferentes espécies e subespécie (**Quadro 4**), sendo que epidemiologicamente *Salmonella enterica* subsp. *enterica* são normalmente associadas com animais de sangue quente, englobando cerca de 100% dos sorovares encontrados.

Quadro 3 – Exemplo do Esquema Kaufmann e White, segundo Grimont e Weill (2007) para classificação de *Salmonella*.

<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar	SOROGRUPOS	CLASSIFICAÇÃO ANTIGÊNICA		
		ANTÍGENO O	ANTÍGENO H	
			FASE 1	FASE 2
Typhimurium	O:4 (B)	1,4, [5], 12	i	1,2
Agona	O: 4 (B)	1,4, [5], 12	f,g,s	[1,2]
Mbandaka	O:7 (C ₁)	6,7,14	z10	e,n,z ₁₅
Infantis	O:7 (C ₁)	6,7,14	r	1,5
Corvallis	O:8 (C ₂ - C ₃)	8,20	z4,z23	[z6]
Hadar	O:8 (C ₂ - C ₃)	6,8	z10	e,n,x
Enteritidis	O: 9 (D)	1,9,12	g,m	---
Minnesota	O:21 (L)	21	b	e,n,x

Quadro 4 – Distribuição e frequência dos sorovares de *Salmonella*, de acordo com a espécie e subespécies, segundo Grimont e Weill (2007) e Guibourdenche et al. (2010).

Espécies	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
Subespécies	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Nº de sorovares	1547	513	100	341	73	13	23

3.3.3 Etiologia e Patogenicidade

De acordo com a evolução histórica sobre o binômio *Salmonella*-salmonelose, no período de 1880 a 1949, a febre tifóide tendo como etiologia a *Salmonella typhi*, era a forma clínica predominante no homem e no mundo. Neste período, sob o ponto de vista clínico-epidemiológico foram apresentadas duas doutrinas, tais como as de Kiel e de Montevideo.

A doutrina de Kiel, na década de 1910 a 1920, classificou as salmonelas por sua patogenicidade em dois grupos: salmonelas humanas, que englobavam aquelas que eram patogênicas exclusivamente ao homem, como *Salmonella* ser. Typhi, Paratyphi A e B, associadas relativamente com baixa dose infectante, longo período de incubação (em torno de 10 a 14 dias) e quadros clínicos de febre tifóide, septicemia, e estado de portador crônico (acima de 1 ano); e as salmonelas animais, representada por outros sorovares associados às doenças de transmissão alimentar (como *Salmonella* ser. Typhimurium e Enteritidis), responsáveis por determinar quadro de enteroinfecções no homem, 24 a 96 horas após a ingestão de 10^6 a 10^8 viáveis, e o mesmo se manter no estado de portador temporário no período variável entre 6 a 12 meses.

A segunda doutrina, denominada de Montevideo reconheceu que os preceitos de Kiel eram verdadeiros para o homem adulto, mas em crianças ≤ 1 ano as salmonelas animais desenvolviam infecções extra-intestinais, de forma similar a patogenia causada em animais jovens (HORMAECHE e PELUFFO, 1941).

Contudo, ao passar dos anos, as infecções determinadas por salmonelas específicas para os hospedeiros foram se tornando relativamente raras. Especialmente no período entre 1950 a 1969, a frequência de casos associados à febre tifóide diminuiu em vários países, devido a medidas de saneamento e tratamento da água. Da mesma maneira, as infecções animais foram controladas com a adoção de práticas higiênicas na área de criação. Com isso, outros sorovares não tifóides foram associados mais frequentemente com infecções entéricas no homem, determinando um período com índices menores de transmissão de sorovares espécie-específico, e aumento daquelas consideradas não tifóides para o homem. Assim, a doença clínica típica produzida pelas salmonelas no homem, marcada por diarreia, febre, dor abdominal, com rara invasão, passou a ser designada gastrenterite.

Mais recentemente, a classificação de Jay (2005), baseou-se na especificidade do hospedeiro e padrão clínico determinado, sendo possível distinguir 3 categorias de salmonelas:

- Salmonelas altamente adaptadas ao homem, como a *Salmonella* ser. Typhi e Paratyphi, agentes etiológicos da febre tifóide e paratifóide (A, B e C) respectivamente, responsáveis por infecções sistêmicas que determinam quadros septicêmicos graves, com alto grau de infectividade e de virulência;
- Salmonelas altamente adaptadas aos animais, representadas por *Salmonella* ser. Gallinarum e Pullorum que determinam os quadros clínicos do tifo aviário em aves adultas e da pulorose em jovens; *Salmonella* ser. Choleraesuis e Typhisuis, agentes de processos patológicos em suínos e *Salmonella* ser. Dublin em bovinos.

Tanto a *Salmonella* ser. Choleraesuis e Dublin, infectando pacientes com doença crônica, idosos e /ou imunocomprometidos podem provocar um quadro septicêmico mais grave que aquele resultante da *Salmonella* ser. Typhi.

- Salmonelas zoonóticas, que incluem a maioria dos sorovares, sendo incriminados por infecções sub-clínicas e síndromes gastrointestinais (enterocolite) ou doenças de transmissão alimentar.

Especificamente, a febre tifóide é uma doença bacteriana aguda, de gravidade variável que está associada a condições sanitárias, de higiene pessoal e ambiental precárias, sendo frequente sua ocorrência sob forma de surtos relacionados com o consumo de água e/ou alimentos contaminados. A dose infectante varia de 10^1 a 10^6 (média de 10^3) células. Após a ingestão, são capazes de alcançar o intestino delgado e se multiplicarem no interior de fagócitos, invadindo desta forma as células M, desenvolvendo um quadro generalizado que envolve a participação ativa do sistema retículo endotelial (BAUMLER e KINGSLEY, 2000). Dentre suas características clínicas destacam-se septicemia, febre, mal estar, cefaléia, náusea, vômito e dor abdominal. Nas formas mais severas pode-se observar disfunção cerebral, delírio, choque e ocasionalmente perfuração intestinal e hemorragia (COSTA e HOFER, 1972).

O período de incubação pode variar de 3 dias a 3 meses, sendo em média de 1 a 3 semanas. Os portadores assintomáticos desempenham papel importante na disseminação da doença. Entre aqueles que se curam clinicamente, o número de portadores temporários é de 5 a 10 % (eliminam o micro-organismo por até 3 meses após o início do quadro clínico) e os portadores crônicos de *Salmonella* ser. Typhi, de 2 a 3% albergando a bactéria na vesícula biliar e eliminando-a durante toda a vida (JAKABI e PERESI, 2006).

Contudo, são as espécies zoonóticas que representam especialmente na atualidade, um sério problema de Saúde Pública em todo o mundo, pois estão associadas em quadros de gastroenterite, sendo responsáveis por significantes índices de morbidade e mortalidade, tanto nos países emergentes como desenvolvidos, determinando pequenos e grandes surtos envolvendo, principalmente, o consumo de alimentos de origem animal como ovos, carnes e produtos lácteos (SVS, 2011).

Burr et al. (1998) reconhecem que todos os sorovares de *Salmonella* são considerados potencialmente patogênicos, e seu grau de virulência dependem da própria linhagem, do hospedeiro e do meio ambiente. Cesco (2010) ainda reafirma que a patogenicidade e a virulência da *Salmonella* spp. estão relacionadas a diferentes fatores associados ao sorovar envolvido, dose infectante e pré-disposição do hospedeiro.

A ingestão de 10^5 a 10^8 células viáveis é o suficiente para o desenvolvimento da doença sintomática, o período de incubação pode variar em função da quantidade de células viáveis ingeridas e do sorovar envolvido. As primeiras manifestações clínicas aparecem em torno 12 a 36 horas após a ingestão e são caracterizadas por dor abdominal, diarreia, náuseas e vômito. Normalmente as infecções por *Salmonella* spp. são autolimitadas, com duração em torno de 7 dias. No entanto, em alguns casos, a doença pode evoluir para uma infecção extraintestinal, marcados por quadros de septicemia, otite, osteomielite, artrite, hepatite, pneumonia, meningite, entre outros (SVS, 2011).

Os micro-organismos penetram por via oral, sendo capazes de invadir a mucosa e se disseminar para as células adjacentes, resultando em enterocolite aguda. Normalmente o quadro diarreico é moderado, sem a presença de sangue, entretanto, em alguns quadros clínicos, pode ocorrer perda de pequeno volume de fezes associado a tenesmo e sangue.

Em particular, para indivíduos subnutridos ou com deficiência do sistema imune, o quadro pode ser efetivamente mais severo, incluindo quadros bacterêmicos, como o exemplo em pacientes portadores de SIDA, dos quais 20 a 60% relatam infecção gastrointestinal prévia (SVS, 2011).

Sua virulência é multifatorial, incluindo mobilidade, habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais, resistência à ação do complemento, produção de diferentes toxinas, cuja avaliação molecular de seus componentes, ainda necessita de ser ampliada, tendo em vista o reconhecimento quanto à participação de genes presentes em diferentes ilhas de patogenicidade, algumas das quais capazes de ser transferida através de DNA plasmidial (CASTILLA et al., 2006; OKAMOTO, 2009).

3.3.4 Ecologia

A salmonelose é uma das zoonoses mais complexa em sua epidemiologia e controle, cujos padrões diferem de uma região para outra. Isto se deve a diferenças nos hábitos alimentares, práticas na elaboração de alimentos, criação de animais e padrões de higiene e saneamento. Seu controle é permanente, tendo em vista a emergência de novos sorovares e reemergência de outros em determinadas áreas, tanto nos países emergentes quanto naqueles industrializados (SVS, 2011).

As salmonelas possuem vasta distribuição na natureza, sendo encontrada no trato intestinal dos animais e do homem. A principal via de transmissão é fecal-oral, por intermédio do contato direto ou indireto com animais infectados ou pela ingestão de alimentos e água contaminados, estando dispersas amplamente em ambientes onde há presença de animais e dejetos (KETZ-RILEY, 2003; MERMIN et al., 2004; DAVIES, 2007; SVS, 2011).

O micro-organismo é eliminado em grande número nas fezes, contaminando o solo e a água, permanecendo viáveis no meio externo por tempo prolongado. A sobrevivência das salmonelas pode variar entre 28 meses em fezes secas de aves, 30 meses no estrume bovino, 280 dias no solo cultivado e 120 dias na pastagem, sendo ainda encontrada em efluentes de água de esgoto, como resultado de contaminação fecal. A veiculação hídrica, conseqüentemente leva à contaminação de produtos agrícolas, como hortaliças, frutas, vegetais e leguminosas, que quando ingeridas cruas, determinam quadro gastrentérico no homem (ACHA e SZYFRES, 2003; CARDOSO e CARVALHO, 2006; SVS, 2011).

O caráter zoonótico deste gênero tem influência sob a suscetibilidade destes micro-organismos à pressão seletiva imposta pelas condições do ambiente, o que constitui um aspecto importante para se adaptar em diferentes nichos ecológicos, favorecendo sua disseminação em nosso meio (SVS, 2011).

Desta forma, constituem um dos maiores problemas de Saúde Pública, pois a maioria dos sorovares atinge indistintamente o homem, através do contato com animais domésticos ou pela ingestão de alimentos de origem animal e seus derivados, que desenvolvem manifestações clínicas de gastroenterite (enterocolite) e infecção alimentar (WHO, 2012).

Sua participação em surtos alimentares é capaz de determinar um impacto socioeconômico em vários países do mundo, principalmente nos industrializados, onde o agente etiológico desta enfermidade é relatado como o principal patógeno responsável por doenças transmitidas por alimentos (KOTTWITZ et al., 2010; VAZ et al., 2010; AFSCA, 2011; WHO, 2012; CDC, 2012).

Na cadeia epidemiológica, particularmente os animais de produção ocupam o ponto central na epidemiologia das salmoneloses entéricas, representando reservatório de importância sanitária e difícil controle.

Freitas Neto et al. (2010) ressaltam a importância de animais silvestres e domésticos como reservatórios de *Salmonella*, sendo um risco de contaminação para humanos e animais de produção (BERCHIERI JUNIOR e OLIVEIRA, 2006).

Especialmente as aves constituem um dos principais reservatórios de salmonela, representando um risco em potencial na transmissão para o homem. Nestes animais, os sorovares de *Salmonella* não apresentam seletividade por linhagens ou raças, sendo indistintamente encontrados em pombos, pássaros e principalmente em aves comerciais para consumo alimentar.

De acordo com o Escritório Internacional de Epizootias (OIE, 2010), as aves são capazes de transmitir a doença para o homem e outros animais, bem como contaminarem alimentos por contato direto e indireto, representando um dos mais importantes reservatórios implicados na propagação de *Salmonella* spp. na cadeia epidemiológica.

Nas aves, a transmissão de *Salmonella* spp. pode ser do tipo vertical ou horizontal. Por séculos o consumo de ovos sem cocção era uma prática comum do homem, porém na atualidade diferentes surtos evidenciados pela participação da *Salmonella* ser. Enteritidis e mais recentemente os outros sorovares (*Salmonella* ser. Heidelberg, Agona e Virchow) levaram ao reconhecimento de sua capacidade de transmissão transovariana, evidenciando sua disseminação ao homem através de alimentos onde são utilizados sem a devida cocção (WHITE et al., 2006).

A transmissão horizontal envolve todos os sorovares, os quais apresentam características ubíquas, e normalmente ocorre através do meio ambiente, onde portadores assintomáticos constituem um importante fator epidemiológico, pois a falta de sintomas e a dificuldade de técnicas para sua detecção antes ou durante a inspeção dos produtos de origem animal, os convertem em fonte contínua de contaminação do meio ambiente e, portanto dos alimentos (SVS, 2011).

Em outros tipos de alimentos de origem animal produzidos para o consumo, como leite, carnes bovinas ou suínas e seus subprodutos, a contaminação ocorre através da exposição direta e para a carne, usualmente durante as operações de abate (OLIVEIRA et al., 2012).

Particularmente, a contaminação em ambientes avícolas pode ser favorecida pelo uso de ingredientes contaminados por *Salmonella* spp., e especialmente as farinhas de origem animal são potencialmente consideradas as que determinam perigo e maior risco como veículos de infecção (BERCHIERI JUNIOR e OLIVEIRA, 2006).

Entre os métodos e os suplementos utilizados na alimentação desses animais, a farinha é uma matéria-prima de valor nutricional desejável pelos formuladores de ração. Os ingredientes utilizados em rações animais são basicamente originados do processamento industrial de tecidos animais, carne, osso e pena, elaboradas segundo as normas sanitárias vigentes. Embora a *Salmonella* spp. não resista às temperaturas de processamento da farinha, a contaminação ocorre através da veiculação por insetos, utensílios contaminados, armazenamento em locais com fezes contaminadas e também pela manipulação humana (KETZ-RILEY, 2003).

Quinn et al. (2005) sugerem que a contaminação da ração normalmente está relacionada às falhas no processamento e armazenamento e, reconhecem que podem representar um elo na disseminação de *Salmonella* spp. para outras fontes, incluindo ambiental, animal e humana.

Nesta prerrogativa, análises realizadas em diferentes partes do mundo apontaram a participação efetiva dos insumos de origem animal e ração, na veiculação de *Salmonella* spp., para várias fontes de infecção. No Brasil, destacam-se os trabalhos de Kaneto et al. (1996), que entre as matérias-primas utilizadas para a elaboração de rações destinadas a alimentação de galinhas poedeiras, evidenciaram a contaminação por *Salmonella* spp. em percentuais equivalentes a 40% em farinha de carne e 20 % em farinha de peixe, assim como, as avaliações realizadas por Hofer et al. (1998) em 2293 cepas de *Salmonella* spp. isoladas em 1976 e durante 12 anos consecutivos (1979 -1991) provenientes de matérias-primas e rações para aves, reconhecendo que a dimensão do problema passou a ser mais evidente, especialmente quando o incremento extraordinário da criação dos animais sob a forma intensiva estimulou o uso de rações como nutrição básica em plantéis avícolas. Segundo os autores, este veículo, mesmo albergando um discreto número de células viáveis, pode se constituir no ponto de partida do processo de colonização de *Salmonella* spp. num plantel.

3.3.5 Epidemiologia

Atualmente as doenças de transmissão alimentar (DTA) constituem alvo de discussão mundial na busca de estratégias que permitam o controle de patógenos transmitidos através dos alimentos e garantia da colocação de produtos inócuos no mercado consumidor. O aumento de sua casuística no mundo atual industrializado é produto de inúmeros fatores, tais como o desenvolvimento econômico, a globalização do comércio de alimentos, a intensificação da urbanização e a modificações dos hábitos alimentares dos consumidores, com aumento do consumo de alimentos frescos ou "in natura", preferência por alimentos prontos ou semi-prontos e o consumo de refeições fora do domicílio.

Dados fornecidos pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estimam que anualmente, nos Estados Unidos da América, as doenças transmitidas por alimentos acometem 76 milhões de pessoas, resultando em 325 mil hospitalizações e 5 mil óbitos, entre os quais cerca de 40% são de origem bacteriana, e aproximadamente 4 milhões são causados por *Salmonella* spp. (WHO, 2012).

As salmoneloses estão incluídas neste contexto, sendo considerada a doença transmitida por alimentos que mais preocupa as autoridades sanitárias em nível mundial. Atualmente, estimam-se em torno de 8000 mortes/ano nos Estados Unidos, com incidência de cerca 20 casos por 100.000 habitantes/ano. Na Hungria e na Finlândia a estimativa é de 120 casos por 100.000 habitantes/ano (WHO, 2012). Em razão da sua elevada endemicidade e, sobretudo, pela dificuldade de controle (SANTOS et al., 2002; ANTUNES et al., 2003), representam uma das zoonoses mais problemáticas para a Saúde Pública em todo o mundo, com significantes índices de morbidade e mortalidade (CARDOSO et al., 2002).

Nos alimentos, os produtos de origem animal são os maiores responsáveis pela distribuição mundial deste gênero, representados principalmente pela carne de frango e subprodutos; e ovos cuja cocção incompleta pode servir de veículo a salmonelose humana. Inúmeros surtos de infecção alimentar já foram descritos envolvendo alimento desta origem e derivados (WHO, 2012). Rodrigues et al. (2010) reconhecem que a preocupação com a segurança alimentar das populações é um tema real e atual, tendo em vista inúmeros surtos associados à ingestão de alimentos de origem aviária contaminados por *Salmonella* spp. reportados em todo o mundo.

Na Austrália, Dalton et al. (2004) ao revisarem no período de 1995 a 2000, 293 surtos de DTA, concluíram que *Salmonella* spp. esteve incriminada com maior frequência, sendo responsável por 40% dos óbitos ocorridos, onde entre os alimentos envolvidos, a carne de frango esteve associada em 27 deles. Nos Estados Unidos, Chittick et al. (2006) analisaram 6633 surtos de DTA no período de 1973 a 2001, constatando que *Salmonella* ser. Heidelberg foi responsável por 184 surtos, sendo que destes 53 foram provocados pelo consumo e ingestão de carne de aves, bem como ovos e alimentos elaborados a partir dessas fontes.

Em relação ao Brasil, as DTA não diferem muito das observadas em outros países. O gênero *Salmonella* tem sido descrito em alimentos tais como carnes cruas de bovinos, suínos e aves; salsicha de porco; ovos e seus derivados quando consumidos crus ou mal cozidos e vegetais.

Sob este aspecto, o perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos em estudos nacionais evidenciaram no período entre 2005 a 2010, 4.716 surtos notificados, com 98.018 pessoas acometidas e registros de 39 óbitos segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (WHO, 2012). Particularmente no Estado de São Paulo, foram notificados ao Departamento de Vigilância Epidemiológica (DEVEP/SVS), 878 surtos de doenças transmitidas por alimentos, com 20.471 casos. No Rio Grande do Sul, foram notificados 1.275 surtos de DTA residenciais, atribuídas a ingestão de alimentos de origem animal (44%) e 18% por alimentos de origem mista. Basicamente entre as matrizes alimentares envolvidas, 83,6% dos casos tiveram alimentos oriundos da cadeia avícola com incidência de 72,2% de alimentos preparados com ovos e 11,4% de carne de frango. No entanto, esse quadro não demonstra completamente a realidade atual, visto que muitas vezes há a falta/omissão de notificação de casos ao Sistema de Saúde.

Desta forma, estudos de caráter epidemiológico vêm sendo realizados contribuindo para evidenciar os principais agentes envolvidos em DTA, e especialmente para as salmonelas tem representado uma ferramenta importante para a identificação de sorovares emergentes, re-emergentes e/ou exóticos introduzidos em nosso meio.

Isto pode ser constatado pelas mudanças constantes que vem sendo observadas nos últimos anos em relação à distribuição, frequência e prevalência de determinados sorovares em diversos lugares do mundo. Ressalta-se o aparecimento súbito e multifocal da *Salmonella* ser. Agona no início da década de 70 nos Estados Unidos, Reino Unido, Holanda e Israel (CLARK et al., 1973), cuja introdução recaiu na hipótese sobre a contaminação da farinha de peixe peruana utilizada como ingrediente das rações, sendo posteriormente veiculada, implantada e propagada em diferentes espécies animais de abate, atingindo subsequentemente o homem. De modo semelhante, difundiu-se internacionalmente, situando-se em posição de relevância em vários países, constituindo o sorovar mais prevalente no Brasil especialmente na década de 80 (SOLARI et al., 1986).

No entanto, este panorama foi alterado com a emergência da *Salmonella* ser. Enteritidis a partir dos anos 90, representando um sério problema no setor avícola e em Saúde Pública, devido seu elevado índice em quadros de infecções humanas, decorrentes da ingestão de alimentos contaminados (REIS, 1994; OLSEN et al, 2001; CARDOSO e CARVALHO, 2006).

Durante esta década, salmonelose humana por *Salmonella* ser. Enteritidis vinha sendo descrita como um grave e crescente problema em vários países de avicultura desenvolvida, particularmente nos Estados Unidos (EUA) e União Europeia (HUMPHREY, 1990; BARROW, 1993; MUNRO et al., 1999; VELGE et al., 2005; ASSEVA et al., 2006), com os quais o Brasil vinha mantendo forte intercâmbio comercial na compra de material genético (SILVA e DUARTE, 2002).

Conseqüentemente, o reflexo da disseminação da *Salmonella* ser. Enteritidis foi prontamente evidenciada no Brasil, pelas constatações realizadas por Peresi et al. (1998) de surtos ocorridos no estado de São Paulo no período entre 1993 a 1997; Alves et al. (2001) em São Luís /MA; e ainda na região Sul, por Santos et al. (2002), no período 1995 e 1996; Geimba et al. (2005), em 1999 e 2000; e Oliveira (2005) entre 2001 e 2002.

Contudo, as investigações epidemiológicas demonstravam um panorama muito semelhante e reconheciam que em todas as partes do mundo, os surtos estavam estreitamente relacionados com o consumo de produtos avícolas contaminados, como carne de frango, ovos e alimentos a base de ovos (HUMPHREY, 1990; ZEIDLER, 1996; PERESI et al., 1998; BARBOUR et al., 1999; CHANG, 2000; ALVES et al., 2001; GIL-SETAS et al., 2002; KOTTWITZ et al., 2010).

Na avicultura, as primeiras detecções de *Salmonella* ser. Enteritidis em matrizes no Brasil ocorreram entre 1993 e 1994 e eram feitas em aves reagentes no teste de pulrose enviadas para exames bacteriológicos laboratoriais (SILVA e DUARTE, 2002).

A partir daí, o aumento significativo da ocorrência de *Salmonella* ser. Enteritidis foi sendo retratada em algumas áreas geográficas brasileiras, como as observações feitas por Irino et al. (1996) em São Paulo, que constataram a introdução e disseminação de *Salmonella* ser. Enteritidis fagotipo PT4 a partir de 1993, através do intercâmbio comercial de matrizes de aves com países da Europa.

Mais tarde, Andreatti Filho (2001) apontam a predominância de *Salmonella* ser. Enteritidis entre todos os sorovares isolados entre 1994 e 1999 pelo Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, SP com percentuais correspondentes a 75,6% dos 45 sorovares isolados de aves no período, em semelhança aos resultados obtidos por Silva e Savano (2002) que detectaram em material de galinha recebido pelo Laboratório de Diagnóstico Avícola no Rio Grande do Sul, a prevalência de *Salmonella* ser. Enteritidis em todos os anos avaliados entre 1997 a 2001.

Desta forma, *Salmonella* ser. Enteritidis passou a ser considerada como o sorovar de maior relevância para avicultura, conjuntamente com a *Salmonella* ser. Pullorum, Gallinarum e Typhimurium, fazendo com que a partir de 1995, o Ministério da Agricultura e Agropecuária (MAPA) reforçasse a legislação de controle de *Salmonella* ser. Enteritidis nas granjas avícolas com a implantação do Programa Nacional de Sanidade Avícola, que constitui uma importante ferramenta de vigilância, controle e erradicação das principais doenças aviárias que possuem impacto na Saúde Pública (MAPA, 1994).

Contudo, o histórico epidemiológico da *Salmonella* spp. é caracterizado pelo predomínio de alguns sorovares que se mantêm disseminados em estágio contínuo. Inclui-se neste contexto, a *Salmonella* ser. Typhimurium, reconhecida durante muitos anos como importante sorovar isolado de diferentes fontes da cadeia alimentar no Brasil (HOFER et al., 1979; MEDEIROS, 2006; REIS et al., 2011).

Relatos neste sentido foram enfatizados nos estudos realizados por Bouvet e Grimont (2001), verificando que aproximadamente 60% dos casos humanos reportados pelo CDC (2012) tinham como etiologia *Salmonella* ser. Typhimurium (22,1%), Enteritidis (17,7%), Newport (10,0%) e Heidelberg (5,9%).

Em 2004, dos 15806 casos de infecção diagnosticados nos Estados Unidos, 6464 foram atribuídos a *Salmonella* spp., sendo que 5942 (92%) pertenciam a cinco sorovares correspondendo a 56% das infecções, onde *Salmonella* ser. Typhimurium foi o mais prevalente (1170 - 20%), seguido dos sorovares Enteritidis (865-15%), Newport (585 - 10%), Javiana (406 - 7%) e Heidelberg (304 - 5%).

Particularmente no Brasil, há evidências de alguns sorovares mais prevalentes como *Salmonella* ser. Enteritidis, Typhimurium, Mbandaka, Minnesota, Panama, Infantis. Estes sorovares detectados através de estudos epidemiológicos e de monitoramento demonstram oscilações quanto à sua frequência, no entanto se mantém presentes em níveis variáveis em todas as fontes da cadeia alimentar (RODRIGUES et al., 2010).

Esta assertiva pode ser consolidada pelas observações realizadas por Hofer et al. (1997), que ao avaliar a prevalência de *Salmonella* em aves no Brasil entre 1962 a 1991, verificaram a circulação de *Salmonella* ser. Agona, Saintpaul, Typhimurium, Hadar e Enteritidis durante os anos avaliados, reconhecendo que as flutuações daqueles dominantes numa região, quase sempre retratam primariamente este acontecimento nas aves com projeções futuras para outras fontes de infecções.

Kottwitz et al. (2010), em avaliações sob o ponto de vista epidemiológico dos surtos ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, constataram a prevalência de *Salmonella* ser. Enteritidis em 87,8% dos casos, embora outros sorovares como London, Mbandaka, Newport e Oranienburg tenham sido detectados em amostras de pacientes.

Os autores consideram que os alimentos mais frequentes envolvidos nestes surtos, foram aqueles à base de ovos e subprodutos de aves, evidenciando além de *Salmonella* ser. Enteritidis em 80,6% das amostras, a circulação de outros sorovares (Anatum, Derby, Infantis, Johannesburg e Typhimurium) isolados tanto em amostras provenientes de pacientes quanto de alimentos, e *Salmonella* ser. Agona, Albany, Branderup, Heidelberg, Pomona, Saintpaul somente em alimentos.

Um levantamento epidemiológico recentemente realizado pelo Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB, IOC/FIOCRUZ/RJ) apontou um panorama global dos sorovares de *Salmonella* circulantes no país no período de 2000 a 2009, retratando a incidência de *Salmonella* spp. em diferentes fontes da cadeia epidemiológica, incluindo isolados de fonte humana, alimentar, animal, ambiental, matéria-prima e rações (RODRIGUES et al., 2010). Segundo os autores, o número de sorovares detectados neste período (em torno de 93), manteve-se relativamente constante, mas avaliando a ordem dos sorovares individualmente dentro do ranking de prevalência, podem-se observar flutuações ano a ano. Neste estudo, foi possível reconhecer que particularmente a *Salmonella* ser. Enteritidis foi considerada durante 7 anos o sorovar mais prevalente em isolados de origem humana, cujos índices diminuíram a partir de 2004, dando lugar a *Salmonella* ser. Typhimurium. Em cepas de origem animal, entre os 10 mais prevalentes nos anos de 2008 e 2009, destacaram-se a *Salmonella* ser. Typhimurium, Enteritidis e Schwarzengrund, enquanto que para as provenientes de matéria-prima, rações e ambiente, os índices apontaram a prevalência dos sorovares Agona, Panama, Minnesota e Senftenberg, envolvendo diferentes regiões do país. Por outro lado, em cepas de origem alimentar, o aumento da incidência de *Salmonella* ser. Corvallis vêm sendo evidenciado nos últimos anos, desde sua introdução em 2007 (RODRIGUES et al., 2010).

3.4 Métodos de Subtipagem em *Salmonella*

Subtipagem é a análise das características de um grupo de isolados bacterianos que permitem a discriminação abaixo do nível de espécie, através de métodos feno e genotípicos (SWAMINATHAN e MATAR, 1993).

Segundo Tenover et al. (1997), os métodos de tipagem são categorizados em convencionais ou fenotípicos, os quais avaliam os produtos de expressão gênica apresentadas pelos micro-organismos; e moleculares ou genotípicos que analisam as estruturas genéticas responsáveis por estas características. A combinação de ambos é capaz de fornecer evidências laboratoriais sobre a identidade de isolados relacionados sob o ponto de vista epidemiológico.

Historicamente, entre a década de 60 e 70, os esquemas de identificação bacteriana basicamente se pautavam na avaliação das características metabólicas, dos quais a variabilidade de determinados testes, como a produção de indol, pigmentos, ácido sulfídrico, eram considerados marcadores para determinados micro-organismos. Segundo Hofer et al. (1990), por alguns anos o comportamento bioquímico emergiu como uma metodologia útil nas investigações epidemiológicas, tendo em vista que o uso de determinadas provas bioquímicas representavam fatores preponderantes para a diferenciação dos gêneros da família Enterobacteriaceae.

Contudo, a própria evolução no campo científico conduziu a introdução de novas metodologias, sob o ponto de vista molecular, que permitiam elucidar as inúmeras variações, baseados na presença ou ausência de atividades metabólicas ou biológicas expressas pelos micro-organismos (ARBEIT et al., 1995; FARBER, 1996).

Particularmente em *Salmonella*, a adaptação a um grande número de diferentes nichos evolucionários tem levado a um alto grau de diversidade fenotípica e genotípicas em linhagens de *Salmonella* spp. (BESSA, 2006).

Entre os métodos clássicos de tipagem fenotípica destacam-se a sorotipagem, fagotipagem, colicinogenia e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Estes constituíam ferramentas epidemiológicas de grande valor na caracterização do gênero *Salmonella*, devido a sua estabilidade, reprodutibilidade e tipabilidade (TENOVER et al., 1997).

A sorotipagem é a metodologia mais comumente empregada para diferenciar linhagens em *Salmonella* spp., baseados nos determinantes antigênicos da superfície celular bacteriana, através da avaliação dos antígenos somáticos (O), capsulares (Vi) e flagelares (H) dentro de distintos sorovares. No entanto, o uso desta técnica está limitado aos Laboratórios de Referência e para fins epidemiológicos, é adequado que esteja associada a outras metodologias, pois um único sorotipo pode ser isolado de uma grande diversidade de fontes (SVS, 2011).

A fagotipagem constitui em uma técnica relativamente rápida, de baixo custo e altamente discriminatória para distinguir linhagens de *Salmonella* spp., através da caracterização bacteriana baseada na suscetibilidade a um painel definido de bacteriófagos.

Alguns relatos em literatura evidenciam sua utilização, reconhecendo os fagotipos de *Salmonella* spp. prevalentes no Brasil. Destacam-se os estudos de Hofer (1990) e Quintaes et al. (2002) em *Salmonella* ser. Typhi isoladas no Brasil, àqueles descritos por Peresi et al. (1998), Oliveira et al. (2003), Ribeiro et al. (2007), Kottwitz et al. (2010) em *Salmonella* ser. Enteritidis, os de Pereira et al. (2007a) em *Salmonella* ser. Hadar e Pereira et al. (2007b) em *Salmonella* ser. Typhimurium.

Particularmente em *Salmonella* ser. Typhimurium a aplicação desta metodologia apresenta relevância sob o ponto de vista epidemiológico, principalmente nas cepas DT104 que apresentam associação ao perfil ACSSut, representado por genes que conferem

multirresistência a antimicrobianos (CHIU et al., 2006; CY et al., 2008; GREENE et al., 2008; NIELSEN et al., 2009; REIS et al., 2011).

Hofer et al. (1979), considerando sua relevância para Saúde Pública, estabeleceu considerações ecológicas e epidemiológicas sobre a circulação de cepas de *Salmonella* ser. Typhimurium provenientes de diversas fontes da cadeia alimentar no Brasil, reconhecendo a presença dos fagotipos DT193 entre aquelas de origem humana, animal e alimentar, que paralelamente apresentavam o perfil de resistência ao ácido nalidíxico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, furazolidona, canamicina, sulfadiazina e tetraciclina. Em semelhança, Medeiros (2006), evidenciou sob o ponto de vista epidemiológico, os fagotipos DT193 e DT104 entre aqueles circulantes no Brasil no período entre 1999 a 2003, estabelecendo sua correlação quanto ao seu perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Mais recentemente, Reis et al. (2011) em um estudo abrangente de isolados entre as décadas de 1970 e 2008, apontaram que a prevalência de DT193 tem sido crescente desde a década de 90.

Em adição aos métodos convencionais, o padrão de suscetibilidade aos antimicrobianos tem representado uma técnica de extrema valia, tendo em vista a evolução de resistência às drogas antimicrobianas desde a década de 50, com flutuações que envolvem uma combinação entre fontes de isolamento e sorovares, alguns dos quais aparentemente mais suscetíveis à pressão seletiva do ambiente. Embora seu poder discriminatório seja reduzido, em casos cujo padrão de resistência é singular, sua aplicabilidade ganhou ênfase como metodologia epidemiológica, tendo sido indispensável nas rotinas laboratoriais, tanto na área clínica quanto de pesquisa, sendo na atualidade empregada como primeira avaliação de relevância particularmente em regiões com dificuldades de aplicação de outras metodologias adicionais.

A avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos constitui uma técnica rotineiramente utilizada em atividades de rastreamento epidemiológico. Em *Salmonella* spp., vêm delineando características peculiares quanto à resistência a determinadas drogas antimicrobianas e sua disseminação na cadeia alimentar. Desta forma, sua utilização vem sendo evidenciada em um número grande de sorovares de *Salmonella* isoladas de diferentes fontes de infecção. Esta pode ser exemplificada pelos relatos realizados por Threfall et al. (1997), Asseva et al. (2006), Ribeiro et al. (2008), em salmonelas responsáveis por infecções humanas, assim como avaliações descritas por Manie et al. (1998), Cortez et al. (2006), Ribeiro et al. (2007), Spricigo et al. (2008), Kim et al. (2012) e Thai et al. (2012) em cepas provenientes da contaminação de alimentos de origem animal, especialmente aves e suínos.

No entanto, de acordo com Farber (1996), os usos de marcadores fenotípicos podem levar a avaliações contraditórias pela sua instabilidade em certas condições ambientais ou de cultivo. Esta assertiva conduziu ao aprimoramento dos métodos tradicionais de tipagem e à associação aos métodos moleculares, permitindo discriminar cepas bacterianas a partir da análise de proteínas/enzimas e, principalmente, de DNA.

A utilização de métodos moleculares para a identificação e diferenciação de linhagens de micro-organismos patogênicos apresenta diversas vantagens sobre os métodos convencionais, devido à própria estabilidade do DNA, além das características de sensibilidade e especificidade dos métodos.

Segundo Hunter (1990), os métodos de tipificação molecular devem atender a três critérios básicos: poder discriminatório, reprodutibilidade e capacidade de tipificar diferentes micro-organismos.

De acordo com Maslow et al. (1993), os sistemas de tipificação molecular podem ser empregados para a investigação de surtos, confirmação e delineamento dos perfis de transmissão de uma ou mais linhagens, formulação de hipóteses sobre origem e veículos de transmissão destas linhagens e monitoramento de seus reservatórios, permitindo levantamentos epidemiológicos fidedignos e avaliação de medidas de controle.

Dentre os métodos moleculares de tipificação mais comumente utilizados na caracterização de *Salmonella* spp., destacam-se a avaliação plasmidial, métodos baseados em PCR (RFLP, RAPD, REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR) e análises de padrões de restrição de DNA como a técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis* (MLVA) e o sequenciamento de DNA.

Particularmente, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR- *Polymerase Chain Reaction*) foi desenvolvida por Kary Mullis em meados da década de 80 (MULLIS e FALOONA, 1987). Essa técnica, desde sua introdução, causou uma grande revolução na biologia, tanto na pesquisa, para o entendimento dos processos biológicos fundamentais, como nas áreas de diagnósticos e melhoramento genético de micro-organismos.

A PCR é uma técnica que envolve a síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. A reação se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizadas como iniciadores (*primers*), que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Esses iniciadores são sintetizados artificialmente, de maneira que suas sequências sejam complementares àquelas que se deseja amplificar. Por detectar uma região única do genoma bacteriano, a técnica da PCR demonstra maior especificidade do que os métodos bacteriológicos usuais (MULLIS e FALOONA, 1987).

A PCR tem sido atualmente, considerado uma estratégia utilizada e citada por muitos autores como eficiente e rápida para detecção de vários micro-organismos, assim como para estudos de caráter epidemiológico nas avaliações de genes associados à virulência e resistência aos antimicrobianos.

Como uma variação da PCR tradicional, a PCR multiplex pode ser utilizada como um método alternativo para a detecção simultânea de sequências-alvo numa mesma amostra. É considerada uma técnica simples e rápida, baseada em uma reação de amplificação desenhada que permite reconhecer múltiplas sequências a partir de primers randômicos com cadeias curtas de oligonucleotídeos para amplificar regiões repetitivas do DNA genômico, empregado em estudos epidemiológicos.

Atualmente a PCR multiplex, tem sido uma técnica comumente utilizada para o diagnóstico e a avaliação de marcadores de virulência e resistência em *Salmonella* spp. Isto pode ser exemplificado através trabalhos reportados por Nayzaki et al. (2004); Castilla et al. (2006); Chiu et al. (2006); Okamoto (2009); Cesco (2010).

Desde sua descoberta, diversas adaptações têm sido realizadas, revelando um significativo número de aplicações, particularmente na epidemiologia das infecções. Para subtipagem em *Salmonella*, destacam-se sua associação ao RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), onde as regiões alvo são inicialmente amplificadas por PCR e o produto da amplificação é digerido por enzimas de restrição (PAIVA et al., 2009; AKBARMEHR et al. 2010); RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*), utilizada em estudos de caracterização e diferenciação molecular de *Salmonella* (MALORNY et al., 2001; SANTOS, 2004; JIN et al., 2006; OLIVEIRA, 2005; SANTOS et al., 2008). Contudo a baixa reprodutibilidade vem reduzindo sua utilização epidemiológica. Outrossim, métodos como REP-PCR (*Repetitive Sequence Extragenic Palindromic*), ERIC PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e BOX PCR, apresentam melhor poder discriminatório

através da amplificação de elementos de DNA repetitivos altamente conservados (BURR et al., 1998; ALCOCER et al., 2006; ALBUFERA et al., 2009).

Como exemplo da utilização de diferentes técnicas fenotípicas e genotípicas na epidemiologia de *Salmonella* em nosso meio, são citados trabalhos de Quintaes et al. (2002) em *Salmonella* ser. Typhi; Bessa (2006) e Marjo (2006) em *Salmonella* ser. Typhimurium; Reis (1994) e Oliveira et al. (2007) em *Salmonella* ser. Enteritidis. É importante ressaltar que em todas as avaliações, estes autores admitem que a escolha de um único método de tipificação pode ser insuficiente para a identificação precisa de uma linhagem. Sendo assim, o que se tem observado é a utilização de sistemas múltiplos de tipagem, onde a combinação entre métodos fenotípicos e moleculares vem sendo empregados como uma ferramenta essencial para o reconhecimento de características epidemiológicas e de patogenicidade, com o intuito de fornecer informações sobre a ocorrência da *Salmonella* spp. na natureza, assim como sua evolução e alterações fisiológicas e genéticas.

3.5 Resistência Antimicrobiana

A resistência aos antibióticos, entre os vários gêneros bacterianos, representa um problema de Saúde Pública mundial. Segundo a WHO (2012), seu aumento tem ocorrido de forma alarmante nos últimos anos, sendo estimado que, no futuro, o uso de fármacos para o tratamento de infecções possa resultar em perda de efetividade.

Para alguns estudiosos, a situação caminha para o que foi vivenciado na era do pré-antibiótico, uma vez que o surgimento de novos recursos terapêuticos não acompanha a evolução dos mecanismos de resistência (YIM et al., 2006; SANDIUMENGE et al., 2006).

Segundo Guimarães et al. (2010) a resistência bacteriana é considerada um fenômeno biológico natural e a cada vez que se introduz uma nova droga na prática clínica e/ou veterinária, micro-organismos de alta capacidade de adaptação se tornam resistentes, podendo esta ser de diferentes mecanismos. Fuchs (2004) conceitua que a do tipo primário é apresentada por espécies bacterianas naturalmente resistentes aos antimicrobianos. E a adquirida consiste em um fenômeno genético relacionado à existência de genes contidos em micro-organismos que codificam diferentes mecanismos bioquímicos, impedindo a ação de diversos fármacos (FRERE, 1995; KAYE et al., 2000).

A resistência bacteriana não respeita fronteiras e seu aparecimento em localidades remotas pode resultar em impacto para o mundo em curto intervalo de tempo. A eliminação destes micro-organismos no meio ambiente é resultante de sua utilização, muitas vezes indiscriminada, destes fármacos em medicina humana, veterinária e nas práticas agrícolas (FUCHS, 2004; ANGULO et al., 2004; PALERMO NETO e ALMEIDA, 2006; JUNIOR et al, 2010).

Particularmente na avicultura, são apontadas inúmeras considerações referentes ao seu uso na produção animal e resistência resultante do processo adaptativo de alguns micro-organismos, assim como a capacidade de perpetuar essas características para seus descendentes (KANETO et al., 1996; HOFER et al., 1998; HASMAN et al., 2005; AARESTRUP et al., 2007).

Junior et al. (2010) apontam ainda que o uso em doses sub-terapêuticas de antimicrobianos na prática veterinária, leva a seleção de um pool de genes transferíveis para bactérias comensais, os quais através de pressão seletiva, sobrevivem e se disseminam pela cadeia alimentar. Considerando ecossistema global, a resistência aos antimicrobianos

adquirida é descrita praticamente em todas as espécies, infectando agentes etiológicos de diferentes nosologias, entre estes, *Salmonella* (ASSEVA et al., 2006).

Uma série de investigações demonstra que os mecanismos de resistência podem ocorrer via modificação do DNA dos micro-organismos ou por produção de moléculas, reações ou comportamentos transmissíveis a outros descendentes ou não. Além disso, podem envolver o DNA cromossomal, como a mutação, ou ser feito pela aquisição de material genético extracromossomal por transdução, transformação ou conjugação de genes (KAYE et al., 2000; SCHWARZ e CHASLUS-DANCLA, 2001; ALEKSHUN e LEVY, 2007; SOUZA et al., 2010).

A resistência antimicrobiana extracromossômica envolve disseminação em nível clonal, associada à replicação cromossômica, através de replicons, transferência de plasmídeos ou migração de genes com replicação de transposons, os quais coexistem na natureza e se multiplicam de forma exponencial, tendo em vista que estão associados com a duplicação do DNA. Resistência a 12 drogas foi observada em um simples plasmídeo de uma enterobactéria (LEDUC, 1996). Podem ser citadas diferentes situações, por exemplo, no sudeste da Ásia observado em *Salmonella* ser. Typhi resistente ao cloranfenicol, tetraciclina e ampicilina (MIRZA et al., 2000).

Como abordagem da evolução histórica da resistência aos antimicrobianos em nível de Brasil, inúmeras avaliações individuais, relacionadas ao monitoramento da resistência vêm sendo efetuadas desde a década de 50, tendo Cisalpino (1957) analisado a sensibilidade de salmonelas isoladas a partir de 1947 e verificado o aumento progressivo de amostras resistentes. Entre as décadas de 60 e 70 este percentual ascendeu tendo sido apontado por Costa et al., 1964 e Hofer, 1974. Durante os anos 80, estudos realizados em diferentes regiões do país, em cepas de origem humana, alimentar, animal e ambiental, revelam a resistência simples ou múltipla em *Salmonella* spp., bem como capacidade de transferência destes marcos (QUEIROZ et al., 1985; CAMPOS e HOFER, 1989). Resultados similares foram obtidos por Solari et al. (1986) em *Salmonella* ser. Agona, Reis (1994) em *Salmonella* ser. Enteritidis e Reis et al. (2011) em *Salmonella* ser. Typhimurium, das quais foram isoladas de várias fontes e regiões do país.

Sua prospecção na cadeia de animais de produção vem sendo evidenciada em diversas partes do mundo, especialmente em países onde a avicultura é considerada uma atividade de expansão. Esta assertiva pode ser corroborada pelas observações obtidas por Frye e Fedorka-Cray (2007) quanto ao perfil de suscetibilidade em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de origem animal nos Estados Unidos, Kim et al. (2012) em carne de frango processados na Coreia e Thai et al. (2012) em carne suína e de ave comercializadas no Norte do Vietnã.

Na Europa, o resultado de um estudo realizado por Carraminãna et al. (2004), em Zaragoza, na Espanha, demonstraram resistência equivalente a 96,2% entre cepas de *Salmonella* spp. isoladas de um abatedouro de aves, com multirresistência em 65,4% a drogas correspondentes as tetraciclina, aminoglicosídeos e sulfonamidas.

Mais recentemente, a avaliação realizada por Álvarez-Fernández et al. (2012) em salmonelas isoladas de pele e cortes de carcaças de frangos de corte no Noroeste da Espanha, nos anos de 1993 e 2006, evidenciaram a resistência em 100% das cepas (N=69), com variação de 3 a até 13 marcos distintos.

Assim como Bacci et al. (2012) analisaram 123 amostras de *Salmonella* spp. provenientes de carnes de frango e codorna da Itália e detectaram entre os sorovares prevalentes 86,1% de resistência à tetraciclina e 30,5% de multirresistência para ampicilina, sulfametoxazol e tetraciclina. Em semelhança aos resultados obtidos por Corona et al. (2012) em carne de frango importada por Cuba, onde das 83 amostras, 32,1% mostraram-se

resistentes à tetraciclina, 25% à ampicilina, 17,9% à ceftazidima, 10,7% à ceftriaxona e 3,6% ao ácido nalidíxico.

No Brasil, o panorama evolutivo da resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp. provenientes em aves comercializadas (carcaças, cortes e/ou subprodutos), foram catalogados por Vessoni (2004) que avaliaram a resistência antimicrobiana em cepas isoladas de carcaças, verificando nesta época um percentual acentuado de resistência para drogas utilizadas como promotores de crescimento.

Rezende et al. (2005), ao analisarem *Salmonella* spp. de carcaças de frangos de agroindústrias goianas, constataram resistência múltipla em cepas pertencentes aos sorovares Enteritidis, Typhimurium e Muenster, para beta-lactâmicos (incluindo ampicilinas e cefalosporinas de 1ª e 2ª geração), aminoglicosídeos e fencóis.

Posteriormente, Ribeiro et al. (2006) analisaram os níveis de resistência em 22 cepas de *Salmonella* ser. Hadar provenientes de carcaças de frango congeladas no estado do Rio grande do Sul, revelando 100% de resistência à tetraciclina, estreptomicina e sulfazotrim e 86,36% ao ácido nalidíxico, 18,18% a nitrofurantoína e 4,5% ao cloranfenicol.

Já nas avaliações realizadas em cepas provenientes de carcaças de frango do nordeste brasileiro, Duarte et al. (2009) constataram que 94,7% eram resistentes a pelo menos um antimicrobiano, demonstrando entre os perfis detectados uma maior prevalência para os marcadores nitrofurantoína, ácido nalidíxico e tetraciclina.

Embora estudos desta natureza venham sendo elucidados ao longo dos anos por uma série de investigações individuais, em 2004 a Agência de Vigilância Sanitária e laboratórios colaboradores em todo país, tomaram a iniciativa de implantar o Programa de Monitoramento da Prevalência e Resistência Antimicrobiana em Frango (PREBAF). Neste estudo foram coletadas 2.710 unidades amostrais de carcaças de frango congeladas colhidas no comércio, obtendo como análise preliminar, resultados equivalentes ao percentual de 4% para o isolamento de *Salmonella* spp. e consideraram como mais preocupante, o alto nível de resistência encontrado na totalidade das cepas (ANVISA, 2008).

3.6 Mecanismos de Resistência Antimicrobiana

O conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos é de grande importância para se entender como a bactéria pode desenvolver a resistência aos antimicrobianos. Entre os principais mecanismos, destacam-se a produção de enzimas que destroem ou inativam as drogas, alterações na permeabilidade da membrana impedindo ou dificultando a penetração do antibiótico; hiperexpressão de bombas de efluxo e alteração do sítio alvo do antibiótico (SCHWARZ e CHASLUS-DANCLA, 2001, ALEKSHUN e LEVY, 2007).

3.6.1 Mecanismo de Resistência aos Beta-lactâmicos

A resistência bacteriana ao grupo dos Beta-lactâmicos ocorre por diversos mecanismos, sendo a produção de enzimas beta-lactamases o de maior interesse entre bactérias Gram-negativas, como as salmonelas. Estas enzimas agem catalisando a hidrólise do anel beta-lactâmico, sendo capaz de inativar a ação de vários antibióticos pertencentes a esta classe (SANDIUMENGE et al., 2006).

A produção de beta-lactamases (ESBL) por enterobactérias é o mecanismo de resistência mais comum aos antibióticos beta-lactâmicos, especialmente àqueles considerados de amplo espectro (ESBL). A ação hidrolítica destas enzimas pode conferir clinicamente, resistência às penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, mas não às cefamicinas e carbapenemas. No entanto, cepas produtoras de ESBL podem ser capazes de degradar carbapenêmicos, quando estão associados a outro mecanismo de resistência.

As beta-lactamases são codificadas por genes chamados *bla*, podendo estar presentes no DNA cromossomal ou plasmidial. A expressão dos genes *bla* pode ser induzida pela presença dos beta-lactâmicos ou estar continuamente ativada. Assim, as beta-lactamases podem estar presentes de forma induzível ou constitutiva (FRERE, 1995).

Atualmente, já foram descritas mais de 890 enzimas distintas, cuja classificação apresenta alto nível de complexidade e subdivisões propostas, no entanto as mais utilizadas são as descritas por Ambler (1980) e Bush e Jacob (2010).

A classificação molecular proposta por Ambler (1980) considera a homologia da sequência de nucleotídeos e aminoácidos, agrupando as beta-lactamases em quatro classes: A, B, C, D. Já a classificação funcional proposta por Bush e Jacob (2010) dividem as beta-lactamases em quatro grupos (1, 2, 3,4) relacionando suas características bioquímica, enzimáticas e imunológicas.

Seguindo esta classificação, entre os grupos de enzimas mais encontrados em enterobactérias, destacam-se o Grupo 1, constituindo a cefalosporinases. Estas enzimas pertencem à classe molecular C de Ambler, e são codificadas por cromossomos. Suas características englobam sua atividade maior sobre as cefalosporinas, especialmente a cefoxitina, que pode ser utilizado como marcador para caracterização desta enzima.

Como variação resultante de mutações, destaca-se o subgrupo 1c, com maior atividade sobre a ceftazidima e outros oximino- β – lactâmicos (ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima e cefpodoxima), denominadas beta-lactamases de espectro estendido do tipo AmpC (BUSH e JACOBY, 2010). Este grupo engloba enzimas de importância epidemiológica para a resistência especialmente à cefalosporinas de 3ª geração e pode ser avaliado pela pesquisa dos genes *bla_{CMY}* entre outros. E ainda, o grupo 2 onde estão classificadas as serina beta-lactamases das classes moleculares A e D de Ambler, constituindo o maior número de enzimas caracterizadas. Particularmente em Gram-Negativos, destacam-se as enzimas do subgrupo 2b, normalmente mediadas por genes plasmidiais, hidrolisam penicilinas e cefalosporinas sendo fortemente inibidas pelo ácido clavulânico, determinadas pelos genes *bla_{TEM-1}*, *bla_{TEM-2e}* *bla_{SHV-1}*; e a variação 2be (ESBL), determinada atividade de amplo espectro para outras drogas como ceftazidima, cefotaxima e aztreonam. Estas são caracterizadas pelos genes *bla_{TEM-3}*, *bla_{SHV-2}* variantes que estão presentes nos dias atuais, e *bla_{CTX-M}* considerada atualmente a mais amplamente distribuída em muitas regiões do mundo (BUSH, 2001; ARCHAMBAULT et al., 2006).

3.6.2 Mecanismo de Resistência às Quinolonas

A resistência as quinolonas ocorre usualmente por mutações cromossomais transmissíveis verticalmente (CATTOIR et al., 2007; CORVEC et al., 2009; STRAHILEVITZ et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; MÉRENS e SERVONNET, 2010).

Contudo, recentemente foram descritos mecanismos de resistência a quinolonas mediados por plasmídeos (PMQR – Plasmid Mediated Quinolone Resistance), transmitidos horizontalmente (CORVEC et al., 2009; STRAHILEVITZ et al., 2009; CATTOIR e NORDMAN, 2009; SOUZA et al., 2010; HERRERA-LÉON et al., 2011), que podem surgir isoladamente ou em combinação com outros mecanismos.

Estudos demonstram que entre as mutações que ocorrem em nível cromossomal, são reconhecidos dois mecanismos distintos: as que ocorrem em enzimas alvo, normalmente em genes que codificam as topoisomerases do tipo DNA girase e Topoisomerase IV (CATTOIR e NORDMAN, 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011) e as que minimizam o acesso às enzimas alvo, pela diminuição da permeabilidade resultante de mutações em genes que regulam a síntese de porinas, ou uma hiper-expressão de bombas de efluxo ativo (MÉRENS e SERVONNET, 2010).

Quanto às mutações associadas às alterações do sítio-alvo de ação, tem sido descritas substituições aminoácidas nas proteínas GyrA/GyrB (DNA girase) e ParC/ParE (Topoisomerase IV), por redução de afinidade destes antibióticos ao seu local de ligação (SOUZA et al., 2010). A resistência em quinolonas é resultante de mutações seriadas, que ocorrem inicialmente no gene que codifica a subunidade GyrA da DNA girase e posteriormente no gene que codifica a subunidade Par C da Topoisomerase IV (CATTOIR e NORDMAN, 2009; CORVEC et al., 2009; SOUZA et al., 2010). No entanto, Rodríguez-Martínez et al. (2011) consideram que mutações espontâneas são um evento genético demasiado raro e admitem que sejam necessárias múltiplas mutações para culminar no surgimento de micro-organismos resistentes às quinolonas.

No entanto, foi a descoberta recente da resistência adquirida à quinolonas, associada à transferência horizontal de genes mediados por plasmídeos (PMQR) que veio acrescentar uma nova dimensão ao problema da resistência a esta classe de antibióticos (STRAHILEVITZ et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). Entre eles, incluem a proteção das enzimas alvo por proteínas *Qnr* (*QnrA*, *QnrB*, *QnrS*, *QnrC*, *QnrD*), pertencentes a uma família de pentapeptídeos repetidos que protegem a DNA girase e a Topoisomerase IV da inibição das quinolonas (CATTOIR e NORDMAN, 2009; KARAH et al., 2010; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011) e ainda a variante de um aminoglicosídeo acetiltransferase, determinado como *aac(6')-Ib*, capaz de acetilar e conseqüentemente reduzir a atividade de algumas fluoroquinolonas, como norfloxacin e ciprofloxacina (STRAHILEVITZ et al., 2009; SOUZA et al., 2010; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Segundo Strahilevitz et al. (2009), as proteínas *Qnr* são responsáveis por conferirem resistência ao ácido nalidíxico e/ou diminuir a suscetibilidade à ciprofloxacina. No entanto, os autores admitem que os mecanismos codificados pelos genes pertencentes ao grupo *qnr*, não se encontram completamente elucidados, e tem sido relatado de uma forma mais abrangente pelos estudos iniciais realizados especialmente para *qnrA*. No entanto, admite-se que todo o grupo apresente a mesma ou semelhante forma de atuação (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). Sabe-se que a proteína *QnrA* se liga às subunidades da DNA girase e Topoisomerase IV, formando o complexo *QnrA*-topoisomerase, reduzindo a formação do complexo binário topoisomerase-DNA e inibindo a ligação das quinolonas as enzimas (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Por outro lado, Mérens e Servonnet (2010), reconhecem que o processo de inativação enzimática pela enzima *aac(6')-Ib*, constitui uma variante que confere resistência a ciprofloxacina, através de enzimas que atuam modificando os aminoglicosídeos por acetilação dos seus grupos – NH₂, designadas de aminoglicosídeo-N-acetiltransferases (AACs), a partir de uma proteína designada *aac(6')-I*. Estudos realizados em *Escherichia coli* e *Klebsiella*

pneumoniae por Karah et al. (2010), permitiram considerar que sua natureza pode ser cromossomal, plasmidial, ou estar localizada em transposons e integrons, podendo conferir paralelamente resistência para alguns aminoglicosídeos como tobramicina, canamicina, amicacina e gentamicina, determinando desta forma a resistência cruzada entre essas duas classes (KARAH et al., 2010).

3.6.3 Mecanismo de Resistência mediado por Integrons

Avanços recentes na caracterização molecular dos mecanismos de resistência a antibióticos destacam a existência de estruturas genéticas chamadas integrons, envolvidos na aquisição de genes de resistência (HALL e COLLIS, 1995). Estes elementos de DNA têm sido relatados frequentemente em cepas multirresistentes isoladas de animais e humanos, e são localizados no cromossoma bacteriano ou em plasmídeos de uma ampla gama de hospedeiros (CARATTOLI, 2001). Os integrons promovem a captura de um ou mais conjuntos de genes com o mesmo sítio de ligação, formando assim clusters compostos de genes resistentes a antibióticos (STOKES e HALL, 1989). Atualmente são conhecidas nove classe de integrons, sendo os de classe 1 os mais amplamente encontrados em isolados clínicos, animais e ambientais.

Por estarem presentes em plasmídeos e transposons, contribuem para a disseminação e associação com a multirresistência aos antimicrobianos em membros da família Enterobacteriaceae e outras bactérias Gram-Negativas (LEVERSTEIN-VAN HALL et al., 2002).

As primeiras tentativas de descrever integrons sugeriam que estes consistiam de duas regiões conservadas vizinhas a uma região variável contendo um ou mais genes de resistência (STOKES e HALL, 1989). Uma descrição mais detalhada de sua estrutura estabeleceu os componentes essenciais dos integrons, que são o gene *integrase* (*intl1*), o sítio de ligação (*attI1*) e o promotor, que promove a expressão de qualquer conjunto de cassetes de genes integrados ao sítio *attI1* (RECCHIA et al., 1994). Os integrons pertencentes à classe 1 também são caracterizados pela presença do gene *sul1*, que confere resistência a sulfonamidas, localizados distalmente no segmento conservado-3' ou 3'-CS (HALL et al., 1991). Este segmento também inclui o gene *qacEΔ1*, que confere resistência aos compostos de amônio quaternário. Estes cassetes móveis de genes estão integrados entre o 5'-CS e o 3'-CS (BISSONNETTE e ROY, 1992).

A região variável do integron pode apresentar diversos cassetes gênicos inseridos, estes são compostos por um único gene e por uma sequência curta, denominada de elemento base 59 (59be) que funciona como sítio de recombinação específica, chamada de “sítio aatC” (HALL et al., 1991). Os genes presentes nos cassetes gênicos normalmente não apresentam promotores, necessitando desta forma, da região integrase presente no integron para sua expressão. A integrase permite a interação e excisão dos cassetes na região variável do integron (GONZÁLES et al., 2004). O número de cassetes gênicos associados aos integrons pode variar de nenhum a mais de 100 (HALL et al., 1991). Os cassetes de genes que possuem integrons são capazes de conferir resistência a vários antibióticos diferentes, incluindo aminoglicosídeos, cefalosporinas, cloranfenicol, penicilinas e trimetoprim, e para cada um destes antibióticos, foram relatados vários cassetes de genes (MAZEL e DAVIES, 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Foram selecionadas no banco de dados a totalidade das cepas de *Salmonella* spp. (N=243) isoladas no período de 2009-2011 de carcaças de frango congeladas (N=84) e resfriadas (N=159), comercializados em diferentes regiões do país. Estas foram encaminhadas por Instituições Públicas e Privadas para o Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB) para a caracterização antigênica conclusiva, cuja distribuição de acordo com a fonte de isolamento e região encontra-se apresentada no **Quadro 5**.

Entre estas, uma amostragem cujo total numérico é de 194 cepas apresentavam seu perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, o qual foi determinado em face às atividades de monitoramento desenvolvidas pelo LRNEB.

Quadro 5 – Distribuição geográfica de cepas de *Salmonella* spp. avaliadas no período de 2009 a 2011.

Fonte de Isolamento	Ano	REGIÕES BRASILEIRAS										TOTAL
		Sul			Centro-Oeste			Sudeste		Nordeste	Norte	
		SC	PR	RS	GO	MT	MS	MG	SP	BA	PA	
Carcaças Congeladas	2009	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	8
	2010	-	42	-	-	-	-	-	-	4	-	46
	2011	6	-	1	-	4	5	-	14	-	-	30
Carcaças Resfriadas	2009	-	-	-	-	1	0	-	29	-	-	30
	2010	9	20	-	6	5	1	-	1	-	1	43
	2011	5	2	19	-	55	0	5	0	-	-	86
TOTAL			104			85		49		4	1	243

4.2 Recuperação das cepas

As cepas mantidas em Agar Nutriente Fosfatado (DIFCO) foram inoculadas em Caldo Nutriente (DIFCO) e incubadas a 37°C por 12 - 18 horas e posteriormente semeadas em Agar Enterico Hektoen (OXOID). Após 18 - 24 h/ 37°C, as colônias com características de *Salmonella* (não fermentadoras de lactose e produtoras de gás sulfídrico) foram repicadas para meio de triagem de Costa e Vérnin para diagnóstico presuntivo (COSTA e HOFER, 1972).

4.3 Confirmação do Perfil Bioquímico

A confirmação do perfil bioquímico foi avaliada através da metodologia descrita por Costa e Hofer (1972) e Edwards e Ewing (1986). Foram realizados os testes de produção de gás em meio de glicose, capacidade de utilização do citrato como única fonte de carbono em meio Citrato de Simmons (DIFCO), avaliação da mobilidade, produção de gás sulfídrico e de indol em meio de SIM (DIFCO), e capacidade de descarboxilação do aminoácido lisina (**Quadro 6**).

Quadro 6 – Perfil bioquímico de *Salmonella* spp., segundo Costa e Hofer (1972); Edwards e Ewing (1986).

Provas Bioquímicas	Gênero <i>Salmonella</i>
Produção de Indol	-
Motilidade	+
Produção de H ₂ S	+
Produção de gás em Glicose	+
Citrato de Simons	-
Descarboxilação da Lisina	+

4.4 Diagnóstico Antigênico Conclusivo

A partir da confirmação do perfil bioquímico, as cepas foram semeadas em ágar nutriente inclinado (DIFCO) incubado 18 - 24 horas/37°C para a confirmação da estrutura antigênica.

O diagnóstico antigênico conclusivo foi efetuado através da técnica de soroaglutinação rápida em lâmina, com antissoros poli e monovalentes, somáticos (O) e flagelares (H), produzidos pelo Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB), do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ. A caracterização antigênica do sorovar específico foi realizada com base no esquema sorológico de Kauffmann-White e Le Minor e representada de acordo com os critérios de GRIMONT e WEILL (2007) e GUIBOURDENCHE et al. (2010).

4.5 Manutenção de Cepas

Após a caracterização antigênica conclusiva, as cepas foram preservadas a -20°C em tubos de criopreservação contendo Caldo Brain Heart Infusion – BHI (DIFCO) acrescido de 15% de glicerol.

4.6 Confirmação e Determinação do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

A confirmação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizada em 194 cepas de *Salmonella* spp., através do método de difusão de disco em ágar.

Tendo em vista a inexistência de avaliação da suscetibilidade para droga de uso veterinário exclusivo (ceftiofur – CFT) esta foi determinada através do método de microdiluição em caldo. Esta avaliação foi realizada somente para as cepas identificadas durante o ano de 2011.

Em ambas as metodologias empregadas para a avaliação da suscetibilidade, foram utilizados os critérios preconizados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2009, 2010, 2011).

4.6.1 Método de Difusão de Disco em Agar

4.6.1.1 Preparo do Inóculo

Para a obtenção de colônias isoladas, cepas de *Salmonella* spp. foram semeadas por esgotamento em Ágar Nutriente (DIFCO) e incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após esse período, 4 a 5 colônias foram selecionadas e inoculadas em 4,0 mL de Caldo Mueller-Hinton - MH (OXOID), e incubadas a 37°C até atingir a escala de turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland (1×10^8 UFC/mL). Foi utilizado espectrofotômetro (UNICO-1100 Spectrophotometer) para a obtenção da turbidez variável entre 0,008 a 0,010 de absorbância em comprimento de onda de 625nm.

4.6.1.2 Meio de Cultura

Para a execução do teste foi utilizado ágar Mueller-Hinton - MH (OXOID), preparado e esterilizado de acordo com as recomendações do fabricante, distribuído em placas de Petri de 20x100 mm de diâmetro, em volume de aproximadamente 20 mL, visando obtenção de camada interna de 4 mm de profundidade.

4.6.1.3 Drogas Antimicrobianas

Foram utilizados fármacos representativos das classes de antimicrobianos: beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a e 4^a geração), fenicóis, tetraciclina, quinolonas, aminoglicosídeos, carbapenens, inibidores de folatos e nitrofuranos (**Quadro 7**).

O critério de escolha das drogas antimicrobianas teve por base drogas empregadas sob o ponto de vista humano e veterinário e a orientação da Organização Mundial de Saúde (OMS) quanto aos antimicrobianos utilizados no monitoramento da resistência bacteriana.

Quadro 7 – Drogas antimicrobianas (MARCA OXOID) utilizadas na avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana.

ANTIMICROBIANOS		SIGLA
Fenicois	Cloranfenicol	CHL
Beta-lactâmicos		
Penicilinas	Ampicilina	AMP
Cefalosporinas	Cefalotina	CEP
	Cefoxitina	FOX
	Ceftriaxona	CRO
	Cefepime	FEP
	Ceftazidima	CAZ
Aminoglicosídeos	Estreptomicina	STR
	Gentamicina	GEN
Quinolonas	Ácido nalidíxico	NAL
	Ciprofloxacina	CIP
Tetraciclina	Tetraciclina	TCY
Carbapenens	Imipenem	IPM
Antifolatos	Sulfametoxazol-trimetoprim	SXT
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	NIT

4.6.1.4 Execução da Técnica

A semeadura foi realizada com auxílio de swab em três direções (horizontal, vertical e diagonal) e após absorção do inóculo, os discos de antimicrobianos depositados com auxílio de dispensador (OXOID). As placas foram incubadas a 35°C durante 18 -24 horas.

4.6.1.5 Leitura e Interpretação dos Resultados

Após o tempo de incubação, realizou-se a leitura do diâmetro do halo com auxílio de paquímetro digital (MITUTOYO – Absolute Digimatic). Os valores obtidos foram interpretados, segundo CLSI (2011) na tabela padrão de interpretação do teste de suscetibilidade antimicrobiana pelo método disco-difusão (**Quadro 8**).

Quadro 8 - Padrão de interpretação do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão de disco em ágar, segundo CLSI (2011).

Agente Antimicrobiano	Concentração do Disco	Diâmetro da Zona (mm)		
		S	I	R
Ampicilina	10 µg	≥17	14 – 16	≤13
Cefalotina	30µg	≥18	15 – 17	≤14
Ceftriaxona	30µg	≥23	20 – 22	≤19
Cefoxitina	30µg	≥18	15 – 17	≤14
Cefepime	30µg	≥18	15 – 17	≤14
Ceftazidima	30µg	≥21	18 -20	≤17
Ceftiofur	30 µg	≥18	15 – 17	≤14
Gentamicina	10µg	≥15	13 – 14	≤12
Tetraciclina	30µg	≥15	12 – 14	≤11
Ciprofloxacina	5µg	≥31	21 – 30	≤20
Ácido Nalidíxico	30µg	≥19	14 – 18	≤13
Sulfametoxazol-Trimetoprim	1.25/23.75µg	≥16	11 – 15	≤10
Cloranfenicol	30µg	≥18	13 – 17	≤12
Nitrofurantoína	300µg	≥17	15 – 16	≤14
Estreptomina	10 µg	≥15	12 – 14	≤11

4.6.2 Método de Microdiluição

4.6.2.1 Preparo da Solução Antimicrobiana

Foi preparada uma solução antimicrobiana na concentração de 10mg/mL, utilizando-se os solventes e diluentes recomendados de acordo com o CLSI 2011 (**Quadro 9**).

Quadro 9 - Solvente e diluente utilizado no preparo da solução antimicrobiana, de acordo com o CLSI (2011).

ANTIMICROBIANO	SIGLA	MARCA	SOLVENTE	DILUENTE
Ceftiofur	CFT	SIGMA	Tampão Fosfato, pH6.0, 0.1 mol/L	Água

Após seu preparo, a solução foi filtrada em membrana Millipore 0,2µm, distribuída em alíquotas de 2 mL e acondicionada em tubos de criopreservação, devidamente rotulados e mantidos em freezer a – 20°C.

4.6.2.2 Preparo das Placas de Microtitulação

Para a realização desta técnica foi utilizado o Caldo Mueller-Hinton CAMHB-OXOID (CLSI 2011), previamente preparado de acordo com as recomendações do fabricante, ajustando o pH entre 7,2 e 7,4 a cada partida de meio.

Posteriormente, foi acrescido ao Caldo CAMHB o volume de solução antimicrobiana previamente preparada tomando-se por base as concentrações recomendadas pelo CLSI.

Foi distribuído 50µL de meio de cultura (acrescido de solução antimicrobiana), em placas de microtitulação esterilizadas, contendo 96 orifícios. Estas foram vedadas com parafilme e armazenadas a – 20°C.

4.6.2.3 Preparo do Inóculo

O preparo do inóculo seguiu os mesmos procedimentos descritos no item 4.6.1.1.

4.6.2.4 Execução da Técnica de Microdiluição

Para a Determinação da Concentração Mínima Inibitória em placas de microtitulação, foram retirados 50µl do inóculo e adicionado nas microplacas previamente sensibilizadas com caldo CAMHB + solução antimicrobiana em diferentes concentrações. Estas foram incubadas por 18 a 24h/35°C.

4.6.2.5 Interpretação e divulgação dos resultados

Para a realização da leitura, as microplacas foram colocadas em superfície escura não reflexiva, para observar a presença ou ausência de turvação. A leitura é efetuada com base na observação de turbidez do último orifício com crescimento bacteriano e interpretada de modo quantitativo ou qualitativo, cujos critérios integrados, são apontados e revisados anualmente pelo CLSI (**Quadro 10**).

Quadro 10- Padrão de interpretação do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de microdiluição, segundo CLSI (2011).

Agente Antimicrobiano	Padrão de Interpretação do MIC (µg/mL)		
	S	I	R
Ceftiofur	≤ 2	4	≥ 8

4.6.3 Controle de Qualidade do Teste

Para o controle na qualidade de execução e confiabilidade dos resultados obtidos, foram continuamente empregados cepas padrão (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), sob as mesmas condições de meios de cultivo e incubação, segundo CLSI, 2009/ 2010/ 2011 (**Quadro 11**).

Quadro 11 – Cepas padrão utilizadas no controle de qualidade do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, CLSI (2009/2010/2011).

CEPAS PADRÃO	CONTROLE DE QUALIDADE
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Avaliação geral dos discos de antimicrobianos, inclusive associações de inibidores de β -lactamases; controle negativo para β -lactamase.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	Avaliação de antibióticos associados a inibidores de β -lactamases
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Avaliação geral dos discos de antimicrobianos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Avaliação do conteúdo de cátions divalentes (Ca^{+2} e Mg^{+2}) e o conteúdo de íons zinco. Avalia a qualidade dos aminoglicosídeos, tetraciclinas e polimixina.
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Avalia conteúdo de timina, se elevado antagoniza sulfas e sua associação ao trimetoprim

Os resultados foram registrados e avaliados quanto aos níveis aceitáveis, de acordo com os valores referentes aos pontos de corte das cepas utilizadas como controle, segundo CLSI, 2009/2010/2011 (**Quadro 12**).

Quadro 12 - Limites aceitáveis em cepas padrão utilizadas no controle de qualidade do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, CLSI (2009/2010/2011).

Agente Antimicrobiano	<i>S. aureus</i> ATCC® 29213		<i>E. coli</i> ATCC® 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853		<i>E. coli</i> ATCC® 35218		<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	
	mm	µg/mL	mm	µg/mL	mm	µg/mL	mm	µg/mL	mm	µg/mL
Ampicilina	27-35	0,5-2	16-22	2-8	-	-	6	>32	-	0,5-2
Cefoxitina	23-29	1-4	23-29	2-8	-	-	-	-	-	-
Ceftriaxona	22-28	1-8	29-35	0,03-0,12	17-23	1-4	-	-	-	-
Cefalotina	29-37	0,12-0,5	15-21	4-16	-	-	-	-	-	-
Cefepime	23-29	1-4	31-37	0,015-0,12	24-30	0,5-4	-	-	-	-
Ceftazidima	16-20	4-16	25-32	0,06-0,5	22-29	1-4	-	-	-	-
Ceftiofur	27-31	0,25-1,0	26-31	0,25-1	14-18	16-64	-	-	-	-
Cloranfenicol	19-26	2-16	21-27	2-8	-	-	-	-	-	4-16
Ciprofloxacina	22-30	0,12-0,5	30-40	0,004-0,015	25-33	0,25-1	-	-	-	0,25-2
Gentamicina	19-27	0,12-1	19-26	0,25-1	16-21	0,5-2	-	-	-	4-16
Ácido Nalidíxico	-	-	22-28	1-4	-	-	-	-	-	-
Nitrofurantoína	18-22	8-32	20-25	4-16	-	-	-	-	-	4-16
Tetraciclina	24-30	0,12-1	18-25	0,5-2	-	8-32	-	-	-	8-32
Sulfametoxazol - trimetoprim	24-32	≤0,5/9,5	23-29	≤0,5/9,5	-	8/152-32/608	-	-	-	≤0,5/9,5

4.7 Detecção de Genes de Resistência pelo Método de PCR

4.7.1 Amostragem

Para a caracterização de genes de resistência foi utilizada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em cepas que apresentaram o perfil intermediário ou resistente para as classes quinolonas/fluoroquinolonas, beta-lactâmicos (cefalosporinas de 3ª e 4ª geração) e aminoglicosídeos.

4.7.2 Extração e Quantificação do DNA

Após crescimento em Caldo Trypticase Soja - TSB (MERCK) a 37°C/18h, uma alíquota de 1,5 mL da suspensão bacteriana foi transferida para tubo Eppendorf. A extração do DNA foi realizada através da adsorção seletiva do ácido nucléico em membrana de sílica gel, seguindo as recomendações descritas no KIT DNEASY TISSUE (QIAGEN). O DNA purificado foi quantificado em Nanodrop (ND-1000 *Spectrophotometer* Uniscience) e a concentração final padronizada em 50nm.

4.7.3 Primers empregados na caracterização de genes de resistência

As sequências de nucleotídeos iniciadores - “primers” (α DNA) utilizadas para a detecção de cassetes gênicos estão descritos no **Quadro 13** e incluem genes relacionados à resistência aos beta-lactâmicos (*bla_{CMY}*, *bla_{CTX-M}*); quinolonas (*gyrB*, *qnrA,B, S*, *integrase* e o gene *rrs* para o controle da reação multiplex) e aminoglicosídeos (*aac(3’)*-IIa, *aac(6’)*-Ib, *integrase*, integron variável).

Quadro 13 – Sequência de nucleotídeos empregados na caracterização de genes de resistência em *Salmonella* spp.

Gene	Sequência do Primer 5’ – 3’	Produto Amplificado	Referência Bibliográfica
<i>gyrB</i>	F GGACAAAGAAGGCTACAGCA R CGTCGCGTTGTACTCAGATA	880pb	CHAU et al., 2007
<i>bla_{CMY}</i>	F GACAGCCTCTTTCTC R TGGAACGAAGGCTAC	920pb	AAERESTRUP et al., 2004
<i>bla_{CTX-M}</i>	F ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC R TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCA	593pb	LARTIGUE et al., 2004 PITOUT et al., 2008
<i>qnrA</i>	F ATTTCTCACGCCAGGATTTG R GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	516pb	PITOUT et al., 2008 ROBICSEK et al., 2006
<i>qnrB</i>	F GATCGTGAAAGCCAGAAAGG R ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	469pb	
<i>qnrS</i>	F ACGACATTCGTCAACTGCAA R TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	417pb	
<i>rrs</i>	F GGATTAGATACCCTGGTAGTCC R TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC	320pb	
<i>aac(6’)</i> - Ib	F TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482pb	PARK et al., 2006
<i>aac(3’)</i> - IIa	F CGCTAAACTCCGTTACC R TAGCACTGAGCAAAGCC	325pb	DIAZ et al., 2004
<i>integrase</i>	F CCTCCCGCACGATGATC R TCCACGCATCGTCAGGC	250pb	PEIRANO et al., 2006
Integron variável	F AAGCAGACTTGACCTGA R GGCATCCAAGCAGCAAG	VARIÁVEL	PEIRANO et al., 2006

4.7.4 Preparo do MASTER MIX

Para a reação em cadeia da polimerase foram preparadas soluções de 25 μ L de Master Mix Platinum (INVITROGEN) nas concentrações apontadas no **Quadro 14**:

Quadro 14– Componentes e concentrações utilizadas no preparo do MIX para PCR

Componentes	Concentração Final	Objetivo
Tampão	1X	Estabilização o pH da reação
MgCl ₂	1,5mM	Co-fator da enzima Taq DNA polimerase
DNTP	0,2mM	Síntese de DNA
Primers	1.0 μ M/20 picomol	Oligonucleotídeo complementar para a amplificação
<i>Taq DNA</i> polimerase	0.025 U/ μ l	Ligação dos oligonucleotídeos à fita molde de DNA
DNA molde	1 μ g	DNA a ser analisado

4.7.5 Condições de Amplificação

O material foi amplificado em termociclador (THERMO PX2 Thermal Cycler), cujas condições estão descritas no **Quadro 15**.

4.7.6 Corrida e Visualização do Perfil Molecular

Os produtos da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de Agarose 1% (SIGMA) em tampão TBE 1X (Tris Base 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 20 mM pH8,0 - ROCHE) em 100V por 1 hora. Foi utilizado como referência o marcador de peso molecular eletivo de 1-kb (ladder-Gibco BRL). O gel foi corado em solução Brometo de Etídio (10 μ d/mL) durante 10 minutos e posteriormente visualizado em sistema de fotodocumentação (Image Quant 300, GE).

Quadro 15 - Condições de amplificação empregadas na caracterização de genes de resistência.

GENES		CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO
<i>gyrB</i>	Desnaturação Inicial	94°C 4 min, 1 ciclo
		94°C 1 min, 61°C 30 seg, 72°C 1 min - 30 ciclos
	Extensão final	72°C 10 min, 1 ciclo - 4∞
<i>bla_{CMY}</i>	Desnaturação Inicial	94°C 4 min, 1 ciclo
		94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min - 30 ciclos
	Extensão final	72°C 10 min, 1 ciclo - 4∞
<i>bla_{CTX-M}</i>	Desnaturação Inicial	94°C 5 min, 1 ciclo
		94°C 45 seg, 61°C 45 seg, 72°C 45 seg - 30 ciclos
	Extensão final	72°C 10 min, 1 ciclo - 4∞
<i>qnrA</i> <i>qnrB</i> <i>qnrS</i> <i>rrs</i>	Desnaturação Inicial	94°C 6 min, 1 ciclo
		94°C 45 seg, 53°C 45 seg, 72°C 1 min - 30 ciclos
	Extensão final	72°C 7 min, 1 ciclo - 4∞
<i>aac (6') - Ib</i>	Desnaturação Inicial	94°C 2 min, 1 ciclo
		94°C 45 seg, 55°C 45 seg, 72°C 45 seg - 34 ciclos
	Extensão final	72°C 30 seg, 1 ciclo - 4∞
<i>aac(3'') - IIa</i>	Desnaturação Inicial	94°C 2 min, 1 ciclo
		96°C 15 seg, 55°C 30 seg, 70°C 3 min - 25 ciclos
	Extensão final	70°C 15 min, 1 ciclo - 4∞
<i>integrase</i>	Desnaturação Inicial	94°C 10 min, 1 ciclo
		94°C 1 min, 55°C 30 seg, 72°C 1 min - 35 ciclos
	Extensão final	72°C 10 min, 1 ciclo - 4∞
Integron variável	Desnaturação Inicial	94°C 5 min, 1 ciclo
		94°C 1 min, 54°C 1 min, 72°C 5 min - 35 ciclos
	Extensão final	72°C 10 min, 1 ciclo - 4∞

5 RESULTADOS

A reavaliação das 243 cepas isoladas de carcaças de frango congeladas e resfriadas confirmaram seu perfil bioquímico, antigênico e integridade de suas características.

Foram identificados 9 sorogrupos distintos, cuja distribuição encontra-se apresentada no **Gráfico 1**.

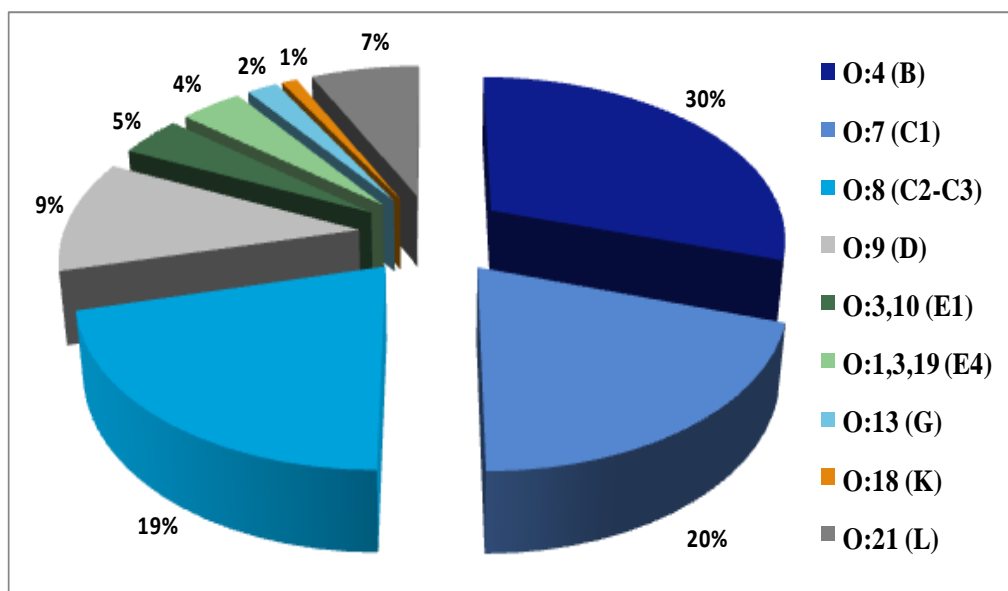


Gráfico 1- Sorogrupos de *Salmonella* identificados em carcaças de frango congeladas e resfriadas, no período de 2009-2011.

No cômputo geral os sorogrupos O:4 (B), O:7 (C₁) e O:8 (C₂-C₃) foram os mais prevalentes representando 69% do total.

Entre os sorogrupos mais frequentes, destacam-se O:8 (C₂-C₃) em 45% (17/38) das cepas avaliadas em 2009; O:7 (C₁) e O:4 (B) com percentuais semelhantes equivalentes a 29% (26/89) e 28% (25/89) respectivamente, em 2010; e O:4 (B) em 34% (40/116), seguido de O:7 (C₁) em 18% (21/116) em 2011 (**Gráfico 2**).

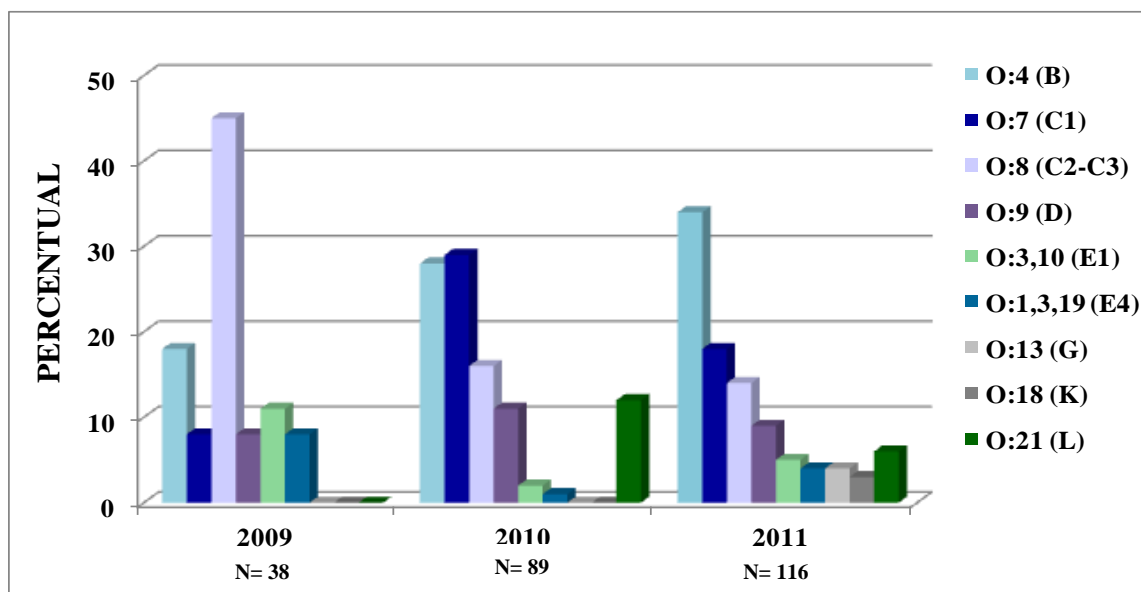


Gráfico 2 – Frequência anual dos sorogrupos de *Salmonella* identificados em carcaças de frango congeladas e resfriadas, no período de 2009-2011.

Considerando a distribuição dos 5 sorogrupos prevalentes entre os dois grupos de amostras isoladas, o sorogrupo O:4 (B) foi mais frequente em carcaças resfriadas com o percentual de 32,7% (52/159) em relação aos demais sorogrupos. Em carcaças congeladas o sorogrupo O:4 (B) (23,8% - 20/84), O:7 (C₁) (22,6% - 19/84) e O:8 (C₂-C₃) (20,2% - 17/84) apresentaram percentuais semelhantes (**Gráfico 3**).

Outrossim, é importante ressaltar que os sorogrupos O:9 (D) e O:21 (L) apresentaram percentuais mais elevados em carcaças congeladas, equivalendo a 14,3% (12/84) e 12% (10/84) em relação às resfriadas com 7% (11/159) e 5% (8/159) respectivamente (**Gráfico 3**).

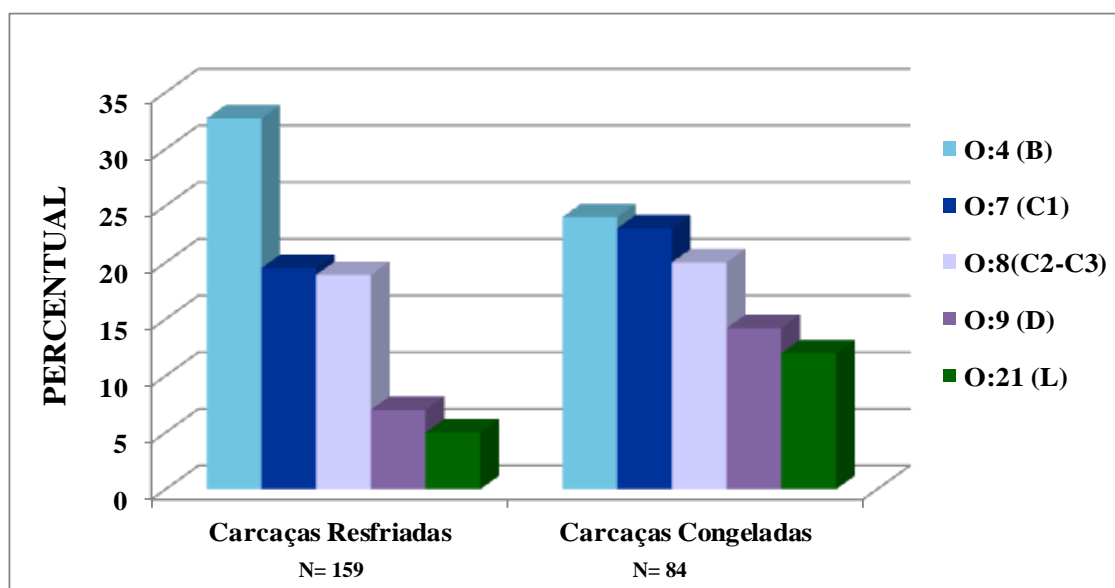


Gráfico 3 – Frequência dos 5 sorogrupos de *Salmonella* mais prevalentes em carcaças de frango congeladas e resfriadas.

Cabe ressaltar ainda que os de menor casuística, cujo percentual variou entre 1 a 4%, representados pelos sorogrupos O:13 (G) e O:18 (K) só foram evidenciados em carcaças resfriadas (**Tabela 1**).

Particularmente em relação aos sorovares identificados, a avaliação geral permitiu reconhecer 33 sorovares de *Salmonella*, entre os isolados de carcaças de frango congeladas e resfriadas (**Tabela 1**).

Entre os sorovares pertencentes a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* a distribuição dos 10 prevalentes aponta Mbandaka (10.3% - 25/243), Enteritidis (7% - 18/243), Minnesota (7% - 18/243), Typhimurium (7% - 17/243), Infantis (6,2% - 15/243), Saintpaul (5% - 12/243), Corvallis (4.5% - 11/243) Schwarzengrund (4,5% - 11/243), Hadar (3,7% - 9/243) e Senftenberg (3.7% - 9/243).

É interessante observar que a *Salmonella* ser. Mbandaka apresentou maior frequência numérica em 2011 em carcaças resfriadas e em 2010 entre as carcaças congeladas, enquanto cada um dos demais sorovares apresentaram distribuição semelhante durante os três anos de avaliação.

Outrossim, considerando as origens das cepas é interessante apontar que a *Salmonella* ser. Heidelberg somente foi caracterizada a partir de carcaças de frango resfriadas. De modo semelhante os sorovares Agona e Senftenberg mostraram maior frequência a partir desta fonte. Outro aspecto interessante se dá quanto à diversidade de sorovares encontrados em 2011 em cepas isoladas de carcaça resfriadas. Nas congeladas, esta foi observada em 2010 e 2011.

No cômputo geral, *Salmonella* ser. Mbandaka (12/159 = 7,5%), Infantis (11/179 = 7,0%) e Enteritidis (9/159 = 5,7%) foram mais frequentes em carcaças resfriadas; enquanto em congeladas apontaram os sorovares Mbandaka (13/84 = 15,5%), Minnesota (10/84 = 11,9%), Typhimurium (9/84 = 10,7%).

A frequência anual dos sorovares em carcaças resfriadas demonstrou índices maiores para Kentucky (20% - 6/30) em 2009; Minnesota (11,6% - 5/43), Infantis (11,6% - 5/43) e Enteritidis (9,3% - 4/43) em 2010; Mbandaka (10,5% - 9/86), Bredeney (8,1% - 7/86) e Typhimurium (7% - 6/86) em 2011.

Em carcaças congeladas, os 7 sorovares detectados em 2009 (*Salmonella* ser. Albany, Bredeney, Give, Hadar, Mbandaka, Muenchen e Panama) apresentaram índices reduzidos variando entre 1 a 2%; em 2010 sendo mais frequentes *Salmonella* ser. Mbandaka (24% - 11/46); e em 2011 *Salmonella* ser. Enteritidis e Typhimurium com percentual equivalente à (17% - 5/30).

Tabela 1 - Distribuição dos sorovares de *Salmonella* identificados em carcaças de frango congeladas e resfriadas.

SOROGRUPOS	N° cepas	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar	CARCAÇAS RESFRIADAS			CARCAÇAS CONGELADAS			TOTAL
			2009	2010	2011	2009	2010	2011	
O:4 (B)	73	Agona	2	3	2	-	1	-	8
		Brandenburg	-	1	1	-	-	-	2
		Bredeney	-	-	7	1	-	-	8
		Derby	-	-	1	-	-	-	1
		Heidelberg	2	2	4	-	-	-	8
		Saintpaul	-	3	3	-	2	4	12
		Schwarzengrund	-	4	5	-	2	-	11
		Typhimurium	-	2	6	-	4	5	17
		O:4,5	2	-	3	-	1	-	6
O:7 (C₁)	48	Infantis	-	5	6	-	4	-	15
		Mbandaka	1	2	9	1	11	1	25
		Montevideo	1	-	-	-	-	-	1
		Ohio	-	1	1	-	-	-	2
		Tennessee	-	2	3	-	1	-	6
		Thompson	-	-	-	-	-	1	1
O:8 (C₂- C₃)	53	Albany	2	-	1	1	1	-	5
		Bovismorbificans	-	-	1	-	-	-	1
		Corvallis	2	1	2	-	5	1	11
		Hadar	2	1	2	1	-	3	9
		Kentucky	6	-	-	-	1	-	7
		Muenchen	-	2	-	2	-	1	5
		Newport	1	2	5	-	1	-	9
O:9 (D)	23	Enteritidis	2	4	3	-	4	5	18
		Ndolo	-	1	-	-	-	-	1
		Panama	-	-	1	1	1	1	4
O:3,10 (E₁)	10	Anatum	2	1	-	-	-	-	3
		Give	-	-	1	1	-	-	2
		Muenster	-	-	4	-	-	-	4
		Orion	-	-	-	-	1	-	1
		O:3,10	1	-	1	-	-	-	2
O:1,3,19 (E₄)	9	Senftenberg	3	1	3	-	-	2	9
O:13 (G)	5	Grumpensis	-	-	1	-	-	-	1
		Worthington	-	-	4	-	-	-	4
O:18 (K)	3	Cerro	-	-	3	-	-	-	3
O:21 (L)	18	Minnesota	-	5	3	-	6	4	18
		<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	-	-	-	-	-	1	1
		<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	1	-	-	-	-	1	2
TOTAL			30	43	86	8	46	30	243

Sob o ponto de vista geográfico, o maior número de cepas foi encaminhado pela região Sul (42,7% - 104/243), seguido da região Centro-Oeste (39,4% - 85/243), Sudeste (20,2% - 49/243), Nordeste (1,6% - 4/243) e Norte (0,4% - 1/243).

A distribuição apontada na **Figura 1** permite observar que a circulação dos sorovares varia de região para região. No Sul do Brasil, 17 foram detectados no Estado do Paraná, 14 em Santa Catarina e 8 no Rio Grande do Sul. Na região Centro-Oeste foi possível detectar 24 sorovares distintos no Mato Grosso, 11 em Goiás e 3 no Mato Grosso do Sul. No sudeste, observa-se 14 sorovares em São Paulo e 2 em Minas Gerais; a semelhança com a Bahia, no Nordeste do país, onde foram detectados 4 sorovares e no Norte, representado pelo Pará apenas 1 sorovar.

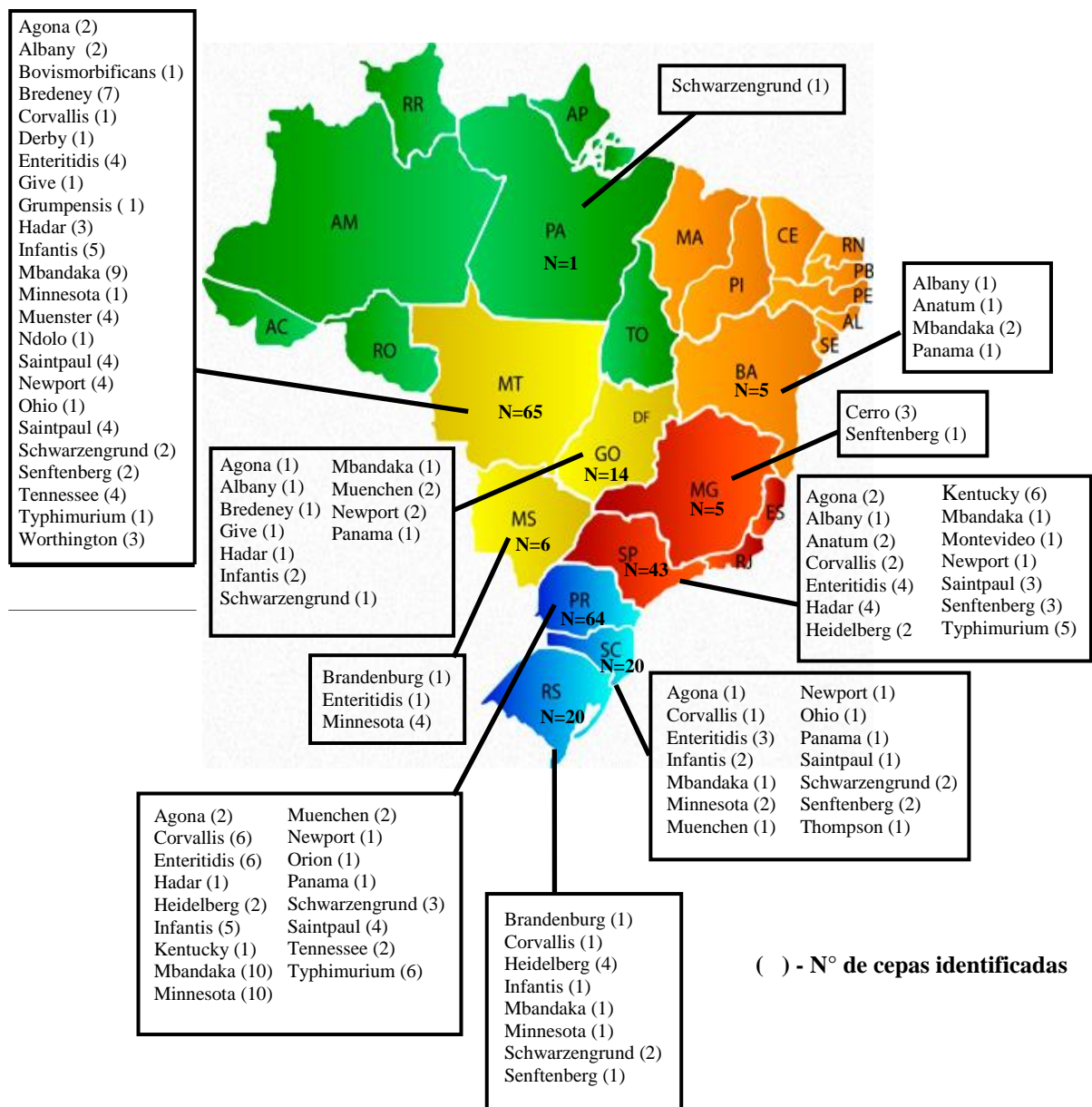


Figura 1 – Distribuição geográfica dos sorovares de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isoladas de carcaças de frango resfriadas e congeladas, no período de 2009-2011.

Quanto à avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos, as 194 cepas (46 de carcaças de frango congeladas e 148 de carcaças de frango resfriadas) confirmaram seu perfil inicial, sendo caracterizadas 70% (135/194) resistentes a uma ou mais droga, 17% (33/194) sensíveis e 13% (26/194) intermediárias. No cômputo geral foi possível reconhecer 57 perfis distintos com variação entre 1 a 7 marcos de resistência, cuja distribuição pode ser observada na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Perfis de resistência detectados em *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango congeladas e resfriadas, no período de 2009-2011.

PERFIL DE RESISTÊNCIA	Nº DE CEPAS	PERFIL DE RESISTÊNCIA	Nº DE CEPAS	PERFIL DE RESISTÊNCIA	Nº DE CEPAS
AMP	5	TCY,NAL	3	AMP,FOX,FEP,CAZ	1
CIP	1	TCY,SXT	2	AMP,TCY,CRO,GEN	1
GEN	4	AMP,FOX,CAZ	6	AMP,TCY,STR,GEN	1
NAL	24	AMP,FOX,CRO	1	AMP,FOX,CRO,GEN,CFT	3
NIT	2	AMP,TCY,CRO	1	AMP,TCY,FOX,CRO,NAL	1
STR	3	AMP,TCY,NAL	1	AMP,FOX,CRO,SXT,NIT	1
TCY	10	AMP,TCY,STR	5	AMP,TCY,FOX,CRO,STR	1
AMP,CRO	1	FOX,CAZ,STR	1	AMP,TCY,GEN,NAL,STR	2
AMP,FEP	1	NAL,FOX,CFT	1	AMP,TCY,STR,NAL,SXT	1
CHL,GEN	1	NAL,SXT,STR	1	AMP,TCY,SXT,NIT,STR	1
CHL,TCY	1	TCY,GEN,SXT	1	TCY,GEN,NAL,NIT,STR	1
AMP,NIT	1	TCY,NAL,NIT	2	AMP,CHL,TCY,CIP,NAL,STR	1
AMP,SXT	1	TCY,NAL,STR	2	AMP,CHL,FOX,CRO,NAL,SXT	1
AMP,TCY	1	TCY,STR,NIT	1	AMP,TCY,FOX,CRO,GEN,CFT	3
GEN,STR	1	TCY,STR,SXT	1	AMP,TCY,FOX,CRO,NAL,CFT	1
TCY,STR	5	AMP,CEP,CRO,NAL	1	AMP,TCY,FOX,GEN,NAL,CFT	1
TCY,CIP	1	AMP,CEP,FOX,CRO	1	AMP,CHL,FOX,CAZ,STR,NAL,NIT	1
NAL,NIT	14	AMP,FOX,CRO,CAZ	1	AMP,CHL,TCY,GEN,NAL,SXT,NIT	1
NAL,STR	1	AMP,FOX,CRO,CFT	1	AMP,TCY,FOX,CRO,GEN,NAL,CFT	1

AMP- Ampicilina; CHL – Cloranfenicol; TCY- Tetraciclina; FOX – Cefoxitina; CRO – Ceftriaxona; CFT – Ceftiofur; CAZ – Ceftazidime; FEP – Cefepime; GEN – Gentamicina; STR – Estreptomicina; NAL – Ácido Nalidíxico; CIP – Ciprofloxacina; NIT – Nitrofurantoína

Durante o período de análise, o aumento gradual nos percentuais de resistência foi observado entre 2009 (19,6% - 29/148) e 2011 (29,7% - 44/148) em carcaças de frango resfriadas. Nas congeladas, a resistência foi observada a partir de 2010 em 24% (11/46) das cepas analisadas, elevando-se para 37% (17/46) no ano de 2011.

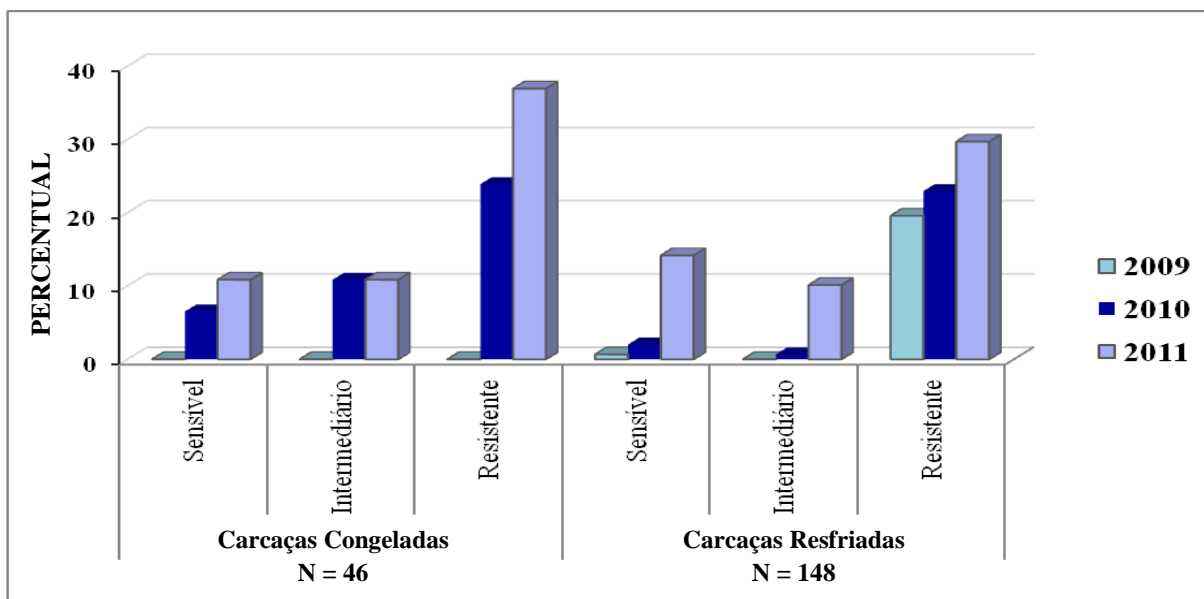


Gráfico 4 – Perfil de suscetibilidade de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango congeladas e resfriadas, no período de 2009 a 2011.

A evolução da resistência às oito classes de drogas avaliadas entre 2009 e 2011 apontou aumento para os beta-lactâmicos a partir de 2010. Índices representativos foram encontrados para quinolonas em 2009 (73% -24/30), com redução significativa para 21% (23/107) em 2011. Para as fluoroquinolonas este foi de 7% (2/30) em 2009 e 1% (1/107) em 2011. Naquelas proscritas como nitrofuranos, houve redução acentuada com percentual de 37% (11/30) em 2009 e 4% (4/107) em 2011. Resultados semelhantes foram também obtidos para os fenicóis, bem como para antifolatos com níveis médios entre 3 a 9% durante o período de análise. Assinala-se ainda que a totalidade das cepas apresentou sensibilidade para a classe dos carbapenems (**Gráfico 5**).

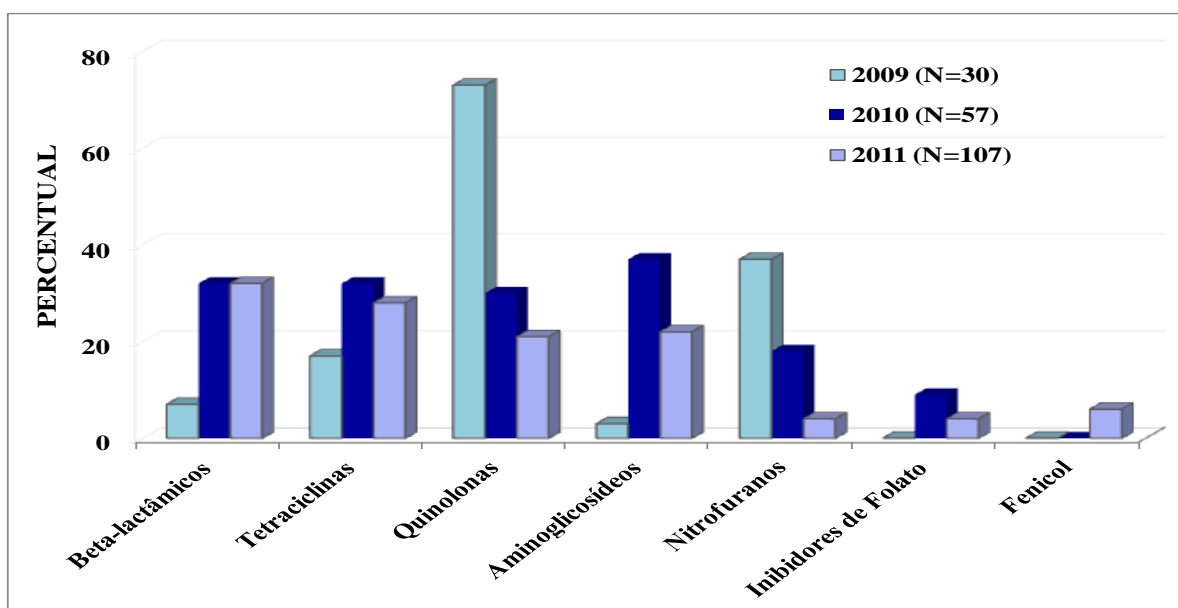


Gráfico 5 – Evolução da resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango congeladas e resfriadas, no período de 2009 a 2011.

Particularmente, entre as cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango congeladas foi observada a resistência a 6 classes de antimicrobianos (exceção dos fenicóis e carbapenems), com percentuais mais elevados para quinolonas e aminoglicosídeos em 2010 (\approx 13%) e tetraciclina em 2011 (\approx 24%). A evolução nesta fonte permitiu evidenciar aumento para os percentuais de beta-lactâmicos de 2% (1/46) em 2010 para 15% (7/46) em 2011 e níveis médios em torno de 2 e 4% para antifolatos e nitrofuranos (**Dados não representados em tabela**).

Em carcaças resfriadas, a resistência foi evidenciada em todas as classes analisadas, com ênfase para o aumento observado nas quinolonas, cujo percentual foi equivalente a 15% (23/148) em 2009 e os beta-lactâmicos que em 2010 e 2011 apresentaram 11% (17/148) e 18% (27/148) respectivamente. Inversamente foi evidenciado para nitrofuranos que obtiveram taxas reduzidas de 7% (11/148) em 2009 para 2% (3/148) em 2011 (**Dados não representados em tabela**).

Entre os perfis detectados em carcaças congeladas, a resistência igual ou menor que 2 classes de antimicrobianos (≤ 2) se manteve em torno de 40% nos anos de 2010 e 2011. Multirresistência – MDR ou resistência igual ou maior que três classes de antimicrobianos (≥ 3) foi evidenciada em 3 cepas (16% - 3/19) em 2010 elevando-se para 6 (24% - 6/27) em 2011.

Nas resfriadas, 94% (28/30) das cepas apresentaram resistência a ≤ 2 classes em 2009, com redução a partir de 2010, alcançando 37,5% (30/80) em 2011. Em contraposição, a resistência a ≥ 3 classes aumentou em 2010 (26,3% - 10/38) e se manteve em torno de 17,5% (14/80) em 2011. Paralelamente, o perfil intermediário determinado a partir de 2010 apresentou índices equivalentes a 2,6% (1/38) acentuando-se em 2011 (15/148) (**Gráfico 6**).

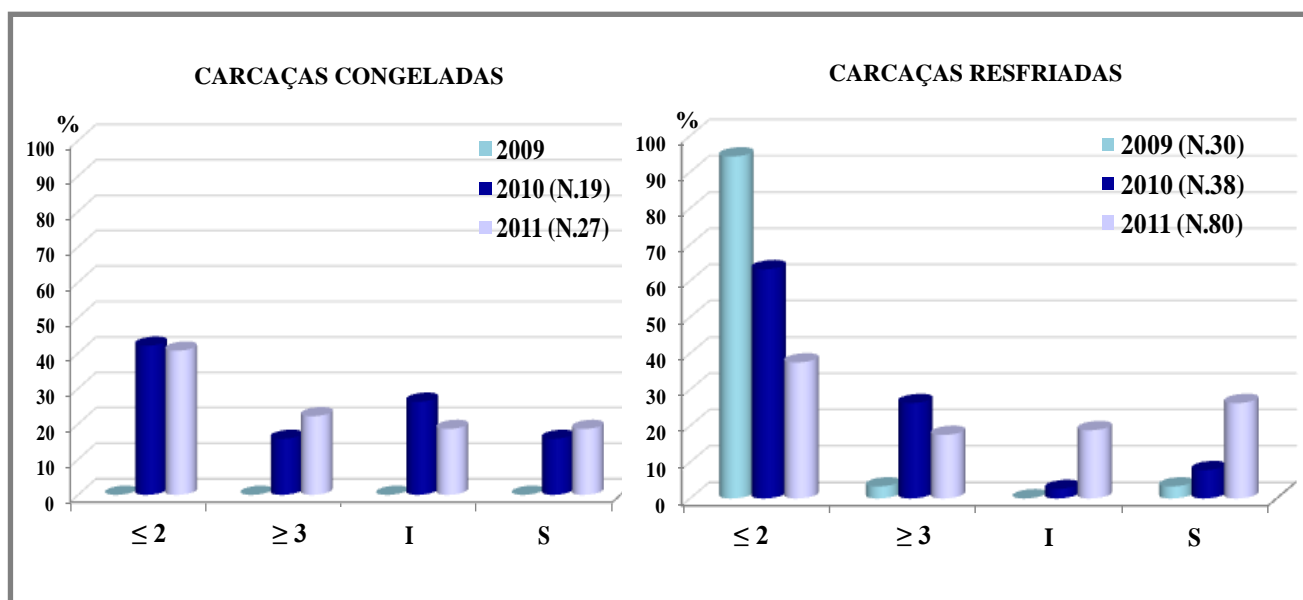


Gráfico 6 - Suscetibilidade antimicrobiana em *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango congeladas e resfriadas, no período de 2009 a 2011

No cômputo geral, o perfil de suscetibilidade permitiu identificar que 17,5% (34/194) cepas apresentaram resistentes a mais que 3 classes de antimicrobianos (Multirresistência – MDR), sendo esta característica detectada em apenas um sorovar em 2009, 10 sorovares em 2010 e 11 em 2011, conforma apresentado na **Tabela 3**. Particularmente foram mais frequentes em *Salmonella* ser. Heidelberg isoladas no período de 2010 a 2011, Mbandaka em 2010, e Typhimurium em 2011.

Tabela 3 – Distribuição dos sorovares de *Salmonella* multirresistentes de acordo com ano e fonte de isolamento.

	2009		2010		2011	
	CC	CR	CC	CR	CC	CR
<i>Salmonella</i> <i>ser.</i>		Hadar (1)	Corvallis (1)	Brandenburg (1)	Hadar (1)	Brandenburg (1)
			Mbandaka (1)	Heidelberg (2)	Typhimurium (3)	Bredeney (1)
			Albany (1)	Mbandaka (2)	Saintpaul (1)	Derby (1)
				Minnesota (1)	Enteritidis (1)	Enteritidis (1)
				Saintpaul (1)		Heidelberg (2)
				Schwarzengrund (1)		Minnesota (1)
				Tennessee (1)		Muenster (1)
				Typhimurium (1)		Newport (1)
						Typhimurium (5)

() – N° de cepas; CC – Carcaças Congeladas; CR – Carcaças Resfriadas

Foram reconhecidos 25 padrões distintos, destacando-se especialmente àqueles com mais de 5 marcos de resistência, encontrados em 2010 em *Salmonella* ser. Tennessee, Brandenburg, Schwarzengrund e Heidelberg e em 2011 nos sorovares Newport, Enteritidis, Typhimurium, Minnesota, Muenster, Heidelberg e Saintpaul, conforme descrito na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Distribuição dos perfis de multirresistência detectados nos diferentes sorovares de *Salmonella*, de acordo com ano e fonte de isolamento.

ANO	SOROVARES	PERFIS DE MULTIRRESISTÊNCIA			
		CARCAÇAS CONGELADAS	N	CARCAÇAS RESFRIADAS	N
2009	Hadar			TCY,NAL,NIT	1
	Minnesota			AMP, TCY, STR	1
2010	Mbandaka	AMP, TCY, STR	1	AMP, TCY, STR	2
	Albany	NAL, SXT, STR	1		
	Saintpaul			TCY, GEN, SXT	1
	Corvallis	TCY, NAL, NIT	1		
	Typhimurium			TCY, STR, SXT	1
	Tennessee			AMP, TCY, STR, GEN	1
	Brandenburg			AMP, TCY, STR, NAL, SXT	1
	Schwarzengrund			AMP, TCY,SXT,NIT, STR	1
	Heidelberg			AMP,TCY,GEN,NAL,STR	1
				TCY,GEN,NAL,NIT,STR	1
2011	Typhimurium	AMP,TCY,STR,GEN,NAL	1	AMP,TCY,NAL	1
		AMP,TCY, FOX,CRO,NAL,CFT	1	AMP,TCY,STR	1
		AMP,TCY,FOX,CRO,GEN,NAL,CFT	1	AMP,TCY,FOX,CRO,STR	1
				AMP,TCY,FOX,GEN,NAL,CFT	1
				AMP,CHL,TCY,GEN,NAL,SXT,NIT	1
	Derby			TCY,NAL,STR	1
	Hadar	TCY,STR,NIT	1		
	Bredeney			AMP,CRO,GEN,NAL	1
	Brandenburg			AMP,TCY,CRO,GEN	1
	Newport			AMP,TCY,FOX,CRO,NAL	1
	Enteritidis	AMP,FOX,CRO,SXT,NIT	1		
	Minnesota			AMP,CHL,TCY,CIP,NAL,STR	1
	Muenster			AMP, CHL,FOX,CRO,NAL,SXT	1
	Heidelberg			AMP,TCY,FOX,CRO,GEN,CFT	
	Saintpaul	AMP,TCY, FOX,CRO, GEN, CFT	1		
Enteritidis			AMP,CHL,FOX,CAZ,STR,NAL,NIT	1	

AMP- Ampicilina; CHL – Cloranfenicol; TCY- Tetraciclina; FOX – Cefoxitina; ; CRO – Ceftriaxona; CFT – Ceftiofur; CAZ – Ceftazidime; FEP – Cefepime; GEN – Gentamicina; STR – Estreptomicina; NAL – Ácido Nalidíxico; CIP – Ciprofloxacina; NIT – Nitrofurantoína

Considerando a resistência observada para os beta-lactâmicos, o marco ampicilina foi detectado em 26,2% (51/194) das cepas. Quanto à cefalosporinas de 3ª geração de uso terapêutico humano foi observada em 2009 em *Salmonella* ser. Agona e O:4,5 com percentual de 1% (2/194). Em 2010, esta característica foi observada em 4 sorovares e 2011 em 10 sorovares.

Outrossim, para aquelas de uso veterinário (ceftiofur), embora tenha sido avaliada somente em 2011, esta característica foi detectada tanto em sorovares que apresentavam perfis de resistência para drogas de uso humano, quanto em sorovares de reduzida disseminação, como por exemplo a *Salmonella* ser. Worthington detectada somente em carcaças resfriadas. (Tabela 5)

Tabela 5 – Distribuição dos sorovares de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isoladas de carcaças congeladas e resfriadas de frango resistentes à cefalosporinas de uso humano e veterinário.

	2009	2010	2011
USO HUMANO	Agona (1)	Agona (2)	Brandenburg (1)
	O: 4,5 (1)	Infantis (4)	Enteritidis (2)
		Newport (1)	Heidelberg (3)
		Schwarzengrund (1)	Infantis (2)
			Minnesota (2)
			Muenster (1)
			Newport (3)
			Saintpaul (2)
			Schwarzengrund (1)
			Typhimurium (3)
USO VETERINÁRIO	ND	ND	Heidelberg (2)
			Minnesota (1)
			Newport (2)
			Saintpaul (2)
			Typhimurium (3)
		Worthington (1)	

ND – Não determinado, () - N° de cepas resistentes

Ainda sob o aspecto de resistência às cefalosporinas de 3ª geração, os resultados encontrados apontam elevação acentuada em carcaças de frango resfriadas, com índices correspondentes a 7% em 2009 (2/30), 21% em 2010 (8/38) e 20% em 2011 (16/80). Nas congeladas, esta progressão foi observada em 22,2% das cepas (6/27) a partir de 2011 (Gráfico 7).

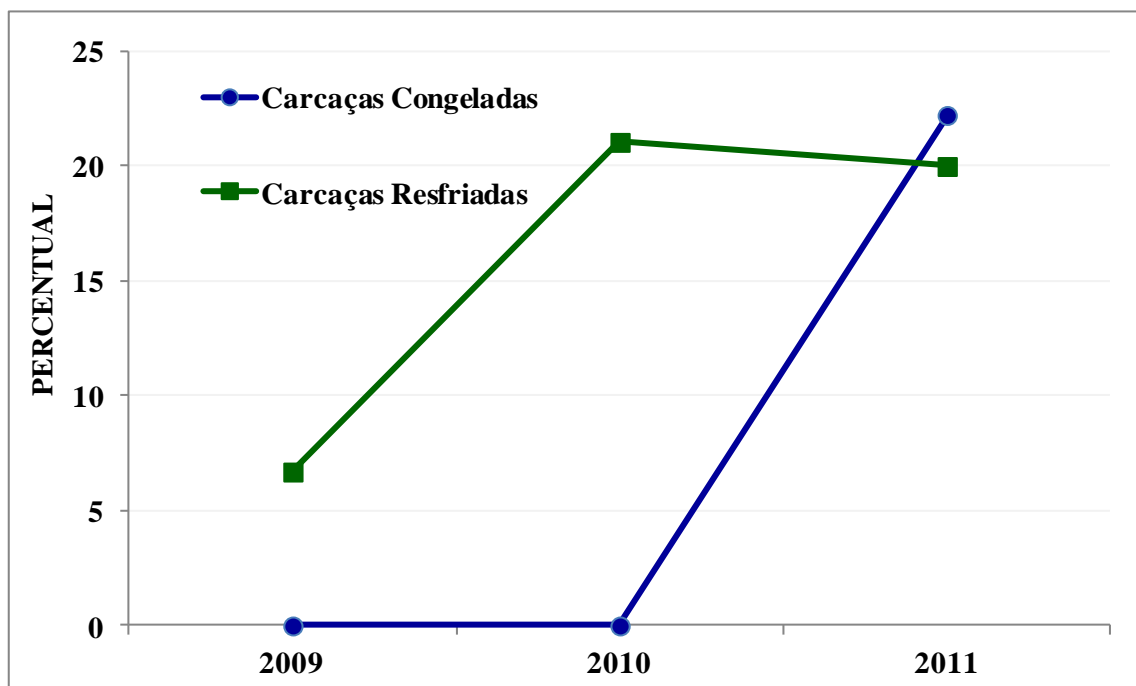


Gráfico 7 – Evolução da resistência à cefalosporinas de 3ª geração em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango congeladas e resfriadas, no período de 2009 a 2011.

Quanto às fluoroquinolonas, a resistência foi observada em 7% das cepas (2/30) em 2009, com redução a partir de 2010, alcançando 1% (1/107) em 2011, envolvendo os sorovares Newport, Senftenberg e Minnesota.

Em relação aos aminoglicosídeos foram evidenciados percentuais de resistência de 11% (21/194) para gentamicina e 15% (30/194) para estreptomicina.

Quando esta avaliação se faz com o tipo de carcaça é possível observar que em congeladas os percentuais foram iguais a 9% (4/46) para gentamicina e 13% (6/46) para estreptomicina. Em semelhança, os índices encontrados em resfriadas, foram 10% (17/148) e 14% (21/148) respectivamente.

Para drogas de uso proibido pelo MAPA, no cômputo geral os resultados indicam um percentual de 27% (52/194) para tetraciclinas, 12% (23/194) para nitrofuranos 3,0% (6/194) para cloranfenicol.

Quando avaliados isoladamente em carcaças resfriadas, 13% (4/30) foram resistentes para tetraciclinas em 2009, 37% (14/38) em 2010 e 22,5% (18/80) em 2011. Inversamente foi observado para nitrofuranos, com 37% (11/30) em 2009, 15,7% (6/38) em 2010 e 2,5% (2/80) em 2011. Enquanto para cloranfenicol a resistência nesta fonte só foi observada em 2011 em 7,5% das cepas (6/80).

Já os resultados evidenciados em carcaças congeladas, os percentuais para tetraciclinas apontaram 21% (4/19) em 2010 com progressão para 40,7% (11/27) em 2011. Para nitrofuranos foi evidenciada em 11% (2/19) em 2010, com uma redução para 7,4% (2/27) em 2011. A totalidade das cepas se apresentou sensível para cloranfenicol.

A caracterização dos genes de resistência pelo método da PCR entre cepas que apresentavam perfis resistente, intermediário ou com sensibilidade reduzida para cefalosporinas de 3ª geração (genes *bla_{CMY}* e *bla_{CTX-M}*), quinolonas (genes *gyrB*, *qnr* e *integrase*), aminoglicosídeos (*aac(3'')*-IIa, *aac(6')*-Ib e *integrase*) encontram-se discriminados na **Tabela 6**.

Tabela 6– Avaliação do padrão molecular de genes de resistência em *Salmonella* spp. pelo método da PCR.

GENES DE RESISTÊNCIA	CARCAÇAS RESFRIADAS						CARCAÇAS CONGELADAS					
	Nº de cepas avaliadas			Nº de cepas positivas			Nº de cepas avaliadas			Nº de cepas positivas		
	R	I	Sr	R	I	Sr	R	I	Sr	R	I	Sr
<i>bla_{CMY}</i>	26	-	105	13	-	3	6	-	29	3	-	-
<i>bla_{CTX-M}</i>	26	-	21	6	-	4	6	-	5	1	-	0
<i>gyrB</i>	51	-	-	23	-	-	14	-	-	3	-	-
<i>qnrA</i>	52	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-
<i>qnrB</i>	52	-	-	7	-	-	15	-	-	2	-	-
<i>qnrS</i>	52	-	-	2	-	-	15	-	-	0	-	-
<i>aac(3'')</i> - IIa	34	-	-	-	-	-	12	-	-	1	-	-
<i>aac(6')</i> - Ib	34	-	-	-	-	-	12	-	-	0	-	-
<i>integrase</i>	71	11	5	15	0	1	21	8	1	4	0	0

R – perfil resistente; I – perfil intermediário; Sr – sensibilidade reduzida.

No cômputo geral, em 166 cepas que apresentaram resistência (32) ou sensibilidade reduzida (134) à cefalosporinas de 3ª geração, a presença do gene *bla_{CMY}* foi evidenciada em 12,2% (16/131) cepas isoladas de carcaças de frango resfriadas e 8,6% (3/35) de carcaças congeladas, perfazendo um total de 19 cepas (11,4% - 19/166) (**Tabela 6**).

Particularmente àquelas resistentes à cefalosporinas de 3ª geração, a presença do gene *bla_{CMY}* foi evidenciada em 50% (13/26) dos isolados de carcaças de frango resfriadas e 50% (3/6) de congeladas, demonstrando similaridade entre os resultados. Entre as cepas com sensibilidade reduzida para esta droga, a positividade para este gene foi observada em 3 cepas isoladas de carcaças resfriadas (2,9% - 3/105) (**Tabela 6**).

Entre os sorovares positivos para o gene *bla_{CMY}*, destacam-se *Salmonella* ser. Hadar isolada em 2009, 7 cepas em 2010 pertencentes aos sorovares Agona, Infantis e Newport, e 11 cepas em 2011 distribuídas entre os sorovares Saintpaul, Typhimurium, Schwarzengrund, Albany, Newport, Minnesota, Brandenburg, Senftenberg e Infantis, conforme descrito na **Tabela 7**.

Quanto à caracterização do gene *bla_{CTX-M}* observado entre as 58 cepas analisadas, apontaram que 21,2% (10/47) foram detectados em *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango resfriadas e apenas 9% (1/11) nas congeladas (**Tabela 6**).

A presença deste gene foi evidenciada nos sorovares Infantis (2010), Bredeney, Heidelberg, Schwarzengrund e Typhimurium (2011) e Minnesota e Newport (2010 e 2011), oriundas dos estados de Santa Catarina, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (**Tabela 7**).

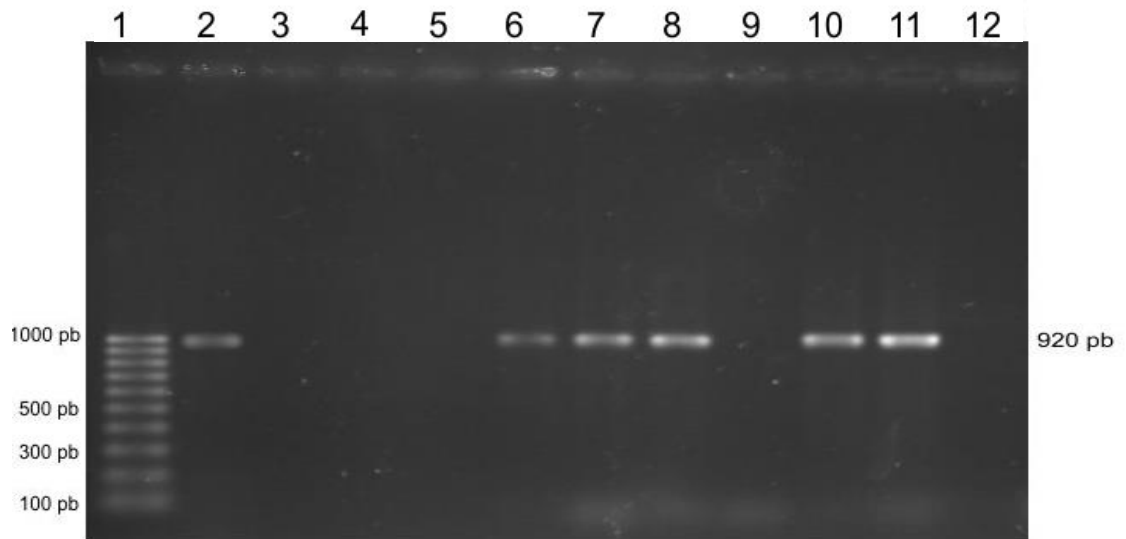
É importante ressaltar que entre as 26 cepas que apresentaram sensibilidade reduzida (21 isoladas de carcaças resfriadas e 5 congeladas), um total de 19% (4/21) de cepas isoladas de carcaças resfriadas apresentaram o gene *bla_{CTX-M}* (**Tabela 6**), tendo sido caracterizado em *Salmonella* ser. Newport procedente de Goiás (perfil AMP, NIT), *Salmonella* ser. Bredeney de Mato Grosso (perfil TCY,NAL,STR), *Salmonella* ser. Typhimurium e Minnesota (AMP, TCY, STR) isoladas nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina respectivamente (**Tabela 7**).

A correlação entre os resultados obtidos, na caracterização dos genes *bla_{CMY}* e *bla_{CTX-M}*, permite observar que estes genes não tem sua presença concomitante, exceto em uma cepa *Salmonella* ser. Infantis (**Tabela 7**).

Tabela 7 – Avaliação comparativa da presença de genes codificantes de resistência à cefalosporinas de 3ª geração em sorovares de *Salmonella* spp.

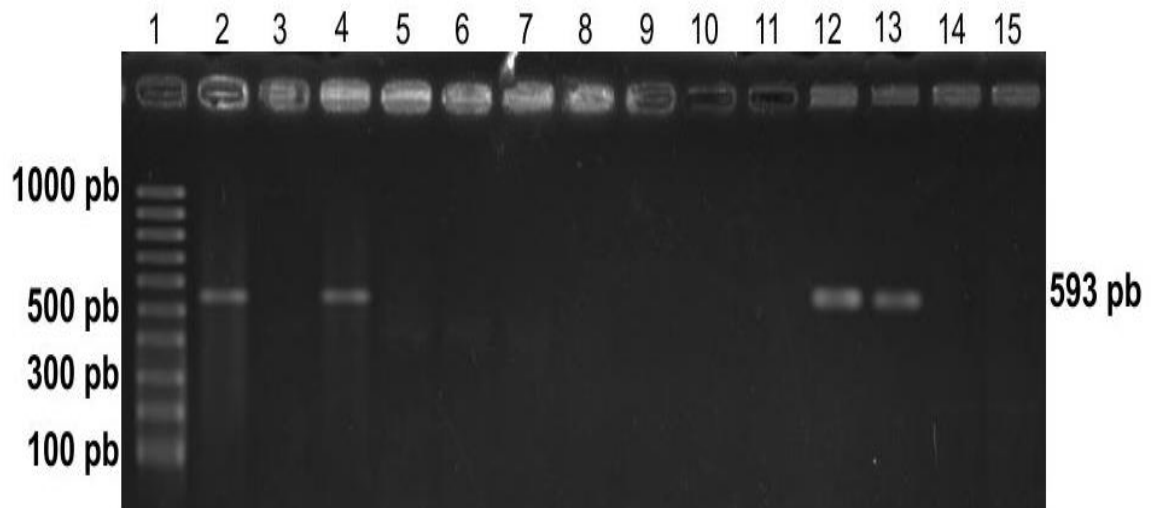
ANO	<i>Salmonella enterica</i> serovar	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE	ORIGEM	N	GENES DE RESISTÊNCIA	
					<i>Bla</i> _{CMY}	<i>Bla</i> _{CTX-M}
2009	Hadar	AMP,CEP,FOX,CRO	SP	1	POSITIVO	NEGATIVO
	Agona	AMP, FOX,CAZ	GO	1	POSITIVO	NEGATIVO
		AMP,FOX,FEP,CAZ	MT	1	POSITIVO	NEGATIVO
2010	Infantis	AMP,FOX,CAZ	GO, PR, MT	3	POSITIVO	NEGATIVO
		AMP,FEP	SC	1	POSITIVO	POSITIVO
	Minnesota	AMP,TCY,STR	MS	1	NEGATIVO	POSITIVO
	Newport	AMP,FOX,CAZ	GO	1	POSITIVO	NEGATIVO
		AMP, NIT	GO	1	NEGATIVO	POSITIVO
	2011	Albany	TCY	MT	1	POSITIVO
Bredeney		TCY, NAL, STR	MT	1	NEGATIVO	POSITIVO
Brandenburg		AMP,TCY,CRO,GEN	RS	1	POSITIVO	NEGATIVO
Heidelberg		AMP,TCY,FOX,CRO,GEN,CFT	RS	2	NEGATIVO	POSITIVO
Infantis		AMP,FOX,CRO,CAZ	MT	1	POSITIVO	NEGATIVO
Minnesota		AMP,FOX,CRO,GEN,CFT	MT	1	POSITIVO	NEGATIVO
		AMP,TCY,CRO	MS	1	NEGATIVO	POSITIVO
Newport		AMP, FOX,CRO,GEN,CFT	MT	1	POSITIVO	NEGATIVO
		AMP,FOX,CRO,CFT	MT	1	POSITIVO	NEGATIVO
		AMP,TCY,FOX,CRO,NAL	SC	1	NEGATIVO	POSITIVO
Saintpaul		AMP, FOX,CRO,GEN,CFT	SP	1	POSITIVO	NEGATIVO
		AMP,TCY, FOX,CRO, GEN, CFT	SP	1	POSITIVO	NEGATIVO
Schwarzengrund		INTERMEDIÁRIO STR	MT	1	POSITIVO	NEGATIVO
		AMP, FOX, CRO	RS	1	NEGATIVO	POSITIVO
Senftenberg		AMP	MT	1	POSITIVO	NEGATIVO
Typhimurium	AMP,TCY,FOX,CRO,GEN,NAL,CFT	SP	1	POSITIVO	NEGATIVO	
	AMP,TCY,STR	RS	1	NEGATIVO	POSITIVO	
	AMP,TCY,FOX,CRO,STR	RS	1	NEGATIVO	POSITIVO	

N – N° de cepas



1 – Marcador de peso molecular; 2 – Controle positivo; 12 – Controle negativo
Reação positiva: 6 –*Salmonella* ser. Saintpaul; 7–*Salmonella* ser. Typhimurium; 8–*Salmonella* ser. Minnesota; 10 –*Salmonella* ser. Infantis; 11–*Salmonella* ser. Newport.
Reação negativa: 3–*Salmonella* ser. Enteritidis; 4–*Salmonella* ser. Mbandaka; 5–*Salmonella* ser. Heidelberg; 9–*Salmonella* ser. Panama.

Figura 2– Produto da amplificação do gene *bla_{CMY}* obtido através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella* spp.



1 – Marcador de peso molecular; 2 – Controle positivo; 15 – Controle negativo
Reação positiva: 4 - *Salmonella* ser. Infantis, 12 - *Salmonella* ser. Typhimurium, 13 - *Salmonella* ser. Minnesota;
Reação negativa: 3- *Salmonella* ser. Agona, 5 - *Salmonella* ser. Enteritidis, 6- *Salmonella* ser. Saintpaul, 7- *Salmonella* ser. Senftenberg, 8- *Salmonella* ser. Brandenburg, 9- *Salmonella* ser. Hadar, 10- *Salmonella* ser. Agona, 11 - *Salmonella* ser. Typhimurium, 14– *Salmonella* ser. Schwarzengrund.

Figura 3– Produto da amplificação do gene *bla_{CTX-M}* obtido através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella* spp.

Quanto à avaliação molecular de cepas resistentes a quinolonas, os resultados apontaram em um total de 65 cepas, a presença do gene *gyrB* em 45% das cepas isoladas de carcaças resfriadas (23/51) e 21% (3/14) congeladas.

A presença do gene *gyrB* foi identificado em 18 sorovares distintos, sendo *Salmonella* ser. Agona, Brandenburg, Bredeney, Enteritidis, Grumpensis, Hadar, Heidelberg, Kentucky, Corvallis, Montevideo, Ndolo, Newport, Tennessee, Typhimurium e Worthington isoladas de carcaças resfriadas provenientes dos estados de São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina e *Salmonella* ser. Corvallis, Panama e Albany isoladas de carcaças congeladas do Paraná e Bahia (**Tabela 8**).

Entre estes sorovares, destacam-se aqueles cujo perfil demonstrou resistência a mais que 4 classes de drogas, como *Salmonella* ser. Brandenburg (AMP,TCY,STR,NAL,SXT); Heidelberg (TCY,GEN,NAL,NIT,STR) e Typhimurium (AMP,CHL,TCY,GEN,NAL,SXT,NIT), conforme descrito na **Tabela 8**.

A caracterização dos genes *qnr* (A, B, S) realizada em um total de 67 cepas, constatou positividade para o gene *qnrB* em 13,4% (7/52) de cepas isoladas de carcaças resfriadas, em semelhança com àquelas isoladas de congeladas, cujo percentual foi 13,3% (2/15). (**Tabela 6**)

O gene *qnrB* foi detectado em *Salmonella* ser. Typhimurium, Corvallis, Hadar e Derby isoladas de carcaças resfriadas provenientes do Mato Grosso, *Salmonella* ser. Anatum, Derby, Corvallis e O:3,10 de São Paulo e *Salmonella* ser. Anatum da Bahia. Em carcaças congeladas, esta característica foi observada em *Salmonella* ser. Mbandaka e Panama na Bahia. Quanto ao gene *qnrS*, o mesmo foi caracterizado em 3,8% (2/52) somente das resfriadas, entre os sorovares Senftenberg e Typhimurium provenientes do Estado de São Paulo e Paraná respectivamente. A presença do gene *qnrA* não foi evidenciada em nenhuma cepa avaliada (**Tabela 8**).

A presença de *aac*(3'')-IIa e *aac*(6')-Ib foi avaliada na totalidade de cepas (N=46) que apresentavam em seu perfil, resistência aos aminoglicosídeos e quinolonas. Entre os resultados obtidos, apenas 1 cepa (2%) identificada como *Salmonella* ser. Typhimurium isolada de carcaças congeladas de São Paulo apresentou o gene *aac*(3'')-IIa. Entre as cepas avaliadas (N=46), não houve positividade para o gene *aac*(6')-Ib.

Utilizando critério semelhante, a pesquisa de cassetes gênicos determinados por integrons de Classe 1 foi realizado em um total de 92 cepas resistentes (71 isoladas de carcaças resfriadas e 21 de congeladas), 19 com perfil intermediário (11 isoladas de carcaças resfriadas e 8 de congeladas) e 6 com sensibilidade reduzida para estreptomicina, gentamicina, ácido nalidíxico e/ou ciprofloxacina (5 isoladas de carcaças resfriadas e 1 de congeladas). Inicialmente foi avaliado a presença do gene *integrase* (análise da região conservada) em 117 cepas (**Tabela 6**). Entre as resistentes, o gene *integrase* foi detectado em 22,5% (16/71) das cepas isoladas de carcaças resfriadas, apresentando similaridade com os percentuais encontrados em congeladas, cujo o percentual detectado foi de 19% (4/21).

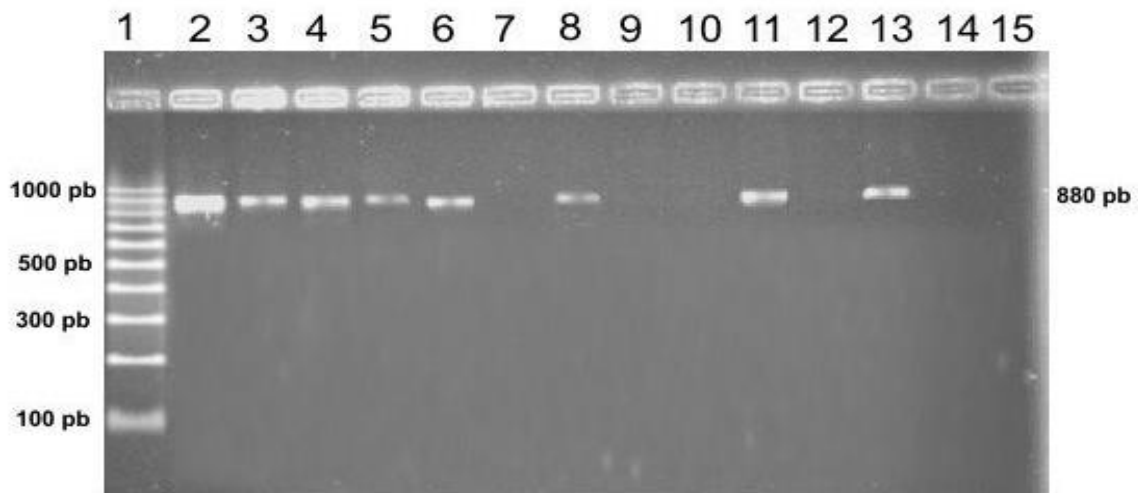
Entre as resfriadas, destacam-se os sorovares Brandenburg, Derby, Enteritidis, Heidelberg, Infantis, Mbandaka, Saintpaul, Schwarzengrund e Typhimurium distribuídas entre os Estados de São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, conforme descrito na **Tabela 8**. Em congeladas, esta característica foi evidenciada em *Salmonella* ser. Corvallis e Tennessee isoladas no Paraná, *Salmonella* ser. Albany na Bahia e *Salmonella* ser. Typhimurium, em São Paulo.

Cabe ressaltar ainda, que não houve a detecção de *integrase* em cepas intermediárias e com sensibilidade reduzida para aminoglicosídeos e quinolonas, com exceção de 1 cepa de *Salmonella* ser. Infantis, com perfil AMP, FOZ, CRO, CAZ, isolada de carcaças resfriadas.

Tabela 8 - Caracterização dos genes *gyrB*, *Qnr*(B,S), *aac*(3'')IIa e *integrase* em *Salmonella* spp.

ANO	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE	ORIGEM	N	GENES DE RESISTÊNCIA			
					<i>gyrB</i>	<i>qnr</i>	<i>aac</i> (3'')-IIa	<i>integrase</i>
2009	Agona	NAL	SP	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Corvallis	TCY, NAI			NEGATIVO	POSITIVO*	NEGATIVO	NEGATIVO
	Enteritidis	NAL,NIT	SP	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Hadar	TCY,NAL	SP	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Heidelberg	NAL	SP	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Kentucky	NAL	SP	3	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Mbandaka	GEN	SP	1	ND	ND	ND	POSITIVO
	Montevideo	NAL,NIT	SP	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Newport	CIP	SP	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Senftenberg	NAL, NIT	SP	1	NEGATIVO	POSITIVO*	NEGATIVO	NEGATIVO
	O:3,10	NAL	SP	1	POSITIVO	NEGATIVO	ND	POSITIVO
	O:4,5	AMP, CEP, CRO, NAL	SP	1	NEGATIVO	POSITIVO*	NEGATIVO	NEGATIVO
	2010	Albany	NAL,SXT,STR	BA	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Anatum		NAL	BA	1	NEGATIVO	POSITIVO*	NEGATIVO	NEGATIVO
Brandenburg		AMP,TCY,STR,NAL,SXT	MS	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
Corvallis		TCY,NAL,NIT	PR	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		TCY,STR	PR	1	ND	ND	NEGATIVO	POSITIVO
Enteritidis		NAL, NIT	PR	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Hadar		NAL, NIT	PR	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Heidelberg		TCY,GEN,NAL,NIT,STR	PR	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
Mbandaka		NAL	BA	1	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		AMP,TCY,STR	PR	1	ND	ND	NEGATIVO	POSITIVO
Panama		NAL	BA	1	POSITIVO	POSITIVO*	NEGATIVO	NEGATIVO
Saintpaul		TCY,GEN,SXT	PR	1	ND	ND	ND	POSITIVO
Tennessee		NAL, NIT	MT	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		TCY,STR	PR	1	ND	ND	NEGATIVO	POSITIVO
Ndolo		NAL	MT	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Schwarzengrund		AMP,TCY,SXT,NIT,STR	PA	1	ND	ND	ND	POSITIVO
Typhimurium		NAL, STR	PR	1	NEGATIVO	POSITIVO*	NEGATIVO	POSITIVO
	TCY,STR,SXT	PR	1	ND	ND	NEGATIVO	POSITIVO	
2011	Bredeney	NAL	MT	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Corvallis	NAL	MT	1	NEGATIVO	POSITIVO*	NEGATIVO	NEGATIVO
	Derby	TCY, NAL, STR	MT	1	NEGATIVO	POSITIVO*	NEGATIVO	POSITIVO
	Enteritidis	NAL	MT	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		AMP,CHL,FOX,CAZ,STR,NAL,NIT	MT	1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
	Grumpensis	NAL	MT	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Hadar	NAL	MT	1	NEGATIVO	POSITIVO*	NEGATIVO	NEGATIVO
	Infantis	AMP,FOX,CRO,CAZ	MT	1	ND	ND	ND	POSITIVO
	Newport	AMP,TCY,FOX,CRO,NAL	SC	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Schwarzengrund	GEN	MT	1	ND	ND	NEGATIVO	POSITIVO
	Typhimurium	TCY,STR	RS	1	ND	ND	NEGATIVO	POSITIVO
		AMP,TCY,STR	RS	1	ND	ND	NEGATIVO	POSITIVO
		AMP, TCY, NAL	MT	1	NEGATIVO	POSITIVO*	NEGATIVO	NEGATIVO
		AMP,TCY,FOX,CRO,STR	RS	1	ND	ND	NEGATIVO	POSITIVO
		AMP,TCY,STR,GEN,NAL	SP	1	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
		AMP,CHL,TCY,GEN,NAL,SXT,NIT	RS	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Worthington	NAL,FOX,CFT	MT	1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

**qnrB*; ** *qnrS*; ND – Não determinado

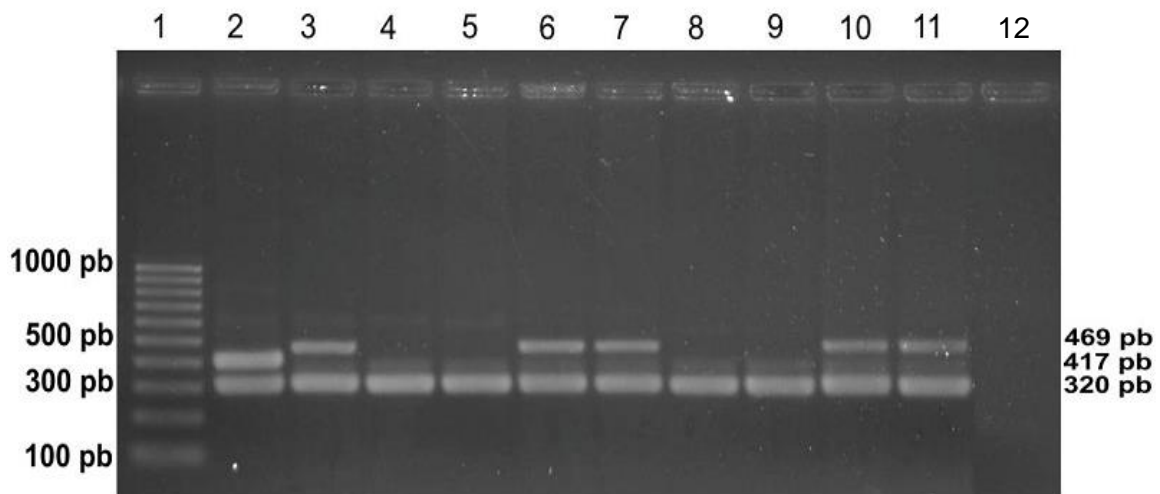


1 – Marcador de peso molecular; 2 – Controle positivo; 15 – Controle negativo

Reação positiva: 3- *Salmonella* ser. Agona, 4- *Salmonella* ser. Typhimurium, 5- *Salmonella* ser. Enteritidis, 6- *Salmonella* ser. Hadar; 8- *Salmonella* ser. Heidelberg; 11- *Salmonella* ser. Corvallis; 13 - *Salmonella* ser. Brandenburg

Reação negativa: 7- *Salmonella* ser. Albany, 9- *Salmonella* ser. Mbandaka, 10- *Salmonella* ser. Derby, 12- *Salmonella* ser. Typhimurium; 14- *Salmonella* ser. Enteritidis

Figura 4 – Produto da amplificação do gene *gyrB* obtido através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella* spp.



1 – Marcador de peso molecular; 2 – Controle positivo *QnrS*; 3- Controle positivo *QnrB*; 12 – Controle negativo

Reação positiva *QnrB*: 6- *Salmonella* ser. Mbandaka, 7- *Salmonella* ser. Corvallis, 10- *Salmonella* ser. Typhimurium, 11- *Salmonella* ser. Panama;

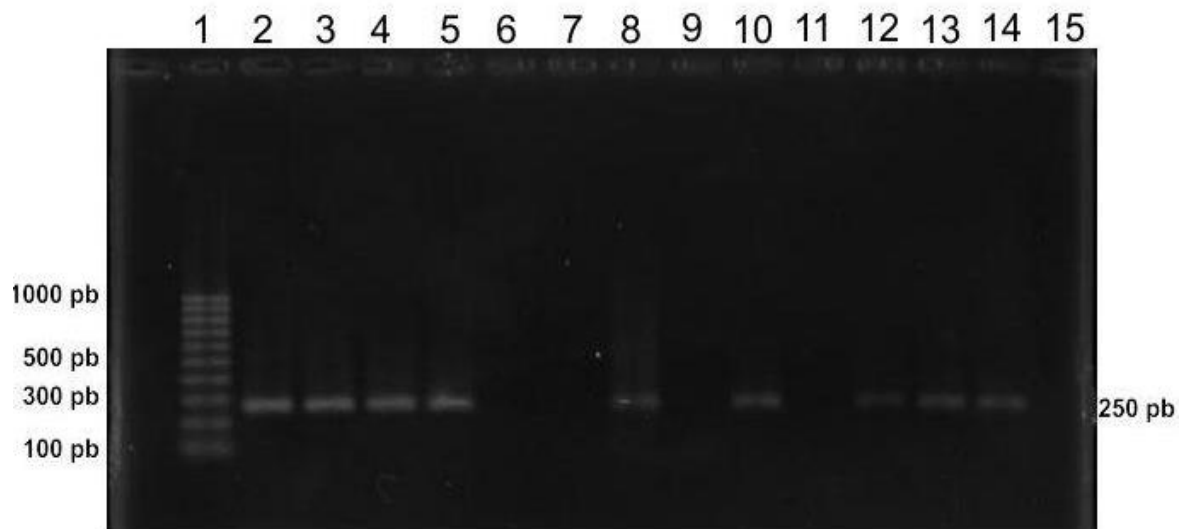
Reação negativa: 4- *Salmonella* ser. Enteritidis, 5- *Salmonella* ser. Mbandaka, 8- *Salmonella* ser. Typhimurium, 9- *Salmonella* ser. Minnesota.

Figura 5 – Produto da amplificação dos genes *qnrB* e *qnrS* obtidos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – Multiplex em *Salmonella* spp.

Entre as 20 cepas que apresentaram a região conservada do integron, realizou-se a PCR para a caracterização dos genes da região variável, sendo possível reconhecer a amplificação de regiões que apresentaram peso molecular entre 700 e 800pb em 10% (2/20) das cepas avaliadas, 900pb em 45% (9/20), acima de 1000pb em 15% (3/20) e em 30% não foram determinados, conforme descrito na **Tabela 9**.

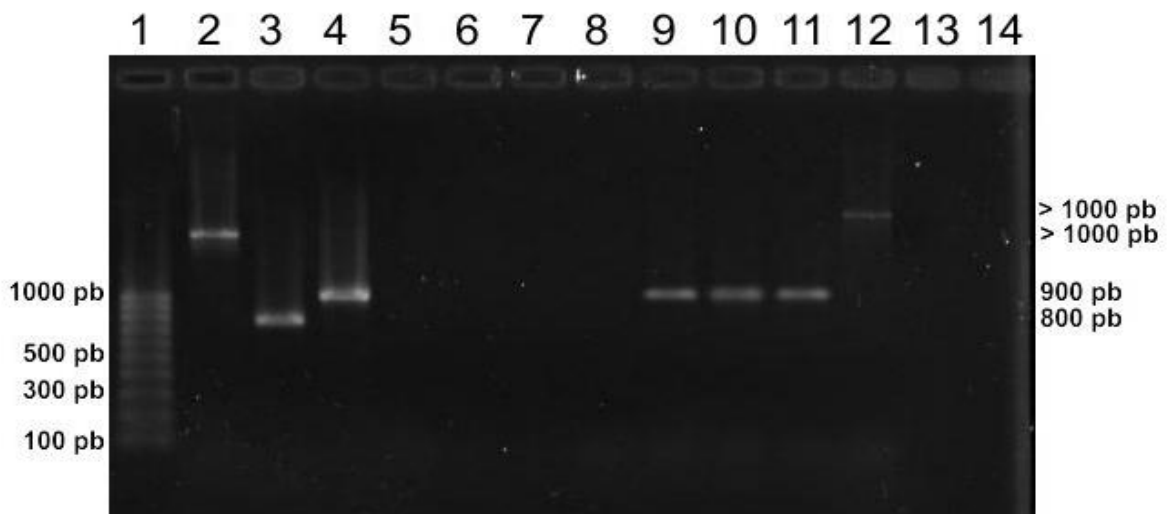
Tabela 9 – Distribuição dos sorovares de *Salmonella* positivas para o gene *integrase*, de acordo com perfil de suscetibilidade e estado de origem.

<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE	ESTADOS BRASILEIROS	INTEGRON VARIÁVEL
Albany	NAL,SXT,STR	BA	+/- 900 pb
Brandenburg	AMP,TCY,STR,NAL,SXT	MS	ND
Corvallis	TCY, STR	PR	+/- 900 pb
Derby	TCY,NAL,STR	MT	ND
Enteritidis	AMP,CHL,FOX,CAZ,STR,NAL,NIT	MT	> 1000pb
Heidelberg	TCY,GEN,NAL,NIT,STR	PR	+/- 900 pb
Infantis	AMP,FOX,CRO,CAZ	MT	+/- 900 pb
Mbandaka	GEN	SP	+/- 900 pb
	AMP,TCY,STR	PR	ND
Saintpaul	TCY,GEN,SXT	PR	>1000 pb
Schwarzengrund	AMP,TCY,SXT,NIT,STR	PA	+/- 800 pb
	GEN	MT	+/- 900 pb
Tennessee	TCY,STR	PR	ND
Typhimurium	AMP,TCY,FOX,CRO,STR	RS	+/- 900 pb
	AMP,TCY,STR	RS	+/- 900 pb
	AMP,TCY,STR,GEN,NAL	SP	ND
	NAL,STR	PR	ND
	TCY,STR	RS	+/- 900 pb
	TCY,STR,SXT	PR	> 1000pb
O:3,10	NAL	SP	+/-700 pb



1 – Marcador de peso molecular; 2 – Controle positivo; 15 – Controle negativo
Reação positiva: 3 - *Salmonella* ser. Mbandaka, 4- *Salmonella* ser. Corvallis, 5- *Salmonella* ser. Typhimurium, 8- *Salmonella* ser. Infantis, 10- *Salmonella* ser. Heidelberg, 12- *Salmonella* ser. Saintpaul, 13- *Salmonella* ser. Schwarzengrund, 14- *Salmonella* ser. Brandenburg;
Reação negativa: 6- *Salmonella* ser. Enteritidis, 7- *Salmonella* ser. Corvallis, 9- *Salmonella* ser. Mbandaka, 11- *Salmonella* ser. Minnesota

Figura 6 – Produto da amplificação da região conservada do integron através da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella* spp.



1 – Marcador de peso molecular; **Bandas com +/- 900pb:** 4- *Salmonella* ser. Mbandaka, 9- *Salmonella* ser. Corvallis, 10- *Salmonella* ser. Typhimurium, 11- *Salmonella* ser. Infantis; **Bandas com +/- 800pb:** 3- *Salmonella* ser. Schwarzengrund; **Bandas >1000pb:** 2- *Salmonella* ser. Enteritidis, 12- *Salmonella* ser. Typhimurium; **Não determinadas:** 5- *Salmonella* ser. Brandenburg, 6- *Salmonella* ser. Tennessee, 7- *Salmonella* ser. Typhimurium, 8- *Salmonella* ser. Derby, 13- *Salmonella* ser. Typhimurium; 14 – Controle negativo

Figura 7– Produto da amplificação da região variável do integron através da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella* spp.

6 DISCUSSÃO

A avicultura é reconhecida como uma atividade econômica internacionalizada e homogênea, sem fronteiras geográficas de tecnologia. A associação entre a implementação de técnicas mais modernizadas e melhoria de parâmetros sanitários foram fundamentais para seu desenvolvimento no Brasil, sendo reconhecida mundialmente como líder absoluta em produção e exportação de carne de frango. A manutenção e expansão dos principais mercados consumidores nacionais ou internacionais estão associadas principalmente com a garantia de qualidade e fornecimento dos alimentos seguros sem riscos à saúde do consumidor.

As restrições diante da presença de micro-organismos patogênicos na cadeia de produção avícola é abrangente, com regulamentações e avaliações técnicas que visam minimizar os impactos à sanidade e produtividade animal e proporcionar segurança para o consumidor. O aspecto de sanidade exige ações contínuas no controle de bactérias zoonóticas algumas de epidemiologia complexa, cujos padrões diferem de uma região para outra. Zoonoses são infecções transmissíveis entre animais e o homem podendo ser adquirida diretamente, através do contato ou ingestão de alimentos contaminados. Atualmente sabe-se que a cadeia alimentar corrobora fortemente para a estimativa de que infecções emergentes tem uma associação maior a partir dos patógenos de natureza zoonótica. O quadro clínico geralmente resulta em gastroenterite, cuja severidade depende da relação parasita-hospedeiro, podendo ainda ocorrer disseminação da bactéria além do trato intestinal e ocasionar infecção sistêmica, cuja gravidade varia de quadros assintomáticos a fatais.

Entre os micro-organismos de características zoonóticas, *Salmonella* spp. tem sido apontada através de numerosos estudos em diversos países, em diferentes sistemas de produção. Sua epidemiologia complexa a torna um dos principais patógenos de transmissão alimentar, sendo freqüentemente relatada em animais de produção, com ampla variedade de sorovares reconhecidos em frangos. Alguns destes representam sério problema na cadeia de produção animal (DALTON et al., 2004; CHITTICK et al., 2006; KOTTWITZ et al., 2010; WHO, 2012).

Vários fatores podem afetar a colonização por *Salmonella* spp. em aves, incluindo sua idade e susceptibilidade genética, stress devido à superlotação, competição com a microbiota intestinal para colonização de diferentes sítios, as características genéticas das cepas que facilitam sua fixação no trato gastrointestinal de aves ou capacidade de burlar as defesas do hospedeiro (LAHELLEC e COLIN, 1985; BAILEY, 1988).

As aves jovens são mais suscetíveis à colonização por *Salmonella* spp. seja por transmissão vertical ou horizontal nas incubadoras ou durante a alimentação, manuseio e transporte. Acrescenta-se ainda adoção de sistemas não-convencionais orgânicos e de pastagem elevando o potencial de contaminação devido à maior facilidade de acesso de vetores, tais como aves, roedores, insetos e outros animais silvestres (CUI et al., 2005; LESTARI et al., 2009).

Desta forma, ações contínuas para o controle de *Salmonella* spp. são consideradas desafios permanentes no setor avícola e a realização de contínuo monitoramento fornece subsídios para definição de medidas de intervenção (KIM et al., 2012).

No Brasil, o conhecimento da dinâmica de circulação de *Salmonella* spp. em carcaças de aves, também constitui elemento que contribui para a compreensão quanto aos fatores envolvidos na sua implantação e disseminação na cadeia alimentar, assim como da emergência e reemergência de alguns sorovares. Estes fatores se devem particularmente devido a associação, ao longo das últimas décadas, entre os sorovares predominantes detectados em aves e nas infecções humanas.

Esta assertiva tem por base estudos realizados em nosso meio (HOFER et al., 1997; PERESI et al., 1998; ANDREATTI FILHO, 2001; BERCHIERI JUNIOR e OLIVEIRA, 2006; SANTOS et al., 2008; KOTTWITZ et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010), fato observado no presente estudo. Quando avaliamos os sorogrupos e sorovares prevalentes na amostragem analisada, é possível constatar que entre os mais comumente detectados em aves ao longo dos últimos 30 anos, também se encontram apontados entre os cinco principais sorovares associados à infecções humanas (WHO, 2012).

Observando os resultados mais detalhadamente é possível reconhecer 9 sorogrupos distintos, entre os quais foram mais frequentes O:4 (B), O:7 (C₁) e O:8 (C₂-C₃) (**Gráfico 1**). Esta distribuição é idêntica aos resultados de Chiu et al. (2010) que detectaram O:4 (B), O:7 (C₁), O:8 (C₂-C₃), O:9 (D) em diferentes províncias na China e apresentaram semelhança nas avaliações realizadas em outros países e regiões, como O:7 (C₁) e O:4 (B) observados em Taiwan (YU et al., 2008), O:9 (D), O:4 (B) e O:7 (C₁) na Holanda (VAN DUIJKEREN et al., 2002) e nos EUA (CDC, 2008), os sorogrupos O:4 (B), O:9 (D) e O:8 (C₂-C₃).

Mundialmente inúmeros inquéritos vêm contribuindo para o conhecimento quanto aos sorovares circulantes em aves, sendo possível o reconhecimento na perspectiva atual dos sorogrupos O:4 (B), O:7 (C₁) e O:9 (D) como os mais prevalentes em países do continente Europeu, Americano e Asiático (ARROYO e ARROYO, 1995; GONCAGÜL et al., 2005; CORONA et al., 2012).

Particularmente em relação aos sorovares, foram evidenciados 33, cuja frequência variou em função do ano e origem de isolamento (**Tabela 1**). Entre os prevalentes, destacam-se a *Salmonella* ser. Mbandaka, seguido de Minnesota, Enteritidis, Typhimurium e Infantis.

No Brasil, o histórico epidemiológico da *Salmonella* é caracterizado pelo predomínio de alguns sorovares, cujo padrão pode variar de uma região para outra. Este panorama pode ser exemplificado pela introdução de *Salmonella* ser. Agona na década de 80, a partir da farinha de peixe proveniente do Peru utilizada como matéria prima em rações animais. Isto favoreceu sua veiculação e implantação em diferentes espécies de animais de abate, atingindo subsequentemente o homem. A partir daí, embora venha sofrendo flutuações sua permanência tem sido detectada em diferentes fontes de isolamento, especialmente em cepas de alimentos de origem animal (SOLARI et al., 1986).

Contudo, uma redução em sua casuística foi observada em meados dos anos 90, e paralelamente o número de isolamentos de *Salmonella* ser. Enteritidis aumentou vertiginosamente constituindo um sério problema em Saúde Pública (VELGE et al., 2005; GEIMBA et al. 2005; RIBEIRO et al., 2007; KOTTWITZ et al., 2010). Neste período, relatos em todo o mundo, apontavam este sorovar como o principal agente envolvido em surtos alimentares associados à ingestão de carne de frango e ovos contaminados (RIBEIRO et al., 2008; SANTOS et al., 2008; VAZ et al., 2010).

A presença de *Salmonella* ser. Enteritidis em frangos foi associada principalmente com roedores (CALLAWAY et al., 2008). Várias explicações foram teorizadas para o seu surgimento e emergência, no qual este sorovar ocupou o nicho ecológico, decorrente da implementação de programas de erradicação dos sorovares Pullorum e Gallinarum (BAUMLER et al., 2000). Além disso, modelos matemáticos sugeriram a exclusão competitiva de *Salmonella* ser. Enteritidis em aves por *Salmonella* ser. Gallinarum (RABSCH et al., 2000).

Evidentemente, por sua relevância e emergência em infecções humanas, a pesquisa sobre a circulação deste sorovar em produtos comercializados de origem animal foi articulada de modo a elucidar os aspectos epidemiológicos envolvidos em sua implantação em todos os elos da cadeia alimentar (REIS, 1994; BARBOUR et al., 1999; RIBEIRO et al., 2008).

Na Espanha, comprovou-se que seu isolamento havia aumentado em 126% entre os anos de 1997 a 1999, sendo considerado o sorovar predominante em ovos e carne de aves ainda no início de 2002 (GIL-SETAS et al., 2002). Em semelhança, as avaliações de Dominguez et al. (2002), verificaram sua predominância em frangos provenientes de mercados localizados em nove províncias de Castilla-León, localizado na Espanha. Em Portugal, 60% das amostras de produtos de origem avícola, disponíveis para consumidores, obtidos em açougues e mercados da cidade do Porto estavam contaminadas com *Salmonella* ser. Enteritidis (ANTUNES et al., 2003). Da mesma forma, que foi reconhecida por Tibaijuka et al. (2003) em carnes de frango vendidas a varejo e miúdos de aves na Etiópia e por Chang (2000) na Coréia.

No Brasil, avaliações no mesmo período foram realizadas por Santos et al. (2000) em carcaças obtidas no comércio varejista de Jaboticabal/SP, que detectaram entre 11 sorovares distintos, a predominância de Enteritidis em 60,4% da amostragem. Andreatti Filho (2001) e Tessari et al. (2003) evidenciaram sua ocorrência em carcaças industrialmente processadas. Em semelhança, Rezende et al. (2005) ao avaliarem carcaças de frango comercializadas em Goiás, verificaram um percentual relativamente elevado equivalente a 63,1%.

A compilação desses estudos, quando confrontados com os resultados obtidos no presente estudo, permite reconhecer que os percentuais atualmente detectados para *Salmonella* ser. Enteritidis vêm diminuindo ao longo do período. A média de isolamento entre os 3 anos foi em torno de 7%, sendo mais frequentes em carcaças resfriadas do que em congeladas (**Tabela 1**).

Rodrigues et al. (2010) reconhecem que a redução gradativa de sua frequência em alimentos de origem avícola vem ocorrendo desde 2004, como resultado da implantação do Programa Nacional de Sanidade Avícola pelo Ministério da Agricultura (MAPA). Seu objetivo inicial foi a eliminação de *Salmonella* ser. Pullorum e Gallinarum, posteriormente se estendeu para o controle dos sorovares Typhimurium e Enteritidis em granjas avícolas (MAPA, 1994).

Segundo Silva e Duarte (2002), o procedimento mais indicado para o controle de *Salmonella* ser. Enteritidis na avicultura está na aquisição e produção de lotes livres do agente.

Possivelmente, os percentuais detectados em nossa avaliação seja justificado, pelo reflexo de programas/ações voltadas para seu controle como o uso de vacinas, auxiliados provavelmente pelo aumento na imunidade natural da população de aves, resultante do contato direto com este sorovar ou ainda de outros com estrutura antigênica semelhante. Embora atualmente seja menor sua casuística, a permanência deste micro-organismo em carcaças, pode estar associada a falhas de biossegurança nas granjas ou ainda por sua presença em portadoras assintomáticas, de difícil detecção na rotina de monitoramento dos plantéis.

Porém quando as atividades são mais fortalecidas, resultados relevantes podem ser constatados ao longo do tempo. Este fato pode ser comprovado através da ausência de *Salmonella* ser. Pullorum e Gallinarum na totalidade das cepas avaliadas, indicando a conscientização e o trabalho que vem sendo realizado pelas indústrias avícolas e pelos órgãos normatizadores do governo.

A diversidade de sorovares reconhecidos em no presente estudo (N=33) e a emergência de alguns deles, como Mbandaka, Minnesota e Corvallis, representam uma consequência natural da ocupação do nicho deixado pela *Salmonella* ser. Enteritidis. Isto reflete uma preocupação potencial sobre qual ou quais outros sorovares irão efetivamente ocupar este nicho e representar uma condição de risco de infecção em seres humanos.

Muitos dos sorovares detectados em nossa avaliação já foram mencionados anteriormente em estudos realizados no Brasil sobre o isolamento de *Salmonella* spp. a partir de carcaças de frango. Rezende et al. (2005), por exemplo, em Goiás, identificaram *Salmonella* ser. Livingstone, Muenster, Typhimurium e Heidelberg. No ano seguinte, Tirolli e Costa (2006) detectaram a prevalência de *Salmonella* ser. Panama em carcaças resfriadas provenientes de Manaus e sinalizaram a emergência de *Salmonella* ser. Mbandaka presente em 17,9% da amostragem e em índices menores (1 a 4%) os sorovares Saintpaul, Senftenberg, Muenchen, Emek e Ohio. Moreira et al. (2008) determinaram a ocorrência de *Salmonella* ser. Albany, Saintpaul, Schwarzengrund, Tennessee, Infantis, Mbandaka, Panama, Muenchen, Emek e Typhimurium em carcaças de frango abatido comercializados em Goiás. Paralelamente, o relatório gerado pelo PREBAF (ANIVISA, 2008) apontava no período entre 2004 a 2006, a frequência de *Salmonella* ser. Infantis, Typhimurium, Heidelberg, Mbandaka em unidades amostrais de frangos representativos de 14 estados brasileiros.

Por outro lado, sabe-se que na epidemiologia das doenças humanas, alguns destes se apresentam em estágio contínuo, como exemplo da *Salmonella* ser. Enteritidis e Typhimurium, ou então se mostram emergentes como os sorovares Corvallis, Panama e Mbandaka (RODRIGUES et al., 2010; SVS/GNF, 2011).

Isso pode ser exemplificado com o que vem acontecendo com *Salmonella* ser. Mbandaka, que em nossa avaliação apresentou um percentual equivalente a 10,3% (25/243), tendo sua incidência anual marcante no ano de 2010 em carcaças congeladas, e em 2011 em carcaças resfriadas. Estes resultados se coadunam com a observação da emergência deste sorovar nas fontes animal, alimentar, ambiental e em matéria-prima/rações, quando realizaram um levantamento epidemiológico das cepas de *Salmonella* spp. recebidas para caracterização antigênica conclusiva pelo Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB) durante o período compreendido entre 2000 a 2009. De modo semelhante, foi apontado o aumento do sorovar Minnesota em amostras de fonte alimentar provenientes da cadeia produtiva de aves e suínos a partir de 2006 e sua dispersão até atingir o primeiro lugar no ranking nacional em 2010 em todos os elos da cadeia alimentar, refletido por sua casuística (7% - 18/243) em nossa avaliação.

Este sorovar tem sido apontado como o agente etiológico de surtos em diferentes países. O CDC em 2008 estimou que cerca de 340 casos de gastroenterites ocorridos nos Estados Unidos, entre 1996 a 2006, tiveram como a principal causa a ingestão de carne de frango contaminada por *Salmonella* ser. Minnesota. Em um relatório gerado sobre os agentes zoonóticos na Bélgica pela Agência Federal de Segurança Alimentar, sua relevância sob o ponto de vista de Saúde Pública foi enfatizada pela sua frequência em animais e em toda a cadeia de processamento avícola, sendo considerado um patógeno em potencial para o homem (AFSCA, 2011).

Outro aspecto interessante que merece ser mencionado, diz respeito à frequência de *Salmonella* ser. Corvallis observada no presente estudo (4,5% - 11/243). Na Ásia e Europa, muitos são os relatos que apontam o envolvimento deste sorovar em surtos de doenças de transmissão alimentar-DTA (HAMADA e TSUJI, 2001). Por ser ainda considerado relativamente raro, sua relevância vem sendo constatada inicialmente em casos humanos esporádicos e atualmente com surtos ou casos isolados. No entanto, sob o ponto de vista epidemiológico, a circulação de cepas com fenótipo de resistência às múltiplas drogas já foi evidenciada em infecções humanas na Dinamarca, Tailândia, Bulgária e Turquia (ARCHAMBAULT et al., 2006; CAVACO et al., 2007; TORPDAHL et al., 2008), impulsionando a investigação sobre os mecanismos envolvidos neste processo.

Destaca-se a primeira descrição de cepas de *Salmonella* ser. Corvallis produtoras de ESBL na Bulgária, relatado por Asseva et al. (2006) e a caracterização molecular dos genes envolvidos com a resistência aos beta-lactâmicos e quinolonas realizada por Archambault et al. (2006) e Veldman et al. (2008), respectivamente. No Brasil, sua introdução foi evidenciada em 2005, inicialmente com registros em amostra de origem humana e ambiente avícola. Dados do LRNEB evidenciam que nos anos subsequentes, houve uma prospecção para outras fontes incluindo animais (principalmente aves), matéria-prima e rações (RODRIGUES et al., 2010) e o monitoramento do perfil de suscetibilidade mostrou entre cepas de origem humana e animal, isoladas no período de 2005 -2009, o fenótipo de multirresistência para beta-lactâmicos, quinolonas e nitrofuranos.

Cabe ressaltar, que a **Figura 1** apresenta a distribuição geográfica dos sorovares de *Salmonella* detectados em nossa avaliação, cuja circulação varia entre as regiões, tendo sido possível reconhecer que Sul, Sudeste e Centro-Oeste foram as que apresentaram a maior diversidade de sorovares. Nestas regiões se concentram os maiores polos avícolas e, conseqüentemente, o implemento das exportações e maior venda para o mercado interno, havendo interesse por parte da indústria em estabelecer medidas de controle cada vez mais rígidas, evitando diretamente grandes prejuízos bem como perdas indiretas, através de embargos econômicos impostos pelos países importadores.

Moreira et al. (2008) admitem que o quantitativo de sorovares identificados em alguns estados, pode estar diretamente relacionado ao padrão sanitário já implementado pelas granjas avícolas brasileiras nestas regiões. Oliveira et al. (2012) atribuem ainda a essas variações, os programas adotados por cada indústria, como implementação de práticas de higiene das granjas e incubatórios, qualidade dos abatedouros e condições de transporte e armazenamento.

Leitão (2002) reconhece que um controle rigoroso de resfriamento minimiza a contaminação, embora não elimine completamente alguns micro-organismos psicrófilos. Costa (2002) acrescentam ainda, que embora se espere um quantitativo menor de micro-organismos em produtos congelados, estes ainda mesmo em níveis inferiores, podem ser fontes de contaminação e veiculação de *Salmonella* spp. para homem.

Entretanto não podemos esquecer que a carga microbiana observada é representada por uma microbiota oriunda principalmente das aves vivas e outra parte pode ser incorporada durante as etapas de abate, processamento ou posterior manipulação da carcaça. Os índices são variáveis em função do armazenamento e estocagem do produto, pois a contaminação da carcaça pode ocorrer durante a comercialização, caso o produto seja mantido em temperatura inadequada. Desta forma, é possível que os resultados obtidos em carcaças de frango congeladas sejam resultantes de uma contaminação cruzada durante o armazenamento, associado às falhas na conservação e interrupção da cadeia de frio.

Além das características de endemicidade, morbidade e especial dificuldade no controle da disseminação de *Salmonella* spp., o ponto de urgência clínica e epidemiológica tem sido a emergência de cepas resistentes a antibióticos de diversas classes (KIESSLING et al., 2002; MCEWEN e FEDORKA-CRAY, 2002; ORMAN et al., 2002; VAZ et al., 2010) especialmente pelo risco potencial de infecções extraintestinais que acometem grupos mais sensíveis da população.

Atualmente este gênero é reconhecido como um dos principais patógenos implicados em doenças de transmissão alimentar, assumindo importância mundial pela ocorrência de cepas multirresistentes a antimicrobianos. Em espécies de animais destinadas à produção de alimentos, representam um grande risco tendo em vista a possibilidade de circulação desses clones na cadeia alimentar.

Nos últimos anos, a evolução da resistência aos antimicrobianos vem sendo evidenciada em *Salmonella* spp. representando um problema impactado pelo uso imprudente de drogas antimicrobianas na medicina humana e na produção animal. Estes fármacos são utilizados no tratamento de infecções no homem, plantas e animais bem como profilaticamente para prevenir infecções e administradas em baixas doses na alimentação animal, para melhoria da taxa de crescimento e conversão alimentar. Uma consequência indesejável de seu uso é o potencial desenvolvimento de resistência antimicrobiana em patógenos de origem alimentar e subsequente transmissão ao homem, através dos alimentos (PALERMO NETO e ALMEIDA, 2006; ARAÚJO et al., 2007; NUNES, 2008; JUNIOR et al., 2010; SANTANA et al., 2011).

No Brasil, inquéritos foram catalogados por Santos et al. (2000), ao avaliarem o perfil de suscetibilidade de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frangos congeladas em Jaboticabal, SP, evidenciaram índices acentuados para resistência a ampicilina (100%), cefalotina (75%), cefoxitina (52,1%) associados a outros fármacos, como gentamicina, tetraciclina, amicacina, tobramicina em menores percentuais. Fernandes et al. (2003) detectaram em *Salmonella* ser. Enteritidis isoladas de aves na Universidade de São Paulo no período de 1975 e 1995, a incidência de cepas resistentes a 5 classes de antimicrobianos (beta-lactâmicos, fenicóis, aminoglicosídeos, quinolonas e inibidores de folatos). Ribeiro et al. (2006) detectaram em isolados de carcaças de frango 100% de resistência em *Salmonella* ser. Hadar a estreptomomicina, tetraciclina e sulfamatoxazol- trimetoprim além de 86,4% ao ácido nalidíxico e 4,5% ao cloranfenicol.

Na presente avaliação, a resistência antimicrobiana foi evidenciada em um percentual acentuado de cepas (70% 135/194). Esta característica foi observada em uma multiplicidade de sorovares, incluindo aqueles considerados prevalentes em carcaças de frango resfriadas e congeladas. Considerando os três anos de avaliação (**Gráfico 4**) foi possível observar tanto em isolados de carcaças congeladas quanto resfriadas, que a partir de 2010, o percentual de cepas sensíveis começa gradativamente a diminuir, com aumento daquelas com resistência \leq 2 classes. Embora em 2011 seja possível observar o aumento no percentual de cepas

sensíveis, a redução de “Intermediárias”, sugere a possibilidade de alteração neste perfil, dada a continuidade de exposição ambiental a diferentes elementos genéticos de resistência.

Esta assertiva tem por base também os resultados apresentados na **Tabela 2**, permitindo o reconhecimento de uma variabilidade de perfis (57 perfis), cuja distribuição aponta resistência entre 1 até 7 classes de drogas, comprovando a magnitude do problema como risco para a saúde.

Estes resultados assemelham-se com aqueles obtidos por Thai et al. (2012), cuja avaliação realizada no período de 2007-2009 no Norte do Vietnã, indicou em isolados de carne de frango obtida do varejo, a resistência frente a uma diversidade de antimicrobianos, distribuída de forma generalizada entre os diferentes sorovares. Na literatura, avaliações realizadas em Portugal, na década de 80, em cepas isoladas de diferentes espécies animais, revelaram 16 perfis de resistência variando entre 1 a 11 marcos, reconhecendo entre aqueles destinados a produção um maior percentual de multirresistência. Assim como na Espanha, Carramiñana et al. (2004) reconhecem que fenótipos multirresistentes (MDR) tem sido bastante documentado em amostras clínicas e na produção de alimentos de origem animal, incluindo o ciclo de produção avícola e suína, além de alimentos derivados. Recentemente, Corona et al. (2012), apontam 9,5% dos isolados de animais nos Estados Unidos foram resistentes a uma única droga e um percentual variando entre 11% a 20% no período de 1997-2003, que apresentaram resistência superior a 5 classes de antimicrobianos.

No presente estudo, perfis cuja resistência se apresentou igual ou superior a três classes de drogas (≥ 3 classes – MDR) foram observados tanto em carcaças de frango resfriadas quanto congeladas (**Gráfico 6**), podendo ser constatado um aumento nos percentuais a partir de 2010 em ambas as fontes, especialmente entre os sorovares cuja casuística era reduzida e que na atualidade encontram-se reconhecidos como emergentes como Minnesota e Mbandaka. (**Tabela 3**)

Um fato interessante a ser apontado é que independentemente da sua origem, um elevado percentual dos isolados de *Salmonella* ser. Enteritidis foi sensível à totalidade de drogas testadas ($\approx 50\%$) em 2009. Em 2010, os perfis mais comuns detectados apresentaram resistência a nitrofurantoína e ácido nalidíxico associados. Porém a partir de 2011, em contraposição a sua casuística, foi observado o aumento no percentual de cepas multirresistentes incluindo a drogas de última geração, o que provavelmente decorra da capacidade de maior competição desse grupo de cepas.

Geimba et al. (2005) reconhecem que a resistência antimicrobiana em *Salmonella* ser. Enteritidis tem se apresentado de forma ambígua, pois avaliações realizadas em um período de 7 anos, por Nastasi et al. (2000) na Itália, em cepas de origem humana, animal e alimentar, demonstraram baixos percentuais de resistência, sendo contraditório com aqueles reportados por Tassiou et al. (1997) na Grécia que apresentaram em seus estudos percentuais acentuados de resistência. Na Tailândia, Boonmar et al. (1998) encontraram uma elevação de 2,8% de cepas isoladas de carcaças de frango congeladas resistentes a antibióticos no ano de 1993, para 21,2% em 1994. Estudo mais recente realizado por Sasaki et al. (2012) no Japão apontam altas taxas de resistência antimicrobiana para a tetraciclina (90,2%), estreptomicina (86,7%) e ampicilina (36,5%). Os autores evidenciaram que um total de 258 (90,5%) de 285 isolados apresentavam-se resistentes a dois ou mais antimicrobianos.

No Brasil, Reis em 1994 reportou índices acentuados de resistência antimicrobiana em cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis isoladas entre 1990- 1993, de diferentes fontes de infecção, incluindo aves. Oliveira (2005) em cepas isoladas de amostras clínicas e ambientais de criação de aves na região Sul, constatou resistência em 68% das cepas isoladas de carcaças de frango, em semelhança com Cortez et al. (2006) que obtiveram 72,4% em cepas isoladas

de abatedouros de aves no Estado de São Paulo. No mesmo ano, Cardoso e Carvalho (2006) detectaram 94% de resistência a nitrofurantóina em carcaças de frango no Rio Grande do Sul.

No cômputo geral, a alta frequência de micro-organismos potencialmente patogênicos para animais e humanos presentes em produtos de origem animal, assim como o aumento de sua resistência aos antimicrobianos utilizados como suplementos alimentares, levaram a questionar seu uso indiscriminado como aditivos em rações animais, dando sustentação às recomendações relacionadas ao seu uso como promotores de crescimento (PALERMO NETO e ALMEIDA, 2006; ARAÚJO et al., 2007; NUNES, 2008; JUNIOR et al., 2010).

Em função dos riscos presumidos, restrições têm sido impostas para sua utilização na produção animal. Revisões recentes apontam os efeitos da proibição de antibióticos como promotores de crescimento na Europa, e concluem benefícios sob o ponto de vista de Saúde Pública. Modelos complexos de análise de risco demonstram claramente o aumento de patógenos de origem alimentar em função do uso inadequado de drogas na produção animal. No entanto, poucos estudos epidemiológicos de campo foram realizados até o momento, devido a inúmeras dificuldades e limitações (SANTANA et al., 2011).

Na presente avaliação, os percentuais apresentados para drogas poscritas pelo MAPA (1998; 2003), no cômputo geral foram de 12% (23/194) para tetraciclina, 3,0% (6/194) para o cloranfenicol. Entretanto na avaliação ao longo do período é possível observar quanto à resistência às tetraciclina uma redução em carcaças de frango resfriadas (13% em 2009 para 2% em 2011) e aumento nas congeladas (21% em 2010 para 40,7% em 2011), nas cepas provenientes das regiões Norte, Sudeste, Centro-Oeste e Sul.

Percentuais mais elevados foram relatados por Rezende et al. (2005) reconhecendo 84,2% de resistência para tetraciclina em *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frangos no estado de Goiás, Cortez et al. (2006) com 72,4% de resistência para tetraciclina em cepas isoladas de abatedouros de aves no estado de São Paulo e Ribeiro et al. (2007) obtiveram 84% para o mesmo antimicrobiano no Rio Grande do Sul. Os autores complementam ainda, que por ser uma característica evidenciada indistintamente em diferentes sorovares, sua distribuição homogênea pode estar correlacionada à capacidade de dispersão através de trocas gênicas entre indivíduos da mesma espécie ou não. Fato comprovado quando foi evidenciado este marco em 18 sorovares distintos, incluindo os 10 mais prevalentes detectados neste estudo, sendo reconhecido em mais de 36% (21/57) dos perfis multirresistentes.

Outrossim, acredita-se que os percentuais por nós obtidos sejam resultantes da relação entre o período em que as cepas foram isoladas e avaliadas, com a proscricção de seu uso. É provável que tais resultados sejam decorrentes de sua utilização tópica na clínica humana, onde a eliminação ambiental mantém o ciclo de disseminação da resistência.

Faz-se necessário o monitoramento contínuo e a conscientização do uso responsável dos agentes antimicrobianos, para que se possa verificar a redução progressiva dessa característica.

Isto se aplica também aos nitrofuranos, cujo percentual apontou em torno de 12%. Porém estes ainda são utilizados na medicina humana no Brasil embora de forma cada vez mais reduzida em face de novas perspectivas terapêuticas, o que parece se traduzir pelo perfil de declínio observado ao longo do período.

Este comportamento tem por base o conhecimento de que ao reduzir a pressão seletiva sobre os micro-organismos, devido à suspensão de uso de algumas drogas, ocorre aumento gradativo do índice de sensibilidade porém de forma gradativa, acreditando-se que devido ao desconhecimento quanto à dispersão natural destes compostos por micro-organismos presentes no meio ambiente (AARESTRUP et al., 2007).

No entanto, os percentuais detectados para esta droga, assumem relevância quando se considera que a carga residual presente na carne, leite e ovos pode representar risco para o homem, tendo em vista seu poder de toxicidade, comprometimento no desenvolvimento ósseo gestacional e alterações odontológicas.

Santana et al. (2011) reconhecem indispensável que as indicações técnicas de todos os antimicrobianos sejam rigorosamente seguidas sobre o uso nas rações. Entretanto, isso não é suficiente, sendo necessário que se melhore o programa de fiscalização e controle de resíduos nos produtos finais. Não fica garantido que a proibição elimina o uso, uma vez que há deficiência na fiscalização de venda e de uso de drogas veterinárias e de promotores de crescimento.

Na presente avaliação, a resistência as quinolonas, foi avaliada através do ácido nalidíxico, a qual se mostrou elevada em 2009 (73%- 24/30), tendo sido reduzido em 2011, para 21% (23/107). Entretanto entre 2009 e 2011 é possível observar resistência também a fluoroquinolona onde o total de 3 cepas pertencentes aos sorovares Newport e Senftenberg (2009), Minnesota (2011) apresenta tal característica.

Embora os percentuais para ciprofloxacina tenham permanecidos reduzidos ($\approx 0,4\%$) Butaye et al. (2006) afirmam que a seleção gradativa de isolados de *Salmonella* spp. resistentes a essas duas classes de antimicrobianos representa importante problema de Saúde Pública, com implicações no tratamento e prevenção de doenças infecciosas em humanos e animais.

Souza et al. (2010) reconhecem que este evento é fundamentalmente determinado por alterações no cromossomo, alteração nos sítios de ligação da DNA *gyrase* e elementos móveis que carregam o gene *qnr* potencialmente capazes de ser transferido de forma horizontal.

Em países da Europa são evidenciados índices de resistência acentuados desde 1999 em *Salmonella* spp. de origem animal, ambiental e humanas (MALORNY et al., 1999; HAKENEN et al., 1999; THREFFALL, 2002; MOLBAK et al., 2002; MARIMÓN et al., 2004). Posteriormente no Brasil, Ribeiro et al. (2006) detectaram em *Salmonella* spp., 86% de resistência ao ácido nalidíxico em cepas de *Salmonella* ser. Hadar isoladas de carcaças de frango no Rio Grande do Sul. Na análise dos resultados obtidos no presente estudo, os níveis de resistência para ácido nalidíxico alcançaram 32% (62/194) da amostragem, compreendendo 23 dos perfis detectados.

Segundo Souza et al. (2010), a redução na eficácia terapêutica desta classe está atribuída à ampla utilização clínica, que corresponde a aproximadamente 10% da prescrição global de antimicrobianos utilizados. No entanto, o aumento de cepas resistentes às quinolonas de primeira geração como ácido nalidíxico, pode representar um fator relevante, tendo em vista que alguns autores consideram que a redução da suscetibilidade encontrada para a classe de fluoroquinolonas (por exemplo, ciprofloxacina), pode ser resultante da resistência a essa droga.

Embora seja reconhecido que as aves são importantes reservatórios de *Salmonella* spp. multiresistentes, outros animais de produção, domésticos e silvestres também podem contribuir com a disseminação destas cepas, cuja incidência e gravidade vêm aumentando com preocupações significativas quanto à fonte de disseminação. A circulação de cepas resistentes em alimentos pode ser mais facilmente detectada quando é estabelecido um monitoramento contínuo possibilitando o controle de forma eficaz, de transmissão cruzada (ANGULO et al., 2004; SALYERS et al., 2004; SALYERS e SHOEMAKER, 2006).

Sabe-se que o principal desafio de escolha terapêutica humana é detectar a magnitude da resistência aos antimicrobianos. O intercâmbio ocorre tanto em bactérias patogênicas quanto em comensais e o uso crescente de drogas de amplo espectro resulta na emergência da resistência a estes agentes e necessidade constante de novas drogas.

Um exemplo bem claro foi a utilização durante décadas de ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim no tratamento de infecções. O desenvolvimento ascendente da resistência a estas drogas levou ao uso de fluoroquinolonas e cefalosporinas de amplo espectro para infecções graves, como meningite e septicemia. Nestas, o tratamento com antibiótico é essencial, sendo as cefalosporinas de espectro estendido usadas preferencialmente em crianças (Threfall, 2002). No entanto, a aquisição de β -lactamases de espectro estendido ou genes de resistência a fluoroquinolonas podem resultar em falhas terapêuticas. A combinação entre elas representa um dos maiores problemas no tratamento eficaz de infecções bacterianas, tanto comunitárias quanto nosocomial.

Em muitas ocasiões é possível observar algumas consequências dadas pelo uso de drogas de última geração. Após a aprovação da enrofloxacin para uso veterinário, no Reino Unido, em 1993 foi observada a diminuição da susceptibilidade entre isolados de fonte humana particularmente de *Salmonella* ser. Typhimurium DT104 carreador de cassetes de resistência à ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (ACSSuT). Esta em 1993, não tinha uma sensibilidade diminuída para fluoroquinolonas, até que em 1996, Threfall et al. (1997) detectaram em 14% dos isolados de animais no Laboratório Central Veterinário, no Reino Unido.

O mesmo perfil pode ser evidenciado em outros fagotipos como PT204 e PT193. Estes podem ser transferidos total ou parcialmente através de trocas gênicas. Particularmente no Brasil, *Salmonella* ser. Typhimurium DT193 tem sido prevalente desde a década de 70 com a presença integral ou parcial do perfil ACSSuT, em isolados de diferentes fontes (HOFER et al, 1979; MEDEIROS, 2006; REIS et al., 2011). Krauland et al. (2009) admitem que a resistência ao ácido nalidíxico evidenciada em isolados obtidos no sul da Ásia e África, provavelmente seja responsável pela expansão clonal determinada por *Salmonella* ser. Typhimurium no mundo.

Os resultados encontrados no presente estudo mostraram que a média de 9% (12/135) deste sorovar apresentou entre 2009 a 2011 resistência ≥ 3 diferentes classes de drogas. Não foi detectada resistência a ciprofloxacina, entretanto para cefalosporinas de 3ª geração foi observada no ano de 2011 em cepas provenientes de São Paulo e Rio Grande do Sul.

Entre os isolados de *Salmonella* monofásica O4,[5],12: i:-, a qual é conhecida como uma variante do sorovar Typhimurium, foi evidenciado um percentual equivalente a 1% de resistência para 2 classes diferentes (penicilinas, cefalosporinas de 1ª e 3ª geração e quinolonas).

Estudos demonstram que a maioria dos isolados de *Salmonella* spp. resistentes às cefalosporinas de amplo espectro pode ser dotada de mecanismos capazes de hidrolisar cefalosporinas e monobactâmicos, como a produção de beta-lactamases de espectro ampliado, o que talvez possa ser uma justificativa para os elevados índices encontrados para cefalosporinas.

Esta assertiva pode ser comprovada pelos estudos realizados na Holanda por Hasman et al. (2005) em cepas de *Salmonella* spp. oriundas de aves/subprodutos e amostras clínicas humanas, na Bulgária por Asseva et al. (2006) e Archambault et al. (2006) em *Salmonella* ser. Corvallis isoladas de fonte humana, animal e ambiental e no Canadá por Dutil et al. (2010) em *Salmonella* ser. Heidelberg isoladas de frango e amostras humanas.

Um fator que pode contribuir para resistência a este grupo de drogas é a utilização do ceftiofur, cefalosporina de amplo espectro empregada no tratamento animal (bovinos, suínos, equinos, ovinos, aves e animais domésticos) e inoculação em ovos para controle da onfalite, infecção determinada por *Escherichia coli* em frangos de corte. Estudo realizado na Holanda por Overdeest et al. (2011), demonstram um alto grau de similaridade entre os genes da resistência detectados em *E. coli* isoladas de infecções humanas e carne de varejo.

Seu uso em animais conduz a resistência a outras cefalosporinas de espectro estendido, tais como ceftriaxona e cefamicinas, antimicrobianos utilizados no tratamento de uma grande variedade de infecções em seres humanos. Entre outras indicações, a ceftriaxona é a droga de escolha para o tratamento da salmonelose grave ou invasiva em crianças e mulheres grávidas, onde fluoroquinolonas não são aprovados e as opções de tratamento são limitadas (FEY et al., 2000). Por conseguinte, as cefalosporinas de terceira geração foram classificadas como antimicrobianos criticamente importantes em medicina humana pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2007).

Os resultados obtidos na presente avaliação (**Tabela 5**) alertam para o aumento exponencial do número de sorovares que apresentam fenotipicamente resistência para cefalosporina de uso humano (ceftriaxona, ceftazidima e cefepime), incluindo aqueles de maior prevalência ou ainda cuja casuística é reduzida. Como consequência, predizem a possibilidade de disseminação ambiental. Paralelamente, a resistência para cefalosporina de uso veterinário (ceftiofur) foi evidenciada em 8% (11/135) das cepas, apontando uma dispersão entre sorovares isolados tanto de carcaças congeladas quanto refrigeradas.

Bush e Jacoby (2010) já haviam sinalizado a elevação gradual dos percentuais de resistência para cefalosporinas em *Salmonella* spp., cujas observações mostraram similaridade com aqueles encontrados no presente estudo para cefalotina (1,5% - 2/135), cefoxitina (20% - 27/135), ceftazidima (7,4% - 10/135) /ceftriaxona (15,6% - 21/135) e cefepime (1,5% 2/135). Admitem ainda, que os níveis encontrados representam uma problemática sob o ponto de vista terapêutico, devido às implicações que podem resultar no tratamento de infecções onde esse antimicrobiano é reconhecido como droga de escolha.

Estudo realizado por Giles et al. (2004) sugerem que resistência às cefalosporinas por exposição a outros antimicrobianos ou a produtos químicos utilizados em agricultura podem representar fatores para o aumento da resistência, tendo relatado a presença do gene *sugE*, responsável pela resistência a compostos quaternários de amônio na mesma região do gene *bla_{CMY-2}* em *Salmonella* spp.. Considerando que o gene *bla_{CMY-2}* é transferível horizontalmente e frequentemente observado que cepas isoladas de frango são resistentes ao ceftiofur, Dutil et al. (2010) sugerem que o frango poderia ser um reservatório deste gene responsável por sua transmissão para diferentes micro-organismos.

As avaliações realizadas pelo FDA apontaram novas regras para o uso de ceftiofur em animais de produção, devido ao aumento da prevalência de bactérias entéricas resistentes a terceira geração de cefalosporinas. Particularmente em bovinos, o tratamento parenteral com ceftiofur, tem efeitos limitados sobre bactérias entéricas e que sua eliminação ambiental exerce pressão seletiva em *Escherichia coli* presentes no solo. Esta condição tem maior relevância durante os meses frios, tendo em vista que a degradação do ceftiofur depende da temperatura, acumulando-se no meio ambiente e aumentando ainda mais a seleção (SUBBIAH et al., 2012).

Cepas de *Salmonella* spp. isoladas de fonte humana, animal e carnes de frango à varejo foram avaliadas nos EUA, dentro do Programa Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana (NARMS), quanto à resistência à cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração. Nestas, a resistência para o ceftiofur, entre os anos de 2002 a 2005, foram equivalentes a 13,2% entre 1044 cepas isoladas de alimentos à varejo, apresentando percentuais mais elevados em peito de frango em 2006. Frye e Fedorka-Cray (2007) verificaram que entre 34.411 salmonelas isoladas de animais nos EUA no período de 1999 e 2003, o percentual de 10,9% foram resistentes ao ceftiofur. Resultados semelhantes são descritos na Bélgica (11.0%) no período de 1998-2009 (CODA-CERVA, 2010).

De modo semelhante, resultados do programa do Health Canada- CIPARS, concluíram que determinadas utilizações do ceftiofur em animais produtores de alimentos têm aumentado o potencial de resistência antimicrobiana (WEBSTER, 2009).

No cômputo geral, a evolução da resistência aos antimicrobianos em *Salmonella* spp. representa um problema que vem sendo impactado pelo uso imprudente destas drogas em diversos segmentos da clínica humana e veterinária e na produção animal e vegetal. Contudo, sabe-se que as bactérias têm acesso a uma variedade de elementos genéticos e mecanismos de recombinação que conferem diversas propriedades fundamentais para sua sobrevivência no ambiente em que se encontram, tornando-se essencial compreender e acompanhar os mecanismos de adaptação de determinadas populações bacterianas frente à introdução de novas drogas antimicrobianas de modo a evitar falhas no tratamento de doenças e consequentemente infecções persistentes tanto em seres humanos quanto em animais.

Krauland et al. (2009) reconhecem que a resistência antimicrobiana pode ocorrer através de mutações pontuais no genoma bacteriano ou através de transferência horizontal de elementos genéticos que transportam os genes de resistência. A resistência pode ser disseminada através da expansão clonal de cepas resistentes ou através da transferência horizontal de elementos genéticos que codificam determinantes de resistência. A dinâmica populacional é alterada em função da introdução de estirpes que se expandem e se deslocam entre as populações existentes, facilitando a disseminação de cepas multirresistentes como resultado da expansão clonal. Este fato pode ser exemplificado pela disseminação global da *Salmonella* ser. Typhimurium clone de fagotipo DT104, cuja propagação de determinantes de resistência vem sendo evidenciada em vários países e continentes (CHIU et al., 2006; CY et al., 2008; GREENE et al., 2008; NIELSEN et al., 2009; REIS et al., 2011).

Desta forma, faz-se necessária melhor compreensão quanto aos fatores que possam contribuir para mudanças populacionais, tendo em vista que fatores genéticos dos micro-organismos podem favorecer o aumento de determinados sorovares (JOHNSON et al., 2010).

Nesta perspectiva, a base molecular da resistência a antibióticos de última geração foi avaliada nas cepas de *Salmonella* spp. visando caracterizar os elementos genéticos envolvidos na aquisição de genes resistentes a antibióticos.

A presença dos genes *bla*_{CMY} e *bla*_{CTX-M} foi avaliada entre as cepas que apresentavam resistência ou sensibilidade intermediária para cefalosporinas de 3ª geração, tanto de uso humano quanto veterinário. Um total de 19 cepas (11,4% - 19/166) apresentou o gene *bla*_{CMY}, distribuindo-se de maneira análoga entre isolados de carcaças resfriadas e congeladas (≈ 50%). Quanto ao gene *bla*_{CTX-M}, este foi observado em 11 cepas tendo sua prevalência mais significativa naquelas de carcaças resfriadas (21,2% - 10/47).

Em vários sorovares de *Salmonella*, o número de casos relatados de cepas produtoras de ESBL tem aumentado em todo o mundo nos últimos anos (CARATTOLI et al., 2002a; LI e MUSTAPHA, 2004; MELENDEZ et al., 2010; KIM et al., 2011).

O surgimento de novas variantes e a prevalência de ESBL em isolados de origem comunitária, ambiental e em alimentos de origem animal têm demonstrado a complexidade em estabelecer a origem da resistência. Com relação aos animais de produção e produtos derivados, o isolamento de micro-organismos produtores de ESBL é preocupante, tanto pelas implicações na Saúde Pública como pelo fator econômico, uma vez que o Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango.

A resistência a cefalosporinas de amplo espectro tem aumentado entre os sorovares de *Salmonella* nas 2 últimas décadas (THREFALL et al., 2000; WINOKUR et al., 2000). Em sua maioria, as cepas de *Salmonella* spp. resistentes à cefalosporinas, são capazes de expressar ESBL tais como TEM e SHV, responsáveis pela hidrólise das cefalosporinas e monobactams. No entanto, avaliações recentes indicam que várias espécies pertencentes à família Enterobacteriaceae adquiriram plasmídeos codificando AmpC, com característica semelhante, mas com capacidade de hidrolisar também a cefamicinas (cefexitina e ceftriaxona). Normalmente, a resistência à ceftriaxona é mediada pelo gene *bla*_{CMY}, apresentando algumas variantes já anteriormente descritas em *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* entre outras enterobactérias de importância clínica na Europa e nos Estados Unidos (NORDMAN, 1998). Entre cepas de *Salmonella* spp. foi descrita por Winokur et al. em 2000, a partir do isolamento realizado em animais e amostras clínicas nos Estados Unidos e em sequência inúmeras avaliações vêm apontando a presença deste gene em diferentes sorovares de *Salmonella* (FRICKE et al., 2009; GONZÁLEZ-SANZ et al., 2009; JOHNSON et al., 2010; FOLSTER et al., 2010).

Em nossa avaliação, um resultado que merece ser mencionado é o reconhecimento dos genes *bla*_{CMY} e *bla*_{CTX-M} em cepas que apresentavam sensibilidade reduzida, em um percentual equivalente a 2,9% e 19% respectivamente. Um estudo semelhante foi realizado por Heider et al. (2009), que ao avaliarem *Salmonella enterica* isoladas de fonte alimentar, humana e animal, que apresentavam sensibilidade reduzida a ceftriaxona, foi capaz de caracterizar o gene *bla*_{CMY} em 8 cepas sem o fenótipo de susceptibilidade alterado. Zhao et al. (2001) indicaram que os genes *bla*_{CMY} são comumente presentes em *Salmonella* spp. de origem animal, sendo esta característica sendo evidenciada em cepas que apresentam menor suscetibilidade ao ceftiofur e ceftriaxona. Esta assertiva conduz na necessidade de monitoramento contínuo das variantes deste gene *bla*_{CMY} em micro-organismos isolados de animais e alimentos de origem animal, pois podem apresentar futuros desafios terapêuticos em animais e na saúde humana.

Particularmente o tipo CTX-M tem sido recentemente detectado em cepas oriundas de aves e subprodutos em vários países. Na Holanda, uma grande diversidade genética foi observada por Hasman et al. (2005), sendo predominantemente os genes do tipo *bla*_{CTX-M} em *Salmonella* ser. Isangi, Typhimurium e Virchow. Riano et al. (2006) na Espanha detectou a presença do gene *bla*_{CTX-M} em *Salmonella* ser. Enteritidis, Rissen e Virchow a partir de amostras de fezes de galinhas poedeiras em nível de matadouro. Na França, Weill et al. (2004) avaliaram *Salmonella* ser. Virchow isoladas a partir de frangos provenientes de granjas, abatedouros e comércio à varejo, detectando nestas cepas o fenótipo de resistência para beta-lactâmicos mediado pelo gene *bla*_{CTX-M-9}.

Bonnet et al. (2000) e Fernandes et al. (2009) reconhecem um número crescente de descrições dessas enzimas no Brasil. Particularmente, este estudo infere que variantes do tipo CTXM sejam mais predominantes no país em comparação às enzimas do tipo TEM e SVH, prevalentes na América do Norte e oeste Europeu, respectivamente.

Particularmente, os grupos CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 são frequentemente detectados no território brasileiro (BONNET et al., 2000; FERNANDES et al., 2009; GARCIA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009), em diversas enterobactérias.

Recentemente, a produção de CTX-M-2 foi reportada em *Salmonella enterica* isoladas de produtos de origem aviária (frango e ovos) e fontes relacionadas (granjas avícolas) provenientes dos estados do Paraná e Santa Catarina (SILVA e LINCOPAN, 2010). Particularmente em nossa avaliação, os resultados foram semelhantes tendo em vista que oito cepas da Região Sul apresentaram o gene *bla*_{CTX-M} (N=11), tendo relevância por representarem os maiores produtores de carne de frango.

Silva e Licopan (2012) admitem que a presença de patógenos produtores de ESBL em alimentos de origem animal é alarmante, devido ao risco de infecções com alternativas terapêuticas limitadas; ao fato de o intestino dos seres humanos e dos animais de produção servirem de reservatório para gene de resistência e a possibilidade transferência horizontal dos mecanismos de resistência à microbiota residente e a outros patógenos.

Sabe-se que os principais tipos moleculares das beta-lactamases descritos em Gram-negativos são codificados por genes localizados em plasmídeos conjugáveis ou transposons, facilitando assim, a disseminação da resistência aos beta-lactâmicos, e promovendo a co-seleção em relação a outros antibióticos.

Há uma preocupação legítima de que os animais de produção podem servir como reservatório de *Salmonella* spp. produtoras de ESBL para o homem e os genes de resistência transferidos através da cadeia alimentar.

Inúmeros estudos têm reproduzido experimentalmente a transferência de genes de resistência entre sorovares de *Salmonella* e outras espécies bacterianas via plasmídeos conjugativos, alguns deles são altamente prevalentes e emergem em conjunto com genes de resistência clinicamente importantes (CARATTOLI, 2011).

Zioga et al. (2008) e Shahada et al. (2010) verificaram a presença frequente de genes codificadores de beta-lactamases em cepas de *Salmonella* spp., admitindo que a diversidade de enzimas identificadas pudesse ser reflexo da troca frequente desses genes entre as cepas. Shahada et al. (2010) realizaram a caracterização molecular de *Salmonella* ser. Infantis de aves no Japão com fenótipos multirresistentes e detectaram a presença em 32 cepas dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CMY} responsáveis pela resistência à ampicilina, cefalotina, ceftazidima e cefotaxima. De forma semelhante, Zioga et al. (2008) apresentaram a existência simultânea do gene *bla* codificador de beta-lactamase no cromossomo e em plasmídeos conjugativos de cepas de *Salmonella* ser. Typhimurium, responsáveis por conferir resistência às cefalosporinas de espectro-estendido (CARATTOLI et al., 2002a; AARESTRUP et al., 2004; FDA, 2010).

Na Bélgica, Bertrand et al. (2006) sugeriram que um clone selecionado a partir de um bando de aves, resultou na dispersão de *Salmonella* ser. Virchow produtor de CTX-M-2 para a população humana, tendo como consequência múltiplos casos de gastroenterite relatados na época.

Quanto a ocorrência de genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas, os resultados apontaram dois tipos distintos: *qnrB* detectado em 13% das cepas tanto isoladas de carcaças resfriadas (7/52) quanto congeladas (2/15) e *qnrS* evidenciado em 3,8% (2/52) de carcaças resfriadas (**Tabela 6**), demonstrando uma dispersão entre os sorovares Mbandaka, Corvallis, Panama, Anatum, Senftenberg Typhimurium, Hadar e Derby. Não foi detectado nenhum isolado contendo os genes *qnrA* e *aac(6')-Ib*.

McGrath et al. (2006) e Souza et al. (2010) admitem que esses genes encontram-se localizados em diferentes tipos de elementos genéticos móveis, como plasmídeos conjugativos, transposons compostos, sequências de inserção, cassetes gênicos ou integrons alojados em plasmídeos conjugativos/transposons, o que torna este mecanismo de resistência fácil e rapidamente disseminável entre diferentes espécies. Por outro lado, os processos de recombinação e a conseqüente evolução destes elementos genéticos móveis, torna comum a coexistência de genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas e de genes que conferem resistência a beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, sulfonamidas, trimetoprim e cloranfenicol, entre outros, conferindo à bactéria um fenótipo de multirresistência.

Esta assertiva pode ser confirmada quando observamos que a presença de *qnrB* e *qnrS* foi detectada em *Salmonella* spp. que não apresentavam resistência apenas para o ácido nalidíxico, mas também para outras drogas, como foi evidenciado entre sorovares Corvallis que apresentaram perfil TCY, NAL, Typhimurium (AMP, TCY, NAL), Derby (TCY, NAL, STR) e ainda O:4,5 (AMP, CEP, CRO, NAL), cuja dispersão foi evidenciada nos estados de São Paulo, Bahia, Mato Grosso e Paraná. Desta forma, tendo em vista a emergência e a alta mobilidade destes genes, é provável que este fato esteja relacionado com uma disseminação plasmídica, embora a transmissão vertical de clones epidêmicos não possa ser excluída.

Strahilevitz et al. (2009) compilando informações relatadas em todo o mundo até o final de 2008, verificaram que os genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* foram detectados em todos os continentes e numa vasta variedade de plasmídeos e de espécies bacterianas. Nesta base de dados, os percentuais apontados para *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* apresentaram uma média em torno de 1,5%, 4,6% e 2,4% respectivamente, enquanto para o *aac(6')*-Ib foi considerado o mais prevalente, com percentuais acentuados em torno de 10,8%.

Souza et al. (2010) consideram que embora os genes *qnr* e o *aac(6')*-Ib tenham uma dispersão em vários países do mundo, seu principal reservatório parece estar concentrado em países dos continentes asiáticos e americano, nos quais estudos realizados por Park et al. (2006), Cattoir et al. (2007), Kim et al. (2009), Kim et al. (2012) descrevem prevalências entre 50% a 90%.

Na medicina veterinária, as quinolonas podem ser usadas para fins terapêuticos, profiláticos ou como promotores de crescimento, particularidade que tem fomentado o aumento do seu uso em ambiente de produção animal ao longo dos anos (LANGHOUT, 2005). Como consequência, a seleção de bactérias resistentes a quinolonas e o aumento da prevalência de genes que codificam para a resistência a esta droga vem sendo observada nos animais e no ambiente, o que conduz ao comprometimento do tratamento de várias doenças infecciosas (AARESTRUP et al., 2007; MÉRENS e SERVONNET, 2010).

De acordo com os resultados observados no presente estudo, a ocorrência e diversidade de genes que codificam para resistência adquirida a quinolonas podem ser consideradas pequenas (13,4% - 9/67 para *qnrB* e *qnrS* 3% - 2/67) quando comparadas ao percentual de cepas que apresentaram resistência para esta classe de drogas. No entanto, estes percentuais apontados em animais de produção intensiva representam um sério problema, não só pela facilidade de disseminação entre animais que co-habitam espaços confinados, mas também devido à possibilidade da sua disseminação dos animais para o homem, quer por contato direto, meio ambiente ou através da cadeia alimentar (BUTAYE et al., 2006).

Esta assertiva coaduna com as constatações evidenciadas por Asai et al. (2010) que ao demonstrarem a emergência e disseminação de PMQR em *Salmonella* spp. isoladas de animais de produção intensiva, como suínos, aves e bovinos, concluíram que estes animais constituem um importante reservatório de genes de resistência adquirida a quinolonas e um possível vetor de transmissão para o ambiente circundante e para o homem, podendo ser exemplificados pelas observações obtidas em Portugal por Rodríguez-Martínez et al. (2011) em isolados bacterianos clínicos produtores de ESBLs no período de 2004-2006, e paralelamente a presença de *qnrS* (8%) e *aac(6')*-Ib (65%) da amostragem. Por Antunes et al. (2011), que descreveram a presença de *qnrS* em *Salmonella* ser. Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ainda por inquéritos realizados em alguns países, onde a taxa de resistência a quinolonas é elevada e associada ao mecanismos por PMQR como na Espanha, França, Itália, Suécia e Reino Unido (LAVILLA et al., 2008; KARAH et al., 2010, HERRERA-LÉON et al., 2011; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Cabe ressaltar, que em nossa avaliação os percentuais obtidos na caracterização do gene *qnrB* em *Salmonella* spp. resistentes à quinolonas (13,4% - 9/67) apresentaram distribuição semelhante entre carcaças congeladas e resfriadas, corroborando com os estudos catalogados por Asai et al. (2010) e Ma et al. (2011), quando descrevem a resistência a quinolonas mediada por este gene em *Salmonella* spp. isoladas de aves.

Por outro lado, a compilação no campo científico apontam alguns destaques como os estudos realizados por Ahmed et al. (2009), que demonstraram a presença de *qnrB* e *qnrS* em *Salmonella* ser. Typhimurium e Thompson, provenientes de animais para consumo humano (aves, suínos e bovinos) e seus derivados (carnes, ovos e produtos lácteos) comercializados no Japão. Assim como as avaliações realizadas a partir de uma cooperação internacional em 13 países da Europa, descreveram o gene *qnrB* em *Salmonella* ser. Bredeney em aves de capoeira na Itália e Holanda, reconhecendo sua circulação mediada por plasmídeo entre outros sorovares isolados de fonte animal, humana, alimentar e ambiental (VELDMAN et al., 2011).

No cômputo geral, os resultados apontados no presente estudo quando comparados aos que já foram reportados em literatura, possibilitam atribuir a maior prevalência de genes associados a resistência a quinolonas, em países em que o controle do uso de antibióticos é baixo e/ou onde o uso de promotores de crescimento em ambiente de produção animal ainda não foi abolido, como países asiáticos, Estados Unidos da América e Canadá, entre outros.

Contudo, os percentuais obtidos na caracterização dos genes *qnr* embora se apresentem relativamente baixos, devem ser considerados relevantes quando admitimos que a contaminação da carcaça pode ter sua origem a partir de animais contaminados e/ou por esses micro-organismos pertencerem a microbiota normal de aves saudáveis. No entanto, para aquelas cepas cuja avaliação não apresentou o gene *qnr*, pode-se atribuir ao fato de que outros mecanismos de resistência poderão estar presentes, sendo mediados por exemplo, por genes de localização cromossômica que codificam bombas de efluxo (CATTOIR e NORDMAN, 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Particularmente os resultados obtidos para *Salmonella* ser. Minnesota, que apresentaram concomitantemente o perfil de resistência para o ácido nalidíxico e ciprofloxacina, permitem sugerir a existência de mutações ocorridas em nível cromossomal, cuja justificativa pode estar relacionada a interação das proteínas Qnr com as subunidades da enzima DNA girase na zona QRDR (região determinante de resistência á quinolonas), conduzindo alterações aminoácidas no local de ligação e conseqüentemente impedindo a ligação da quinolona por redução de afinidade com esta subunidade. Esta assertiva pode ser respaldada pelas considerações realizadas por Souza et al. (2010), que consideram este

mecanismo um pré-requisito para as gerações seguintes adquirirem mutações nas enzimas alvo, atingindo um alto nível de resistência às fluoroquinolonas.

Strahilevitz et al. (2009) reiteram que apesar deste fenótipo de resistência não diferenciar entre mutações cromossômicas ou mecanismos PMQR, contribuiu inegavelmente para o aumento generalizado da resistência a quinolonas para outras partes do mundo, por considerar que as mutações cromossômicas são eventos demasiadamente raros e pelo fato dos genes que codificam a resistência para quinolonas se localizarem em plataformas genéticas móveis, o que conduz a sua ampla e rápida disseminação, contribuindo para ocorrência de mutações cromossômicas conducentes a altos níveis de resistência a quinolonas. Na perspectiva atual alguns autores admitem que estes mecanismos possam estar associados à produção de ESBL (CATTOIR e NORDMAN, 2009; MA et al., 2011; HERRERA-LEÓN et al., 2011, KIM et al., 2012).

Inquéritos internacionais apontam a associação dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* à integrons de classe 1, encontrados em uma vasta variedade de plasmídeos, muitas vezes adjacentes a outros genes de resistência, como os quais codificam para beta-lactamases de espectro expandido dos tipos SHV, CTX-M ou AmpC. Neste contexto, destacam-se os reportados por Lavilla et al. (2008) que avaliaram a prevalência de *Qnr* e produção de ESBL em enterobactérias isoladas em Barcelona, na Espanha e por Pitout et al. (2008), que realizaram monitoramento de determinantes de resistência a quinolonas mediada por plasmídeos na região de Calgary no Canadá. Em semelhança Fang et al.(2009), detectaram as mesmas características no sul de Estocolmo.

A **Tabela 8** aponta em dois sorovares (*Salmonella* ser. Typhimurium e Derby) a presença concomitante de *qnr* e *integrase*, no entanto estas cepas não apresentaram o fenótipo de resistência para os beta-lactâmicos, sendo apenas observada, a associação de resistência entre ácido nalidíxico e tetraciclina e/ou estreptomicina. Possivelmente, a localização de ambos deve ser em um mesmo elemento móvel, no entanto esta afirmação carece de estudos moleculares mais aprofundados.

Outro determinante importante diz respeito a associação de *qnr* e *aac(6')-Ib* reportados em uma série de investigações catalogadas por Park et al. (2006) nos Estados Unidos, Xiong et al., (2008) que investigaram genes *qnr* e *aac(6')-Ib* em *Enterobacter cloacae* isolados na Província de Anhui na China e Kim et al. (2012) em enterobactérias isoladas de amostras clínicas na Coreia. Embora os autores reconheçam que a localização do gene *aac(6')-Ib* é majoritariamente em integrons de classe 1, não podemos considerar esta assertiva em função da ausência deste gene em todas as cepas analisadas.

Quanto à pesquisa de integrons de classe 1 realizada em 117 cepas apresentando perfil de resistência, intermediário e sensibilidade reduzida à quinolonas e aminoglicosídeos, a presença da região conservada do integron, detectada através do gene *integrase* foi evidenciada em 22,5% (16/71) das cepas isoladas de carcaças resfriadas e 19% (4/21) de congeladas. Entre os sorovares que apresentaram tal característica destacam-se Albany, Brandenburg, Derby, Enteritidis, Heidelberg, Infantis, Mbandaka, Saintpaul, Schwarzengrund, Corvallis, Tennessee e Typhimurium e resistência a até cinco classes de drogas antimicrobianas.

Conforme apresentado na **Tabela 9**, os produtos amplificados variaram de 700 a >1000 kb e os isolados positivos para integron de classe 1 apresentaram 20 perfis de suscetibilidade distintos. Entre estes, 15 apresentaram resistência para estreptomicina, a qual normalmente associada à outras drogas, como ácido nalidíxico, tetraciclina, ampicilina, cefoxitina, ceftriaxona, ceftazidima e sulfametoxazol-trimetoprim.

Os sorovares Albany (NAL, SXT, STR), Corvallis (TCY, STR), Heidelberg (TCY, GEN, NAL, NIT, STR), Infantis (AMP, FOX, CRO, CAZ), Mbandaka (GEN), Schwarzengrund (GEN) e Typhimurium (AMP, TCY, FOX, CRO, STR/ AMP, TCY, STR/ TCY, STR) apresentaram o mesmo tamanho da região variável (+/- 900 KB). Enquanto que a *Salmonella* ser. Enteritidis (AMP, CHL, FOX, CAZ, STR, NAL, NIT), Saintpaul (TCY, GEN, SXT) e Typhimurium (TCY, STR, SXT) apresentaram a região variável > que 1000 kb. Estes resultados indicam que os isolados apresentam um ou mais genes inseridos no cassete gênico, sugerindo que a multirresistência detectada neste sorovares talvez seja decorrente da presença dos mesmos.

Peirano et al. (2006) admitem que dentre os elementos gênicos móveis existentes, as bactérias do gênero *Salmonella* fazem uso de integrons, particularmente os de classe 1. Frequentemente, a presença desse componente em cepas multirresistentes está associada ao cromossomo ou plasmídeos conjugativos.

Os integrons parecem ter um papel importante na disseminação de genes de resistência em *Salmonella* spp. e outros organismos, sendo considerados elementos de expressão, potencialmente associados a transmissão rápida e eficaz entre diferentes espécies bacterianas, especialmente pelo seu poder de recombinação, mobilidade e capacidade de coletar/inserir cassetes gênicos através de mecanismos moleculares para a aquisição de genes de resistência.

Estudos recentes confirmam que os integrons estão amplamente distribuídos em cepas de *Salmonella enterica*. Carattoli (2001) avaliando cepas de *Salmonella* spp. não relacionadas isoladas na Albânia, que permitiram verificar a coexistência de três integrons na mesma célula bacteriana (*oxa1*, *eaac_{C1}* e *aadB*) alocados na região conservada e/ou variável do integron, que determinavam o fenótipo multirresistente à beta-lactâmicos, fenicóis e aminoglicosídeos. Ajiboye et al. (2009) avaliaram nos EUA a dispersão de elementos genéticos móveis responsáveis pela codificação de resistência a antibióticos, detectando a presença de integron de classe 1 em 28% das cepas de *E.coli* isoladas de animais e 72% de *Salmonella* spp. de humanos e animais.

Na Irlanda e na França, avaliação similar foi catalogada por Casin et al. (1999) e Daly e Fanning (2000), cuja caracterização molecular de resistência antimicrobiana relatou a presença de múltiplos integrons em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de fontes humanas, animais e alimentares.

Guerra et al. (2000), identificaram a presença de integrons de classe 1 em cepas de *Salmonella* spp. multirresistentes coletadas na Espanha durante 1989 e 1998, reconhecendo a presença e/ou combinação de cassetes gênicos que conferiam resistência para estreptomicina, beta-lactâmicos e trimetoprim amplamente distribuídos especialmente em *Salmonella* ser. Typhimurium, Panama e Ohio. Nastasi e Mammina (2001), ao avaliarem cepas de *Salmonella* spp. isoladas entre 1997 a 1999 na Itália, evidenciaram resultados semelhantes, tendo em vista a detecção de integrons de classe 1 em percentual acentuado de *Salmonella* ser. Typhimurium, atribuindo este fato ao aparecimento do clone DT104.

Krauland et al. (2009), determinando a presença de integrons em uma coleção de *Salmonella enterica* multirresistentes, reconheceram que a expansão clonal e a transferência de genes horizontal podem contribuir para a difusão da resistência antimicrobiana. Neste estudo, o fenótipo ACSSuT determinado pela *Salmonella* ser. Typhimurium DT104 foi evidenciado em isolados geneticamente não relacionados em 8 países distintos, incluindo *Salmonella* ser. Uganda, Schwarzengrund, Bredeney, Isangi e Typhimurium PT19.

Os resultados encontrados no presente estudo mostraram que na avaliação geral quanto à suscetibilidade aos antimicrobianos, 6% (12/94) do sorovar Typhimurium foram resistentes até sete drogas. A presença de integrons de classe 1 apontada na **Tabela 9** evidenciada em 30% (6/20) das cepas reportam fenótipos multirresistentes distintos entre cepas oriundas do Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo. Estes resultados parecem coadunar com as afirmações realizadas por Gonzáles et al. (2004) e Antunes et al. (2006), já que uma grande variedade de genes descritos em bactérias Gram-negativas são parte de cassetes gênicos inseridos em um integron e responsáveis por codificar resistência a diversos antimicrobianos.

A presença de integrons de classe 1 foi observada entre sorovares considerados prevalentes, como por exemplo, *Salmonella* ser. Mbandaka, Saintpaul e Corvallis, reafirmando a importância destes sorovares para disseminação da resistência antimicrobiana em nosso meio. Cassetes de genes dos integrons de classe 1 podem ser expressos de forma diferente dependendo do promotor principal e variantes do promotor. Consistem tipicamente de um gene (*Inti*) que codifica uma integrase (que catalisa o movimento do cassete do gene por recombinação sítio-específica), um local de recombinação (*attII*), e um promotor (Pc) localizada dentro da sequência de codificação *intI1* responsável pela expressão de cassetes de genes inseridos. O envolvimento de integrons em fenótipos de multirresistência expressos por isolados de *Salmonella* tem sido extensivamente estudado e relatado por outros estudos (WALKER et al., 2001; CARATTOLI et al., 2002b; KRAULAND et al., 2009).

No que diz respeito ao sorovar Enteritidis, os resultados encontrados demonstraram que apenas uma cepa apresentou positividade para integrons de classe 1 (região variável >1000kb). No entanto, a mesma apresentou um fenótipo de resistência ao maior número de drogas, tendo seu perfil representado por AMP, CHL, FOX, CAZ, STR, NAL, NIT. Alguns relatos apontam que grande parte das cepas do sorovar Enteritidis apresentam fenótipo de resistência aos antimicrobianos em percentuais menos elevados, quando comparados a outros sorovares, podendo ser resultantes da aquisição de integrons anteriormente recebidos através de transmissão horizontal.

Este fato pode ser exemplificado pela aquisição do gene *bla* e *ampR* a partir de uma cepa de *Morganella morganii*, reconhecido por Verdet et al. (2000) quando descreveu a presença de integrons de classe 1 em *Salmonella* ser. Enteritidis.

Firoozeh et al. (2012) reconheceram cinco matrizes distintas variando entre 750 a 1300Kb, quando avaliaram a região variável do integrons de classe 1 em cepas de Enteritidis isoladas de fontes humana e aviária. Segundo os autores, a diversidade de cassetes gênicos deliberados pelo integron de classe 1 contribuíram para resistência concomitante aos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e anti-folatos.

Outro aspecto importante foi que os resultados obtidos no presente estudo apontaram a presença de integrons de classe 1 em 13 cepas de *Salmonella* spp. resistentes à tetraciclina. Entre estas, destacam-se os perfis que apontam resistência à tetraciclina associada a outras drogas antimicrobianas, especialmente ampicilina, estreptomicina e sulfametoxazol-trimetoprim.

White et al. (2001) admitem que a presença deste amplo perfil de resistência é muito comum, provavelmente devido à ligação genética existente entre integrons, transposons e plasmídeos conjugativos. Isto pode representar um sério problema, dada à capacidade destes componentes alocarem um grupo de genes (incluindo o gene *tet*) que podem ser transferidos na íntegra entre sorovares de *Salmonella*, e entre espécies bacterianas distintas. Esta assertiva pode ser comprovada pelo alto percentual de resistência à tetraciclina em isolados de *Escherichia coli* obtidos a partir de aves e suínos evidenciados por Lapierre et al. (2008) e a

caracterização desta resistência mediada por genes *tetA* e *tetB* alocados em integrons, capazes de serem transferidos por conjugação para uma célula receptora *E. coli* J53 AZ.

Constatação semelhante foi relatada por Sunde e Norström (2006) em *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. isoladas de produtos cárneos e subprodutos na Noruega, caracterizando os genes *tetA* e genes *sul1* *drf1*, *aad1* em integrons de classe 1 entre cepas resistentes à tetraciclina, sulfametoxazol e estreptomicina. Assim como em Portugal, a presença de integrons de classe 1 carreando resistência para estas mesmas drogas foi detectada por Antunes et al. (2006) em *Salmonella enterica* de isolados clínicos, do ambiente e de carnes de frango, porco e gado.

Thong e Modarressi (2011) reconhecem a necessidade de monitoramento e compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos na dispersão de resistência a antibióticos entre patógenos de origem alimentar, tendo em vista que em *Salmonella* spp. isoladas de carne de aves e bovinos cruas comercializadas em supermercados e feiras livres, bem como alimentos prontos derivados de aves e bovinos em restaurantes na Malásia, detectaram diversos genes localizados em integrons presentes em plasmídeos conjugativos que conferiam resistência a antibióticos como sulfonamida, ácido nalidíxico, sulfametoxazol-trimetoprim, ampicilina e cloranfenicol.

No Brasil, a ocorrência de genes de resistência a antimicrobianos e o papel de integrons em *Salmonella enterica* oriundas de fonte humana e animal foi determinada por Peirano et al. (2006). Este estudo possibilitou a caracterização de integrons de classe 1 em 55 cepas entre 17 sorovares mais incidentes circulantes no país, sendo possível detectar genes não relacionados entre cepas multirresistentes. Foram determinados mecanismos associados à presença dos genes *sul2* e *sul3* para resistência à sulfonamidas, *tet* (B) e *tet* (A) para tetraciclina, *catA1* para o cloranfenicol, *strA* para estreptomicina e *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CMY-2} para ampicilina e cefalosporinas.

Incontestavelmente, a variabilidade genotípica observada no presente estudo, assim como a possibilidade de genes *qnr* e *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CMY} estarem integrados na estrutura do integron podem ser responsáveis pelo fenótipo de multirresistência apresentado pelas cepas de *Salmonella* spp. Os resultados demonstram que mecanismos múltiplos de resistência a determinados antimicrobianos podem coexistir em um mesmo isolado bacteriano, constituindo fator de preocupação, tendo em vista a disseminação de resistência através de incorporação de DNA livre no ambiente e elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons, para bactérias de diferentes grupos taxonômicos e ecológicos, determinando um impacto clínico e epidemiológico para a medicina humana e veterinária.

Os resultados obtidos no presente estudo apoiam a hipótese de que a versatilidade de plasmídeos, troca de integrons e genes de resistência por transferência gênica vertical e horizontal entre cepas ocorrentes na cadeia alimentar podem contribuir para propagação da resistência aos antimicrobianos. Sua caracterização representa uma base útil para o conhecimento quanto à disseminação da multirresistência para cepas de *Salmonella* spp. de origem humana e animal.

7 CONCLUSÕES

- Os 5 sorovares prevalentes em carcaças de frango isoladas entre o período de 2009 a 2011 foram *Salmonella* ser. Mbandaka, Enteritidis, Minnesota, Typhimurium e Infantis.
- Os sorogrupos prevalentes em carcaças de frango foram O:4 (B), O:7 (C₁), O:8 (C₂-OC₃).
- A resistência aos beta-lactâmicos de 3ª geração de uso humano e veterinário foi evidenciada tanto entre sorovares prevalentes quanto naqueles com reduzida casuística.
- Os sorovares Newport e Senftenberg (2009) e Minnesota (2011) isolados de carcaças resfriadas foram os únicos a apresentarem resistência às fluoroquinolonas.
- A totalidade das cepas apresentaram sensibilidade aos carbapenems.
- A multirresistência foi detectada em 12,4% das cepas avaliadas, tendo sido reconhecidos 28 padrões distintos (entre 3 a 7 classes de antimicrobianos).
- A totalidade das cepas manteve o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos originalmente determinado pelas atividades de monitoramento.
- A redução acentuada de resistência a drogas proscritas (tetraciclina, cloranfenicol, nitrofurantoína) indica seu desuso na avicultura.
- O gene *bla*_{CMY} foi detectado tanto em cepas isoladas tanto em carcaças resfriadas quanto em congeladas e *bla*_{CTX-M} teve maior prevalência nas resfriadas.
- Os genes *bla*_{CMY} e *bla*_{CTX-M} foram reconhecidos em cepas que apresentavam sensibilidade reduzida, em um percentual de 2,9% e 19% respectivamente.
- O gene *qnrB* apresentou distribuição semelhante entre carcaças congeladas e resfriadas.
- Foi caracterizado integron de classe 1 (*integrase*) em 17,1 % de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças resfriadas e congeladas, durante todo o período de análise.
- Os resultados obtidos indicam mecanismos múltiplos de resistência resultantes de genes capazes de serem transferidos horizontalmente entre diferentes espécies, através de elementos móveis como plasmídeos, transposons e integrons.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M.; HASMAN, H.; OLSEN, I.; SORENSEN, G. International spread of *bla*(*cmy-2*)-mediated cephalosporin resistance in a multiresistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolate stemming from the importation of a boar by Denmark from Canada. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, p.1916–1917, 2004.
- AARESTRUP, F.M.; HENDRIKSEN, R. S.; LOCKETT, J.; GAY, K.; TEATES, K.; MCDERMOTT, P. F.; WHITE, D. G. HASMAN, H.; SORENSEN, G.; BANGTRAKULNONTH, A.; PORNREONGWONG, S.; PULSRIKARN, C.; ANGULO, F.J.; GERNER-SMIDT, P. International Spread of Multidrug-resistant *Salmonella* Schwarzengrund in Food Products. **Emerging Infectious Disease Journal**. v.13, n.5, p.726-31, 2007.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. 989 p.
- AFSCA – Federal Agency for the safety of the food chain – Trends and Sources 2010 – 2011, report on zoonotic agents in Belgium, Working group on foodborne infections and intoxications, 2011. Disponível em: www.afsca.be/publications-en/.../2012-12-06_TS_2010_2011_S.pd... Acesso: 22 jan de 2013.
- AHMED, M.; ISHIDA, Y.; SHIMAMOTO, T. Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in Japan. **Journal of Applied Microbiology**. v.106, n.2, p. 402-409, 2009.
- AJIBOYE, R.M.O.D.; SOLBERG, B.M.; LEE, E.; RAPHAEL, C.; DEBROY, L.W.; RILEY, L.W. Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquire infections. **Journal of Clinical Infectious Diseases**. v.49, p. 365-371, 2009.
- AKBARMEHR, J.T.; ZAHRAEI SALEHI, G.H.; NIKBAKHT, B. Identificação de *Salmonella* isoladas de aves por MPCR técnica e avaliação da sua diversidade genética EL *gro hsp* com base na análise de PCR-RFLP . **Jornal Africano de Pesquisa – Microbiologia**. v.4, n.15, p. 1594-1598, 2010.
- ALBUFERA, U.; BHUGALOO-VIAL, P.; ISSACK, MI.; JAUFEEERALLY-FAKIM, Y. Molecular characterization of *Salmonella* isolates by REP-PCR and RAPD analysis. **Infection Genetics and Evolution**. v.9, n.3, p.322-327, 2009.
- ALCOCER, I.; OLIVEIRA, K.M.; VIDOTTO, M.M.; OLIVEIRA, T.R. Discriminação de Sorovares de *Salmonella sp.* Isolados de Carcaças de Frango por REP e ERIC-PCR e Fagotipagem do Sorovar Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.26, p. 441-420, 2006.

- ALEKSHUN, M; LEVY, S. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**. v.128, p.1037-1050, 2007.
- ALMEIDA FILHO, E.S.; SIGARINI, C.O.; BORGES, N.F.; DELMONDES, E.C.; OZAKI, A.S.; SOUZA, L.C. Pesquisa de *Salmonella* spp. em carcaças de frango (*Gallus gallus*), comercializadas em feira livre ou em supermercado no município de Cuiabá, MT, Brasil. **Higiene Alimentar**. v.17, p.74-79, 2003.
- ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E.; ALONSO-CALLEJA, C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, C.; CAPITA, R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. **International Journal of Food Microbiology**. v. 153, p. 281-287, 2012.
- ALVES, L. M. C.; COSTA, N. F.; SILVA, M. S.; SALES, S. S.; CORREIA, M.R. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis: relato de um surto ocorrido em São Luís-MA. **Higiene Alimentar**. v. 15, p. 57-58, 2001.
- AMBLER, R.P. The structure of Beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. **Biological Sciences**. v. 289, n.1036, p.321-331, 1980.
- ANDREATTI FILHO, R. L. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. **Revista de Educação Continuada**. Conselho Regional de Medicina Veterinária (CRMV-SP). v. 4, p. 90-101, 2001.
- ANGULO, F. J.; NARGUND, V. N.; CHILLER, T. C. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. **Journal Veterinary Medical Science**. Ser. B. v.51, p.374-379, 2004.
- ANTUNES, P.; RÉU, C.; SOUSA, J.C.; PEIXE, L.; PESTANA, N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**. v.82, n.2, p.97-103, 2003.
- ANTUNES, P.; MACHADO, J.; PEIXE, L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 58, p. 297-304, 2006.
- ANTUNES, P.; MOURÃO, J.; MACHADO, J.; PEIXE, L. First description of *qnrS1* – IncN plasmid in a ST11 *Salmonella* Enteritidis clinical isolate from Portugal. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 69, n.4, p.463-465, 2011.
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001a. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso: 20 jan de 2013.

- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução - RDC nº 13, de 2 de janeiro de 2011b. Regulamento técnico para instruções do uso, preparo e conservação na rotulagem de carnes de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados. Disponível em: <
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9d14a400474574f7832bd73fbc4c6735/RDC_13.pdf?MOD=AJPERES> Acesso: 28 dez de 2013.
- ANVISA (AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Programa Nacional de Monitoramento da prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango. Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil (PREBAF). Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. , 2008. Brasília. 188 p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d6fa54004745870b908fd43fbc4c6735/relatorioprebaf.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso: 15 jan de 2013.
- ARAÚJO, J.A.; SILVA, J.H.V.; AMÂNCIO, A.L.L.; LIMA, M. R.; LIMA, C.B. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinária Brasília**. v.1, n.3, p.69-77, 2007.
- ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 33, p. 2233-2239, 1995.
- ARCHAMBAULT, M.; PETROV, P.; HENDRIKSEN, R.S.; ASSEVA, G.; BANGTRAKULNONTH, A.; HASMAN, H.; ARESTRUP, F.M. Molecular characterization and occurrence of extended-spectrum beta-lactamase resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Corvallis from Thailand, Bulgaria and Denmark. **Microbial Drug Resistance**. v.12, n. 3, p.192-198, 2006.
- ARROYO, G.; ARROYO, J.A. Detection of *Salmonella* serotypes in edible organ meats from markets in Madrid, Spain. **Food Microbiology**. v.12, p.13-20, 1995.
- ASAI, T.; SATO, C.; MASANI, K.; USUI, M.; OZAWA, M.; OGINO, T.; AOKI, H.; SAWADA, T.; IZUMIYA, H.; WATANABE, H. Epidemiology of plasmid-mediated resistance in *salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from food-producing animals in Japan. **Gut Pathogens**. v.2, n.1, p.2-5, 2010. Disponível em:<
<http://www.gutpathogens.com/content/pdf/1757-4749-2-17.pdf> >Acesso: 26 jan de 2013.
- ASSEVA, G.; PETROV, P.; IVANOV, I.; KANTARDJIEV, T. Vigilância das salmoneloses humana na Bulgária, 1999-2004: evolução, mudanças e resistência aos antibióticos. **Eurosurveillance Journal**. v.11, n.5, p.624, 2006.
- BACCI, C.; BONI, E.; ALPIGIANI, I.; LANZONI, E.; BONARDI, S.; BRINDANI, F. Phenotypic and genotypic features of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolated from chicken meat and quail carcasses. **International Journal of Food Microbiology**. v. 160, n.1, p. 16-23, 2012.

- BAILEY, J. S. Integrated colonization control of *Salmonella* in poultry. **Poultry Science**. v.67, p.928–932, 1988.
- BARBOUR, E.K.; JURDI, L.H.; TALHOUK, R.; QATANANI, M.; EID, A.; SAKR, W.; BOULJIHAD, M.; SPASOJEVIC, R. Emergence of *Salmonella* Enteritidis outbreaks in broiler chickens in the Lebanon: epidemiological markers and competitive exclusion control. **Rev. Science Tchenology Off International Epizotia**. vol. 18, n.3. p.710-718, 1999.
- BARROW PA. *Salmonella* – present, past and future. **Avian Pathology**. v. 22, p. 651-669, 1993.
- BAUMLER, A. J.; KINGSLEY, R. A.; Host adaptation and the emergence of infectious diseases: the *Salmonella* paradigm. **Molecular Microbiology Journal**. v. 36, n. 5, p.1006-14, 2000.
- BAUMLER, A. J.; HARGIS, B. M.; TSOLIS, R. M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**. v.287; p.50–52, 2000.
- BENASSI, F.; VON SPECHT, M.; GARCIA, M.; PUCCIARELLI, A.; ZUBRESKI, E. Frecuencia de aislamiento de *Salmonellas* y *Pseudomonas* en canales de pollos refrigeradas procedentes de Misiones, **Revista de Ciência y Tecnología**. n.1, p.1, 1998.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; OLIVEIRA, G.H. Salmoneloses aviárias. In: ANDREATTI FILHO, R.L. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca. p.96 -111, 2006.
- BERNARDO, F.M.A; MACHADO, J.C.C. Prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango em Portugal: perspectiva epidemiológica em humanos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 84, p. 31-45, 1989.
- BERSOT, L.S. *Salmonella* no Brasil: Sua importância no abate de aves. In: V SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, 2006. Santa Maria, RS, Brasil. Anais... Santa Maria. p.90-94, 2006.
- BERTOGLIO, O. **Avicultura de Corte Brasileira: Desempenho recente e competitividade internacional**. 2006. 120p. Dissertação (Mestrado em Integração Latino-Americana) - Universidade Federal Santa Maria, RS, 2006.
- BERTRAND, S; WEILL, F.X.; CLOECKAERT, A.; VRINTS, M.; MAIRIAUX, E.; PRAUD, K.; DIERICK, K.; WILDEMAUVE, C.; GODARD, C.; BUTAYE, P.; IMBERECHTS, H.; GRIMONTE, P.A.; COLLARD, J.M. Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2) – producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000-2003). **Journal of Clinical Microbiology** v.44, n.8. p. 2897-2903, 2006.
- BESSA, M.C. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul**. 2006. 145 p. (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

- BISSONNETTE, L., ROY, P. H.. Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of Gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**. v. 174, p.1248-1257, 1992.
- BNDES - BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Relato setorial avicultura**. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br> Acesso: 19 dez de 2012.
- BONI, H.F.K.; CARRIJO, A.S.; FASCINA, V.B. Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. Salvador, v.12, n.1, p.84-95, 2011.
- BONNET, R.; SAMPAIO, J.L.M.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. A Novel CTX-M β -Lactamase (CTX-M-8) in Cefotaxime-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.44; n.7, p1936–1942, 2000.
- BOONMAR, S.; BANGTRAKULNONT, A.; PORNRUANGWONG, S.; SAMOSORN SUK, S.; KANEKO, K.; OGAWA, M. Significance increase in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from human beings and chicken meat in Thailand. **Veterinary Microbiology**. v.62, p.73-80, 1998.
- BOTTEZINI, I.M.P.; CORSO, M.P.; VEIT, V.M. **Uso de Antibióticos na produção de Frango**. Cefet/PR - Unid. Medianeira, 2003. Disponível em: www.dipemar.com.br/carne/309/materia_arttec_carne.htm Acesso: 6 jan de 2013.
- BOUVET, P.; GRIMONT, P. Données de vigilância 1999 du centro nacional de Référence des et *Salmonella* e *Shigella*, **Boletim Épidémiologique**, Hebdomadaire. v.12, p. 1-9 , 2001.
- BURR, M.D.; JOSEPHSON, K L.; PEPPER, I.L. An evaluation of ERIC-PCR an AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. **Letters in Applied Microbiology**. v. 27, p. 24-30, 1998.
- BUSH K. New beta-lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Journal of Clinical Infectious Diseases**. v.32, p. 1085-1089, 2001.
- BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of Beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.54, n.3, p.969-976, 2010.
- BUTAYE, P.; MICHAEL, G. B.; SCHWARZ, S.; BARRETT, T. J.; BRISABOIS, A.; WHITE, D. G. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. **Microbes and Infection**. v. 8, p. 1-7, 2006.
- CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; ANDERSON, R. C.; BYRD, J. A.; NISBET, D. J. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. **Journal of Animal Science**. v.86, p.E163–E172, 2008.
- CAMPOS, L.C; HOFER, E. Antimicrobial resistance among *Salmonella* serovars isolated from different sources in Brazil during 1978-1983. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.55, p. 349-359, 1989.

- CARATTOLI, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. **Veterinary Research**. v.32, p. 243-259, 2001.
- CARATTOLI, A.; TOSINI, F.; GILES, W. P.; RUPP, M. E.; HINRICHS, S.H.; ANGULO, F.J.; BARRETT, T.J.; FEY, P.D. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.46, p.1269–1272, 2002a.
- CARATTOLI, A.; FILETICI, E.; VILLA, L.; DIONISI, A. M. Antibiotic resistance genes and *Salmonella* genomic island 1 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.46, p.2821–2828, 2002b.
- CARATTOLI, A. Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 301, p. 654– 658, 2011.
- CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, A.M.I.; GAMA, N.M.S.Q. Pesquisa de *Salmonella* spp. em ovos comerciais, analisados no Laboratório de Patologia avícola de Descalvado, SP. **Higiene Alimentar**. v. 16, p. 76-79, 2002.
- CARDOSO, T.G.; CARVALHO, V.M. Foodborne disease caused by *Salmonella* spp. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**. v.24, n. 2. p. 95-101, 2006.
- CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C. *Salmonella* na segurança dos alimentos – Divulgação Técnica do Instituto Biológico, **Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola**, São Paulo. v.70, n.1, p.11-13, 2008.
- CARRAMINÁNA, J. J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, I.; HERRERA, A. High prevalence of multiple resistance in *Salmonella* serovars isolated from poultry slaughterhouse in Spain, **Veterinary Microbiology**. v. 104, p. 133-139, 2004.
- CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L.L. *Salmonella* sp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**. v.35, p.1465-1468, 2005.
- CASIN, I., BREUIL, J., BRISABOIS, A., MOURY, F., GRIMONT, F., COLLATZ E. Multidrug-resistant human and animal *Salmonella typhimurium* isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome- and integron-encoded beta-lactamase PSE-1. **Journal of Infectious Disease**. v.179, p.1173-1182, 1999.
- CASTILLA, K.S.; FERREIRA, C. S. A.; MORENO, A.M. Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* and *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.37, n.2, p.135-139, 2006.
- CATTOIR, V; POIREL, L.; ROTIMI, V.; SOUSSY, C.J.; NORDMANN, P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolones resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 60, n.2, p. 394-397, 2007.

- CATTOIR, V.; NORDMAN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance in Gram-negative bacterial species: an update. **Current Medicinal Chemistry**. v.16, n.8, p.1028-1046, 2009.
- CAVACO, L.M.; HENDRIKSEN, R.S.; AARESTRUP, F.M. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrSI* detected in *Salmonella enterica* serovar Corvallis strains isolated in Denmark and Thailand. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.60, p. 704–706, 2007.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella* surveillance: annual summary, 2008. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2004. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2003/SalmonellaIntroduction2003.pdf>> Acesso: 20 dez de 2012.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella* surveillance: outbreaks involving *Salmonella*, 2012. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Service. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>> Acesso: 15 fev de 2013.
- CESCO, M.A.O. **Pesquisa de fatores associados à virulência de *Salmonella* Hadar através da reação em cadeia da polimerase (PCR)**. Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.
- CHANG, Y.H. Prevalence of *Salmonella* spp. in poultry broilers and shell eggs in Korea. **Journal of Food Protection**. v.63, n.5, p.655-658, 2000.
- CHAU, T.T.; CAMPBELL, J.I.; GALINDO, C.M. Antimicrobial drug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhi in Asia and molecular mechanism of reduced susceptibility to the fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.51, p.: 4315-4323, 2007.
- CHITTICK, P.; SULKA, A.; TAUXE, R.V.; FRY, A.M. A summary of national reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **Journal of Food Protection**. v.69, n.5, p.1150-1153, 2006.
- CHIU, C. H.; SU, L. H.; , WANG, M. H.; YEH, C. M.; WEILL, F. X. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44; p.2354–2358, 2006.
- CHIU, L.H., LIN, T.Y.; HUANG, Y.C.; SHU,C.; TSAO, K.C. Characterization of 13 multi-drug resistant *Salmonella* serovars from different broiler chickens associated with those of human isolates. **BMC Microbiology**. v.10, p.86-90, 2010.
- CISALPINO, E.O. **Sensibilidade das Salmonelas aos antibióticos**. 1957. 60p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1957.
- CLARK, G.M.; KAUFMANN, A.F.; GANGAROSA, E.J. Epidemiology of an international outbreak of *Salmonella agona*.. **The Lancet Journal**, II. v.7827, p. 490-493, 1973.

- CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: M100-S19**, 2009. v.29, n.3, 151p.
- CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: M100-S20**, 2010. v.30, n.1, 158 p.
- CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: M100-S21**, 2011. v.31, n.1, 170 p.
- CODA-CERVA (Centrum voor Onderzoek in de Diergeneeskunde en Agrochemie – Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques), 2010. *Salmonella* serotypes analyzed at the CODA-CERVA in 2009. Disponível em <http://www.thepoultrysite.com/articles/1772/salmonella-serotypes-analysed-at-the-codacerva-in-2009>. Acesso: 16 nov de 2012.
- CORONA, M. S. R.; GRANDA, A. E.; BONACHEA, L. F. H. Resistência antimicrobiana em cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* aisladas en carnes de aves importadas. **Revista de Salud Animal**. v. 34, n. 2, p. 120-126, 2012.
- CORTEZ, A.L.L; CARVALHO, A.C. F.B.; IKUNO, A.A.; BÜRGER, K.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 73, p. 157-163, 2006.
- CORVEC, S.; POIREL, S.; ESPAZE, L.; GIRAUDEAU, E.; DRUGEON, C. Vitek2 system: a reliable toll to detect *qnr* determinants in Enterobacteriaceae without quinolone resistance-determining region modifications. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.64, n.4, p.455-457,2009.
- COSTA, G.A; HOFER, E.; CARVALHO, M.D.L.; BASÍLIO, C.A. Sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos de enterobactérias isoladas de processos diarreicos infantis. **Boletim do Instituto de Puericultura da Universidade de São Paulo**. v.21, p.131-138, 1964.
- COSTA, G. A.; HOFER, E. **Isolamento e identificação de enterobactérias**. Rio de Janeiro. 1972. 120p. [Monografia] - Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, 1972.
- COSTA, P.M.R.M. Resistências antimicrobianas em avicultura. CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS [Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, 2002], SPCV, Oeiras, 10-12 Out. p. 251-260, 2002.
- CUI, S.; GE, B.; ZHENG, J.; MENG, J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in organic chickens from Maryland retail stores. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, p.4108–4111, 2005.
- CY, Y.U.; CHOU, S.J.; YEH, C.M.; CHAO, M.R.; HUANG, K.C.; CHANG, Y.F.; CHIOU, C.S.; WEILL, F.X.; CHIU, C.H.; CHU, C.H.; CHU, C. Prevalence and characterization of multidrug-resistant (type ACSSuT) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains in isolates from four gosling farms and a hatchery farm. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, p. 522-526, 2008.

- DALTON, C.B.; GREGORY, J.; KIRK, M.D.; STAFFORD, R.J.; GIVNEY, R.; KRAA, E. Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. **Communicable Diseases Intelligence**. v.28, n.2, p.211–24, 2004.
- DALY, M., FANNING, S. Characterization and chromosomal mapping of antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium, **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, p.4842-4848, 2000.
- DAVIES, R. Salmonellosis. In: World Organization for Animal Health – OIE. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 5th ed. chap. 2.10.3, 2007. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00129.htm> Acesso: 27 jan de 2013.
- DIAZ, P.; BELLO, H.; DOMINGUEZ, M.; TRABAL, N.; MELLA, S.; ZEMELMAN, R.; GONZALEZ, G.R. Resistência a gentamicina, amicacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie pneumoniae productoras de β -lactamases de espectro extendido. **Revista Médica de Chile**. v.132, p. 1173-1178, 2004.
- DOMINGUEZ, C.; GÓMEZ, I.; ZUMALACÁRREGUI, J. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. **International Journal of Food Microbiology**. v.72, n.1-2, p.165-168, 2002.
- DUARTE, D. A. M.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SANTOS, S. B.; SILVA, J. V. D.; DE ANDRADE, P. L. A.; FALCÃO, L. S. P. C. A. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 40, p. 569-573, 2009.
- DUTIL, L.; IRWIN, R.; FINLEY, R.; NG, L.K.; AVERY, B.; BOERLIN, P.; BOURGAULT, A.M.; COLE, L.; DAIGNAULT, D.; DESRUISSEAU, A.; DEMCZUK, W.; HOANG, L.; HORSMAN, G.B.; ISMAIL, J.; JAMIESON, F.; MAKI, A.; PACAGNELLA, A.; PILLAI, D.R. Ceftiofur Resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Chicken Meat and Humans, Canada. **Emerging Infectious Disease Journal**. v.16, p.48-54, 2010.
- EWING, W.H. Edward's and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Publishing Co., Inc. New York. 1986.
- FANG, H.; HUANG, H.; SHI, Y.; HEDIN, G.; NORD, C.E.; ULLBERG, M. Prevalence of *qnr* determinants among extended-spectrum beta-lactamase positive Enterobacteriaceae clinical isolates in southern Stockholm, Sweden. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.34, n.3, p, 268-279, 2009.
- FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **Journal of Food Protection**. v. 59, p.1091-1101, 1996.
- FDA - Food and Drug Administration. 2010. National Antimicrobial Resistance Monitoring System—enteric bacteria (NARMS): 2007 executive report. U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Rockville, MD.

- FERNANDES, S.A.; GHILARDI, A.C.R.; TAVECHIO, A.T.; MACHADO, A.M.O.; PIGNATARI, A.C.C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 45, p.59-63, 2003.
- FERNANDES, S. A.; PATERSON, D.L.; GHILARDI-RODRIGUES, A.C.; ADAMS-HADUCH, J.M.; TAVECHIO, A.T.; DOI, Y. CTX-M-2- producing *Salmonella* typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microbial Drug Resistance**. v. 15, n. 4, p. 317-21, 2009.
- FEY, P.D.; SAFRANEK, T.J.; RUPP, M.E.; DUNNE, E.F.; RIBOT, E.; IWEN, P.C.; BRADFORD, P. A.; ANGULO, F. J.; HINRICHS, S. H. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. **New England Journal of Medicine**. v. 342, p.1242–1249, 2000.
- FIROOZEH, F.; ZAHRAEI, T.; SHAHCHERAGHI, F.; KARIMI, V.; ASLANI, M.M. Characterization of class I integrons among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from humans and poultry. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 64. p. 237-243, 2012.
- FOLSTER, J. P.; PECIC, G.; BOLCEN, S.; THEOBALD, L.; HISE, K.; CARATTOLI, A.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P.F.; WHICHARD, J.M. Characterization of extended-spectrum cephalosporin- resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from humans in the United States. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.7, p.181–187, 2010.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 196 p., 2005.
- FREITAS NETO, O.C.; PENHA FILHO, R.A.C; BARROW, P.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Sources of Human Non-Typhoid Salmonellosis A Review. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.12, n.1, p.01-11, 2010.
- FRERE, J.M. Beta-lactamase and bacterial resistance to antibiotics. **Molecular Microbiology Journal**. v.16, p. 385-395, 1995.
- FRICKE, W. F.; MCDERMOTT, P.F.; MAMMEL, M.K.; ZHAO, S.; JOHNSON, T.J.; RASKO, D.A.; FEDORKA-CRAY, P.J.; PEDROSO, A.; WHICHARD, J.M.; LECLERC, J.E.; WHITE, D.G.; CEBULA, T.A.; RAVEL, J. Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic *Escherichia coli* strains in *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates from poultry. **Applied and Environmental Microbiology**. v.75, p.5963–5971, 2009.
- FRYE, J.G.; FEDORKA-CRAY, P.J. Prevalence, distribution and characterization of ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* isolated from animals in the USA from 1999 to 2003. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.30, p.134-142, 2007.
- FUCHS, F.D. Princípios gerais do uso de antimicrobianos. In: FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B. **Farmacologia clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 393-399, 2004.

- FUZIHARA, T.O.; FERNANDES, S. A.; FRANCO, B. D. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **Journal of Food Protection**. v.63, p.149-153, 2000.
- GARCIA, D.O.; DOI, Y.; SZABO, D.; ADAMS-HADUCH, J.M.; VAZ, T.M.I.; LEITE, D.; PADOVEZE, M.C.; FREIRE, M.P.; SILVEIRA, F.P.; PATERSON, D.L. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum Beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.52, n.5, p.1790-1793, 2008.
- GEIMBA, M.P.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from foods involved in human foodborne outbreaks that occurred in the south of Brazil, 1999 – 2000. **Journal of Food Safety**. v.25, p. 173-182, 2005.
- GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. Barueri, SP: Manole. p. 317-323, 2008.
- GILES, W. P; BENSON, A.K.; OLSON, M.E.; HUTKINS, R.W.; WHICHARD, J.M.; WINOKUR, P.I.; FEY, P.D. DNA sequence analysis of regions surrounding *bla_{CMY-2}* from multiple *Salmonella* plasmid backbones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, p.2845 – 2852, 2004.
- GIL-SETAS, A.; RAMOS, A.M.; SALAS, C.M.; DOMÍNGUEZ, M.U.; ELIA, M.E.I. Salmonelosis no tifoidea en un área de salud de Navarra, España. **Revista Española de Salud Pública**, v.76, n.1, p.49-56, 2002.
- GONCAGÜL, G.; GÜNAYDIN, K; CARLI, T. Prevalence of *Salmonella* serogroups in chicken meat. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**. v. 29, p. 103-106, 2005.
- GONZÁLES, G.R.; MELLA, S.M; ZEMELMAN, R.Z.; BELLO, H.T.; DOMÍNGUEZ, M.Y. Integrones y cassettes genéticos de Resistência: estructura y rol frente a los antibacterianos. **Revista Médica de Chile**. v.132, n.5, p.619-626, 2004.
- GONZÁLEZ-SANZ, R.; HERRERA-LEON, S.; DE LA FUENTE, M.; ARROYO, M.; ECHEITA, M. A. Emergence of extended-spectrum beta-lactamases and AmpC-type beta-lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 64, p.1181–1186, 2009.
- GREENE, S.K.; STUART, A.M.; MEDALLA, F.M.; WHICHARD, J.M.; HOEKSTRA, R.M.; CHILLER, T.M. Distribution of Multidrug-Resistant Human Isolates of MDR-ACSSuT *Salmonella* Typhimurium and MDR-AmpC *Salmonella* Newport in the United States, 2003–2005. **Foodborne Pathogens and Disease**. V. 5, n.5, 2008.
- GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. **Antigenic formulae of *Salmonella* serovars**. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 9th edition. France: Institute Pasteur , 2007. 167 p.
- GUERRA, B.; SOTO, S.; SANTIAGO, C.; MENDONZA, M.C. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n.8. p. 2166-2169, 2000.

- GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M; FIELDS, P.I.; BOCKEMUHL, J; GRIMONT, P.A.D., WEILL, F.X. Supplement 2003-2007 (No.47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**. v.161. p.26-29, 2010
- GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectiva para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. v.33, n.3. p.667-679, 2010.
- HAKENEN, A.; SITONEN, A.; KOTILAINEN, P.; HUOVINEN, P. Increasing fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serotyping in Finland during 1995-1997. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.43, p.145-148, 1999.
- HALL, R. M.; BROOKES, D. E.; STOKES, H. W. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. **Molecular Microbiology Journal**. v.5, p.1941-1959, 1991.
- HALL, R. M.; COLLIS, C. M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination, **Molecular Microbiology Journal**. v.15, p.593-600, 1995.
- HAMADA, K.; TSUJI, H. *Salmonella* Brandenburg and *Salmonella* Corvallis involved in a food poisoning outbreak in a hospital in Hyogo Prefecture. **Journal of Infectious Disease**. v.54, p.195-196, 2001.
- HASMAN, H.; MEVIUS, D.; VELDMAN, K.; OLESEN, I.; AARESTRUP, F.M. β -Lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.56, p.115-121, 2005.
- HEIDER, L.C.; HOET, A.E.; WITTUM, T.E.; KHAITSA, M.L.; LOVE, B.C.; HUSTON, C.L.; MORLEY, P.S.; FUNK, J.A; GEBREYES, W.G. Genetic and Phenotypic Characterization of the *bla*_{CMY} Gene from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Isolated from Food-Producing Animals, Humans, the Environment, and Retail Meat. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.6, n.10, p.1235-1240, 2009.
- HERRERA-LEÓN, S.; GONZÁLEZ-SANZ, R.; HERRERA-LEÓN, L.; ECHEITA, M.A. Characterization of multidrug-resistant Enterobacteriaceae carrying plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.66, n.2, p. 287-290, 2011.
- HOFER, E. Considerações sobre a frequência de sorotipos de *Salmonella* na cidade do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.72, p. 63-72, 1974.
- HOFER, E.; ANDERSON, E.S.; MACHADO, J.D.C.; DIAS, J.C.; RIBEIRO, A.; RODRIGUES, D.P.; SOLARI, C.A. Considerações ecológicas e epidemiológicas sobre a subdivisão de *Salmonella typhimurium* em lisotipos e biótipos. X Congresso Brasileiro de Microbiologia, Rio de Janeiro, RJ. Anais. 1979.
- HOFER, E.; REIS, E.M.F.; PUENTE, A.P.; OLIVEIRA, M.A.; SOLARI, C.A. Typhoid fever caused by a negative lysine descarboxylase *Salmonella* Typhi strains in two patients from Distrito Federal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 85, p.481-482, 1990.

- HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 17, p. 55-62, 1997.
- HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.18, n.1, p.21-27, 1998.
- HORMAECHE, E.; PELUFFO, C.A. Las salmonelosis infantiles y su diagnostico. Puerto Rico. **Journal of Public Health and Tropical Medicine**. p. 17-71, 1941.
- HUMPHREY, T. J. Public health implications of the infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. **World's Poultry Science Journal**. v. 46, p. 5-13, 1990.
- HUNTER, R.R. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v.28, p.1903-1905, 1990.
- IRINO, K.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G. Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 38, p. 193-196, 1996.
- JAKABI, M.; PERESI, J.T.M. **Detecção de *Salmonella* em Alimentos**. Curso de Capacitação Integrada em métodos epidemiológicos e diagnóstico laboratorial para Isolamento e identificação de *Salmonella*- Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 126p, 2006.
- JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 6ed. Maryland: Aspen, 2005. 679p.
- JIN, J. D.; LEE, D. S.; SHIN, E. K.; KIM, S. J.; JUNG, R.; HAHN, T. W. Molecular Typing by Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) and Detection of Virulence Genes of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum. **Journal Veterinary Medical Science**. v. 68, p. 1321-1326, 2006.
- JOHNSON, T.J.; THORSNESS, J.L.; ANDERSON, C.P.; LYNNE, A.M.; FOLEY, S.L.; HAN, J.; FRICKE, W. F.; MCDERMOTT, P.F.; WHITE, D.G.; KHATRI, M.; STELL, A.L.; FLORES, C.; SINGER, R.S. Horizontal gene transfer of a ColV plasmid has resulted in a dominant avian clonal type of *Salmonella enterica* serovar Kentucky. **PLoS One**. v.5, n.12, p.1, 2010.
- JONES, F.T.; RICKE, S.C. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. **Poultry Science**. v. 82, p.613-617, 2003.
- JUNIOR, A.M.P.; BRUNO, D.G.; TIBA, S.; FUJII, R. Uso de Aditivos Antimicrobianos na Alimentação Animal - Controle, Restrição e Tendências. Palestra apresentada durante o AVISULAT, em São Bento, RS, 2010. Disponível em: <http://www.nftalliance.com.br/uso-de-aditivos-antimicrobianos-na-alimenta-o-animal-controle-restri-o-e-tend-ncias/> Acesso: 18 dez de 2012.

- KANETO, C.N.; GAMA, N.M.S.Q.; FERNANDES, S.A.; MASUKO, R.M.; VILLALOBOS, E.M.C; TAVECHIO, A.T. *Salmonella* sp em ingredientes de ração para aves de postura comercial. In: 9ª REUNIÃO ANNUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.63. p. 19-19. , 1996.
- KARAH, N.; POIREL, L.; BENGTSSON, S.; SUNDQVIST, M.; KAHLMETER, G.; NORDMANN, P.; SUNDSFJORD, A.; SAMUELSEN Ø; Norwegian Study Group on PMQR. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')*-Ib in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from Norway and Sweden. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**. v.66, n.4, p. 425-431, 2010.
- KAUFFMANN, F.; EDWARDS, P.R. Classification and Nomenclature of Enterobacteriaceae. Intern Bull Bacteriol Nomen-Tax 2: 2-8. Kauffmann, F. The Bacteriology of Enterobacteriaceae. Munksgaard, Copenhagen, Scandinavian University Books, 400p. 1952.
- KAUFFMAN – WHITE SCHEME. Antigenic Formulae of the *Salmonella*. WHO BD/72. rev.3, 1980.
- KAYE, K.S.; FRAIMOW, H.S.; ABRUTYN, E. Pathogens resistant to antimicrobial agents – Epidemiology, molecular mechanisms and clinical management. **Infectious Diseases Clinical of North America**. v. 14, p. 293-317, 2000.
- KETZ-RILEY, C. J. Salmonellosis and Shigelosis. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and Wild Animal Medicine**. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 2003. chap. 65, 782 p.
- KIESSLING, C.R.; CUTTING, J.H.; LOFTIS, M.; KIESSLING, W.M.; DATTA, A.R.; SOFOS, J.N. Antimicrobial resistance of food-related *Salmonella* isolates 1999-2000. **Journal of Food Protection**. v.65, p. 603-608, 2002.
- KIM, E. S.; JEONG, J. Y.; JUN, J. B.; CHOI, S.H.; LEE, S.O.; KIM, M.N.; WOO, J.H.; KIM, Y.S. Prevalence of *aac(6')*-Ib-cr Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme among *Enterobacteriaceae* Blood Isolates in Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 6, p. 2643–2645, 2009.
- KIM, S.; KIM, S.H.; KIM, J.; SHIN, J.H.; LEE, B.K.; PARK, M.S. Occurrence and distribution of various genetic structures of class 1 and class 2 integrons in *Salmonella enterica* Isolates from foodborne disease patients in Korea for 16 years. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.8, p. 319–324, 2011.
- KIM, M.S.; LIM, T.H.; JANG, J. H.; LEE, D.H.; KIM, B.Y.; KWON, J. H.; CHOI, S.W.; NOH, J.Y.; HONG, Y.H.; LEE, S.B.; YANG, S.Y.; LEE, H.J.; LEE, J.B.; PARK,S.Y.; CHOI, I.S.; SONG, C.S. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* species isolated from chicken meats produced by different integrated broiler operations in Korea. **Poultry Science**. v. 91, p.2370-2375, 2012.
- KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Eds) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4a ed. Washington: American Public Health Association (APHA), p. 69-82, 2001.

- KOTTWITZ, L.B.M.; DE OLIVEIRA, T.C.R.M.; ALCOCER, I.; FARAH, S. Epidemiological data of salmonellosis outbreaks occurred between 1999 and 2008 in Parana State, Brazil. **Acta Scientiarum Health Sciences (UEM)**. v.32, n.1, p.9-15 2010.
- KRAULAND, G.M.; MARSH, J.W.; PATERSON, D.L.; HARRISON, L.H. Integron-mediated Multidrug Resistance in a Global Collection of Nontyphoidal *Salmonella enterica* Isolates. **Emerging Infectious Disease Journal**. v.15, n.3, p.388–396, 2009.
- LAGE, E.A.; WANDER, A.E.; NASCIMENTO, F.N. Avaliação de impactos de novas tecnologias na agropecuária brasileira pelo método do excedente econômico. **Jornal do fazendeiro**. Goiânia, 2007.
- LAHELLEC, C.; COLIN, P. Relationship between serotypes of *Salmonellae* from hatcheries and rearing farms and those from processed poultry carcasses. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v. 26, p.179–186, 1985.
- LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: a visão da indústria e recentes avanços. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. Anais. FACTA- Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos, SP, p.2133, 2005.
- LAPIERRE, L.; CORNEJO, J.; BORIE, C.; TORO, C.; SAN MARTÍN, B. Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and class 2 integrons in commensal strains of *Escherichia coli* isolated from poultry and swine. **Microbial Drug Resistance**. v.14. n.4., p. 265-271, 2008.
- LARTIGUE, M.F.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Diversity of genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. **FEMS Microbiology Letters**. v. 234, n.2, p.201-207, 2004.
- LAVILLA, S.S.; GONZÁLEZ-LOPEZ, J.J.; SABATÉ, M.M; GARCÍA-FERNANDEZ, A.A.; LARROSA, M.N.; BARTOLOMÉ, A.M.; CARATTOLI, G.G. Prevalence of *qnr* genes among extend-spectrum beta-lactamase- producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.61, n.2 , p. 291-295, 2008.
- LEDUC, J. W. Plan of action. Information. **Glob Issues 1**. v. 17, p. 27-30, 1996.
- Le MINOR. L. Genus III.*Salmonella* Lignières 1900. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Krieg, N.R.; Holt, J.G. (eds.). Williams & Wilkins Co., Baltimore. v.1, p.427-458, 1984.
- LEITÃO, M.F.F. Qualidade e segurança alimentar em produtos avícolas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. Anais. FACTA- Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, SP, p.215-232, 2002.
- LESTARI, S. I.; HAN, F.; WANG, F; GE, B. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars in conventional and organic chickens from Louisiana retail stores. **Journal of Food Protection**. v.72, p.1165–1172, 2009.

- LEVERSTEIN-VAN HALL, M.A.; BOX, A.T.A.; BLOK, HEM.; PAAUW, A.; FLUIT, A.C.; VERHOEF, J. Evidence of extensive interspecies transfer of integron-mediated antimicrobial resistance genes among multidrug-resistant Enterobacteriaceae in clinical setting. **Journal of Infectious Disease**. v.186, n.1. p.49-56, 2002.
- LI, Y.; MUSTAPHA, A. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in apple cider and produce by a multiplex PCR. **Journal of Food Protection**. v.67, p.27-33, 2004.
- LINZMEIER, L.G.; BAZAN, C.T.; ENDO, R.M.; LINO, R.S.; MENINO, B.B.; PUGLIESE, P.; SHAFRANSKI, E.; SILVA, L.C. Uso de antibióticos em aves de produção. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça – FAMED/FAEF. Editora FAEF. Ano VII, n.12, 2009. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria12/revisao/pdf/AnoVII-Edic12-Rev162.pdf> Acesso: 3 jan de 2013.
- LOPES, M.; GALHARDO, J.A.; OLIVEIRA, J.T.; TAMANINI, R.; SANCHES, S.F.; MULLER, E.E. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. **Ciências Agrárias**, Londrina. v. 28, p.465-476, 2007.
- MA, J.; ZENG, Z.; CHEN, Z.; XU, X.; WANG, X.; DENG, Y.; LÜ, D.; HUANG, L.; ZHANG, Y.; LIU, J.; WANG, M. High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr*, and *qepA* among Ceftiofur-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates from Companion and Food-Producing Animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n.2, p. 519-524, 2011.
- MALORNY, B.; SCHROETER, A.; HELMUTH, R. Incidence of quinolones resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 43, p. 2278-2282, 1999.
- MALORNY, B.; SCHROETER, A.; BUNGE, C.; HOOG, B.; STEINBECK, A.; HELMUTH, R. Evaluation of molecular typing methods for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated in Germany from healthy pigs. **Veterinary Research**. v.32, p. 119-129, 2001.
- MANIE, T.; KHAN, S.; BROZEL, V.S. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South America. **Letters in Applied Microbiology**. v.26, p.253-258, 1998.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil. - Portaria Ministerial nº 193 de 19 de setembro de 1994. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Programa Nacional de Sanidade Avícola - PNSA, 1994. Disponível em: http://ag20.cnptia.embrapa.br/Repositorio/programa_nacional_sanidade_avicola_000f_yh51e9y02wx5ok0pvo4k3xecpyt9.pdf> Acesso: 22 out de 2012
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Brasil. Coordenadoria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 193, de 12 de maio de 1998. Regulamento Técnico para o licenciamento e a renovação de licença de antimicrobianos de uso veterinário. [online]. Disponível em: <www.agricultura.gov.br> Acesso: 26 nov de 2013.

- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Brasil. Instrução Normativa nº 09, de 27 de junho de 2003. [online]. Disponível em: www.agricultura.gov.br > Acesso: 26 nov de 2013.
- MARIMÓN, J.M.; GOMÁRIZ, M.; ZIGORRAGA, C.; CILLA, G.; PÉREZ-TRALLERO, E. Increasing prevalence of quinolone resistance in human nontyphoid *Salmonella enterica* isolates obtained in Spain from 1981 to 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, p.3789–3793, 2004.
- MARJO, C.B. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isoladas de suínos do Rio Grande do Sul**. Dissertação de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade do Rio Grande do Sul, 2006.
- MASLOW, J.N.; MULLIGAN, M.E.; ARBIT, R.D. Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Journal of Clinical Infectious Diseases**. v.17, p.153-164, 1993.
- MAZEL, D.; DAVIES, J. Antibiotic resistance. The big picture, **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 456, p. 1-6, 1998.
- MCEWEN, S.A.; FEDORKA-CRAY, P.J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Journal of Clinical Infectious Diseases**. v.34, p. 93-106, 2002.
- MCGRATH, B. O'HALLORAN, J.A.; PITERINA, A.V.; PEMBROKE, J. T. Molecular tools to detect the IncJ elements: a family of integrating antibiotic resistant mobile genetic elements. **Journal of Microbiological Methods**. v.66, n.1, p 32-42, 2006.
- MEDEIROS, L.M. **Estudo fenotípico e genotípico de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium resistentes a antimicrobianos isolados de diferentes fontes da cadeia alimentar no Brasil. Rio de Janeiro**. 2006. 104 p. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - FIOCRUZ. 2006.
- MELENDEZ, S. N.; HANNING, I.; HAN, J.; NAYAK, R.; CLEMENT, A.R.; WOONING, A.; HERERRA, P.; JONES, F.T.; FOLEY, S.L.; RICKE, S.C. *Salmonella enterica* isolates from pasture-raised poultry exhibit antimicrobial resistance and class I integrons. **Journal of Applied Microbiology**. v.109, p.1957–1966, 2010.
- MÉRENS, A.; SERVONNET, A. Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluorquinolones em 2010. **Revue Francophone des Laboratoires**. v.422, p. 33-41, 2010.
- MERMIN, J.; HUTWAGNER, L.; VUGIA, D.; SHALLOW, S.; DAILY, P.; BENDER, J.; KOEHLER, J.; MARCUS, R.; ÂNGULO, F. J. Reptiles, amphibians, and human *Salmonella* infection: a population-based, case-control study. **Journal of Clinical Infectious Diseases**. v. 38, p. 253-261, 2004.
- MIRZA, S., KARIUKI, S., MAMUN, K.Z., BEECHING, N.J., HART, C.A. Analysis of plasmid and chromosomal DNA of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi from Asia. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, p.1449-1452, 2000.

- MOLBAK, K.; GENER-SMIDT, P.; WEGENERT, H.C. Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **Emerging Infectious Disease Journal**. v.8, n.5, p. 514-515, 2002.
- MOORE, P.R.; EVENSON, A.; LUCKEY, T.D. McCOY, E.; ELVEHJEM, C.A.; HART, E.B. Use of sulfasuxidine, streptothricin and Streptomycin in nutritional studies with the chick. **Journal of Biological Chemistry**. v.165, p. 437-441, 1946.
- MOREIRA, G.N.; MINAFRA E REZENDE, C.S.; MESQUITA, S.Q.P.; OLIVEIRA, A.N.; ARRUDA, M. L.T. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo. v.67, p. 126-130, 2008.
- MULLIS, K., FALOONA, F.. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.155, p. 335-350, 1987.
- MUNRO, D.S., GIRWOOD, R.W.A., REILLY, W.J. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Scotland. In: SAEED, A. M. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals – epidemiology, pathogenesis and control. 1.ed. Ames: Iowa State University Press, p. 27-31, 1999.
- NARMS. National Antimicrobial Resistance Monitoring System. Annual Report Enteric bacteria, 2006. Disponível em: <www.cdc.gov/narms/annual/2006/NARMSAnnualReport2006.pdf> Acesso: 02 nov de 2013.
- NASTASI, A.; MAMMINA, C.; CANNOVA, L. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis, Southern Italy, 1990-1998. **Emerging Infectious Disease Journal**. v.6, n.4, p.401-403, 2000.
- NASTASI, A.; MAMMINA, C. Presence of class I integrons in multidrug-resistant, low prevalence *Salmonella* serotypes, Italy. **Emerging Infectious Disease Journal**. v.7, n.3, p. 455-456, 2001.
- NAYZAK, R.; STWART, T.; WANG, R.F; LIN, J.; CERNIGLIA, C.E.; KENNEY, P.B. Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. **International Journal of Food Microbiology**. v. 91, n.1, 2004.
- NIELSEN, E.M.; TORPDAHL, M.; ETHELBERG, S.; HAMMERUM, A.M. Variation in Antimicrobial Resistance in Sporadic and Outbreak-related *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Emerging Infectious Disease Journal**. v.15, n.1, p.101-103, 2009.
- NORDMANN P. Trends in beta-lactam resistance among Enterobacteriaceae. **Clinical Infectious Diseases**. v. 27, n.1, p.100–106, 1998.
- NUNES, A.D. **Influência do uso de aditivos alternativos a antimicrobianos sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte**. 2008. 110p. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2008.

- OIE/WHO. Organization International des Epizooties (World Organization for Animal Health. **Salmonellosis: World Health Organization, and Food and Agriculture Organization of the United Nations. OIE Terrestrial Manual 2010.** Chapter 2.9.9. P.1-19. Disponível em: < http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.09_SALMONELLOSIS.pdf> Acesso: 20 out de 2012.
- OKAMOTO, A.S. **Deteccão dos genes *integron*, *inv A* e *spvC* em *Salmonella* Enteritidis proveniente de material avícola e transferência horizontal do gene *integron* entre Enterobactérias.** 2009. 69p. Dissertação de Doutorado apresentada ao Departamento de Clínica Veterinária, Universidade Estadual Paulista, 2009.
- OLIVEIRA, S.D.; RODENBUSH, C.R.; MICHAEL, G.B.; CARDOSO, M.I.R.; CANAL, C.W.; BRANDELI, A. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different sources. **Brazilian Journal of Microbiology.** v.34, p. 123-124, 2003.
- OLIVEIRA, F.A. **Caracterização por susceptibilidade a antimicrobianos, PCR-Ribotipificação e RAPD de *Salmonella* Enteritidis envolvidas em surtos de doenças veiculadas por alimentos ocorridas no Rio Grande do Sul, nos anos de 2001 e 2002.** 2005. 85 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- OLIVEIRA, S.D.; BESSA, M.C.; SANTOS, L.R.; CARDOSO, M.R.I; BRANDELLI, A.; CANAL, C.W. Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Salmonella* Enteritidis. **Brazilian Journal of Microbiology.** v.38, n.4, p. 720-728, 2007.
- OLIVEIRA, C.F.; FRAZZON, N. L.; FORNO, D.; ALVES, I. A.; HORTA, J. A.; RIEGER, A.; ALVES, S. H. Prevalência das famílias TEM, SHV, CTX-M de Beta-Lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. no hospital universitário de Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.42, n.5, p.556-560, 2009.
- OLIVEIRA, A.P.; SOLA, M.C.; FEISTEL, J.C.; MINAFRA e REZENDE, C.S.; FAYAD, A.R. *Salmonella* sp. e o abate de frangos: pontos críticos de controle. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, **Centro Científico Conhecer**, Goiânia. v.8, n.14; p.865-875, 2012.
- OLSEN, S. J.; BISHOP, R.; BRENNER, F. W.; ROELS, T. H.; BEAN, N.; TAUXE, R. V.; SLUTSKER, L. The Changing Epidemiology of *Salmonella*: Trends in Serotypes Isolates from Human in the States, 1987-1997. **Journal of Infectious Disease.** v.183, p.753-761, 2001.
- ORMAN, B.E.; PIÑEIRO, S.A.; ARDUINO, S.; GALAS, M.; MELANO, R.; CAFFER, M.I.; SORDELLI, D.O.; CENTRÓN, D. Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v.46, n.12, p. 3963- 3970, 2002.
- OVERDEVEST, I.; WILLEMSSEN, I.; RIJNSBURGER, M.; EUSTACE, A.; XU, L.; HAWKEY, P.; HECK, M.; SVELKOU, P.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; VAN DER ZWALUW, K.; HUIJSDENS, X.; KLUYTMANS, J. Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, the Netherlands. **Emerging Infectious Disease Journal.** v.17 n.7. p. 1216-1222, 2011.

- PAIVA, J.B.; CAVALINI, J.S.; SILVA, M.D.; ALMEIDA, M.A.; ANGELA, H.L.; BERCHIERI JUNIOR, A. Molecular differentiation of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum by RFLP of *fliC* gene from Brazilian isolates. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.11, n.4, p. 271 – 276, 2009.
- PALERMO NETO, J.; ALMEIDA, R.T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. P. 640-658.
- PARK, C. H.; ROBICSEK, A.; JACOBY, G.A.; SAHM, D.; HOOPER, D.C. Prevalence in the United States of *aac(6')*-Ib-cr Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 11. p. 3953–3955, 2006.
- PEIRANO, G.; AGERSØ, Y.; AARESTRUP, F.M.; DOS REIS, E.M.; RODRIGUES, D.P. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brasil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.58, n. 2, p. 305-309, 2006.
- PEREIRA, C.S.; ALMEIDA, M.T.N.; FESTIVO, M.L.; COSTA, R.G.; REIS, E.M.F.; RODRIGUES, D.P. *Salmonella* Hadar phage types isolated from different sources of foodchain in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38 n.4, p. 620-623, 2007a.
- PEREIRA, C.S.; MEDEIROS, L.M.; COSTA, R.G.; FESTIVO, M.L.; REIS, E.M.F.; SEKI, L.M.; RODRIGUES, D.P. Phage Typing and Multidrug Resistance Profile in *S. Typhimurium* Isolated from Different Sources in Brazil from 1999 to 2004. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, n.2, p. 385-390, 2007b.
- PERESI, J. T.M.; ALMEIDA, I.; A.; Z.; C.; LIMA, S.I.; MARQUES, D.F.; RODRIGUES, E.C.A.; FERNANDES, S.A.; GELLI, D.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 32, p. 1-13, 1998.
- PIRES, D.S.L.; PACHECO, M.S.; ROLLINS, M.B.Q.; SANTANA, A.L.; MOURÃO, A.P.B.L. Pesquisa de *Salmonella* spp. e coliformes termotolerantes em carcaças de frangos in natura, comercializados no distrito sanitário da cidade de Recife – PE. **Medicina Veterinária**. Recife, v.3, p.31-36, 2009.
- PITOUT, J. D.; WEI, Y.; CHURCH, D. L.; GREGSON, D. B. Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of *aac(6')*-Ib-cr. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 61 n.5, p.999-1002, 2008.
- POPPE, C. *Salmonella* infections in the domestic fowl, in: *Salmonella in Domestic Animals* (C. Wray and A. Wray eds), pp 107-132, UK: CABI Publishing, 2000.
- QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; CISALPINO, E.O.; PENA, F.J. Frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica em crianças com diarreia aguda e em controles, em Belo Horizonte. **Revista de Microbiologia**. v.16.; p.95-100, 1985.

- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Família *Enterobacteriaceae*. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 18, p. 115-130.
- QUINTAES, B. ; LEAL, N.C.; REIS, E.M.F.; FONSECA, E.L.; HOFER, E. Conventional And Molecular Typing Of *Salmonella* typhi Strains From Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.44, p.315-319, 2002.
- RABSCH, W.; HARGIS, B. M.; TSOLIS, R. M.; KINGSLEY, R. A.; HINZ, K. H.; TSCHÄPE, H.; BÄUMLER, A. J. Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* by *Salmonella gallinarum* in poultry. **Emerging Infectious Disease Journal**. v.6, p.443–448, 2000.
- RALL, V. L. M.; MARTIN, J. G. P.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; SILVA, M. G.; RALL, R.; ARAÚJO JUNIOR, J.P. Pesquisa de *Salmonella* e das condições sanitárias em frangos e linguças comercializados na cidade de Botucatu. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 46, n. 3, p. 167-174, 2009.
- RECCHIA, G. D., STOKES, H. W., HALL, R. M. Characterization of specific and secondary recombination sites recognized by the integron DNA integrase. **Nucleic Acids Research**. v.22, p.2071-2078, 1994.
- REIS, E.M.F. **Análise de marcadores epidemiológicos de *Salmonella Enteritidis* oriundos de diferentes fontes de infecção e de regiões do país**. 1994. 84p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, 1994.
- REIS, E.M.F.; RODRIGUES, D. P.; ALMEIDA, A.C. F.; HOFER, E. Prevalence of R-type ACSSuT in strains of *Salmonella* serovar Typhimurium DT 193 isolated from human infections in Brazil. **Pan American Journal of Public Health**. v.29. p.387-392, 2011.
- REITER, M.G.; FIORESE, M.L.; MORETTO, G. , LÓPEZ, M.C.; JORDANO, R. Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**. v.70, p.1723-1725, 2007.
- REZENDE, C. S. M.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; LINHARES, G. F. C.; MESQUITA, A. Q.; MINAFRA, C. S. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa. v. 100, p. 199-203, 2005.
- RIANO, I.; MORENO, M.A.; TESHAGER, T.; SAENZ, Y.; DOMINGUEZ, L.; TORRES, C. Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 58, p.844–847, 2006.
- RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; FITTÉL, A. P.; NASCIMENTO, V.P.L. Resistência Antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Hadar isoladas de carcaças de frango. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**. v.73, p.357-360, 2006.

- RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolated. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, p.296-299, 2007.
- RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.5, p.1259-1262, 2008.
- ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; SAHM, D.F.; JACOBY, G.A.; D. C. HOOPER, D.C. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.50, p.2872-2874, 2006.
- RODRIGUES, D.P.; REIS, E.M.F.; ARAUJO, M.S.; MARQUES, G.C.M.; GOMES, E.D.T.; SANTOS, A.F.M; SILVA, E.O.; SILVA, G.A.; COSTA, R.G.; FESTIVO, M.L.. PEREIRA, C.S; LAZARO, N.S.; BERTO, L.H. Laboratory based surveillance of *Salmonella* spp. isolated in Brazil from 2000-2009 National Reference Laboratory for Enteric Disease – Oswaldo Cruz Institute-FIOCRUZ. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM *SALMONELLA* AND SALMONELLOSIS, Saint Malo, France, Proceedings. 2010.p. 377-378.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; CANO, M.E.; VELASCO, C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. **Journal of infection and Chemotherapy**. v. 17, n.2, p. 149-182, 2011.
- ROSEN, G. D. Antibacterial in poultry and pig nutrition. In: WALLACE, R. J.; CHESSON, A. (eds). **Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding**. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft. p. 143-172, 1995.
- SALLES, M.A.; SILVA, P.K.S.; FONSECA, V.R.S.; CARNEIRO, A.L.; BRANCO, F.R.; SILVA, P.L.; ALVES, N.F.; CUNHA, A.P. Pesquisa de *Salmonella* sp através de provas de triagem rápida e convencional, em carcaças de frangos abatidos no município de Uberlândia, MG. **Higiene Alimentar**. v.16, n.92/93, p.36-40, 2002.
- SALYERS, A.; GUPTA, A.; WANG, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. **Trends in Microbiology**. v.12, p.412–416, 2004.
- SALYERS, A.; SHOEMAKER, N. B. Reservoirs of antibiotic resistance genes. **Animal Biotechnology**. v.17, p.137–146, 2006.
- SANDIUMENGE, A.; DIAZ, E.; RODRIGUEZ, A.; VIDAUR, L.; CANADELL, L.; OLONA, M.; RUE, M.; RELLO, J. Impacto f diversity of antibiotic use on the development of antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.57, n.6, p.1197-1204, 2006.
- SANTANA, E.S; OLIVEIRA, F.H.; BARNABÉ, A.C.S.; MENDES, F.R.; ANDRADE, M.A. Uso de Antibióticos e quimioterápicos na avicultura. . ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, **Centro Científico Conhecer**, Goiânia. v.8, n.14; p.865-875, 2011.
- SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, S.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília. v. 20, p. 39-42, 2000.

- SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; FLORES, M. L.; ROSEK H.; D'ANDREA A.; ALBUQUERQUE M.C.; RAMPANELLI Y.; MACHADO N.P.; RIOS S.; FERNANDES S.A. *Salmonella Enteritidis* isoladas de amostras clinicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**. v. 16, p. 93-99, 2002.
- SANTOS, R. S. Padronização da RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) para caracterização molecular de *Salmonella Enteritidis*. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**. v. 10, p. 72 - 86, 2004.
- SANTOS, L.R.; RIBEIRO, A.R.; OLIVEIRA, S.D.; RODRIGUES, L.B.; FLORES, M.L.; LOPES, R.F.F.; NASCIMENTO, V.P. RAPD/PCR and phage typing of *Salmonella Enteritidis* isolated from poultry and food poisoning outbreaks. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**. v.75, n.1, p.91-94, 2008.
- SASAKI, Y.; IKEDA, A.; ISHIKAWA, K.; MURAKAMI, M.; KUSUKAWA, M.; ASAI, T.; YAMADA, Y. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in Japanese broiler flocks. **Epidemiology and Infection**. v.40, p.2074-2081, 2012.
- SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M. Patógenos emergentes relacionados à contaminação de alimentos de origem animal. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**. v.64, p.123–127, 2002.
- SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary Research**. v.32, p. 201-225, 2001.
- SHAHADA, F.; SUGIYAMA, H.; CHUMA, T.; SUEYOSHI, M.; OKAMOTO, K. Genetic analysis of multi-drug resistance and the clonal dissemination of beta-lactam resistance in *Salmonella* Infantis isolated from broilers. **Veterinary Microbiology**. v. 140, p. 136-144, 2010.
- SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis in poultry: retrospective in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v. 4, p. 85-100, 2002.
- SILVA E. N.; SAVANO, D. O *Salmonella enteritidis* em aves e Saúde Pública. **Higiene Alimentar**. v.9, p.7-12, 2002.
- SILVA, J.A.; AZERÊDO, G.A.; BARROS, C.M.R. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. **Higiene Alimentar**. v. 16, n. 100, p. 97-101, 2002.
- SILVA, M.C.D.; RAMALHO, L.S.; FIGUEREDO, E.T. *Salmonella* spp. em ovos e carcaças de frangos “in natura” comercializados em Maceió AL. **Higiene Alimentar**. v.18, p.80-84, 2004.
- SILVA, K. C., LINCOPAN, N.E. Dissemination of CTX-M-2-type extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella* spp. in poultry farms in Brazil. In: 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50, Boston, EUA. Anais: divulgação digital, C2 687, Boston: ICAAC, 2010.
- SILVA, K.C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das beta-lactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.48, n.2, p.91-99, 2012.

- SOLARI, C.A.; REIS, E.M.; DIAS, J.C.; HOFER, E. Resistência antimicrobiana de *Salmonella agona* oriundas de várias regiões do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 81, p. 7-14, 1986.
- SOUZA, R.B.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. **Ciências Agrárias**, Londrina. v. 31, p. 413-428, 2010.
- SPRICIGO, D.A.; MATSUMOTO, S.R.; ESPINDOLA, M.L.; VAZ, E.K.; FERRAZ, S.M. Prevalência e perfil de resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguças suínas tipo frescal em Lages, SC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.2, p.517-520, 2008.
- STOKES, H. W., HALL, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons, **Molecular Microbiology**. v.3, p.1669-1683, 1989.
- STOKSTAD, E.L.R.; JUKES, T.H. Further observations on the “animal protein factor”. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 73, p. 523- 528, 1950.
- STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C.; ROBICSEK, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 22, n.4, p. 664-689, 2009.
- SUBBIAH, M.; SHAH, D.H.; BESSER, T.E.; ULLMAN, J.L.; CALL, D.R. Urine from Treated Cattle Drives Selection for Cephalosporin Resistant *Escherichia coli* in Soil. **PLOS One**, 2012. Disponível em < <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0048919> > Acesso: 15 fev de 2012.
- SUNDE, M.; NORSTRÖM, M. The prevalence of associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.58, n.4, p. 741-747, 2006.
- SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE). **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp.** Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolpho Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 60p.
- SWAMINATHAN, B.; MATAR, G.M. Molecular typing methods. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER. F.C.; WHITE, T.J. **Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications**. Washington, D.C., ASM Press, 1993. p.26-50.
- TALAMINI, D.J.D.; MARTINS, F.M.; NOVAES, M. Embrapa: produção de mercado nacional e internacional do frango. **Avicultura Industrial**, Porto Feliz. v.97, p.20-25, 2005.
- TASSIOUS, P.T.; MARKOGIANNAKIS, A.; VATAPOULOS, A.C.; KATSANIKOU, E.; VELONAKIS, E.N.; KOREA-KREMASTINOY, J.; LEGARKIS, N.J. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis during a 7-year period in Greece. **Journal of Clinical Microbiology**. v.35, n.6, p.1316-1321, 1997.

- TAVARES, L.P.; RIBEIRO, K.C.S. Desenvolvimento da Avicultura de Corte Brasileira e Perspectiva frente à Influenza Aviária. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras. v. 9, p.79-88, 2007.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 18, p. 426-439, 1997.
- TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M. Prevalência de *Salmonella* Enteritidis em carcaças de frango industrialmente processadas. **Higiene Alimentar**. v.17, p.52-55, 2003.
- TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; KANASHIRO, A.M.; STOPPA, G.F.Z.; LUCIANO, R.L.; CASTRO, A.G.M. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**. v. 38, p. 2557-2560, 2008.
- THAI, T.H.; HIRAI, T.; LAN, N.T.; YAMAGUCHI, R. Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serovars isolated from retail pork and chicken meat in North Vietnam. **International Journal of Food Microbiology**. v. 156, p.147-151, 2012.
- THONG, K.L.; MODARRESSI, S. Antimicrobial resistant genes associated with *Salmonella* from retail meats and street foods. **Food Research International**. v. 44, p. 2641-2646, 2011.
- THREFALL, E.J.B.; ROWE, J.A.; SKINNER, J.; WARD, L.R. Increase in multiple antibiotic resistance in non-typhoidal *Salmonella* from humans in England and Wales: A comparison of data for 1994 and 1996. **Microbial Drug Resistance**. v.3, p.263-266, 1997.
- THREFALL, E. J.; SKINNER, J. A.; GRAHAM, A.; WARD, L. R.; SMITH, H. R. Resistance to ceftriaxone and cefotaxime in non-typhoidal *Salmonella enterica* in England and Wales, 1998–99. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 46, p.860–862, 2000.
- THREFALL, E.J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. **FEMS Microbiology Reviews**. v.26, p.141-148, 2002.
- TIBAIJUKA, B.; MOLLA, B.; HILDEBRANDT, G.; KLEER, J. Occurrence of Salmonellae in retail raw chicken products in Ethiopia. **Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift**. v.116, n.1-2, p.55-58, 2003.
- TIROLI, I.C.C.; COSTA, C.A. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém-abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. **Acta Amazônica**, Manaus. v.36, p. 205-208, 2006.
- TORPDAHL, M.; HAMMENUM, A.M.; ZACHARIASEN, C.; NIELSEN, E.M. Detection of *qnr* genes in *Salmonella* isolated from humans in Denmark. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.63. n.2, p. 406-408, 2008.

- UBABEF – UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. Relatório anual 2012. Disponível em < <http://www.abef.com.br/uba/exibenoticiauba.php?notcodigo=2041> > Acesso: 22 nov de 2012.
- VAN DUIJKEREN, E.; WANNET, W.J.B.; HOUWERS, D.J.; VAN PELT, W. Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p.3980-3985, 2002.
- VAZ, C.S.L.; STRECK, A. F.; MICHAEL, G.B.; MARKS, F.S.; RODRIGUES, D.P.; DOS REIS, E.M.; CARDOSO, M.R.; CANAL, C.W. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecie *enterica* serovar Enteritidis from human outbreaks and poultry in southern Brazil. **Poultry Science**.v.89, p. 1530-1536, 2010.
- VELDMAN, K.; WILFRID, V.P.; MEVIUS, D. First report of *qnr* genes in *Salmonella* in **The Netherlands Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 61, p. 452–463, 2008.
- VELDMAN, K.; CAVACO, L.M.; MEVIUS, D.; BATTISTI, A.; FRANCO, A.; BOTTELDOORN, N.; BRUNEAU, M.; PERRIN-GUYOMARD, A.; CERNY, T.; DE FRUTOS ESCOBAR, C.; GUERRA, B.; SCHROETER, A.; GUTIERREZ, M.; HOPKINS, K.; MYLLYNIEMI, A.L.; SUNDE, M.; WASYL, D.; AARESTRUP, F. M. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66, n.6, p. 1278-1286, 2011.
- VELGE, P.; CLOECKAERT A.; BARROW, P. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Veterinary Research**. v. 36, p. 267-288, 2005.
- VERDET, C., ARLET, G., BARNAUD, G., LAGRANGE, P.H., PHILIPPON, A. A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the *bla*(DHA1) gene and its regulator gene *ampR*, originated from *Morganella morganii*, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.44, p. 222-225, 2000.
- VESSONI, C.L.Z. **Resistência a antimicrobianos em cepas de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp isoladas de carcaças de frango**, 2004. p. 146, Dissertação de Mestrado, UNICAMP, 2004.
- WAIBEL, P.E.; HALVORSON, J.C.; NOLL, S.L.; HOFFBECK, S.L. Influence of virginimycin on growth and efficiency of large white turkeys. **Poultry Science**. v.70, p.837-847, 1991.
- WALKER, R.A.; LINDSAY, E.; WOODWARD, M.J.; WARD, L.R. Variation in clonality and antibiotic-resistance genes among multi-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage-type U302 (MR U302) from humans, animals, and foods. **Microbiology Research**. v.7, p.13–21, 2001.

- WEBSTER P. The perils of poultry. **Canadian Medical Association Journal** (CMAJ). v. 181, n. 1-2, p. 21-24, 2009.
- WEILL, F.X.; LAILLER, R.; PRAUD, K.; KEROUANTON, A.; FABRE, L.; BRISABOIS, A.; GRIMONT, P.A.; CLOECKAERT, A. Emergence of extended-spectrum- β -lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, p. 5767–5773, 2004.
- WHITE, P.A.; MCIVER, C.J.; RAWLINSON, W.D. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, n.9. p.2658-2661, 2001.
- WHITE, D.G.; FEDORKA-CRAY, P.; CHILLER, T.C.. The National Antimicrobial Monitoring System (NARMS). NMC Annual Meeting Proceedings, Florida p.6-60, 2006.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION Critically important antibacterial agents for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to nonhuman use. Report of the second WHO Expert Meeting, Copenhagen, 29–31, 2007. Geneva: WHO, 2007. Disponível em <http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf. > Acesso: 22 dez de 2012.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION *Salmonella*. Health Topics, 2012. Disponível em <<http://www.who.int/topics/salmonella/en> > Acesso: 28 jan de 2013.
- WINOKUR, P. L.; BRUEGGEMANN, A.; DESALVO, D. L.; HOFFMANN, L.; APLEY, M. D.; UHLENHOPP, E. K.; PFALLER, M. A.; DOERN, G. V. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.44, p. 2777–2783, 2000.
- XIONG, Z. Z.; WANG, P.P.; YANYAN, Y.W.; WANG, H.H.; CAO, H.H.; HUANG, H.; LI, J.U. Investigation of *qnr* and *aac(6)-Ib-cr* in *Enterobacter cloacae* isolates from Anhui Province, China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 62, n. 4, p. 457-459, 2008.
- YIM, G.; WANG, H.H.; DAVIES, J. The truth about antibiotics. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 296, n.2-3, p. 163-170. Apr, 2006.
- YU, C.Y.; CHU, C.; CHOU, S.J.; CHAO, M.R.; YEH, C.M.; LO, D.Y.; SU, Y.C.; HORNG, Y.M.; WENG, B.C.; TSAY, J.G.; HUANG, K.C. Comparison of the association of age with the infection of *Salmonella* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Pekin ducks and Roman geese. **Poultry Science**. v. 87, p.1544-1549, 2008.
- ZEIDLER G. Who's afraid of the *Salmonella* wolf? *World Poultry* 1996; Supl. 4-9.
- ZHAO, S.; WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F.; FRIEDMAN, S.; INGLÊS, L.; AYERS, S.; MENG, J.; MAURES, J.J.; HOLLAND, R.; WLAKER, R.D. Identification and Expression of Cephamycinase *bla*_{CMY} Genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* Isolates from Food Animals and Ground Meat. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, n.12, p. 3647-3650, 2001.

- ZIOGA, A.; WHICHARD, J. M.; JOYCE, K. J.; TZELEPI, E.; TZOUVELEKIS, L. S.; MIRIAGOU, V. Evidence for chromosomal and plasmid location of CMY-2 cephalosporinase gene in *Salmonella* serotype Typhimurium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 61, p. 1389–1399, 2008.