

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

João Paulo Fernandes Ferreira Moreira

**PERFIS MOLECULARES E DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE
ISOLADOS DE *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Minnesota
PROVENIENTES DE GRANJAS DE FRANGOS DE CORTE E DE HUMANOS DE
DIFERENTES ESTADOS BRASILEIROS**

Belo Horizonte

2021

João Paulo Fernandes Ferreira Moreira

**PERFIS MOLECULARES E DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE
ISOLADOS DE *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Minnesota
PROVENIENTES DE GRANJAS DE FRANGOS DE CORTE E DE HUMANOS DE
DIFERENTES ESTADOS BRASILEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Oliveiro Caetano de Freitas Neto

Belo Horizonte

2021

M838p Moreira, João Paulo Fernandes Ferreira, 1991 -
Perfis Moleculares e de resistência antimicrobiana de isolados de *Salmonella entérica* sub *Entérica sorovar mimesota* provenientes de granjas de frangos de corte e humanos de diferentes Estados Brasileiros/ João Paulo Fernandes Ferreira Moreira, -2021.

51 f.il.

Orientador: Oliveiro Caetano de Freitas Neto
Dissertação (Mestrado) Apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Ciência Animal.

Bibliografia: f:42 - 51.

1. Frangos- Teses – 2. Salmonella -Teses - 3. Genética – Teses – I. Neto, Oliveiro Caetano de Freitas – II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOÃO PAULO FERNANDES FERREIRA MOREIRA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 25 de março de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Oliveiro Caetano de Freitas Neto - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Nelson Rodrigo da Silva Martins

Dr.(a). Daniel Farias Marinho do Monte



Documento assinado eletronicamente por **Oliveiro Caetano de Freitas Neto, Professor do Magistério Superior**, em 25/03/2021, às 15:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nelson Rodrigo da Silva Martins, Professor do Magistério Superior**, em 25/03/2021, às 23:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Farias Marinho do Monte, Usuário Externo**, em 26/03/2021, às 08:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0618391** e o código CRC **98A5FB91**.

*Dedico este trabalho a Deus, à minha esposa
Camila, aos meus pais João e Izabel, aos meus
irmãos Rodrigo e Letícia, aos meus familiares
e amigos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus.

Ao Professor Oliveira Caetano de Freitas Neto, pela orientação, apoio e conhecimentos transmitidos.

À Banca examinadora pela presença e sugestões ao trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela oportunidade de realização desse trabalho.

Ao TECSA Laboratórios, em especial ao Dr. Afonso Perez, Dr. Luiz Ristow e Dr. Otávio Valério pelo suporte.

Ao setor de bacteriologia da Fiocruz-RJ, pelo auxílio prestado.

“A persistência é o menor caminho do êxito”
(Charles Chaplin)

RESUMO

A criação de frangos de corte vem se expandindo ao longo de muitas décadas, sendo uma atividade de grande relevância para a economia brasileira. *Salmonella* Minnesota (SM) tem sido apontada como um dos sorovares emergentes na cadeia produtiva de frangos de corte no Brasil, reforçando a necessidade de mais estudos de sua biologia e evolução, tendo em vista sua participação em eventos sanitários e da evolução de resistência aos antimicrobianos. No presente estudo foram analisados os perfis genéticos por meio da técnica de gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE) em 13 isolados de SM provenientes cadeia produtiva de frangos de corte coletados nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo, bem como em cinco recuperados de casos de infecção alimentar em humanos nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Outros 25 isolados de SM de origem avícola foram avaliados quanto à susceptibilidade a antimicrobianos pelo método de Kirby-Bauer. A análise de PFGE das 18 estirpes de SM originou um dendrograma que permitiu agrupar isolados em quatro clusters com 83-90% de similaridade. Dentre os quais, o cluster “A” agrupou a maioria dos isolados (13), incluindo duas amostras de origem humana que apresentaram 90% de similaridade com uma amostra isolada de frango, ambas coletadas em Minas Gerais. As estirpes de SM apresentaram resistência à tetraciclina (88%), cefoxitina (88%), ceftazidima (56%), ácido nalidíxico (28%), ciprofloxacina (16%) e estreptomicina (8%). Isso traz preocupações, uma vez que cefalosporinas de 3ª geração e fluoroquinolonas são drogas de escolhas para tratamento de infecções em humanos. Não foi observada resistência à gentamicina, cloranfenicol, meropenem, nitrofurantoína e sulfametoxazol-trimetoprim. Entretanto, 28% das amostras avaliadas apresentaram perfis de multirresistência, todas pertencentes ao Estado de Minas Gerais. Os resultados encontrados ressaltam a importância de mais estudos envolvendo SM, uma vez que esse sorovar, que atualmente circula na cadeia produtiva de frango de corte do Brasil, pode provocar infecção alimentar em humanos. Destaca-se ainda que os perfis de multirresistência antimicrobiana encontrados nos isolados analisados reforçam ainda mais a preocupação e os riscos que SM oferece para a saúde pública.

Palavras-chave: salmonelose; PFGE; multirresistência; infecção alimentar; saúde pública.

ABSTRACT

The broiler industry has been expanding over several decades in Brazil, being a highly important economic activity in the country. *Salmonella* Minnesota (SM) has been identified as one of the emerging serovars in the broiler production chain in Brazil, reinforcing the need of further studies of its biology and evolution, in view of its participation in animal infections, including human, and the evolution of resistance to antimicrobials. In the present study, genetic profiles were analyzed using the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) technique in 13 isolates obtained from the broiler industry collected in the states of Minas Gerais, São Paulo and Espírito Santo, as well as five recovered from cases of food borne infection in humans in the states of Minas Gerais, Santa Catarina and Rio Grande do Sul. Additionally, 25 isolates of SM from poultry origin were evaluated for susceptibility to antimicrobials by the Kirby-Bauer method. The PFGE analysis of 18 strains of SM generated a dendrogram that grouped the isolates with 83-90% similarity into four main clusters. Among them, cluster “A” grouped the majority of isolates (13), including two isolated of human origin that showed 90% similarity with a broiler isolate, both collected in Minas Gerais. Strains of SM showed resistance to tetracycline (88%), cefoxitin (88%), ceftazidime (56%), nalidixic acid (28%), ciprofloxacin (16%) and streptomycin (8%). This raises concerns, since 3rd generation cephalosporins and fluoroquinolones are drugs of choice for treating infections in humans. No resistance to gentamicin, chloramphenicol, meropenem, nitrofurantoin and sulfamethoxazole-trimethoprim was found. Moreover, 28% of the evaluated isolates presented multi-resistance profile, all belonging to the State of Minas Gerais. The results highlight the importance of further studies involving MS, since this serovar, which is currently spreading in the Brazilian broiler industry, could potentially provoke food borne infection in humans. It is also noteworthy that the multi-resistance antimicrobial profiles found reinforce the concern and risks that SM offers to public health.

Keywords: salmonellosis; PFGE; multiresistance; food borne infection; public health.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Número atual de sorovares em cada espécie e subespécie de <i>Salmonella</i> ...	19
Tabela 02 -	Alteração percentual entre os 20 sorovares de <i>Salmonella</i> mais frequentemente relatados nos Estados Unidos, comparando 2006 e 2016..	27
Tabela 03 -	Fontes de coleta, local e ano de isolamento das 30 amostras de SM analisadas.....	33
Tabela 04 -	Informações sobre os antimicrobianos utilizados (nome, classe e sigla)....	34
Tabela 05 -	Fenótipo de resistência das 25 estirpes avaliadas de SM oriundas de amostras de fezes de frangos de corte.....	35
Tabela 06 -	Perfis de resistência de 25 estirpes de SM isoladas de fezes de frangos de corte.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Participação percentual de estados brasileiros em relação ao total de produção de frangos de corte em 2019.....	16
Figura 02 -	Etapas das sequências de operações em frangos de corte.....	17
Figura 03 -	Percentual de resistência a antimicrobianos em estirpes de SM isoladas de fezes de frango de corte.....	36
Figura 04 -	Dendrograma dos padrões de PFGE de estirpes de SM obtidas a partir de amostras de fezes de frangos de corte e de urina/fezes humanas coletadas em diferentes estados brasileiros. Método de clusterização UPGMA, similaridade baseada no coeficiente de Dice (%), otimização e tolerância definidas a 1,5%.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPP	Boas práticas de produção
CAZ	Ceftazidima
CDC	<i>Center for Disease Prevention and Control</i>
CHL	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CYP	Ciprofloxacina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GEN	Gentamicina
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FOX	Cefoxitina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEM	Meropenem
NAL	Ácido Nalidíxico
NIT	Nitrofurantoína
OECD	<i>Organisation for Economic Co-Operation and Development</i>
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
RASFF	Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
SE	<i>Salmonella</i> Enteritidis
SG	<i>Salmonella</i> Gallinarum
SH	<i>Salmonella</i> Heidelberg
SI	<i>Salmonella</i> Infantis
SM	<i>Salmonella</i> Minnesota
SP	<i>Salmonella</i> Pullorum
SPI	Ilha de patogenicidade de salmonelas
SS	<i>Salmonella</i> Senftenberg
ST	<i>Salmonella</i> Typhimurium
STR	Estreptomicina
SXT	Sulfametoxazol-Trimetoprim
TCY	Tetraciclina
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages</i>
USDA	United States Department of Agriculture

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1. Produção de frangos de corte.....	15
3.2. Taxonomia do gênero <i>Salmonella</i>	18
3.3. Epidemiologia.....	19
3.4. Transmissão	20
3.5. Controle	21
3.6. <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorovar Minnesota: fontes, características genotípicas e fenotípicas.....	22
3.7. Importância em saúde pública	25
3.8. Resistência antimicrobiana em <i>Salmonella</i> spp.	27
3.9. Caracterização molecular por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Amostras.....	32
4.2. Testes de susceptibilidade a antimicrobianos.....	33
4.3. Perfis moleculares por meio da técnica de gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE)	34
4.4. Análise dos resultados	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Resistência a antimicrobianos	35
5.2. Perfil genético.....	39
6. CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

A avicultura é uma atividade econômica de grande relevância para o Brasil. Atualmente, o país ocupa a posição de maior exportador e terceiro maior produtor de frangos de corte no ranking mundial (USDA, 2020). No entanto, questões sanitárias inerentes à qualidade da carne de frango podem prejudicar a comercialização e ainda oferecer risco a saúde dos consumidores. Desta forma, medidas de controle, monitoramento e redução de alguns patógenos, incluindo *Salmonella* spp., devem ser adotadas nos sistemas de produção de frango de corte (FERRARI et al., 2019; SANTOS et al., 2013; ANDREATTI FILHO et al., 2009).

As salmonelas são um grupo complexo da família *Enterobacteriaceae*, compreendendo atualmente 2.659 sorovares (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Essas bactérias são capazes de causar infecções em seres humanos e animais, sendo frequentemente envolvidas em surtos de infecções alimentares em diversos países, sendo, portanto, um relevante problema de saúde pública (BARBOSA, 2020; ASSIS et al., 2017; SHINOHARA et al., 2008). Infecções por *Salmonella* spp. representam a terceira principal causa de morte humana entre as doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo (FERRARI et al., 2019). Os animais de produção são as principais fontes de infecção e os alimentos de origem avícola estão entre os principais veiculadores para os humanos (KUMAR et al., 2019; BORGES et al., 2017; MESQUITA, 2016; MENDONÇA, 2011).

Nos Estados Unidos, os custos estimados da alta incidência da infecção por salmonelas em humanos podem atingir até 4 bilhões de dólares por ano em decorrência de despesas médicas, ausência no trabalho e redução na produtividade (MESQUITA, 2016; USDA, 2014). O Brasil, como maior exportador mundial de carne de frango, deve estabelecer medidas de controle sanitário cada vez mais rígidas, evitando assim possíveis prejuízos decorrentes de embargos econômicos impostos por países importadores (SANTOS et al., 2013; SHINOHARA et al., 2008).

De acordo com a nota técnica publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2018), *Salmonella* Heidelberg (SH) e *Salmonella* Minnesota (SM) foram os principais sorovares isolados de carcaças de frango abatidos em frigoríficos brasileiros em 2017, representando respectivamente 56% e 19% das amostras positivas. Além disso, a nota ainda destaca que os sorovares *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Typhimurium (ST), que mundialmente estão mais associados aos surtos e casos graves de salmonelose em humanos, foram identificados em apenas 0,8% e 0,4% das amostras positivas, respectivamente.

Embora existam estudos abordando aspectos da epidemiologia, resistência antimicrobiana e genômica de SH de amostras oriundas da produção de frangos ou naquelas recuperadas de surtos de infecção alimentar em humanos (ETTER et al., 2019; BEARSON et al., 2017; GIERALTOWSKI et al., 2016), pouco se tem investigado em relação a isolados de SM. Apesar de ser considerado de menor relevância em saúde pública (BARROS; LIMA; STELLA, 2020; SHINOHARA et al., 2008), SM possui plasticidade genética que confere capacidade de provocar infecção em hospedeiros (MELO et al., 2020; RESENDE, 2015). Aliado a isso, pode atuar na troca de genes de resistência antimicrobiana com outras enterobactérias, contribuindo para o agravamento desse problema no ambiente de produção de aves (MOREIRA et al., 2013; MIRIAGO; CARATTOLI; FANNING, 2006; BRABBAN; HITE; CALLAWAY, 2005; MATIC; RAYSSIGUIER; RADMAN, 1995).

Considerando a relevância de *Salmonella* spp. para a saúde pública e veterinária e que produtos de origem avícola, incluindo a carne de frango, estão entre os principais veiculadores de *Salmonella* spp. para população humana (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020; FERRARI et al., 2019; MESQUITA, 2016; VOSS-RECH et al., 2015; MENDONÇA, 2011), elaborou-se o presente estudo, onde realizou-se avaliações dos perfis moleculares e de resistência antimicrobiana de

isolados de SM recuperados da cadeia produtiva de frangos de corte e também de casos de infecção alimentar em humanos, com intuito de estabelecer relações filogenéticas entre estes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Investigar as relações filogenéticas entre isolados de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Minnesota (SM) recuperados da cadeia produtiva de frangos de corte da região sudeste e aqueles recuperados de infecções em humanos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar e comparar os perfis moleculares dos isolados de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Minnesota por meio de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).
- Determinar os perfis de resistência antimicrobiana dos isolados por meio de teste de disco-difusão.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Produção de frangos de corte

A cadeia produtiva de frangos de corte se destaca economicamente em todo o mundo pela competitividade, dinamismo e constante desenvolvimento tecnológico (RODRIGUES; FRAINER; EDUARDO, 2020). Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2020), em 2020 a carne de frango foi a mais produzida e consumida do mundo, com valores de respectivamente 100,4 e 98,3 milhões de toneladas, evidenciando a importância do setor. Além disso, segundo relatório da OECD-FAO (Organisation for Economic Co-Operation and Development - Food and Agriculture Organization of The United Nations), que apresenta projeções agrícolas para 2020-2029, a produção de carnes irá expandir cerca de 40 milhões de toneladas até 2029, sendo que a carne de aves será a principal responsável por esse aumento. O relatório aponta ainda que Brasil, China, União Europeia e Estados Unidos serão responsáveis por aproximadamente 60% da produção global de carnes (OECD-FAO, 2020).

Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo (13,8 milhões de toneladas) e o maior exportador (3,7 milhões de toneladas), com participação em cerca de 40% do mercado mundial (USDA, 2020). Esse desempenho é reflexo de um processo de reestruturação industrial e comercial, que foi intensificado a partir dos anos de 1990 no Brasil. Resultado da introdução de inovações e melhorias tecnológicas em relação à genética, nutrição, manejo e sanidade das aves (COSTA; GARCIA; BRENE, 2015). Além disso, o desenvolvimento de pesquisas e da indústria como um todo têm possibilitado a redução de custos e a diversificação dos produtos finais oferecidos ao consumidor (SCHMIDT e SILVA, 2018).

Segundo estatísticas publicadas pela Embrapa (2019), os estados brasileiros com maior representatividade na produção de frangos de corte estão situados nas regiões Sul do país. Em 2019, estado do Paraná liderou a produção no Brasil com 4,3 milhões de toneladas, seguido por Santa Catarina e Rio Grande do Sul, que em 2019, produziram respectivamente 1,9 e 1,6 milhões de toneladas. A participação percentual na produção de carne frango dos principais estados brasileiros produtores em 2019 estão ilustrados na Figura 01.

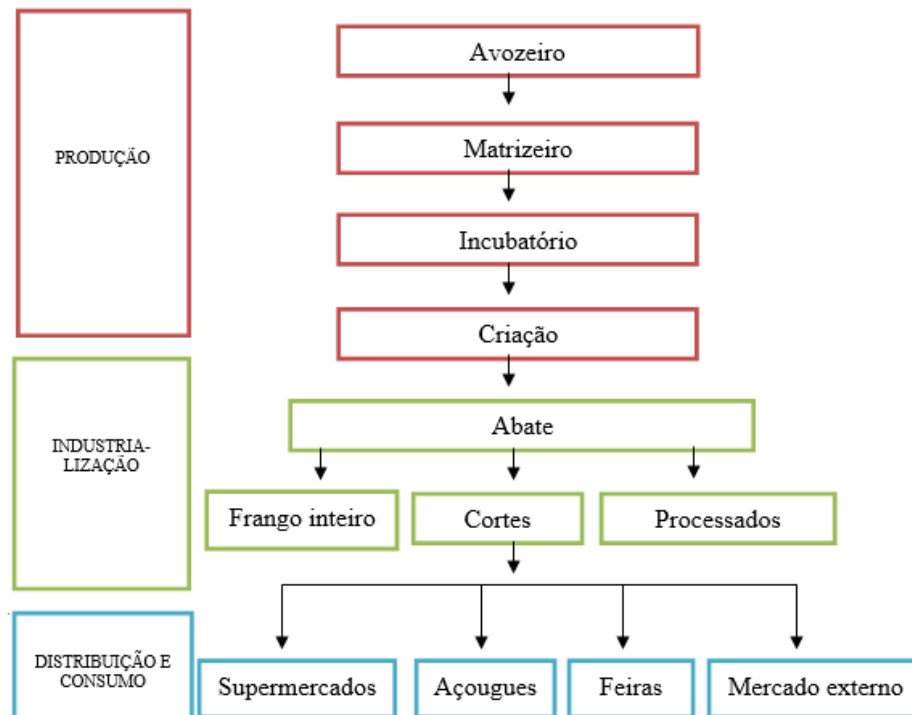
Figura 01: Participação percentual de estados brasileiros em relação ao total de produção de frangos de corte em 2019.



Fonte: Adaptado de Embrapa, 2020.

A avicultura não se limita apenas à produção de carnes, mas em um grande complexo que vai desde o planejamento da produção até a comercialização de diversos produtos finais (SCHMIDT e SILVA, 2018). A cadeia produtiva de frangos propriamente dita é caracterizada por uma sequência de operações que conduzem à produção de bens, sendo dividida em três grandes áreas: a produção de matéria-prima, industrialização e distribuição e consumo (SCHMIDT e SILVA, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2008; VOILA e TRINCHES, 2002). Essas áreas estão representadas no fluxograma da Figura 02.

Figura 02: Etapas das sequências de operações em frangos de corte.



Fonte: Adaptado de Schmidt e Silva, 2018.

Durante o processo de produção, industrialização, distribuição e consumo do produto final, outros setores estão presentes, como os geradores e fornecedores de tecnologia, desenvolvimento genético, equipamentos, rações, insumos, medicamentos, embalagens e transportes, que completam a cadeia produtiva de frangos de corte (SCHMIDT e SILVA, 2018; ARAÚJO et al., 2008).

Para garantir a produtividade e assegurar a segurança alimentar, é importante que normas de biossegurança sejam aplicadas na cadeia produtiva, visando prevenir ou reduzir a presença de patógenos que possam representar risco à produção avícola ou saúde do consumidor (BARROS; LIMA; STELLA, 2020; MESQUITA, 2016; SANTOS et al., 2013; ANDREATTI FILHO et al., 2009).

Dentre os microrganismos patogênicos comumente presentes em granjas, os do gênero *Salmonella* se destacam por sua elevada frequência, importância em saúde pública e por ser responsável por perdas econômicas na produção e comercialização da carne de frango (KUMAR et al., 2019; CUNHA-NETO et al., 2018; MESQUITA, 2016; MENDONÇA, 2011).

Em um sistema de integração, inúmeros fatores contribuem para a presença de *Salmonella*, como a falta de programas de controle e higienização, a contaminação de rações e água de abastecimento, as elevadas densidades populacionais de aves nas criações, a presença de animais portadores do microrganismo e o uso de antibióticos de amplo espectro como promotores de crescimento. Desta forma, o sistema de produção possui importância epidemiológica na disseminação dessas bactérias (SANTOS et al., 2013; MENDONÇA, 2011; ANDREATTI FILHO et al., 2009).]

3.2. Taxonomia do gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo constituído por bactérias Gram-negativas que apresentam morfologia do tipo bastonete (1 a 2 µm). Estes microrganismos podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos e não formam esporos. Podem ser móveis ou não, sendo que a maioria possui flagelos peritríquios que conferem motilidade (BARROS; LIMA; STELLA, 2020; SOUZA, 2019; SANTOS et al., 2013; MENDONÇA, 2011). A maioria é capaz de fermentar glicose e produzir ácidos e gás. Podem fermentar também arabinose, maltose, manitol, manose, rarnose, sorbitol, trealose, xilose e dulcitol. Grande parte das salmonelas de interesse clínico não fermentam lactose, entretanto, algumas estirpes podem adquirir essa característica por meio de transferência plasmidial. São também oxidase negativa, catalase positiva, indol negativo, Voges Proskauer negativo e ureia negativa. Além disso, são capazes de descarboxilar os aminoácidos lisina e ornitina, reduzir nitrato a nitrito e utilizar citrato como única fonte de carbono (KUMAR et al., 2019; BRASIL, 2011; MENDONÇA, 2011).

Em comparação com outros bastonetes Gram-negativos, as salmonelas são relativamente resistentes a vários fatores ambientais e substâncias químicas, apresentando grande adaptabilidade. Os valores ótimos de pH para sua multiplicação são próximos à neutralidade (de 6,5 a 7,5), mas a bactéria pode ser desenvolver nos extremos 3,8 a 9,5 (BRASIL, 2011; MENDONÇA, 2011). Já sua atividade de água (*Aw*) ideal é de 0,995, mas proliferam em valores superiores a 0,94 (BARROS; LIMA; STELLA, 2020; MENDONÇA, 2011).

Salmonelas são bactérias mesófilas, sendo sua temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37°C (extremos entre 5°C e 45°C) e sendo inativada em temperaturas superiores à 70°C (BRASIL, 2011; MENDONÇA, 2011). O crescimento das salmonelas é retardado em baixas temperaturas (MENDONÇA, 2011), de forma que esse microrganismo possui capacidade de resistir ao congelamento e desidratação quando na presença de matéria orgânica, podendo sobreviver no ambiente por longos períodos de tempo (BARROS; LIMA; STELLA, 2020; SOUZA, 2019; BRASIL, 2011; MENDONÇA, 2011). De acordo com Silva et al. (2018), existem registros de salmonelas que resistiram por mais de 28 meses em fezes secas de aves e até 30 meses em fezes bovinas. No ambiente, o microrganismo foi recuperado com 280 dias em solo cultivado e com 120 dias em pastagens. Além disso, amostras de efluentes também comumente apresentam salmonelas, resultante da contaminação fecal.

Segundo Souza (2019), a taxonomia do gênero *Salmonella* é dividida em cinco níveis: gênero, espécie, subespécie, sorovar (ou sorotipo) e biovar. A caracterização dos sorovares pode ser baseada em análises sorológicas dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e por testes bioquímicos complementares (SOUZA, 2019; SANTOS et al., 2013; MENDONÇA, 2011).

Na atualidade, o gênero é subdividido em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *S. enterica* é composta por seis subespécies, *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Baseando-se na classificação mais recente, já foram identificados 2659 sorovares de *Salmonella* spp., dos quais 1586 pertencem à subespécie *enterica*, que inclui cerca de 100 sorovares zoonóticos, sendo os mais comuns em casos de infecção em seres humanos e animais. (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020; FERRARI et al., 2019; SOUZA, 2019; CUNHA-NETO et al., 2018; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). O número atual de sorovares relacionados a cada grupo está descrito na Tabela 01.

Para a descrição desses microrganismos, deve-se colocar em *itálico* ou *sublinhar* os itens referentes ao gênero (primeira letra maiúscula), espécie e subespécie. Por sua vez, os níveis sorovar e biovar são descritos apenas com a primeira letra maiúscula (SOUZA, 2019). Na prática, o nome da subespécie

não precisa ser indicado, de forma que pode-se utilizar, por exemplo, a designação *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium ou apenas *S. Typhimurium* (BRASIL, 2011; MENDONÇA, 2011).

Tabela 01: Número atual de sorovares em cada espécie e subespécie de *Salmonella*.

Gênero	Espécie	Subespécie	Número de sorovares
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	1586
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	522
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>arizonae</i>	102
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>diarizonae</i>	338
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>houtenae</i>	76
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>indica</i>	13
<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>		22
Total			2659

Fonte: Issenhuth-Jeanjean et al., 2014.

3.3. Epidemiologia

Salmonella spp. é um dos microrganismos mais amplamente distribuídos na natureza, sendo os animais e o homem seus principais reservatórios naturais (CARDOSO e TESSARI, 2008). Possuem capacidade de infectar uma grande variedade de animais, podendo assim ser encontrada no trato gastrointestinal de diversos mamíferos, répteis e até mesmo de insetos (MENDONÇA, 2011). Bactérias pertencentes a este gênero constituem os patógenos de origem alimentar mais comuns em todo mundo, sendo as salmoneloses as zoonoses mais difundidas a nível global (BARBOSA, 2020; KUMAR et al., 2019; MONTE et al., 2019; PICLER, 2016).

O fator epidemiológico mais relevante em animais é o estado de portador, onde a falta de sinais e as dificuldades técnicas para sua detecção os convertem em uma fonte contínua de contaminação para meio ambiente e alimentos (BRASIL, 2011). Desta forma, a ampla distribuição de *Salmonella* spp., a existência de portadores assintomáticos e sua permanência no ambiente e em alimentos por longos períodos, contribuem para que esses microrganismos assumam relevância em saúde pública e veterinária a nível mundial (MENDONÇA, 2011; CARDOSO e TESSARI, 2008).

No Brasil, segundo publicação do Ministério da Saúde, entre os anos de 2007 a 2016 foram notificados 6.632 surtos por doenças transmitidas por alimentos, que resultaram em 469.482 expostos, 118.1047 doentes, 17.186 hospitalizações e 109 óbitos. Dentre os agentes envolvidos, 90,5% foram bactérias, 7,1% vírus, 1,7% agentes químicos, 0,7% protozoários e 0,1% fungos. Das bactérias, o gênero *Salmonella* foi a mais frequente, seguido de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2016). Entretanto, destaca-se que a incidência real de toxinfecções alimentares causadas por *Salmonella* spp. no Brasil não é bem estabelecida, uma vez que há muitas subnotificações, principalmente em pequenos surtos, o que dificulta inclusive a quantificação dos gastos reais do sistema de saúde brasileiro (SILVA et al., 2018; RANTHUM, 2002). Segundo Ranthum (2002), o número de casos humanos não informados infectados por *Salmonella* spp. é estimado em mais de 38 vezes o número conhecido.

Entre as salmonelas, os sorovares da subespécie *enterica* são apontados como os mais relevantes para humanos e animais, uma vez que estão envolvidos na grande maioria das infecções (CUNHA-NETO et al., 2018; SILVA et al., 2018; ASSIS et al., 2017; BORGES et al., 2017). O habitat natural desses microrganismos pode ser dividido em três categorias com base na especificidade do hospedeiro e no padrão clínico, podendo ser: altamente adaptadas ao homem; altamente adaptadas aos animais e em sorovares que atingem indiferentemente o homem e os animais, designadas salmonelas zoonóticas

(BRASIL, 2011). Sorovares específicos do hospedeiro normalmente causam infecções caracterizadas por infecções sistêmicas graves, pouca colonização intestinal e mortalidade. Por outro lado, infecções resultantes de sorovares que infectam vários hospedeiros são frequentemente caracterizadas por colonização intestinal intensa, pouca mortalidade, sendo a diarreia o sinal clínico predominante (BARBOSA, 2020).

As infecções humanas mais graves são causadas por *S. Typhi* e *S. Paratyphi* (A, B e C), sorovares adaptados aos seres humanos. Estes não são transmitidos por animais e causam febre tifoide e febre entérica, que podem resultar em septicemia e morte. Os demais sorovares causam salmoneloses, que cursam com quadro de infecção gastrointestinal, geralmente autolimitante, em períodos de 2 a 7 dias. Os sinais e sintomas mais comuns apresentados são diarreia, vômitos febre e dores abdominais (BRASIL, 2018; SILVA et al., 2018; MENDONÇA, 2011).

Quando infectam aves, as salmonelas causam as salmoneloses aviárias, que por sua vez, são divididas em três enfermidades distintas: a pulorose, cujo agente é a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum (SP); o tifo aviário, provocado por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG) e o paratifo aviário, que pode ser causado por outros sorovares (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020; FERRARI et al., 2019; SOUZA, 2019). SP e SG são específicos de aves, por outro lado, os agentes do paratifo aviário (salmonelas paratíficas) não possuem hospedeiros específicos, podendo infectar uma ampla gama de hospedeiros inclusive o homem. Assim, algumas dessas salmonelas podem estar associadas a casos de infecção alimentar humana, estando frequentemente relacionados ao consumo de produtos de origem animal, especialmente os avícolas (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020; SOUZA, 2019; SOUZA, 2019; GIERALTOWSKI et al., 2016; MESQUITA, 2016).

Dos sorovares frequentemente relacionados a doenças em animais e humanos, SE e ST são alguns dos mais relevantes em saúde pública (MONTE et al., 2019; ASSIS et al., 2017; SANTOS et al., 2013; MENDONÇA, 2011; CARDOSO e TESSARI, 2008). Entretanto, existe crescente preocupação com outros sorovares, como SH, *S. Senftenberg* (SS), *S. Infantis* (SI) e SM (BARROS; LIMA; STELLA, 2020; LOURENÇO et al., 2013). No Brasil, entre as salmonelas paratíficas mais isoladas em aves, o sorovar Minnesota tem se destacado pela alta prevalência em amostras de frango (BRASIL, 2018; VOSS-RECH et al., 2015).

3.4. Transmissão

Em aves, a transmissão de *Salmonella* spp. pode ocorrer de diversas formas, sendo a determinação da fonte de infecção ou contaminação muitas vezes complexa. Dependendo do sorovar, as possibilidades de transmissão vertical e horizontal podem ser intensificadas (MENDONÇA, 2011). A pulorose é considerada uma doença de animais jovens, acometendo as aves principalmente nos primeiros dias de vida, sendo a principal via de transmissão a transovariana. A mortalidade e a morbidade são variáveis, podendo atingir 100% do lote (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020). Por sua vez, as manifestações clínicas do tifo aviário, que podem resultar em mortalidade superior a 80%, normalmente são observadas em aves adultas. Sua transmissão é relatada como possível por diversas vias, sendo que, fatores como contato entre ave doente e ave sadia, falta de sanitização, presença de vetores, falhas na biossegurança contribuem para disseminação do agente (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020; MENDONÇA, 2011).

A infecção por salmonelas paratíficas é mais comum em aves jovens, sendo que a morbidade e a mortalidade dependem da intensidade da infecção, do sorovar e da estirpe envolvida. A predominância dos sorovares varia conforme o tipo de ave, região e época do ano (FREITAS NETO; PENHA

FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020; CARDOSO e TESSARI, 2013). As salmonelas paratíficas podem ser transmitidas por via vertical ou horizontal. A transmissão vertical está relacionada à infecção transovariana ou à contaminação do ovo ao passar pela cloaca (região contaminada por fezes), já a transmissão horizontal pode ocorrer de diversas formas, que envolvam a entrada da bactéria pela cavidade oral, cloaca, conjuntiva ocular ou mesmo por inalação (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020).

Por outro lado, a transmissão aos seres humanos se dá pela ingestão de alimentos ou água contaminados por bactérias viáveis (MENDONÇA, 2011). Produtos de origem animal como ovos, carnes de animais (frangos, bovinos, suínos) e leite são os principais veículos de transmissão de *Salmonella* spp. Estes alimentos, por sua vez, podem contaminar os humanos diretamente (quando insuficientemente cozidos ou pasteurizados), ou através de contaminação cruzada (BRASIL, 2018).

Nas últimas décadas o número de surtos causados por *Salmonella* spp. transmitida pelo consumo de vegetais tem aumentado em todo o mundo (ELIAS, NORONHA e TONDO, 2019). A bactéria pode contaminar produtos frescos, o que pode ocorrer tanto durante a produção do vegetal (solo, água, insetos, fezes) quanto diretamente em seu preparo por contaminação cruzada (ELIAS, NORONHA e TONDO, 2019). Além disso, alguns autores têm demonstrado a capacidade do agente em colonizar plantas diversas de forma endofítica (CUI, LIU e CHEN, 2020; MONTANO et al., 2020; KARMAKAR et al., 2018; GUO et al., 2002). Em um experimento com três estirpes distintas de *S. Typhimurium*, Kljujev et al. (2018) observaram que estas demonstraram capacidade de colonizar a superfície e nichos internos da raiz, caule e folha das espécies de plantas investigadas. Vegetais folhosos geralmente são ingeridos crus, de forma que o patógeno permanece ativo, possibilitando sua transmissão (ELIAS, NORONHA e TONDO, 2019). Entretanto, enquanto patógenos que residem na superfície de produtos prontos para o consumo podem ser potencialmente removidos por meio de lavagem, não há tecnologia de desinfecção disponível para a eliminação efetiva de populações bacterianas colonizadoras do meio interno de vegetais (MONTANO et al., 2020).

Em um estudo, realizado por Nadvorny; Figueiredo e Schmidt (2004), foi analisada a ocorrência de surtos de *Salmonella* spp. transmitidas por alimentos ocorridos no Rio Grande do Sul. A salmonelose correspondeu a 74,7% dos surtos confirmados, sendo 72,2% desses associados ao consumo de alimentos preparados com ovos e 11,4% provenientes de frango. Desta forma, observa-se que animais destinados à produção de carne para o consumo humano e produtos de origem animal devem ser rigorosamente monitorados, uma vez que podem albergar tais patógenos e contribuir para sua disseminação (MENDONÇA, 2011; SHINOHARA et al., 2008).

3.5. Controle

Nesse cenário, destaca-se a importância do controle da *Salmonella* spp., uma vez que tanto salmonelas específicas das aves como aquelas não específicas podem prejudicar a comercialização dos produtos de origem avícola no mercado interno e externo, resultando em grandes perdas econômicas, além de oferecerem risco à saúde pública (KUMAR et al., 2019; BRASÃO, 2017; MESQUITA, 2016; SANTOS et al., 2013; MENDONÇA, 2011).

Para assegurar a qualidade e segurança dos alimentos nos processos de produção, diversos programas de segurança alimentar foram elaborados com o objetivo de proporcionar um controle efetivo da produção, armazenamento e distribuição dos produtos (CARDOSO e TESSARI, 2013). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento publicou portarias que seguem o *Codex Alimentarius*, um programa conjunto entre a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação e a Organização Mundial da Saúde, onde constam as normas, diretrizes, padrões e recomendações relacionados à qualidade e inocuidade dos alimentos (SANTOS et al., 2013;

CARDOSO e TESSARI, 2013). A portaria nº1428/1993 estabeleceu a utilização dos programas BPP (Boas Práticas de Produção) e APPCC (Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle) como ferramentas para inspeção de todo o processo de produção da indústria de alimentos.

Outro aspecto importante nesse sentido refere-se à criação do PNSA (Programa Nacional de Sanidade Avícola) pela portaria nº193/1994, que estabelece normas para controlar ou erradicar patógenos de maior impacto na avicultura (BRASIL, 2016; VOSS-RECH et al., 2015; CARDOSO e TESSARI, 2013). Essas ações visam possibilitar a certificação sanitária de um plantel avícola nacional e favorecer a elaboração de produtos avícolas saudáveis para o mercado interno e externo (SANTOS et al., 2013). Desde sua criação, o PNSA recebeu diversas normativas direcionadas ao controle ou redução das salmonelas em aves reprodutoras, produção e durante o abate.

O programa de biossegurança é composto por várias etapas de manejo, que quando aplicadas de forma sinérgica, auxiliam na redução ou eliminação de microrganismos patogênicos. Dentre as práticas, é recomendado que as granjas sejam isoladas, permanecendo distante de outras criações, protegida por barreiras naturais e físicas. Além disso é necessário a realização do controle de tráfego (veículos, pessoas); adoção de medidas de higiênico-sanitárias adequadas; utilização de medicações e vacinações de forma correta; monitoramento periódico; erradicação de doenças comuns; implementação de constantes auditorias, atualizações e programas de educação continuada além do estabelecimento de um plano de contingência (SESTI, 2004).

Um controle adequado não apenas auxilia na manutenção da saúde das aves, mas também agrega valor e possibilita a comercialização de produtos brasileiros no mercado mundial. Cada etapa do manejo é indispensável, de forma que todo o processo deve ser seguido de forma rigorosa, visando cumprir cada detalhe descrito. Além disso, toda as ramificações da avicultura possuem responsabilidade, uma vez que as aves estão sujeitas aos mesmos riscos, que por sua vez podem comprometer a produção avícola nacional (AMARAL, MARTINS e OTUTUMI, 2014; SANTOS et al., 2013).

3.6. *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Minnesota: fontes, características genotípicas e fenotípicas

Salmonella Minnesota (SM) foi isolada pela primeira vez na década de 1930 em uma fazenda de Perus, sendo descrita como um bastonete móvel, com características morfológicas típicas do gênero. Além disso, foi observada a produção de ácido e gás a partir de glicose, arabinose, trealose, ramnose, dulcitol, sorbitol e inositol; a não fermentação de lactose ou sacarose; a ausência de produção de indol e a produção de sulfeto de hidrogênio em caldo de peptona (EDWARDS e BRUNER, 1938). Desde então, o sorovar já foi detectado em diversas fontes, incluindo granjas de produção animal, o que pode resultar na contaminação da carne, ovos e outros produtos em abatedouros (KIPPER et al., 2020).

Nos últimos anos, estudos têm demonstrando aumento na detecção de SM na cadeia avícola. Voss-Rech et al. (2015) analisaram 1.543 suabes de arrasto em granjas de frango de corte em três estados brasileiros e demonstraram a emergência de SM, sendo esse o sorovar mais isolado. O agente representou 40,24% do total de amostras, seguido de SI (14,63%) e SH (7,31%). Por sua vez, Costa et al. (2013) avaliaram 12.582 estirpes provenientes de carcaças de aves comerciais e subprodutos de aves de diferentes regiões do Brasil, coletados entre 2007-2011. Foi identificado que SE, SM, ST, *S. Schwarzengrund* e *S. Mbandaka* foram os sorovares mais prevalentes. Além disso, observou-se um declínio ao longo dos quatro anos na prevalência de SE e um aumento do número de SM, ST e *S. Mbandaka*, sugerindo uma ocupação do nicho ecológico. Já Mendonça et al. (2017), avaliaram isolados de *Salmonella* na cadeia de produção de frangos de corte em amostras de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Dentre os 239 isolados de *Salmonella* oriundos de plantas industriais, 24 sorovares

foram identificados, sendo SM (31,4%) e SI (22,6%) os mais frequentes, apresentando maior frequência no ambiente de abate em relação aos outros sorovares.

A presença de SM em produtos avícolas do Brasil tem sido notificada por diversos países europeus por meio do Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASFF) (CAMPOS et al., 2018). Em 2017, os principais sorovares notificados pelos alertas rápidos europeus e seus números de ocorrência foram: *Salmonella* spp. (254), SH (53), ST (5), SE (4) e SM (4). Em relação à SM, uma estirpe foi identificada na Eslováquia e três estirpes detectadas na Alemanha, todas em peitos de frangos congelados oriundos do Brasil, resultando em várias restrições locais, que incluíram a não importação da carne (RASFF, 2021). Em 2013, SM também foi identificada em 10 das 109 notificações de *Salmonella* spp., sendo todas com destino à Espanha. Além disso, excluindo-se os produtos avícolas, a consulta no banco de dados do RASFF (2021) indica que SM foi detectada em outro alimento brasileiro, a pimenta preta. Em 2020, houveram três notificações sobre o produto, que não foi colocado no mercado.

Recentemente pesquisadores europeus publicaram um estudo onde foi determinado o perfil de resistência antimicrobiana e subsequentemente realizado o sequenciamento do genoma completo de isolados de SH e SM recuperados de amostras de carne de frango importada. O resultado demonstrou que a característica de multirresistência foi comum à grande maioria (94,4%) dos isolados de ambos os sorovares, sendo que vários carregavam o plasmídeo *IncA/C2*, contendo o gene da β -lactamase *bla_{CMY-2}*, e *IncX1*, contendo um sistema de secreção do tipo IV. A comparação entre as sequências genômicas revelou que os isolados apresentaram várias relações genéticas potenciais apoiadas em sua assinatura comum de resistência a antibióticos a isolados de *Salmonella* de frangos do Brasil. O estudo sugere a revisão dos critérios de higiene para monitoramento de alimentos antes de sua colocação no mercado europeu, alertando para a introdução de genes de resistência, em última instância, na alimentação de seres humanos (SILVEIRA et al., 2021).

Em outro estudo similar, Campos et al. (2018) avaliaram a relação clonal entre isolados de *Salmonella* em produtos de carne de aves importados do Brasil em Portugal, bem como sua resistência a cefalosporinas de amplo espectro. As estirpes foram caracterizadas como SH e SM e apresentaram perfis multirresistentes, com a presença do gene *bla_{CMY-2}* localizado em diferentes plasmídeos. Segundo os autores, a importação de carne de frango pode ser uma fonte importante de estirpes epidêmicas portadoras de genes de resistência. Assim, os mesmos questionam o regulamento que estabelece critérios microbiológicos de segurança alimentar europeu, uma vez que o mesmo cobre apenas SE e ST, ressaltando que sorovares menos comuns em aves na Europa, como SH e SM, devem ser considerados, inclusive no que diz respeito a resistência à antibióticos. Desta forma, percebe-se que a presença de SM é indesejável, e pode interferir no comércio internacional (SHINOHARA et al., 2008).

Frequentemente estudos tem demonstrado a presença de SM oriundas de frangos de corte brasileiros resistentes a antibióticos (SILVEIRA et al., 2021; RODRIGUES et al., 2020; CAMPOS et al., 2018; RESENDE, 2015). Em estudo comparando 239 estirpes previamente isoladas de dois abatedouros de frango, Mendonça et al. (2019) relataram que o sorovar Minnesota apresentou o maior percentual de estirpes multirresistentes, provavelmente devido ao uso inadequado de antimicrobianos na indústria avícola.

Além da preocupação com estirpes multirresistentes, deve-se considerar também a patogenicidade do microrganismo, característica diretamente relacionada à virulência do mesmo (BENÍCIO, 2019). Um amplo número de agentes patogênicos apresenta ilhas de patogenicidade, que são segmentos de DNA inseridos nos cromossomos que atribuem várias características de virulência aos que as possuem (VIEIRA, 1995). Nas salmonelas muitos dos fatores de virulência são codificados por genes presentes

nessas ilhas (BARBOSA, 2020; FORTES et al., 2012), com destaque para os de adesão (adesinas, *lpf*, *sefA*), invasão (*inv*, *agf*), inibição de respostas do hospedeiro (*pagC*, *spvC*) e resistência a antibióticos (BENÍCIO, 2019).

O genoma de SM carrega oito ilhas de patogenicidade de salmonelas (SPIs), denominados SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-6, SPI-9 e SPI-16, que com exceção do SPI-6, são conservadas em outros genomas de *Salmonella*. O SPI-6 em SM está assim como em *S. Typhi* estirpe CT18, o que inclui a capacidade de codificar um sistema de secreção tipo VI (T6SS), dois clusters de genes fimbriais (*safABCD* e *pcfABCD*) e a adesina/invasina proteína PagN. Os diferentes clusters de genes fimbriais podem explicar a adaptação da SM a uma ampla gama de hospedeiros (WANG et al., 2017).

Em trabalho avaliando a diversidade filogenética de isolados de SM da cadeia produtiva de frangos (12 do Brasil e 95 de diversos lugares do mundo), Kipper et al. (2020) identificaram a presença de alguns genes de virulência reconhecidos, como *fyuA*, *irp1*, *irp2* e o operon *ybtAPQSTUX* na maioria dos isolados analisados. Este último agrupamento de genes está geralmente localizado em uma região cromossômica denominada “ilha altamente patogênica”, que codifica um sistema de aquisição de ferro mediado por yersiniabactina previamente demonstrado em estirpes patogênicas de *Yersinia* e em vários membros da família *Enterobacteriaceae*, incluindo *Salmonella*. Tais ilhas já haviam sido relatadas em outros sorovares de *Salmonella*, como SI e SS, entretanto, este é o primeiro estudo identificando-as em SM. Além disso, foram detectados 28 genes de resistência antimicrobiana entre os 107 isolados. Essas propriedades genéticas adicionais podem ser determinantes para a disseminação e persistência de SM em granjas avícolas brasileiras (KIPPER et al., 2020).

Apesar da ainda pouca associação de SM com doenças nas aves ou em saúde pública, segundo Melo et al. (2020), SM de origem avícola apresenta fatores de virulência e risco potencial aos humanos. Ao avaliar 71 estirpes de SM isoladas a cadeia produtiva de frangos de corte brasileira entre 2009 e 2010, os autores identificaram a presença dos genes *invA*, *lpfA* e *agfA* em 47,9% (34/71) das amostras, o que indica, além da capacidade de invasão, que essas estirpes também são eficientes no processo de adesão e na formação de biofilmes. Como a presença dos genes *agfA* e *lpfA* é importante no processo de infecção, é possível que haja efeitos aditivos das adesinas Lpf e Agf na colonização do intestino e na expressão de virulência no hospedeiro (MELO et al., 2020).

Por sua vez, a rota da SM no trato gastrointestinal compreende passagem pelo estômago e aderência às células epiteliais na região ileocecal, possuindo como porta de entrada as células M presentes nas placas de Peyer (SILVA et al., 2018; PICLER, 2016). No intestino, ocorre multiplicação no lúmen e adaptação da expressão gênica para o novo ambiente (BARBOSA, 2020). Após 24 horas de desafio oral com SM, Pickler (2016) observou aumento no isolamento de no papo, duodeno e ceco de aves, percebendo ainda que a invasão tecidual resultou em aumento na população de células T, incluindo as células T CD4+ tanto no íleo como no ceco. Por sua vez, a redução na contagem bacteriana no ceco correlacionou com a redução de células T CD8+.

De acordo com Pickler (2016), algumas salmonelas paratíficas, como SM, não causam sinais clínicos em aves, porém persistem no intestino destas, o que favorece sua disseminação na cadeia produtiva. Outra característica de SM é a capacidade de produzir biofilmes (BRASÃO, 2017), auxiliando na persistência desses microrganismos no ambiente e, conseqüentemente, na sua transmissão. Biofilmes são constituídos por células aderidas a uma superfície viva ou inerte, como plástico, vidro e aço inoxidável. A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção, permitindo relações simbióticas sua sobrevivência em ambientes hostis (DANTAS, 2018).

Em um trabalho com o objetivo de caracterizar biofilmes de 29 estirpes de SM de origem avícola, Brasão (2017) identificou que 97% das estirpes apresentavam os genes *adrA* e *csgD* e 93% possuíam o

gene *luxS*, ambos ligados à formação de biofilmes. Os genes *adrA* e *csgD* indicam potencial para produzir biofilmes de forte intensidade, uma vez que estão ligados à expressão da matriz de celulose e de um fator de aderência fimbrial, já o gene *luxS*, está relacionado à produção de substâncias fundamentais à maturação dos biofilmes. No estudo, os isolados demonstraram alta similaridade genética, o que embasa a hipótese de uma disseminação clonal associada a biofilmes (BRASÃO, 2017).

A formação de biofilmes dentro da linha de produção eleva a carga microbiana, e devido ao desprendimento de porções aderidas, podem colocar em risco a saúde do consumidor e a qualidade do alimento, podendo ainda fomentar prejuízos financeiros à indústria em decorrência da diminuição da vida de prateleira e dos gastos para sua eliminação (BRASÃO, 2017). Uma vez associados a biofilmes, esses microrganismos permanecem mais protegidos contra agressões ambientais, o que os torna mais tolerantes a ação de desinfetantes e sanitizantes, dificultando sua eliminação (DANTAS, 2018; SCHERRER e MARCON; 2016).

3.7. Importância em saúde pública

Salmonelas resultam anualmente na perda de milhões de dólares na indústria avícola, o que se reflete tanto no mercado interno quanto em exportações (BRASIL, 2011). Além disso, há um grande dano à saúde da população, uma vez que a salmonelose é uma das doenças mais comuns transmitidas por alimentos, e produtos de origem animal são a principal via de transmissão para humanos (FERRARI et al., 2019; RESENDE, 2015; SANTOS et al., 2013; MENDONÇA, 2011). Dessa forma, o controle de salmoneloses representa um grande desafio ao setor avícola, principalmente pela emergência e diversidade de novos sorovares, bem como pela sua relação com a Saúde Pública (CARDOSO E TESSARI, 2013).

Em geral, as doenças causadas por *Salmonella* spp. em humanos constituem infecções alimentares que cursam com acometimento entérico (BARROS; LIMA; STELLA, 2020). Os sinais principais são dores abdominais, náuseas, vômitos e diarreia, sendo uma das principais complicações a desidratação, especialmente em crianças, idosos, gestantes e pessoas cujo sistema imunológico é suprimido por enfermidades ou medicações. O portador convalescente elimina *Salmonella* spp. durante semanas ou, mais raramente, por meses (BARBOSA, 2020; MENDONÇA, 2011).

A contaminação de produtos alimentícios de origem avícola requer atenção pela elevada frequência e gravidade (BARROS; LIMA; STELLA, 2020). Segundo Mesquita (2016), o consumo de alimentos contaminados gera por ano cerca de 1,2 bilhões de episódios de doenças diarreicas e aproximadamente 2,2 milhões de óbitos. Além disso, considerando que a maioria dos quadros de gastroenterite transcorre sem a necessidade de hospitalizações e sem o isolamento do agente (muitos sequer são diagnosticados), a ocorrência das salmoneloses na população humana transmitida por alimentos de origem animal é provavelmente subestimada (BARROS; LIMA; STELLA, 2020; SHINOHARA et al., 2008).

Estudos epidemiológicos demonstram uma dinâmica ao longo das décadas onde alguns sorovares vão ocupando o lugar de outros (O'BRIEN, 2013). Os sorovares SE e ST foram por muitos anos os mais frequentemente isolados em produtos de origem avícola. Entretanto, atualmente a SM tem trazido preocupações pelo aumento no número de isolamentos na cadeia de produção de carne de aves no Brasil (RODRIGUES et al., 2020; SILVEIRA et al., 2020; MENDONÇA et al., 2019; MACHADO et al., 2017; VOSS-RECH et al., 2015). É possível que o intenso controle na produção avícola com foco em SE e ST tenha selecionado outros sorovares por um mecanismo de exclusão competitiva, onde uma vez que alguns são controlados, outros ocupariam esse nicho. Este fato poderia explicar a alta frequência de SM recentemente encontrada (MENDONÇA et al., 2019; PICKLER et al., 2012).

Surtos em humanos causados por SM são incomuns (Ghamdi et al., 1989; McCracken, 1954). McCracken (1954) relatou que após o seu isolamento na década de 1930 (EDWARDS e BRUNER, 1938), no Reino Unido SM foi isolada novamente a partir de ovos em pó em 1947 e associada a um caso de infecção alimentar em 1950. Após esse episódio, de março de 1950 a outubro de 1951, houveram 8 casos esporádicos reportados. Por sua vez, em novembro de 1951, houve um surto de menor proporção no norte da Escócia com duas mortes associadas ao agente. Além disso, de 21 de dezembro de 1951 a janeiro de 1952, houve um grande surto na Inglaterra causado por tortas de carne industrializadas, que foram comercializadas e distribuídas como presente pela população devido à temporada festiva. Foram reportados mais de 595 casos em Northamptonshire, North Buckinghamshire, Leicester, Leicestershire, Coventry, Worcester, Wareham, Bristol e Oxford. SM foi isolada em um laboratório local em Northampton e o resultado foi posteriormente confirmado por um Laboratório de Referência para *Salmonella* spp. Os sintomas relatados incluíram dor abdominal, náuseas, dor de cabeça seguida de vômito e diarreia. Algumas pessoas apresentaram febre, sendo a temperatura mais alta de 39°C. O período de incubação foi de 18 horas em média, e a duração da doença, de 6 a 7 dias. Oito pacientes foram internados em um hospital de isolamento, onde dois idosos sucumbiram à infecção. Uma investigação entre os funcionários da fábrica, mostrou que vários tiveram distúrbios gastrointestinais leves durante a quinzena anterior ao surto, e que os membros de suas famílias também tiveram sintomas semelhantes. O exame bacteriológico da equipe que trabalhava na indústria (42 pessoas), revelou que 7 estavam excretando a bactéria nas fezes. O caso ganhou grande repercussão, sendo divulgado pela imprensa e pela B.B.C. (British Broadcasting Corporation) (MCCRACKEN, 1954).

Al-Ghamdi et al. (1989), descreveram um surto de infecção alimentar em um acampamento de trabalhadores filipinos na Arábia Saudita causada por SM. Segundo os autores, após comerem a mesma comida, 168 (40%) de 419 trabalhadores desenvolveram gastroenterite aguda com diarreia, vômitos, dor abdominal severa e febre baixa. O período de incubação foi em média de 34 horas, com uma margem de 8 a 96 horas. SM foi isolada de fezes ou suabes retais em 57 (33,9%) trabalhadores, e os isolados apresentaram sensibilidade à ampicilina, cloranfenicol, canamicina, cotrimoxazol, gentamicina, carbenicilina, ácido nalidíxico, furazolidona, cefuroxima e cefazolina. Além disso, 32 (19%) isolados se mostraram resistentes à tetraciclina e 53 (31,5%) à estreptomicina.

Outro caso foi descrito por Steinebrunner et al. (2013) que relataram que uma pessoa desenvolveu sepse por SM na Alemanha. O paciente foi um homem de 31 anos que sofria de doença de Crohn e possuía um cateter ureteral para tratamento de urolitíase. O homem deu entrada no hospital com sonolência, febre (39,8°C), insuficiência renal aguda e ausência de sintomas gastrointestinais, onde apresentou infecção do trato urinário e sepse grave. O Centro Nacional de Referência para Salmonelas e Outros Patógenos Entéricos da Alemanha identificou SM em culturas de urina e sangue. O teste de susceptibilidade antimicrobiana revelou resistência à ampicilina, cefuroxima e aminoglicosídeos. Os autores acreditam que infecções extraintestinais por *Salmonella* devem ser levadas em consideração em pacientes imunocomprometidos que apresentam sepse (STEINEBRUNNER et al., 2013).

No Brasil, os dados da ocorrência de infecções alimentares por SM em humanos não são precisos. Além do fato da maioria dos dados disponíveis pertencerem apenas ao Sul e Sudeste do país, os laboratórios oficiais brasileiros costumam investigar apenas microrganismos clássicos transmitidos por alimentos (BARBOSA, 2020; MEDEIROS, 2013), mas não agentes etiológicos emergentes, como SM. Atualmente, estima-se que menos de 10% dos casos das doenças transmitidas por alimentos chegam a ser registrados pelas autoridades sanitárias, uma vez que ainda existem falhas ou mesmo a não conclusão da investigação de diversos surtos (SANTOS et al., 2020). Desta forma, a notificação e os registros epidemiológicos devem ser estimulados, uma vez que são fundamentais para que os órgãos fiscalizatórios possam estimar os patógenos envolvidos em surtos (SHINOHARA et al., 2008).

Por sua vez, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2016), publicou um relatório com dados sobre todos os sorovares confirmados com cultura em infecções no Estados Unidos nos anos de 2006 a 2016. A dinâmica entre os sorovares mais frequentemente detectados está apresentada na Tabela 02, onde se pode observar que em 2016, o sorovar Infantis foi o que apresentou o maior aumento (165,8%) desde 2006. *S. Javiana* e *S. Thompson* também apresentaram aumentos consideráveis ao longo dos anos, que correspondem a 92,3% e 79,2%, respectivamente. Por sua vez, os sorovares que mais tiveram sua detecção reduzida no período avaliado foram *S. Heidelberg* (49,2%), *S. Typhimurium* (32,8%) e *S. Agona* (31,7%). Em 2016 foram diagnosticados 46.623 casos de infecção humana por *Salmonella*, sendo 27 causados por SM. Além disso, de 2006 a 2016 foram notificados 301 casos de infecções por SM. Apesar do baixo número de casos, quando comparado a outros sorovares, os dados demonstram que a infecção humana por SM é passível de ocorrer (CDC, 2016).

Tabela 02: Alteração percentual entre os 20 sorovares de *Salmonella* mais frequentemente relatados nos Estados Unidos, comparando 2006 e 2016.

Sorovar	Ranking		Números reportados		Percentual de mudança
	2006	2016	2006	2016	2006 x 2016
Enteritidis	2°	1°	6.701	7.830	+ 16,8%
Newport	3°	2°	3.374	4.728	+ 40,1%
Typhimurium	1°	3°	6.813	4.581	- 32,8%
Javiana	5°	4°	1.414	2.719	+ 92,3%
I4,[5],12:i:-	6°	5°	1.222	2.179	+ 78,3%
Infantis	15°	6°	482	1.281	+ 165,8%
Muenchen	8°	7°	757	1.216	+ 60,6%
Montevideo	7°	8°	1.057	1.018	- 3,7%
Braenderup	12°	9°	550	1.001	+ 82,0%
Thompson	16°	10°	442	792	+ 79,2%
Saintpaul	11°	11°	577	778	+ 34,8%
Heidelberg	4°	12°	1.483	754	- 49,2%
Oranienburg	9°	13°	724	692	- 4,4%
Mississippi	10°	14°	604	536	- 11,3%
Typhi	17°	15°	411	423	+ 2,9%
Bareilly	22°	16°	253	412	+ 62,8%
Berta	23°	17°	249	369	+ 48,2%
Agona	13°	18°	530	362	- 31,7%
Paratyphi B var. L (+) tartrate+	18°	19°	408	343	- 15,9%
Anatum	24°	20°	247	257	+ 4,0%

Fonte: CDC, 2016.

3.8. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp.

Segundo publicação da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2019), agentes antimicrobianos (incluindo os antibióticos, antivirais, antifúngicos e antiprotzoários) são instrumentos fundamentais para combater doenças em seres humanos, animais e plantas. Atualmente, mais de 15 classes de

antimicrobianos são conhecidas, que diferem entre si pela estrutura química e pelo mecanismo de ação (MENDONÇA, 2011)

Antibióticos referem-se a uma classe de medicamentos que promovem a eliminação de uma bactéria (efeito bactericida) ou inibição de seu crescimento (efeito bacteriostático), podendo atuar em sua parede celular, membrana plasmática, síntese de proteínas e ácidos nucleicos (BENICIO, 2019; CDC, 2019). O sucesso de uma droga contra um determinado agente é possível devido à toxicidade seletiva, onde um medicamento deve ser mais tóxico ao patógeno do que ao hospedeiro que o abriga. No caso das bactérias, tal característica é possível graças a diferenças estruturais e bioquímicas existentes entre elas e células eucarióticas (MOREIRA et al., 2013).

Esses medicamentos são amplamente utilizados na medicina humana e veterinária para tratamento terapêutico, além de também serem utilizados como promotores de crescimento em animais (DANTAS, 2018). Entretanto, o uso indiscriminado de antibióticos tem promovido pressão seletiva, favorecendo o surgimento de estirpes resistentes a essas drogas (OMS, 2019). Isso tem se tornado um problema cada vez maior e com sérias implicações na prevenção e tratamento de doenças infecciosas em animais e humanos a nível global (MENDONÇA, 2011). Infecções por microrganismos resistentes podem resultar em prolongamento de estadias hospitalares, elevação do risco associado a procedimentos médicos, aumento da taxa de mortalidade e acréscimo de custos associados (RAU, 2019)

A resistência caracteriza-se como a habilidade de um microrganismo interromper a ação de um determinado agente antimicrobiano e continuar a se multiplicar ou persistir na presença de níveis terapêuticos desse agente, resultando em tratamentos ineficazes, infecções/contaminações persistentes e a possibilidade de transmitir essa característica a outros microrganismos (BENICIO, 2019; CDC, 2019; RESENDE, 2015). Salmonelas possuem diversos mecanismos de resistência, como a produção de enzimas que inativam o agente antimicrobiano através de degradação ou modificação estrutural, a redução da permeabilidade celular bacteriana aos antimicrobianos, a superprodução de bombas de efluxo e a modificação de proteínas alvo, que impedem a ligação do antimicrobiano (RAU, 2019).

Segundo a OMS (OMS, 2019), os relatos de resistência antimicrobiana em países de todos os níveis de renda são alarmantes. Em alguns países membros da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), cerca de 35% das infecções humanas comuns já são resistentes aos medicamentos disponíveis, e em alguns países de baixa e média renda, as taxas de resistência chegam a 80-90%. Outro dado relevante, é de que os microrganismos resistentes a medicamentos já causam pelo menos 700.000 mortes por ano em todo o mundo.

A disseminação de patógenos multirresistentes pode causar também um grande impacto econômico, uma vez que influenciam diretamente nas despesas governamentais com cuidados médicos, além do impacto sobre a produção de alimentos, rações, comércio e meios de subsistência. Como resultado, o Banco Mundial estima que em 2030, até 24 milhões de pessoas podem ser forçadas à pobreza extrema, principalmente em países de baixa renda. Caso não seja revertida, os danos econômicos anuais como resultado da resistência antimicrobiana poderão ser comparáveis futuramente aos choques experimentados durante o ano de 2008 com a crise financeira global (OMS, 2019).

Bactérias podem ser tornar resistentes através de mecanismos de transmissão vertical ou horizontal. No primeiro processo, as bactérias sofrem mutação espontânea no seu material genético, conferindo resistência e possibilitando sua sobrevivência na presença de um antibiótico específico, onde bactérias sensíveis são eliminadas e as resistentes sobrevivem, transferindo esta característica às células-filhas (BENICIO, 2019; TORTORA; FUNKE; CASE, 2016; MOREIRA, 2013)

Na transferência horizontal, os genes podem ser adquiridos de outros microrganismos já resistentes da mesma geração. Esse fenômeno envolve uma célula doadora, que contribui com parte de seu genoma para uma célula receptora, podendo ser da mesma espécie ou até mesmo de outro gênero (BENICIO, 2019). Após a transferência, parte do DNA da doadora é incorporado ao DNA da receptora, que passa a ser denominada recombinante. O processo de transferência horizontal pode ser realizado através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação (MOREIRA, 2013). A evolução da virulência em *Salmonella* spp. é impulsionada pela transferência horizontal de genes, o que tem dado origem a patógenos altamente capazes de colonizar novos nichos e estender sua gama de hospedeiros (BÄUMLER, 1997). Os genes codificadores de funções que podem proporcionar vantagens competitivas são transportados através de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons, integrons e fagos (BENICIO, 2019; GAD et al.; 2018; TORTORA; FUNKE; CASE, 2016; MOREIRA, 2013).

De forma geral, genes que conferem vantagens seletivas em relação a um hospedeiro rapidamente são difundidos dentro de uma população bacteriana (MOREIRA, 2013). Além disso, o genótipo da resistência antimicrobiana depende de mais de um gene, e sua expressão pode variar dependendo das condições (DANTAS, 2018). Desta forma, um gene pode estar presente em um microrganismo e não ser observado nos testes fenotípicos de susceptibilidade, o que se deve ao fato de que o mesmo pode não ter sido expresso devido à ausência de fatores intrínsecos à resistência ou a mutações genômicas (SOUZA, 2019).

De acordo com relatório publicado pela OMS (2020), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Salmonella* spp. são as bactérias resistentes mais comumente relatadas em nível mundial. Produtos avícolas estão entre as principais fontes de *Salmonella* e são um dos principais meios de transmissão desta bactéria (FERRARI et al., 2019; VOSS-RECH et al., 2015). O uso controlado de antimicrobianos na produção animal e monitoramento constante de *Salmonella* na cadeia de produção de frangos de corte são formas de evitar a disseminação do agente e contribuir com a saúde pública, entretanto, o setor avícola tem enfrentado continuamente novas situações emergenciais relacionadas à resistência antimicrobiana em toda a cadeia de produção (BENICIO, 2019).

Atualmente, vários estudos têm demonstrado que sorovares resistentes de *Salmonella* spp. estão sendo cada vez mais identificados na indústria avícola como um todo (SOUZA, 2019). Rodrigues et al. (2020) avaliaram perfis de resistência antimicrobiana em 230 estirpes de *Salmonella* isoladas de suabes de cloaca e carcaças de frangos de corte brasileiros. Os resultados da sorotipagem mostraram que 41% das estirpes eram SH, 29% SM, 12% *S. Saintpaul*, 6,5% SE, 3,9% *S. Anatum*, 2,2% *S. Cerro*, 2,2% SS, 1,7 % *S. Newport*, 0,4% *S. Ealing*, 0,4% *S. O:4,5* e 0,4% *S. O:9,12*. Das 230 estirpes, 41,3% apresentaram resistência a penicilinas + inibidor de betalactamase, penicilina, cefalosporinas de 1ª e 2ª geração, cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, tetraciclina e sulfonamida. Além disso, 67,4% apresentaram padrões de resistência a múltiplas drogas, sendo SH a mais frequente, responsável por 54,8% dos isolados, seguida por SM com 22% e *S. Saintpaul* com 14,8%.

Visando investigar a ocorrência de resistência antimicrobiana em isolados de salmonelas paratíficas de origem avícola e humana no Brasil, VOSS-RECH et al. (2017) realizaram uma meta-análise, onde avaliaram a evolução temporal destes microrganismos isolados no período de 1995 a 2014 através de 29 artigos. Nos isolados de origem avícola, os maiores níveis de resistência antimicrobiana foram verificados para sulfonamidas (44,3%), ácido nalidíxico (42,5%) e tetraciclina (35,5%). Nos isolados de origem humana, a resistência ocorreu principalmente para sulfonamidas (46,4%), tetraciclina (36,9%) e ampicilina (23,6%). Os autores reforçam que o monitoramento contínuo da resistência e disseminação desses agentes é fundamental para a manutenção da saúde animal e humana.

Mendonça et al. (2019) conduziram um estudo para avaliar sorovares e suscetibilidade antimicrobiana de isolados de *Salmonella* da cadeia de produção de frangos de corte dos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Um total de 239 estirpes isoladas de frangos, carcaças, criadouros e abate foram analisadas por teste de disco-difusão, no período de 2009 a 2010. Foram identificados 24 sorovares, sendo os mais frequentes SM (31,4%) e SI (22,6%). Do total, 60,7% das estirpes apresentara resistência a pelo menos um antibiótico, e destes, 31,7% apresentaram perfis de multirresistência. Os maiores percentuais de resistência foram obtidos para a sulfonamida (42,7%), tetraciclina (37,6%) e da amoxicilina (27,6%). Os autores apontam que o alto número de estirpes resistentes de *Salmonella* indica a necessidade do uso prudente de antibióticos na produção avícola, a fim de reduzir a ocorrência e disseminação de perfis de resistência a antibióticos. Além disso, estirpes multirresistentes isoladas de frangos podem representar um risco para a saúde humana (MENDONÇA et al., 2019).

Alimentos de origem animal podem abrigar patógenos resistentes a antibióticos e atuar como veículo na disseminação dessas estirpes a salmonelas que são hospedeiras específicas de humanos (MONTE et al., 2019; DANTAS, 2018; MENDONÇA, 2011). Essa possível transferência tem gerado preocupação em diversos órgãos internacionais, como a OMS e a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) (RESENDE, 2015).

Periodicamente, a OMS publica um relatório relativo à classificação de antimicrobianos de importância crítica para a medicina humana. Segundo o último estudo publicado, os seguintes antimicrobianos foram considerados como prioritários no desenvolvimento de medidas e estratégias para manejo da resistência bacteriana: cefalosporinas (3^a, 4^a e 5^a gerações), glicopeptídeos, macrolídeos, polimixinas e quinolonas (incluindo as fluoroquinolonas) (OMS, 2018).

Baseado nos dados apresentados, destaca-se a importância do uso controlado de antimicrobianos na produção animal, assim como o monitoramento constante de *Salmonella* spp. na cadeia avícola (RESENDE, 2015). Investigações que verificam a prevalência de estirpes resistentes em frangos de corte são importantes para produzir informações que subsidiem programas de controle sobre o uso indiscriminado de antibióticos na produção animal, uma vez que informações sobre a magnitude e as tendências de resistência possibilitam o planejamento de tratamentos alternativos (VOSS-RECH et al., 2015). Portanto, além do monitoramento constante e identificação dos sorovares do patógeno, é fundamental avaliar o perfil de resistência antimicrobiana de *Salmonella* ao longo da cadeia de produção (MENDONÇA, 2011).

3.9. Caracterização molecular por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Salmonella spp. pode ser isolada a partir de materiais biológicos e não, como órgãos das aves, fezes, cama, suabe de cloaca, propé, mecônio, ração e ovos (CARDOSO E TESSARI, 2013; MEDEIROS, 2013). O agente pode ser identificado através de isolamento bacteriano ou por PCR (reação em cadeia da polimerase). Uma vez detectado, o isolado pode ser submetido a uma bateria sorológica para sorotipagem ou a um método molecular (ASSIS et al., 2017).

A sorotipagem tradicional é baseada na identificação dos antígenos somáticos (O) e flagelares (H) por meio da aglutinação bacteriana com antissoros específicos. No entanto, a sorotipagem possui algumas desvantagens, como reações falso-positivas resultantes de aglutinação fraca e não específica, isolados não tipáveis devido à auto aglutinação e a perda da expressão do antígeno, por exemplo em estirpes rugosas e imóveis (ASSIS et al., 2017).

O conhecimento dos clones de patógenos, a sua distribuição, incidência e prevalência espacial e temporal são subsídios importantes para investigação e controle de um surto (KOTTWITZ e OLIVEIRA, 2011). O desenvolvimento de métodos genotípicos ao longo das últimas décadas tem se

apresentado como ferramenta complementar aos métodos de sorotipagem (VOSS-RECH et al., 2015). A partir da comparação entre perfis gerados por metodologias que possibilitam a caracterização genética, é possível a obtenção de respostas mais conclusivas, possibilitando o rastreamento e a diferenciação de estirpes geneticamente relacionadas a um surto, identificar a fonte, implementar medidas de controle e estabelecer ações para retirar o alimento contaminado do mercado (SOUZA, 2019; DANTAS, 2018; MACHADO et al., 2017).

Métodos moleculares possibilitam analisar o material genético de uma amostra, permitindo a caracterização de segmentos de DNA de tamanho e composição variáveis, que podem ser interpretados em separação eletroforética e sequenciamento gênico (DANTAS, 2018). A investigação genômica de sorovares de *S. enterica* de alta prioridade é um componente fundamental do trabalho de vigilância epidemiológica, principalmente quando se trata do Brasil, um dos principais países produtores de frango de corte do mundo (EMBRAPA, 2020; MONTE et al., 2019).

A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) foi desenvolvida por Schwartz e Cantor (1984), e é uma importante ferramenta para caracterizar estirpes bacterianas. Atualmente, é considerada o padrão ouro para a tipagem molecular de *Salmonella* spp. sendo amplamente utilizada na discriminação de isolados e investigações de surtos em todo o mundo (MONTE et al., 2020; GAD et al., 2018; ASSIS et al., 2017; VOSS-RECH et al., 2015; KÉROUANTON et al., 2007). A técnica baseia-se na clivagem do genoma por digestão do DNA com endonucleases de restrição, que clivam o DNA em sítios específicos, cortando-o e gerando fragmentos de restrição, de forma semelhante à RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). As enzimas utilizadas são provenientes de diferentes microrganismos, sendo a mais indicada para *Salmonella* a enzima *XbaI*, derivada do microrganismo *Xanthomonas badrii* (SOUZA, 2019; DANTAS, 2018; KOTTWITZ e OLIVEIRA, 2011). Para evitar o cisalhamento do DNA devido aos métodos tradicionais de extração, células bacterianas são incorporadas em plugues de agarose antes da lise e dos procedimentos de purificação de DNA. Uma vez purificado, a digestão é realizada expondo os plugues às enzimas de restrição, sendo os plugues posteriormente inseridos diretamente no gel de agarose. A eletroforese é realizada com a aplicação de campos elétricos alternados variando-se periodicamente o ângulo, de modo que fragmentos grandes (até 2 megabases) são separados efetivamente por diferença de tamanho. Os fragmentos de DNA são visualizados pela coloração dos géis com um corante fluorescente e as imagens são capturadas digitalmente para análise usando pacotes de *software* comerciais (CAMARDA et al., 2015; FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2009).

A PFGE apresenta notável poder discriminatório e reprodutibilidade, o que a tornou um método amplamente aplicável para tipagem comparativa da maioria das espécies bacterianas. A imobilização *in situ* do DNA bacteriano impede o cisalhamento mecânico e os perfis genéticos gerados são baseados em todo o genoma, o que representa uma melhoria significativa em relação a outros métodos de tipagem (FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2009). Este método permite ainda a diferenciação de isolados caracterizados como idênticos por outras análises, como sorotipagem, fagotipagem, ribotipagem e análise de plasmídeos, constituindo-se assim em uma ferramenta de grande valia na vigilância epidemiológica da salmonelose (KOTTWITZ e OLIVEIRA, 2011).

Para interpretar os perfis genéticos obtidos através da técnica de PFGE e utilizar esta informação para estudos genéticos e epidemiológicos, é necessário comparar os padrões gerados. Estes podem diferenciar os isolados em quatro categorias: geneticamente indistinguíveis, estreitamente relacionados, possivelmente relacionados e não relacionadas epidemiologicamente. Essa diferenciação permite associar a origem e rotas de transmissão de patógenos (KOTTWITZ e OLIVEIRA, 2011; TENOVER et al, 1995).

Desde 1996, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e a Associação de Laboratórios de Saúde Pública fundaram o PulseNet, uma rede de tipagem molecular para vigilância de doenças

transmitidas por alimentos, envolvendo 82 países. A rede fornece dados úteis e precoces sobre surtos e agrupamentos de casos associados a um sorovar específico. Além disso, os protocolos PFGE padronizados podem ser usados para alcançar alta reprodutibilidade interlaboratorial, o que por sua vez, pode ser útil no desenvolvimento, manutenção e compartilhamento entre bancos de dados nacionais e internacionais (CAMARDA et al., 2015; DANTAS, 2018; FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2009).

Nos últimos anos, diversos pesquisadores têm utilizado PFGE em inúmeros estudos. Em um trabalho avaliando a prevalência de *Salmonella* em aves domésticas de varejo e visando caracterizar os isolados, Gad et al. (2018) relataram que o PFGE identificou e agrupou com sucesso isolados de *Salmonella* spp. em grupos distintos. Por sua vez, Lapuz et al. (2007) determinaram a correlação epidemiológica de isolados de SE em uma granja de poedeiras, rastreando a cadeia de produção dos ovos através de análises de PFGE, determinando a correlação entre diversas amostras.

Por sua vez, Perin et al. (2020) determinou os “pulsotipos” e a relação clonal entre isolados de *Salmonella* spp. em carne de frango produzida e comercializada no Paraná, o maior produtor brasileiro. Os resultados revelaram 100% de similaridade entre as estirpes localizadas em diferentes regiões do estado, demonstrando o potencial de disseminação do patógeno na cadeia avícola do Paraná. Esse tipo de levantamento epidemiológico se mostra de grande importância na ampliação do entendimento da dinâmica de disseminação das salmonelas, possibilitando um melhor monitoramento dos produtos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras

Foram selecionados 25 isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Minnesota (SM) provenientes do TECSA Laboratórios, credenciado pelo Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA) para realização de exames oficiais para o PNSA. Estes foram relativas a fezes de aves coletadas em granjas de frango de corte localizadas nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo, coletadas no ano de 2019. As amostras foram sorotipadas no Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), e posteriormente encaminhadas para realização de antibiograma e PFGE. Foram selecionadas também cinco isolados de SM previamente sorotipados provenientes de fezes ou urina de humanos, coletados em 2019 e 2020 e fornecidas pela Fiocruz, as quais também foram encaminhadas para PFGE (Tabela 03).

Tabela 03: Fontes de coleta, local e ano de isolamento das 30 amostras de SM analisadas.

Nº Amostra	Fonte de coleta	Local	Ano de isolamento
SM A01/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A02/19	Fezes de frango	SP	2019
SM A03/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A04/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A05/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A06/19	Fezes de frango	SP	2019
SM A07/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A08/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A09/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A10/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A11/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A12/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A13/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A14/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A15/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A16/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A17/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A18/19	Fezes de frango	ES	2019
SM A19/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A20/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A21/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A22/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A23/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A24/19	Fezes de frango	MG	2019
SM A25/19	Fezes de frango	MG	2019
SM H01/19	Fezes humanas	SC	2019
SM H02/20	Fezes humanas	RS	2020
SM H03/20	Urina humana	RS	2020
SM H04/20	Fezes humanas	MG	2020
SM H05/20	Fezes humanas	MG	2020

4.2. Testes de susceptibilidade a antimicrobianos

Os testes nos 25 isolados de SM provenientes de aves foram conduzidos no laboratório de bacteriologia da Fiocruz. O método de disco-difusão de Kirby-Bauer foi utilizado para a realização do teste de detecção fenotípica de resistência, segundo o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2019). Os isolados foram semeados em ágar Triptona de Soja (TSA) e incubadas em estufa bacteriológica à 37°C por 24 horas para a obtenção de colônias isoladas. As colônias foram suspensas em solução salina (NaCl 0,9%) até obtenção de uma turvação igual a 0,5 na escala de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC/mL). Após, cada suspensão foi inoculada com espátula de Drigalski, em toda superfície da placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Merck), e em seguida foram adicionados os discos de antimicrobianos, seguido de incubação à 37°C por 18 horas. A interpretação dos resultados foi realizada através da medição do halo formado com auxílio de uma régua graduada, sendo classificados como sensíveis ou resistentes.

Foram escolhidos antibióticos rotineiramente utilizados em medicina veterinária e humana, descritos na Tabela 04.

Tabela 04: Informações sobre os antimicrobianos utilizados (nome, classe e sigla).

Classe	Antimicrobiano	Sigla
Aminoglicosídeos	Gentamicina	GEN
	Estreptomicina	STR
Anfenicóis	Cloranfenicol	CHL
Carbapenêmicos	Meropenem	MEM
Cefalosporinas (2 ^a geração)	Cefoxitina	FOX
Cefalosporinas (3 ^a geração)	Ceftazidima	CAZ
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	NIT
Quinolonas	Ciprofloxacina	CIP
	Ácido nalidíxico	NAL
Sulfonamidas	Sulfametoxazol-trimetoprim	SXT
Tetraciclinas	Tetraciclina	TCY

As placas foram incubadas a 37°C, e o resultado avaliado após 24 horas de incubação por meio da medida dos halos formados. As zonas de inibição foram medidas e classificadas como intermediárias, sensíveis ou resistentes de acordo com as recomendações do CLSI (2019). As estirpes classificadas como resistentes a pelo menos um antimicrobiano em três ou mais classes foram consideradas multirresistentes, conforme definido pelo CLSI (MAGIORAKOS et al., 2012).

4.3. Perfis moleculares por meio da técnica de gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Estirpes selecionadas de SM (13 de origem aviária e cinco de origem humana) foram submetidas à técnica de PFGE, a qual foi realizada na Fiocruz segundo o protocolo padrão do PulseNet para sorovares de *Salmonella* (CDC, 2017). As estirpes foram repicadas em ágar TSA e incubadas a 37°C por 14-18 horas. Posteriormente, foram inoculadas em caldo BHI e novamente incubadas a 37°C por 16-24 horas. Uma estirpe de *Salmonella* Braenderup ATCC H9812 foi utilizada como marcador molecular. Posteriormente foram preparados os seguintes reagentes: 500 mL de Tris-EDTA; 500 mL de água bidestilada autoclavada; 5 mL de Proteinase K 20 mg/mL e 20 mL de agarose 1% em Tris-EDTA. Após, 200 µL da suspensão celular foi transferida para um tubo de microcentrífuga, com 10 µL de proteinase K (20mg/mL), sendo homogeneizada com o mesmo volume de agarose a 1,2% em solução de Tris-EDTA. Os plugs foram transferidos para uma solução de lise e as células foram mantidas nessa solução a 54°C/2h e em agitação constante. Após esse período, os plugs de agarose foram lavados 2 vezes por 15 minutos com água ultrapura estéril e 4 vezes com tampão TE por 15 minutos.

Os plugs correspondentes à estirpe padrão controle utilizada e às amostras foram clivados com a enzima XbaI (10U/µL), sendo que as amostras foram incubadas durante 2 horas a 37°C e por 4 horas a 37°C para restrição. Após esse período, o gel de agarose a 1% (Mega base pulse-field) foi preparado, e as condições de corrida eletroforética foram: tempo inicial de 5 segundos; tempo final de 40 segundos; voltagem 6 voltz; ângulo de 120°; temperatura de 14°C e tempo de corrida total de 17-20 horas. O sistema de eletroforese de campo pulsado utilizado foi o CHEF-III (Bio-Rad, Laboratories, USA). Os perfis de PFGE gerados foram corados com Gel Red (Biotium, EUA) e visualizados com auxílio do transiluminador em UV Gel Logic 212 PRO (Carestream Molecular Imaging Software - Version 5.0, ©Carestream Health, Inc, EUA).

4.4. Análise dos resultados

As análises e construção do dendrograma por similaridade foram realizadas utilizando o *software* Bionumerics versão 7.1 (Matemática aplicada, Sint-Martens-Latem, Bélgica), aplicando o UPGMA

(*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*). Os padrões das bandas obtidos no PFGE foram comparados utilizando-se o coeficiente de Dice a 1 % de tolerância e 0,5 % de otimização.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resistência a antimicrobianos

A Tabela 05 apresenta o fenótipo de resistência obtido para cada uma das 25 estirpes de SM provenientes das amostras oriundas de fezes de frangos de corte. Das 25 estirpes de SM, 100% apresentaram resistência a, pelo menos, um dos onze antimicrobianos avaliados.

Tabela 05: Fenótipo de resistência das 25 estirpes avaliadas de *S. Minnesota* oriundas de amostras de fezes de frangos de corte.

Nº Amostra	Perfil de resistência
SM A01/19	TCY, FOX, CAZ
SM A02/19	TCY, FOX, CAZ
SM A03/19	TCY, FOX, CAZ
SM A04/19	TCY, FOX, CAZ
SM A05/19	TCY, FOX, CAZ
SM A06/19	TCY, FOX
SM A07/19	TCY, FOX
SM A08/19	TCY, FOX, CAZ, CIP, NAL
SM A09/19	TCY, FOX, CAZ
SM A10/19	TCY, FOX, CAZ, STR, NAL
SM A11/19	TCY, FOX, NAL, CAZ, STR
SM A12/19	TCY, FOX, CAZ, NAL
SM A13/19	TCY, FOX, CAZ
SM A14/19	TCY, FOX, CAZ
SM A15/19	TCY, FOX
SM A16/19	TCY, FOX
SM A17/19	TCY, FOX, CAZ
SM A18/19	NAL
SM A19/19	TCY, FOX, CAZ, NAL
SM A20/19	TCY, FOX
SM A21/19	TCY, FOX
SM A22/19	TCY, FOX, NAL
SM A23/19	TCY, FOX, CIP
SM A24/19	CIP
SM A25/19	CIP

Legenda: ácido nalidíxico (NAL), cefoxitina (FOX), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), estreptomicina (STR) e tetraciclina (TCY).

Foram reconhecidos nove perfis de resistência aos antimicrobianos (1 a 9) entre as estirpes, os quais estão apresentados na Tabela 06. Os perfis mais frequentes foram o “4”, que agrupou 9 isolados resistentes à tetraciclina (TCY), cefoxitina (FOX) e ceftazidima (CAZ); e o “3”, com 6 estirpes

resistentes à tetraciclina e cefoxitina. Além disso, 3 estirpes (12%) foram resistentes a apenas 1 antimicrobiano; 15 estirpes (60%) apresentaram resistência a antimicrobianos em duas classes e 7 estirpes (28%) apresentaram característica de multirresistência, uma vez que se mostraram resistentes a pelo menos um antimicrobiano de três ou mais classes distintas (GIERALTOWSKI et al., 2016).

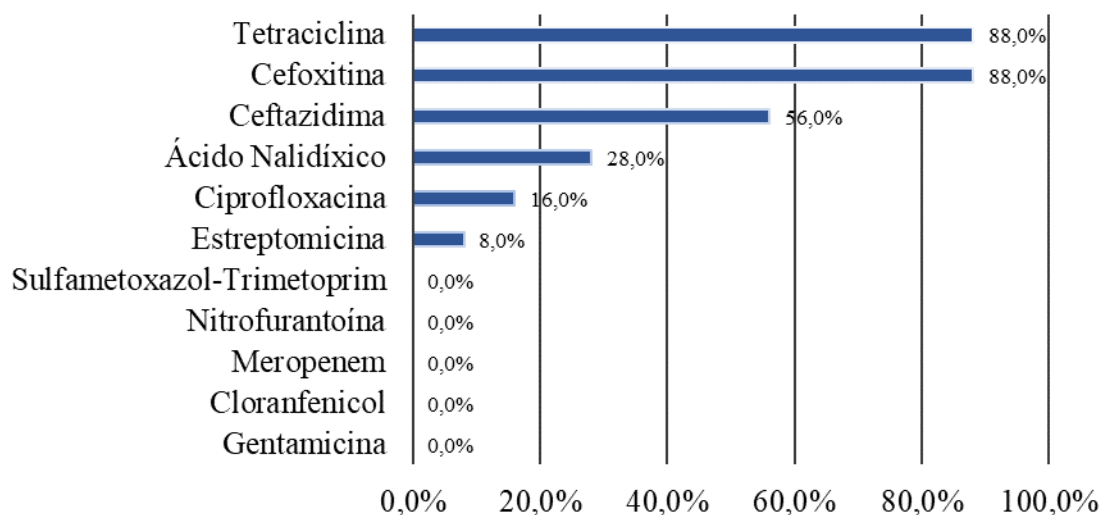
Tabela 06: Perfis de resistência de 25 estirpes de *S. Minnesota* isoladas de fezes de frangos de corte.

Perfil	Perfil de resistência	Nº de estirpes	Percentual de estirpes	Nº de classes	Multirresistência
1	CIP	2	8,0%	1	NÃO
2	NAL	1	4,0%	1	NÃO
3	TCY, FOX	6	24,0%	2	NÃO
4	TCY, FOX, CAZ	9	36,0%	2	NÃO
5	TCY, FOX, CIP	1	4,0%	3	SIM
6	TCY, FOX, NAL	1	4,0%	3	SIM
7	TCY, FOX, CAZ, CIP, NAL	1	4,0%	3	SIM
8	TCY, FOX, CAZ, NAL	2	8,0%	3	SIM
9	TCY, FOX, CAZ, NAL, STR	2	8,0%	4	SIM

Legenda: ácido nalidíxico (NAL), cefoxitina (FOX), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), estreptomicina (STR) e tetraciclina (TCY).

A Figura 03 contém os percentuais de resistência relativos a cada antimicrobiano em relação ao total de estirpes de SM isoladas de amostras de fezes de frangos de corte.

Figura 03: Percentual de resistência a antimicrobianos em estirpes de *S. Minnesota* isoladas de fezes de frango de corte.



No presente estudo, as estirpes de SM avaliadas apresentaram resistência à tetraciclina (88%), cefoxitina (88%), ceftazidima (56%), ácido nalidíxico (28%), ciprofloxacina (16%) e estreptomicina (8%). Não foi observada resistência à gentamicina, cloranfenicol, meropenem, nitrofurantoína e sulfametoxazol-trimetoprim.

Atualmente, é difícil estimar a quantidade de antibióticos utilizados na agropecuária devido a falhas na vigilância e na coleta de dados em muitos países. Entretanto, estima-se que o montante é equivalente ao utilizado na medicina humana, com projeções de aumento. Nos Estados Unidos, mais de 70% dos antibióticos considerados de importância médica também são utilizados em animais (RAU, 2019; O'NEILL, 2015).

Grande parte desses medicamentos é utilizada em animais saudáveis de forma profilática contra infecções, além de serem empregados também como promotores de crescimento. O uso de antimicrobianos para promoção de crescimento é bastante controverso, uma vez que se baseia na utilização de doses subterapêuticas para acelerar o ganho de peso animal, o que pode levar a seleção de bactérias resistentes (RAU, 2019). Isso claramente levanta preocupações do ponto de vista de saúde pública, e muitos países já proibiram o uso de antibióticos para esses fins, com destaque para a União Europeia (O'NEILL, 2015).

O MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) proibiu, através de uma série de instruções normativas, a utilização de alguns antimicrobianos como promotores de crescimento ou melhoradores de desempenho animal, e na terapêutica de animais de consumo, incluindo avoparcina, antibióticos arsenicais, antibióticos antimoniais, cloranfenicol, nitrofuranos, olaquinox, carbadox, anfenicóis, tetraciclina, β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), quinolonas, sulfonamidas sistêmicas, espiramicina, eritromicina, colistina, tilosina, lincomicina e tiamulina (BRASIL, 2017; BRASIL, 2020).

Na avicultura, o uso de antibióticos com objetivos terapêuticos, profiláticos e de promoção de crescimento ainda é uma prática e tem proporcionado, segundo alguns estudos, favorecido a emergência de estirpes resistentes e multirresistentes (DANTAS, 2018; MENDONÇA, 2011). Embora não seja possível afirmar que o uso profilático de antibióticos tenha influenciado nos perfis de resistência das estirpes avaliadas no presente estudo, observou-se 28% das amostras testadas apresentam perfis de multirresistência. Este é um importante aspecto relacionado às salmonelose transmitidas por alimentos, que somado aos diferentes fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade da *Salmonella*, dificultam o controle dessas doenças (DANTAS, 2018; MENDONÇA).

A tetraciclina foi um dos primeiros antimicrobianos adotados para uso na produção animal, sendo comum uma alta frequência de resistência a essa droga (MELO et al., 2020; PERIN et al., 2020; RAU, 2019; COSTA et al., 2013). Apesar de terem sido proibidas em 1998 no Brasil como aditivos na ração animal, elas ainda são utilizadas terapêuticamente, exercendo assim pressão seletiva sobre microrganismos (VOSS-RECH et al., 2017). Melo et al. (2020) avaliaram o perfil de resistência antimicrobiana de estirpes de SM oriundas da cadeia produtiva de frangos de corte isoladas entre 2009 e 2010, encontrando um alto percentual de resistência às tetraciclina (93,8%).

Rau (2019) realizou um estudo para identificar a prevalência e susceptibilidade a antimicrobianos em isolados de *Salmonella* obtidos de carnes de aves em 146 amostras coletadas em 2014 e 163 em 2017 no Brasil. Os resultados mostraram que SH (2014-38%; 2017- 57%) e SM (2014-12%; 2017-24%) foram os sorovares mais prevalentes. Além disso, os isolados apresentaram resistência principalmente à tetraciclina (2014-60,3%; 2017-82,8%), ácido nalidíxico (2014-57,5%; 2017-86,5%), ciprofloxacina (2014-56,9%; 2017-89,0%), ampicilina (2014-56,2%; 2017-76,7%), cefotaxima (2014-52,1%; 2017-76,1%) e ceftazidima (2014-50,0%; 2017-76,1%), observando uma elevação na frequência de SM e também da resistência aos antimicrobianos avaliados ao longo dos anos avaliados. Esse resultado corrobora com os dados do presente trabalho, onde a resistência não só da tetraciclina, como da ceftazidima e ácido nalidíxico também foram identificadas.

Ao avaliar a resistência em 87 isolados de *Salmonella* spp. coletados em diversos estados brasileiros, Silva (2012) identificou que 100% dos isolados foram resistentes a pelo menos um antibiótico, similar

ao presente estudo. As taxas de resistência mais altas foram registradas para sulfametoxazol-trimetoprim (63,22%) e tetraciclina (29,89%), enquanto os perfis de multirresistência foram observados em 12,64% das estirpes. A tetraciclina também foi detectada como um dos principais antibióticos no presente trabalho (88,0%), entretanto, não foi observada resistência à sulfametoxazol-trimetoprim (0%), sendo resistência à cefoxitina a segunda mais detectada (88%). Além disso, os perfis de resistência foram identificados em um maior percentual de estirpes (28%).

Por sua vez, Costa et al. (2013) avaliaram a resistência em 12.582 estirpes de *Salmonella* de carcaças de aves comerciais e produtos avícolas de diferentes regiões do Brasil, isoladas por laboratórios públicos e privados entre 2007 e 2011. A multirresistência foi observada em 16,4% das estirpes. Foi observado um aumento da resistência à ampicilina (12,4 a 18,9%), tetraciclina (15,2 a 18,9%) e gentamicina (7,0 a 9,6%), além de diminuição da resistência aos nitrofuranos (61,9 a 9,2%) e quinolonas (44,4 a 15,5%). Apesar dos dados do presente estudo demonstrarem de forma similar a presença de bactérias resistentes à tetraciclina e ausência de bactérias sensíveis à nitrofurano (nitrofurantoína), não foi verificada a presença de microrganismos sensíveis a gentamicina. Aliado a isso, nas estirpes de SM avaliadas verificou-se alto percentual de resistência a quinolonas (ácido nalidíxico e ciprofloxacina).

Uma vez que a resistência a antibióticos mais antigos (por exemplo, ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol) vem aumentando há muitos anos, as opções de tratamento recomendadas para salmonelose em humanos incluem fluoroquinolonas (ciprofloxacina) e cefalosporinas de 3ª geração (ceftriaxona) (CDC, 2019; JIN, 2019; ANTUNES et al., 2016). Devido ao seu amplo espectro de ação, esses medicamentos também são frequentemente utilizados em medicina veterinária (RAU, 2019).

Segundo a lista de prioridade global de bactérias resistentes a antibióticos para guia de pesquisa publicada pela OMS, *Salmonella* spp. resistentes à fluoroquinolona são classificadas como alta prioridade, e *Enterobacteriaceae* resistentes à cefalosporinas de 3ª geração e carbapenêmicos, são apontadas como microrganismos de prioridade crítica (MONTE et al., 2019; TACCONELLI et al., 2018), evidenciando sua importância. Além disso, o recente surgimento e disseminação global de estirpes de *Salmonella* resistentes a múltiplas drogas tem limitado as opções de tratamento eficazes em humanos (JIN, 2019).

De acordo com o CDC (2019), diversas salmonelas estão se tornando menos suscetíveis aos antibióticos essenciais, reduzindo o elenco de opções de tratamento de infecções graves em humanos. Atualmente 16% das salmonelas apresentam resistência a pelo menos um antibiótico essencial para o tratamento. Por sua vez, estima-se que mais de 70% das cepas de *S. Typhi* não sejam mais sensíveis à ciprofloxacina, desta forma, as opções de tratamento com antibióticos estão diminuindo (CDC, 2019). Embora os casos de salmonelose humana sejam em sua maioria autolimitantes, a antibioticoterapia é sempre utilizada em casos graves. Desta forma, sorovares de multirresistentes são considerados motivo de preocupação, uma vez que podem comprometer o tratamento efetivo da doença (DANTAS, 2018).

Antunes et al. (2016) apontam que o uso regular de antibióticos para a saúde animal e também como promotores de crescimento tem sido considerado um dos principais fundamentos para o desenvolvimento de resistência aos antibióticos em bactérias zoonóticas, como *Salmonella*. Corroborando com esse aspecto, em um estudo avaliando mecanismos de resistência à cefalosporinas de amplo espectro, Seiffert et al. (2013) apontam que o uso massivo e indiscriminado de antibióticos em medicina veterinária contribuiu para a seleção de salmonelas resistentes em alimentos, animais e ambiente, um cenário complexo responsável pela expansão de microrganismos multirresistentes que constituem ameaça à vida humana. Outro estudo publicado por Dutil et al. (2010), informa que através

do Programa Canadense Integrado de Vigilância da Resistência Antimicrobiana foi detectada uma forte correlação ($p < 0,0001$) entre estirpes de SH resistente ao ceftiofur isolado de frango de varejo e a incidência de infecções por SH resistentes ao ceftiofur em humanos, sugerindo que o uso da droga em frangos resultou no aumento da resistência em humanos (DUTIL et al., 2010).

Nesse contexto, observa-se que os dados identificados no presente estudo em relação à alta resistência a antimicrobianos é alarmante. O fenômeno de resistência cruzada ocorre quando um antimicrobiano é capaz de expressar resistência para outros de estrutura semelhante (SOUZA, 2019). A resistência à quinolonas, por exemplo, é algo preocupante, pois apesar do ácido nalidíxico não ser um dos principais antimicrobianos utilizados para o tratamento humano, a resistência a esse medicamento em *Enterobacteriaceae* está geralmente correlacionada à suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina (VOSS-RECH et al., 2017). Segundo Perin et al. (2020), a resistência antimicrobiana às quinolonas tem sido atribuída principalmente a mutações nos genes que codificam a DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) ou topoisomerase (*parC* e *parE*), evitando que a droga atue sobre essas enzimas.

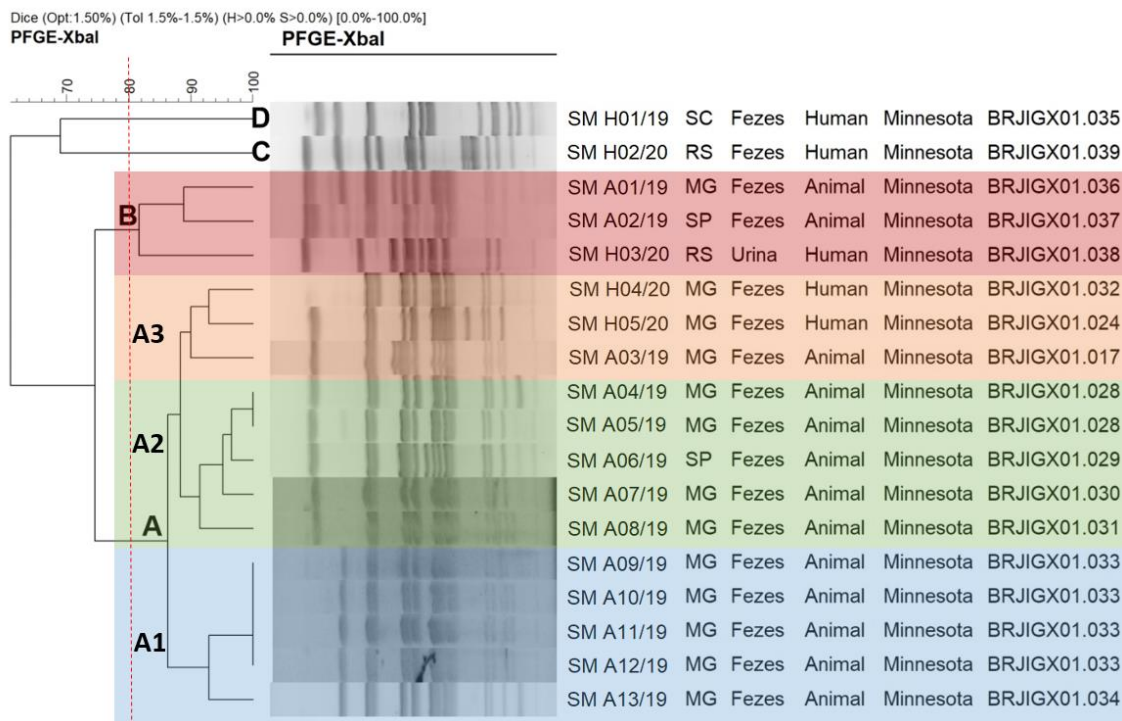
Além disso, a alta resistência a cefalosporinas nas estirpes analisadas indica um perfil que pode transmitir importantes genes de resistência a outros sorovares de *Salmonella*, e até mesmo para outros gêneros (MOREIRA et al., 2013; MIRIAGOU; CARATTOLI; FANNING, 2006). Como as cefalosporinas de 3ª geração e as quinolonas são medicamentos críticos no tratamento de salmonelose no homem, a circulação de estirpes resistentes a estes antimicrobianos constitui um risco à saúde pública, sendo que medidas de controle devem ser continuamente implementadas para o controle de salmonelas no Brasil (MONTE et al., 2019; BAPTISTA et al., 2018; VOSS-RECH et al., 2015).

Observa-se que diferentes perfis de resistência antimicrobiana têm sido comumente identificados em *Salmonella* isoladas a partir de produtos avícolas, além de estirpes multirresistentes, o que aponta para a seriedade da situação na atualidade (MELO et al., 2020; MENDONÇA, 2011). O uso prudente e monitorado de antimicrobianos na avicultura e a vigilância contínua são iniciativas importantes para dificultar a seleção e propagação de estirpes resistentes, visando a redução dos riscos para animais, e consequentemente, humanos (RESENDE, 2015). Para tal, é necessário um esforço contínuo e colaboração entre diversos profissionais, principalmente os profissionais das áreas da saúde e agroindústria, que também devem atuar na conscientização de toda a população (MENDONÇA, 2019).

5.2. Perfil genético

Por meio da análise do padrão de bandas obtidas por PFGE para as 18 estirpes de SM isoladas de fezes de frangos de corte (13) e urina/fezes humanas (5) foi elaborado um dendrograma de similaridade genética (Figura 04), cujo ponto de corte foi de 80% (SOUZA, 2019). No dendrograma gerado foi observada a formação de quatro grupos clonais ou clusters (isolados com ancestral comum), denominados A, B, C e D.

Figura 04: Dendrograma dos padrões de PFGE de estirpes de SM obtidas a partir de amostras de fezes de frangos de corte e de urina/fezes humanas coletadas em diferentes estados brasileiros. Método de clusterização UPGMA, similaridade baseada no coeficiente de Dice (%), otimização e tolerância definidas a 1,5%.



O cluster A reúne 13 isolados (11 de origem avícola e duas humanas), sendo uma amostra proveniente de frangos de corte de São Paulo e o restante de Minas gerais, os quais apresentaram 86% de similaridade. Neste grupo há nove pulsotipos, com destaque para os pulsotipos BRJIGX01.033 e BRJIGX01.028, que apresentaram, respectivamente, quatro e dois representantes. O cluster A foi dividido em A1, A2 e A3 para melhor visualização. No cluster A3 existem duas estirpes humanas, SM H04/20 e SM H05/20, e estas apresentaram 90% de similaridade com uma amostra de origem animal (SM A03/19). Os isolados humanos em A3 apresentam ainda 87% de similaridade com as demais estirpes recuperadas de fezes de frango presentes em A2 e A1.

O cluster B apresenta três isolados, cada um sendo representante único de seus respectivos pulsotipos. Neste cluster há uma estirpe isolada de urina humana (SM H03/20) proveniente do estado Rio Grande do Sul, que possui 83% de similaridade com duas estirpes de origem avícola, uma de Minas Gerais (SM A01/19) e outra de São Paulo (SM A02/19). Por sua vez, os clusters C e D são representados por amostras humanas coletadas em Santa Catarina e no Rio grande do Sul, entretanto, são representantes únicos dos seus respectivos clusters, apresentando <70% de similaridade com as outras amostras avaliadas.

Diversos autores têm comparado perfis moleculares de *Salmonella* spp. por meio da técnica de PFGE (BARBOSA, 2019; FERRARI et al., 2019; ETTER et al., 2019; GAD et al., 2018; ASSIS et al., 2017). A análise do dendrograma gerado pela PFGE de DNA genômico digerido com *Xba*I de 13 cepas de SM, permitiu a identificação de grupos ou clusters com mais de 80% de similaridade entre as estirpes isoladas de amostras provenientes de animais e humanos. Embora mais isolados necessitem ser analisados, o agrupamento em clusters aponta para uma estreita similaridade entre estirpes de SM proveniente de amostras humanas e de frangos de corte. O dado sugere que as estirpes são estreitamente relacionadas clonalmente e possuem uma origem comum, que sofreu mudanças e se

disseminou ao longo do espaço e tempo (PERIN et al., 2020; VOSS-RECH et al., 2015; KITCHEL et al., 2009). Isso é particularmente notável em três estirpes observadas no cluster A (SM H04/20, SM H05/20 e SM A03/19), que além de apresentarem 90% de similaridade, todas foram isoladas no estado de Minas Gerais.

6. CONCLUSÕES

Nas condições de realização do presente estudo, foi possível concluir que:

- Houve similaridade de 83% a 90% entre estirpes de SM de origem avícola e humana.
- As estirpes de SM recuperadas da cadeia produtiva de frangos de corte avaliadas apresentam multirresistência, representando riscos não só à saúde animal e humana, como possibilidade de causarem grandes impactos econômicos, visto que o Brasil é o maior exportador de carne de frangos do mundo.
- A caracterização genética através de técnicas moleculares, como o PFGE, representa uma importante ferramenta auxiliar no entendimento da origem e dinâmica do agente, bem como na identificação de estirpes circulantes e emergentes, auxiliando no controle do patógeno.
- A vigilância epidemiológica é fundamental, visando a limitação da evolução contínua da resistência aos antimicrobianos na cadeia produtiva de frangos de corte.
- O conhecimento dos perfis genéticos e de resistência antimicrobiana da SM é de grande valia para uma avaliação epidemiológica mais detalhada dos pulstipos circulantes na avicultura de corte, o que pode contribuir para melhorias no controle da *Salmonella* spp. nos sistemas de produção atuais, e consequentemente, com a saúde pública.

REFERÊNCIAS

- AL-GHAMDI, M.; AL-SABTY, S.; KANNAN, A.; et al. Na outbreak of food poisoning in a workers' camp in Saudi Arabia caused by *Salmonella* Minnesota. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, v. 7, n. 1 & 2, p. 18-20, 1989.
- AMARAL, P.F.G.P.; MARTINS, L.A.; OTUTUMI, L.K. Biosseguridade na criação de frangos de corte. *Enciclopédia Biosfera*, v. 10, n. 18, p. 664-685, 2014.
- ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; MENCONI, A.; et al. Pesquisa de *Salmonella* spp. em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. *Veterinária e Zootecnia*, v. 16, n. 1, p. 190-194, 2009.
- ANTUNES, P.; MOURÃO, J.; CAMPOS, J.; et al. Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 22, n. 2, p. 110-121, 2016.
- ARAÚJO, G.C.; BUENO, M.P.; BUENO, V.P.; et al. Cadeia produtiva da avicultura de corte: avaliação da apropriação de valor bruto nas transações econômicas dos agentes envolvidos. *Gestão e Regionalidade*, v. 24, n. 72, p. 6-16, 2008.
- ASSIS, F.E.A.; DALLAGASSA, C.B.; FARAH, S.M.S.S.; et al. Molecular characterization of *Salmonella* strains isolated from outbreaks and sporadic cases of diarrhea occurred in Paraná State, South of Brazil. *Epidemiology & Infection*, v. 145, n. 9, p. 1953-1960, 2017.
- BAPTISTA, D.Q.; SANTOS, A.F.M.; AQUINO, M.H.C.; et al. Prevalência e susceptibilidade antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de frangos vivos e carcaças no estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 38, n. 7, p. 1278-1285, 2018.
- BARBOSA, F.O. *Estudo da resposta imune, colonização e invasão de aves (Gallus domesticus) por estirpes de Salmonella enteritidis e Salmonella typhimurium contendo deleções nos genes clpP e fliD*. 2020. 78f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- BARROS, I.M.; LIMA, T.F.; STELLA, A.E. Salmonelose aviária e saúde pública: atualidades e o seu controle no Brasil. *Enciclopédia Biosfera*, v. 17, n. 32, p. 458-473, 2020.
- BÄUMLER, A.J. The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends in Microbiology*, v. 5, n. 8, p. 318-322, 1997.
- BEARSON, B.L.; BEARSON, S.M.D.; LOOFT, T.; et al. Characterization of a multidrug-resistant *Salmonella* enterica Serovar Heidelberg outbreak strain in commercial turkeys: colonization, transmission, and host transcriptional response. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 4, n. 156, p. 1-7, 2017.
- BENICIO, C.G. *Caracterização fenotípica e genotípica de Salmonella enterica de origem avícola e atividade antimicrobiana de extratos de própolis*. 2019. 100f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; SOUZA, S.N.; et al. Phenotypic and Molecular Characterization of *Salmonella* Enteritidis SE86 Isolated from Poultry and Salmonellosis Outbreaks. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 14, n. 12, p. 742-754. 2017.
- BRABBAN, A.D.; HITE, E.; CALLAWAY, T.R. Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne pathogens and disease*, v. 2, n. 4, p. 287-303, 2005.

- BRASÃO, S.C. *Biofilmes de Salmonella Minnesota: formação, influência da superfície, inibição por agentes químicos e importância do período entre tratamentos*. 2017. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- BRASIL. 1995. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria N° 20, de 03 de novembro de 1995. Estabelece Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). *Diário Oficial da União*. Seção 1, p.17694-17698.
- BRASIL. 2016. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa N° 20, de 21 de outubro de 2016. Estabelece o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais. *Diário Oficial da União*. Seção 1, p.13.
- BRASIL. 2020. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa N° 1, de 13 de janeiro de 2020. *Diário Oficial da União*. Seção 1, p.6.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Manual técnico de diagnóstico laboratorial de Salmonella spp.: diagnóstico laboratorial do gênero Salmonella*. 2011. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2021.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Nota Técnica: Salmonela em carne de frango*. 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/entenda-melhor-salmonela-em-carne-de-frango>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Substâncias proibidas*. 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-de-insumos-pecuarios/Substanciasproibidas.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2021.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil*. 2016. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta---o-Surtos-DTA-2016.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2021.
- CAMARDA, A.; CIRCELLA, E.; PUPILLO, A.; et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Salmonella enterica*. *Methods in Molecular Biology*, v.1301, p. 191-210, 2015.
- CAMPOS, J.; MOURÃO, J.; SILVEIRA, L.; et al. Imported poultry meat as a source of extended-spectrum cephalosporin-resistant CMY-2-producing *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota in the European Union, 2014-2015. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 51, n. 1; p. 151-154, 2018.
- CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, ELN.C. Salmonela na segurança dos alimentos. *Biológico*, v. 70, n. 1, p. 11-13, 2008.
- CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, ELN.C. *Salmonella enteritidis* em aves e na saúde pública: Revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, n. 21, 2013.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. *Antibiotic resistance threats in the United States*. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2021.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. *National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Annual Report, 2016*. 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2021.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standards - fourth edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2019.

COSTA, L.S.; GARCIA, L.A.F.; BRENE, P.R.A. Panorama do setor de frango de corte no Brasil e a participação da indústria avícola paranaense no complexo dado seu alto grau de competitividade. In: International Symposium on Project Management, Innovation and Sustainability. 2015. São Paulo. *Anais...* São Paulo, 2015.

COSTA, R.G.; FESTIVO, M.L.; ARAUJO, M.S.; et al. Antimicrobial Susceptibility and Serovars of *Salmonella* Circulating in Commercial Poultry Carcasses and Poultry Products in Brazil. *Journal of Food Protection*, v. 76, n. 12, p. 2011-2017, 2013.

CUI, Y.; LIU, D.A.; CHEN, J. Fate of *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* on vegetable seeds contaminated by direct contact with artificially inoculated soil during germination. *Journal of food protection*, v. 83, n. 7, p. 1218-1266, 2020.

CUNHA-NETO, A.; CARVALHO, L.A.; CARVALHO, R.C.T.; et al. *Salmonella* isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state of Mato Grosso, Brazil: antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization by repetitive sequence-based PCR system. *Poultry Science*, v. 1, n. 97, p. 1373-1381, 2018.

DANTAS, S.T. *Caracterização molecular e da virulência de cepas de Salmonella spp. isoladas em uma planta de abate de aves*. 2018. 77f. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

DUTIL, L.; IRWIN, R.; FINLEY, R.; et al. Ceftiofur Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg from Chicken Meat and Humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, n. 1, p. 48-54, 2010.

EDWARDS, P.R.; BRUNER, D.W. Two new *Salmonella* types isolated from fowls. *Epidemiology & Infection*, v. 38, n. 6, 1938.

ELIAS, S.O.; NORONHA, T.B.; TONDO, E.C. *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 prevalence and levels on lettuce: A systematic review and meta-analysis. *Food Microbiology*, v. 84, 2019.

EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. *Estatísticas Brasil – Frangos de corte*. 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/brasil>. Acesso em: 12 jan. 2021.

ETTER, A.J.; WEST, A.M.; BURNETT, J.L.; et al. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg food isolates associated with a salmonellosis outbreak have enhanced stress tolerance capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 85, n. 16, p. 1-22, 2019.

FERRARI, R.G.; ROSARIO, D.K.; CUNHA-NETO, A.; et al. Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a meta-analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 85, n. 14, p. 1-21, 2019.

FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M.; NAYAK, R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, p. 430-440, 2009.

FORTES, T.P.; FAGUNDES, M.Q.; VASCONCELLOS, F.A. Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 71, n. 2, p. 219-227, 2012.

FREITAS NETO, O.C.; PENHA FILHO, R.A.C.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: ANDREATTI FILHO, R.L.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E.N.; et al. *Doenças das aves*. 3. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2020. p. 495-517.

GAD, A.H.; ABO-SHAMA, U.H.; HARCLERODE, K.K.; et al. Prevalence, serotyping, molecular typing, and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from conventional and organic retail ground poultry. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. 2653, p. 1-10, 2018.

GIERALTOWSKI, L.; HIGA, J.; PERALTA, V.; et al. National outbreak of multidrug resistant *Salmonella* Heidelberg infections linked to a single poultry company. *PLOS One*, v. 11, n. 9, p.1-13, 2016.

GUO, X.; VAN IERSEL, M.W.; CHEN, J.; et al. Evidence of association of salmonellae with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 7, p. 3639-3643, 2002.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; et al. Supplement 2008e2010 (no. 48) to the WhiteKauffmannLe Minor scheme. *Research in Microbiology*, v. 165, p. 526-530, 2014.

JIN, C.; GIBANI, M.M.; PENNINGTON, S.H.; et al. Treatment responses to azithromycin and ciprofloxacin in uncomplicated *Salmonella* Typhi infection: a comparison of clinical and microbiological data from a controlled human infection model. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 12, p. 1-18, 2019.

KARMAKAR, K.; NATH, U.; NATARAJA, K.N.; et al. Root mediated uptake of *Salmonella* is different from phyto-pathogen and associated with the colonization of edible organs. *BMC Plant Biology*, v. 18, n. 344, 2018.

KÉROAUNTON, A.; MARAULT, M.; LAILLER, R.; et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Subtyping Database for Foodborne *Salmonella enterica* Serotype Discrimination. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 4, n. 3, p. 293-303, 2007.

KIPPER, D.; CARROLL, L.M.; MASCITTI, A.K., et al. Genomic Characterization of *Salmonella* Minnesota Clonal Lineages Associated with Poultry Production in Brazil. *Animals*, v. 10, n. 2043, p. 1-13, 2020.

KITCHEL, B.; RASHEED, J.K.; PATEL, J.B.; et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 8, p. 3365-3370, 2009.

- KLJUJEV, I.; RAICEVIC, V.; VUJOVIC, B.; et al. *Salmonella* as an endophytic colonizer of plants - A risk for health safety vegetable production. *Microbial Pathogenesis*, v. 115, p. 199-207, 2018.
- KOTTWITZ, L.B.M.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Métodos de caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella* Enteritidis e a utilidade da técnica PFGE em estudos epidemiológicos. *Biosaúde*, v. 13, n. 1/2, p. 38-50, 2011.
- KUMAR, Y.; SINGH, V.; KUMAR, G.; et al. Serovar diversity of *Salmonella* among poultry. *Indian Journal of Medical Research*, v. 150, n. 1, p. 92-9, 2019.
- LAPUZ, R.; TANI, H.; SASAI, K.; et al. An epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis contamination in a rat-infested. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 69, n. 6, p. 649-652, 2007.
- LOURENÇO, M.C.; KURITZA, L.N.; WESTPHAL, P.; et al. Uso de probiótico sobre a ativação de células T e controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 1, p. 11-14, 2013.
- MACHADO, S.C.A.; PEREIRA, V.L.A.; AQUINO, M.H.C. Serotyping and genotyping of salmonella strains isolated from broilers, chicken carcasses before and after chilling, and frozen chicken breasts produced in the states of Mato Grosso do Sul and Santa Catarina, Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 19, n. 1, p. 135-142, 2017.
- MAGIORAKOS, A-P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 9, p. 269-281, 2012.
- MATIC, I.; RAYSSIGUIER, C.; RADMAN, M. Interspecies gene exchange in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species. *Cell*, v. 80, p. 507-515, 1995.
- MCCRACKEN, D.A. *Salmonella* Minnesota infection in Northamptonshire. *The Royal Sanitary Institute Journal*, v. 74, n. 12, p. 1091-1094, 1954.
- MEDEIROS, N.X. *Detecção molecular de Salmonella sp. em amostras avícolas*. 2013. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- MELO, R.T.; RESENDE, A.R.; MENDONÇA, E.P.; et al. *Salmonella* Minnesota de origem avícola apresenta fatores de virulência e risco potencial aos humanos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 72, n. 4, p. 1353-1362, 2020.
- MENDONÇA, E.P. *Disseminação de Salmonella sp na cadeia produtiva do frango de corte*. 2011. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- MENDONÇA, E.P.; MELO, R.T.; LALEVAIKO, P.C.; et al. Spread of the serotypes and antimicrobial resistance in strains of *Salmonella* spp. isolated from broiler. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.50, p. 515-522, 2019.
- MESQUITA, F.B. *Estimativa dos custos associados a surtos de salmonelose veiculada por produtos de origem animal para o Sistema Único de Saúde do Brasil*. 2016. 64F. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MIRIAGOU, V.; CARATTOLI, A.; FANNING, S. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes and Infection*, v. 8, p. 1923-1930, 2006.

- MONTANO, J.; ROSSIDIVITO, G.; TORREANO, J.; et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s genomic regions required for colonization of lettuce leaves. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, n. 6, 2020.
- MONTE, D.F.M.; ANDRIGHETO, C.; RIBEIRO, V.B.; et al. Highly clonal relationship among *Salmonella* Enteritidis isolates in a commercial chicken production chain, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, p. 2049-2056, 2020.
- MONTE, D.F.M.; LINCOPAN, N.; BERMAN, H.; et al. Genomic features of high-priority *Salmonella enterica* serovars circulating in the food production chain, Brazil, 2000–2016. *Scientific Reports*, v. 9, 2019.
- MONTE, D.F.M.; NETHERY, M.A.; BARRANGOU, R.; et al. Whole-genome sequencing analysis and CRISPR genotyping of rare antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovars isolated from food and related sources. *Food Microbiology*, v. 93, 2021.
- MOREIRA, N.M.; SOLA, M.C.; FEISTEL, J.C.; et al. Os mecanismos de resistência bacteriana da *Salmonella* sp. frente à utilização de antibióticos. *Enciclopédia Biosfera*, v. 9, n. 16, p. 1131-1153, 2013.
- MOREIRA, N.M.; SOLA, M.C.; FEISTEL, J.C.; et al. Os mecanismos de resistência bacteriana da *Salmonella* sp. frente à utilização de antibióticos. *Enciclopédia Biosfera*, v. 9, n. 16, p. 1131-1153, 2013.
- NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. *Acta Scientiae Veterinariae*, V. 32, N. 1, p. 47-51, 2004.
- O'BRIEN, S.J. The “decline and fall” of nontyphoidal *Salmonella* in the United Kingdom. *Clinical Infectious Diseases*, v. 56, n. 5, p. 705-710, 2013.
- O'NEILL, J. Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. 2015. Disponível em:
https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/antimicrobial_resistance/docs/amr_studies_2015_am-in-agri-and-env.pdf. Acesso em: 25 jan. 2021.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029*. 2020. Disponível em:
<http://www.fao.org/3/ca8861en/CA8861EN.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2021.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report*. 2020.
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332081/9789240005587-eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 25 jan. 2021.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. *No time to wait: securing the future from drug-resistant infections*. 2019. Disponível em: https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_EN.pdf?ua=1. Acesso em: 25 jan. 2021.
- PERIN, A.P.; MARTINS, B.T.F.; BARREIROS, M.A.B.; et al. Occurrence, quantification, pulse types, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* sp. isolated from chicken meat in the state of Paraná, Brazil. *Food Microbiology*, v. 51, p. 335-345, 2020.

- PICKLER, L. *Avaliação da resposta imunológica no trato gastrintestinal de frangos desafiados com Salmonella enterica: uso de aditivos fitogênicos e ácidos orgânicos*. 2016. 122f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- PICKLER, L.; HAYASHI, R.M.; LOURENÇO, M.C.; et al. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com Salmonella Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 1, p. 27-36, 2012.
- RANTHUM, M.A. Subnotificação e alta incidência de doenças veiculadas por alimentos e seus fatores de risco: causas e consequências no município de Ponta Grossa – Paraná. 2002. 101f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED – RASFF. *Notification list*. 2021. Disponível em: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList&StartRow=301>. Acesso em: 16 jan. 2021.
- RAU, R.B. Caracterização fenotípica e genotípica e avaliação do perfil de suscetibilidade de *Salmonella* isoladas de alimentos de origem animal no Brasil. 2019. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- RESENDE, A.R. *Fatores de patogenicidade e estudo epidemiológico de Salmonella Minnesota de origem avícola*. 2015. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- RODRIGUES, I.B.B.E.; SILVA, R.L.; MENEZES, J.; et al. High Prevalence of Multidrug-Resistant Nontyphoidal Salmonella Recovered from Broiler Chickens and Chicken Carcasses in Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 22, n. 1, p. 1-6, 2020.
- RODRIGUES, W.O.P.; FRAINER, D.M.; EDUARDO, A.S. Cadeia produtiva de frango de corte: uma análise de desempenho a partir da matriz insumo-produto de Mato Grosso do Sul. *Geosul*, v. 35, n. 76, p. 428-452, 2020.
- SANTOS, J.R.; MEZA S.K.L.; MARTINI, K.C.; et al. A importância do controle da Salmonella na cadeia produtiva de frango de corte. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 12, n. 3, p. 167-174, 2013.
- SANTOS, K.P.O.; FARIA, A.C.S.R.; SILVA, D.P.A.; et al. Salmonella spp. como agente causal em Doenças Transmitidas por Alimentos e sua importância na saúde pública: Revisão. *Pubvet*, v. 14, n. 10, p. 1-9, 2020.
- SCHMIDT, N.S.; SILVA, C.L. Pesquisa e Desenvolvimento na Cadeia Produtiva de Frangos de Corte no Brasil. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, v.56, n.3, p.467-482, 2018.
- SCHRRER, J.V.; MARCON, L.D.N. Formação de biofilme e segurança dos alimentos em serviços de alimentação. *Revista da Associação Brasileira de Nutrição*, n. 2, p. 91-99, 2016.
- SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, v. 37, p. 67-75, 1984.
- SEIFFERT, S.N.; HILTY, M.; PERRETTEN, V.; et al. Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative-organisms in livestock: an emerging problem for human health? *Drug resistance updates*, v. 16, n. 1-2, p. 22-45, 2013.

- SESTI, L. Biosseguridade em granjas de frangos de corte: conceitos e princípios gerais. In: V Simpósio Brasil Sul de Avicultura. 2004. Chapecó. *Anais...* Chapecó, 2004.
- SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 13, n. 5, 2008.
- SILVA, A.J.H.; ANJOS, C.P.; NOGUEIRA, L.S.; et al. *Salmonella* spp. um agente patogênico veiculado em alimentos. *Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica*, v. 5, n. 1, 2018.
- SILVA, Q.M. Epidemiologia molecular das salmonelas de sete estados brasileiros. 2012. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.
- SILVEIRA, L.; NUNES, A.; PISTA, A.; et al. Characterization of Multidrug-Resistant Isolates of *Salmonella enterica* Serovars Heidelberg and Minnesota from Fresh Poultry Meat Imported to Portugal. *Microbial Drug Resistant*, v. 27, n. 1, p. 87-89, 2021.
- SOUZA, A.I.S. *Análise dos perfis genômicos e de resistência à antimicrobianos de estirpes de Salmonella Heidelberg*. 2019. 65f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- STEINEBRUNNER, N.; SANDIG, C.; ZIMMERMANN, S.; et al. *Salmonella enterica* serovar Minnesota urosepsis in a patient with Crohn's disease in the absence of recent or current gastrointestinal symptoms. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, p. 1360-1362, 2013.
- TACCONELLI, E.; CARRARA, E.; SAVOLDI, A.; et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet*, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, E.V.; et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. In: *Microbiologia*. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Cost Estimates of Foodborne Illness*. 2014. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses/cost-estimates-of-foodborne-illnesses/#Pathogen>. Acesso em: 16 jan. 2020.
- USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Production, Supply and Distribution - Custom Query*. 2020. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- VIEIRA, M.A.M. Ilhas de patogenicidade. *O mundo da saúde*, v.33, n. 4, p. 406-414, 1995.
- VOILA, M.; TRICHES, D. *A cadeia de carne de frango: uma análise dos mercados brasileiro e mundial de 2002 a 2010*. 2013. Disponível em: https://www.uces.br/site/midia/arquivos/TD_44_JAN_2013_1.pdf. Acesso em: 12 jan. 2021.
- VOSS-RECH, D.; POTTER, L.; VAZ, C.S.L.; et al. Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella* Isolated from Human and Poultry-Related Samples in Brazil: 20-Year Meta-Analysis. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 14, n. 2, p. 116-124, 2017.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C.S.L.; ALVES, L.; *et al.* A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. *Poultry Science*, v. 94, n. 3, p. 433-441, 2015.

WANG, H.; HOFFMANN, M.; LAASRI, A.; *et al.* Complete Genome Sequence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Minnesota strain. *Genome Biology*, v. 9, n. 10, p. 2727-2731, 2017.