

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

LEONARDO SESTAK

**Avaliação da disseminação de *Salmonella* Senftenberg isoladas de diversos
ambientes avícolas utilizando a técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis***

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira
São José do Rio Preto – SP
2013

LEONARDO SESTAK

**Avaliação da disseminação de *Salmonella* Senftenberg isoladas de diversos ambientes
avícolas utilizando a técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis***

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Mara Corrêa Lelles Nogueira
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Maria Teresa Destro
Universidade de São Paulo

Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Vidotto
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 16 de outubro de 2013

Sestak, Leonardo.

Avaliação da disseminação de Salmonella Senftenberg isoladas de diversos ambientes avícolas utilizando a técnica de Pulsed Field Gel Electrophoresis / Leonardo Sestak. -- São José do Rio Preto, 2013
59 f. : il.

Orientador: Mara Corrêa Lelles Nogueira

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia veterinária. 2. Salmonelose em frango de corte - São Paulo (Estado) 3. Salmonella Senftenberg. 4. Eletroforese em campo pulsátil. I. Nogueira, Mara Corrêa Lelles. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 579.62

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

Dedico

Ao meu pai,

José Francisco Sestak, por sempre acreditar que eu conquistaria os meus ideais...

Ao meu filho Emanuel, pois a espera por sua chegada foi marcada por todas as etapas deste estudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos e me fortalecer na luta por meus sonhos.

À minha esposa Cíntia, meu grande amor, tão companheira e sempre apoiando em minha carreira com paciência e orgulho.

À minha família, que sempre me incentivou a aproveitar as oportunidades do mundo. Amo muito vocês!

À empresa Cobb-Vantress Brasil Ltda, uma grande escola, onde se aprende a trabalhar da maneira séria, ética e esbanjando profissionalismo.

Aos meus líderes e amigos Paulo Raffi, Jairo Arenázio e Joe Schultz que tanto acreditaram e continuam me apoiando em minha formação pessoal e profissional. Devo muito a vocês!

Aos colegas e amigos do laboratório da Cobb, Márcio Gereti, Carol Pupin, Luis, Andrea, Camila e Gláucia pela colaboração e apoio durante a execução deste trabalho. Marcela, muito obrigado também! Seus esforços e apoio foram imprescindíveis!

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira, pela oportunidade e ensinamentos. Muito obrigado por me orientar e ter tido paciência comigo. Você é um exemplo de sabedoria!

Aos membros da banca examinadora, que aceitaram corrigir este trabalho, adicionando experiência e conhecimento.

Ao Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira, por ceder o Laboratório de Pesquisa em Virologia para a realização de grande parte deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Margarete Teresa Gottardo de Almeida, que pelo seu entusiasmo, me motivou a iniciar esse projeto.

Aos amigos Tiago Casella e Mayra Mataruco, por sua grande contribuição neste trabalho, sempre com muita disposição e companheirismo. O que vocês fizeram foi inestimável!

À Juliana Tiemi, Simone Quintão e à Evelin Rodrigues, que auxiliaram em várias etapas deste projeto.

Aos professores da Pós-Graduação, por contribuírem para o meu enriquecimento acadêmico.

Aos amigos Gustavo Santos e Juliana Ribeiro pela forte amizade e pelos vários momentos de descontração no trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do IBILCE/UNESP, que sempre orientaram com paciência os passos a serem tomados.

À UNESP, pela formação acrescentada durante este período de Pós Graduação.

À FAMERP, pelo espaço amplamente utilizado durante o desenvolvimento do projeto.

Agradeço, por fim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste projeto.

RESUMO

Nos últimos anos, a emergência de *Salmonella* Senftenberg no ambiente de granjas de frango tornou-se causa de preocupação, pois este sorotipo, além de ser um potencial agente de paratifo aviário em condições de estresse, tem sido associado a diversos casos de infecções humanas. Acredita-se que sua ampla disseminação seja resultado da capacidade de formar biofilmes, resistir à desidratação, acidez, temperaturas elevadas e radiação, além de permanecer por longos períodos no ceco das aves, na ração e no ambiente. Devido a estas peculiaridades, o controle de *Salmonella* Senftenberg é um desafio para a avicultura e exige a adoção de medidas de controle baseadas no conhecimento das rotas de disseminação e na biologia do micro-organismo. Neste estudo, a disseminação de *Salmonella* Senftenberg em granjas de frango, localizadas na região noroeste do estado de São Paulo, foi avaliada usando a tipagem molecular pela técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Os dados epidemiológicos foram utilizados como ferramenta auxiliar para a comparação dos perfis de PFGE das cepas. As *Salmonella* Senftenberg isoladas de ingredientes de ração, ambiente de fábrica de ração, aves, ambiente dos aviários e de animais provenientes dos arredores de granjas avícolas, apresentaram diferentes identidades genéticas, indicando a transmissão de genótipos distintos entre as várias localidades.

Palavras-chave: frango, disseminação, *Salmonella* Senftenberg, PFGE.

ABSTRACT

In the last years, *Salmonella* Senftenberg has become an emerging pathogen affecting broiler farm's environment and figuring many concerns. In addition to be considered as potential agent of avian paratyphoid under stress conditions, this serotype has been associated to vast cases of human infections. It is supposed its wide dissemination is due to the capacity to produce biofilm, resist to dehydration, lower pH, high temperatures and radiation, and remain for long periods in the bird ceca, feed and environment. Because of these peculiarities, *Salmonella* Senftenberg control shows as a challenge for the poultry industry and requires the adoption of many procedures based on understanding its dissemination routes and biological cycle. In this study, *Salmonella* Senftenberg spread in broiler farms located in the northwestern part of São Paulo State was assessed using molecular typing by PFGE. The epidemiology data was used as an extra tool for strain comparison. *Salmonella* Senftenberg isolated from feed ingredients, feed mill environment, birds, poultry houses and wildlife surround poultry facilities, showed different genetic identities, indicating transmission of different genotypes between various locations.

Keywords: broiler, dissemination, *Salmonella* Senftenberg, PFGE.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da placa com ágar MSR/V após multiplicação bacteriana.....	26
Figura 2 – Exemplos de valores de Ct e temperatura de desnaturação de amostras positivas para <i>Salmonella</i>	27
Figura 3 – Dendrograma com os perfis de PFGE de 53 <i>Salmonella</i> Senftenberg.....	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – <i>Primers</i> usados para a detecção de <i>Salmonella</i>	26
Quadro 2 – Descrição das cepas de <i>Salmonella</i> Senftenberg utilizadas neste estudo.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI – *Brain Heart Infusion*

C_t – *Cycle threshold*

DEPC – *Diethylpyrocarbonate*

DNA – *Ácido desoxirribonucléico*

dNTP – *Desoxynucleoside Triphosphate*

EMB – *Eosin Methylene Blue Agar*

FAMERP – *Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto*

LIA – *Lysine Iron Agar*

MSRV – *Ágar Rappaport-Vassiliadis Modificado*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

q.s.p. – *Quantidade suficiente para*

RNase – *Enzima que degrada o RNA*

SIM – *Teste de H₂S, indol e motilidade*

TGI – *Trato gastro intestinal*

TSI – *Triple Sugar Iron*

TSB – *Tryptic Soy Broth*

UPGMA – *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*

XLD – *Xylose-Lysine Deoxycholate Agar*

LISTA DE SÍMBOLOS

G – força gravitacional

g – gramas

°C – graus Celsius

kb – kilobases

Kg – kilogramas

µg – microgramas

mg – miligramas

µL – microlitros

mL – mililitros

pb – pares de base

pmol – picomol

rpm – rotações por minuto

U – unidade

V/cm – voltagem total dividida pela distância, em centímetros, entre os eletrodos

X – quantidade de vezes que uma solução está concentrada em relação à concentração final

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	13
1.1 A importância de <i>Salmonella</i> spp.	14
1.2 <i>Salmonella enterica</i> subspécie <i>enterica</i> sorovar Senftenberg (<i>S. Senftenberg</i>).....	16
1.3 Aplicação das Técnicas de Biologia Molecular para a Tipagem e Estudo das Rotas de Disseminação.....	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Coleta de amostras	23
3.2 Detecção de <i>Salmonella</i> Senftenberg.....	25
3.3 Manutenção das cepas.....	27
3.4 Tipagem molecular	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Tipagem molecular de <i>Salmonella</i> Senftenberg	31
5 CONCLUSÕES	40
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
7 ANEXOS.....	55
7.1 Procedimentos de <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE).....	55
7.1.1 Preparação dos <i>plugs</i> com o DNA bacteriano.....	55
7.1.2 Limpeza do material utilizado	56
7.1.3 Digestão do DNA bacteriano com enzimas de restrição.....	56
7.1.4 Preparação do gel de agarose	57
7.1.5 Como ligar o aparelho e correr o gel de agarose	58

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil é o maior exportador de carne de aves do mundo e vem conquistando novos e exigentes mercados (BRASIL, 2012). Sendo assim, por motivos comerciais e de saúde pública, é importante a adesão às recomendações para a garantia da inocuidade deste alimento, através do cumprimento dos critérios estabelecidos para controle dos processos de produção e das medidas sanitárias aplicadas à avicultura, particularmente no controle de agentes infecciosos (WHO, 2001; FARIA et al., 2009).

Neste contexto, destacam-se as infecções causadas por *Salmonella* spp., denominadas salmoneloses, que são veiculadas por uma grande diversidade de fontes, e estão entre as principais doenças infecciosas adquiridas através do consumo de alimentos em todo o mundo (MEAD et al., 1999). Entre os produtos de origem animal, as carnes de aves e seus derivados são os principais veículos dessas infecções. Este fato é resultado da complexa epidemiologia de *Salmonella* spp. na avicultura e constitui um desafio para a cadeia produtiva de carnes de aves, no que diz respeito à adoção das medidas necessárias para a prevenção e controle da disseminação desse gênero de bactérias (OLIVEIRA & SILVA, 2000; SANTOS et al., 2002; CIANFLONE, 2008).

Para o controle das populações de *Salmonella* spp. nas aves e no ambiente de criação, são adotadas medidas de biossegurança, tais como a aquisição de aves, rações e matérias-primas livres de *Salmonella*; o uso de ácidos orgânicos e peletização da ração; o uso de produtos de exclusão competitiva; além da imunização com vacinas vivas ou inativadas oleosas (bacterinas) (MOURA, 2007).

Nos últimos anos, a emergência de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Senftenberg (*S.* Senftenberg) no ambiente de granjas de frango tornou-se causa de preocupação (BOUMART et al., 2012; SHIROTA et al., 2012), pois este sorotipo, além de ser um potencial agente de paratifo aviário em condições de estresse, tem sido associado a diversos casos de infecções humanas (HENDRIKSEN et al., 2013). Acredita-se que sua ampla disseminação seja resultado da capacidade de formar biofilmes, resistir à desidratação, baixos valores de pH, temperaturas elevadas e radiação, além de permanecer no ceco das aves, na ração e no ambiente por longos períodos (PEDERSEN et al., 2008; MARIN et al., 2009).

1.1 A importância de *Salmonella* spp.

Salmonella spp. são bacilos Gram-negativos da família Enterobacteriaceae, anaeróbios facultativos, catalase-positivos, oxidase-negativos, redutores de nitratos e nitritos, não formadores de esporos, mesófilos com crescimento ótimo entre 35 °C e 37 °C, mas capazes de crescer em temperaturas variando entre 2 e 47 °C (LE MINOR, 1994). A motilidade é propiciada por flagelos peritríquios, com exceção da *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Pullorum e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum, que não apresentam flagelos (FRANCO & LANGRAF, 1996; JAY, 2000; FORSHELL & WIERUP, 2006).

Foram descritas, pela primeira vez, há mais de um século pelo patologista Salmon, sendo esta a origem da nomenclatura (SALMON & SMITH, 1886). Posteriormente, a taxonomia de *Salmonella* foi modificada várias vezes ao longo dos anos. De acordo com o sistema proposto por Popoff e colaboradores (1995), o gênero *Salmonella* consiste de duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo que a primeira inclui seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*).

A complexa constituição antigênica de *Salmonella* spp. é utilizada para a classificação sorológica, baseada nas diferenças entre os antígenos somáticos, denominados “O”, antígenos flagelares, denominados “H” e antígenos capsulares, denominados “K” (KAUFFMANN, 1972; STERZO et al., 2008). Mais de 2500 sorotipos foram descritos, sendo que alguns são designados por um nome, normalmente derivado do local do primeiro isolamento e outros por uma fórmula. Quando um nome é adotado, geralmente o epíteto específico e o nome da subespécie são omitidos; por exemplo, o termo *Salmonella* Typhimurium frequentemente utilizado, corresponde à *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium (CIANFLONE, 2008).

As salmoneloses apresentam gravidade que varia desde as gastroenterites (quadro autolimitado de diarreia, cólicas abdominais e febre), até a febre entérica, denominação geral para as febres tifóide e paratifoide (forma sistêmica e mais agressiva, causadas por *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi, respectivamente) (VOETSCH et al., 2004; ANDREATTI FILHO, 2006; GRIMONT & WEILL, 2007; FRICKE et al., 2009; SCALLAN et al., 2011).

Até meados dos anos 80, *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi eram os principais causadores de infecção em humanos (D’ Aoust, 1989), sendo que a maioria dos casos era causada pelo consumo de água contaminada, com raras descrições de ocorrências causadas por alimentos (CHRISTENSON & ANDERSON, 1985). Ambos os sorotipos são

caracterizados por elevada virulência, que lhes permite invadir a mucosa intestinal, sobreviver e reproduzir-se no interior de células do sistema imunológico e usar os sistemas linfático e sanguíneo para disseminação, resultando em septicemia (D'AOUST, 2000).

Atualmente, os mais importantes agentes de salmonelose em todo o mundo estão entre os 1531 sorotipos conhecidos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (GRIMONT & WEILL, 2007). Entre eles, destaca-se a *Salmonella* Enteritidis, que emergiu na década de 90 como o mais importante agente de salmonelose. Este fenômeno é resultado da capacidade de transmissão transovariana desse sorotipo entre aves de granja, desencadeando o nascimento de pintos infectados. Além disso, a globalização da economia com a grande movimentação de alimentos através do mundo contribuiu para a pandemia (FSIS, 1998). No Brasil, *S. Enteritidis* é também o principal sorotipo isolado em alimentos associados a casos de infecção de origem alimentar (ALMEIDA et al., 2000).

Na avicultura comercial, as salmoneloses estão entre as principais infecções que afetam as aves, sendo responsáveis por prejuízos diretos ou indiretos à produção avícola, além da importância que possuem na saúde pública (BERCHIERI JÚNIOR et al., 2001; BUCHALA et al., 2006). O tifo aviário, a pulorose e o paratifo aviário são as salmoneloses que acometem as aves. De forma geral, as duas primeiras são consideradas infecções de maior gravidade, com quadro sistêmico que resulta em alta mortalidade (BERCHIERI JÚNIOR, 2000). O tifo aviário é causado pela *Salmonella* Gallinarum, principalmente aves adultas, causando septicemia aguda, alta mortalidade e morbidade. A pulorose é causada pela *Salmonella* Pullorum e se caracteriza por septicemia, quadro de diarreia branca e mortalidade, sendo mais comum em aves jovens (POMEROY & NAGARAJA, 1991; SHIVAPRASAD, 1997; BERCHIERI JÚNIOR, 2000). O paratifo aviário caracteriza-se usualmente pela presença de *Salmonella* sp. no TGI de aves, sem sinais clínicos e sem comprometimento da produtividade dos lotes. Vários sorotipos de *Salmonella* estão associados a esta enfermidade, sendo a *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* os mais comuns, mas outros, como *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg* e *S. Senftenberg* também são identificados como agente etiológico (BERCHIERI JÚNIOR & NETO, 2009).

Os sorotipos associados ao paratifo aviário não são específicos somente de galinhas (*Gallus gallus*), sendo isolados de diversas fontes, tais como ambiente e ração contaminada, além de possuírem reservatórios em diferentes espécies animais, incluindo outras aves, mamíferos e répteis. Esta ecologia permite uma eficiente cadeia de transmissão horizontal, o

que torna a relação entre os sorotipos causadores de paratifo aviário e as aves bastante complexa e de difícil controle (BERCHIERI JÚNIOR & NETO, 2009).

Em um plantel de frango, as rotas de introdução de diferentes sorotipos de *Salmonella* incluem: i) a transmissão vertical, a partir de lotes de matrizes infectadas, ii) o meio ambiente, inclusive roedores infectados e iii) ração contaminada (KAMPELMACHER, 1987; PEREIRA et al., 1999). Nesta última, os principais veiculadores de *Salmonella* spp. são as matérias primas de origem animal, mas ingredientes de origem vegetal também são importantes carreadores, assim como pássaros, roedores e moscas, que entram em contato com a ração principalmente durante a armazenagem (BERCHIERI JÚNIOR & NETO, 2009).

Durante o abate das aves, as *Salmonella* spp. contidas no TGI, inclusive os diferentes sorotipos causadores do paratifo aviário, podem contaminar a carcaça e causar infecções em humanos, após a transmissão via cadeia alimentar (SNOEYENBOS & WILLIAMS, 1991; MATSUBARA, 2005). Isso torna o paratifo aviário um problema sanitário na cadeia produtiva de carne de frango e de outras aves, mas apesar de sua importância, esta condição nem sempre é diagnosticada, a menos que um cuidadoso programa de monitoramento seja efetuado. Diante deste fato, é necessário adotar medidas para evitar tanto a transmissão vertical quanto a horizontal de diferentes sorotipos de *Salmonella* entre aves para exploração comercial (SILVA, 1989; TESSARI et al., 2003).

1.2 *Salmonella enterica* subspécie *enterica* sorovar Senftenberg (*S. Senftenberg*)

As *Salmonella* são classificadas em sorogrupos, de acordo com a presença de fatores antigênicos presentes em sua parede celular que são representados pelas letras do alfabeto e por números. A *Salmonella enterica* subspécie *enterica* sorovar Senftenberg (*S. Senftenberg*) pertence ao grupo E4 e apresenta classificação antigênica somática O: 1, 3, 19 e flagelar H: g, s, t (GRIMONT & WEILL, 2007). Historicamente, *S. Senftenberg* era reconhecida como um sorotipo comum em incubatórios, que desaparecia gradualmente ao longo do crescimento das aves. Em aves adultas, observava-se o gradual desaparecimento deste sorotipo, em função da presença de uma microbiota competidora complexa no TGI, associada ao desenvolvimento do sistema imunológico das aves (HAMADA et al., 1959; HUME et al., 2003). Apenas em circunstâncias de estresse, *S. Senftenberg* era identificada como agente do paratifo aviário, contribuindo para mortalidade subsequente, sendo, neste contexto, reconhecido como

patógeno em aves, apesar de sua baixa virulência (HUGE-JONES, 1969; CDC, 2006; HU & COBURN, 2008).

Nos últimos anos, esta realidade tem se alterado, e a capacidade de algumas cepas de *S. Senftenberg* em persistir no ceco das aves durante todo o período de criação tem sido relatada (BOUMART et al., 2012). Esta capacidade de persistência tem sido evidenciada pelo aumento na frequência de detecção deste sorotipo na avicultura e do risco para a saúde dos consumidores de carne de aves e derivados, o que é evidenciado pelo aumento do número de casos de infecção em humanos tanto na comunidade quanto em hospitais (KAY et al., 2007; XU et al., 2008; HENDRIKSENET al., 2013). No Brasil, existem poucos relatos do isolamento de *Salmonella* Senftenberg tanto a partir de frangos quanto de seres humanos. Dados do Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), que avaliou a presença de *Salmonella* spp. em carnes de frango entre 2004 e 2006, revelaram baixa prevalência deste sorotipo (BRASIL, 2008).

No ambiente de granjas avícolas e em fábricas de ração, *S. Senftenberg* encontra-se amplamente disseminada entre aves, equipamentos, ingredientes e linhas de produção de ração, sendo de difícil eliminação (PEDERSEN et al., 2008). Isso se deve ao fato deste sorotipo apresentar resistência a elevadas temperaturas, desidratação, acidez e radiação, o que permite sua sobrevivência mesmo quando submetidas aos tratamentos térmicos e outras técnicas de controle da contaminação (ANELLIS et al., 1954; NG et al., 1969; PEDERSEN et al., 2008). Em um estudo sobre inativação térmica de *Salmonella* spp. em carnes de frango, a *S. Senftenberg* foi o sorotipo que apresentou maior resistência às temperaturas elevadas, quando comparada a *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Mission*, *S. Montevideo* e *S. California* (MURPHY et al., 2001). Em outro estudo, para a validação da pasteurização de ovos líquidos, a redução logarítmica da população de *Salmonella* Senftenberg foi significativamente menor que a observada para *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (MAÑAS et al., 2003). A resistência a desinfetantes observada em algumas cepas de *Salmonella* Senftenberg é associada à capacidade de formação de biofilmes (MORETRO et al., 2009).

No Brasil existem poucos dados relacionados ao isolamento de *Salmonella* Senftenberg em ambientes de criação de aves, carnes, e tampouco sobre a ocorrência de casos de infecção em humanos. Entretanto, devido à frequência de isolamento deste sorotipo nas granjas estudadas, consideramos importante investigar seu perfil de disseminação.

1.3 Aplicação das técnicas de biologia molecular para a tipagem e estudo das rotas de disseminação

A tipagem molecular, também descrita como genotipagem comparativa, é baseada na variação genética encontrada entre diferentes cepas de uma mesma espécie. Essa característica genética permite a realização de estudos de filogenia e epidemiologia molecular para a identificação e o monitoramento da distribuição de micro-organismos. O conhecimento destas informações facilita a implementação de medidas de controle da disseminação e, no caso de micro-organismos resistentes a antimicrobianos, pode orientar além dos procedimentos para o controle da disseminação, a conduta da terapia antimicrobiana, de forma a aumentar sua eficiência e reduzir a prevalência de clones resistentes (RICE et al., 1996; RICE, 1999; RAHAL et al., 1998; PATERSON et al., 2000).

Entre os diversos métodos para a tipagem molecular de patógenos bacterianos descritos (PFALLER et al., 2001), a análise do perfil de restrição do DNA cromossômico através da eletroforese em campo pulsátil (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE), desenvolvida por Schwartz e Cantor (1984), é o método mais utilizado em programas de vigilância no Brasil e no exterior (SADER, 2000; PFALLER et al., 2001). Essa técnica apresenta grande poder discriminatório e aplicabilidade para a tipagem da maioria das bactérias patogênicas (HOLLIS et al., 1999).

O PFGE é considerado o “padrão ouro” para a genotipagem comparativa de *Salmonella* spp. Nesta técnica, são usadas enzimas de restrição que reconhecem sítios infrequentes no genoma bacteriano, e a variabilidade no posicionamento dos sítios de restrição entre diferentes cepas gera um polimorfismo no número e tamanho de fragmentos, o que permite a discriminação genética (CARLE et al., 1986; AUSUBEL et al., 1994; CHANG & CHUI, 1998; ROBERTS et al., 1998). A aplicação da PFGE para a tipagem de *Salmonella* spp. isoladas durante surtos de infecções de origem alimentar, bem como para o estudo da disseminação de diversos sorotipos em ambientes de produção de aves, tem sido de grande auxílio para o estabelecimento de procedimentos que visem melhorar a segurança dos alimentos. A PFGE também tem auxiliado no estabelecimento de medidas de biossegurança em ambientes avícolas (LYNNE et al., 2009; CAMPIONI et al., 2012; SON et al., 2013).

Quando há detecção de *Salmonella* spp., torna-se importante conhecer dados epidemiológicos, como o perfil de disseminação e as formas de transmissão. Neste contexto, a análise microbiológica é uma ferramenta importante que permite o isolamento e a identificação do gênero nos diversos pontos da cadeia produtiva. Além disso, a utilização das

técnicas de biologia molecular para a genotipagem e posterior comparação da similaridade genética entre os isolados permite realizar o rastreamento dos reservatórios e das fontes de contaminação, além da visualização da transmissão entre lotes de animais. Estas ferramentas são de grande utilidade para o controle de *Salmonella*, pois geram dados que podem ser utilizados para o delineamento e estabelecimento das medidas de controle adequadas.

Devido às peculiaridades de *S. Senftenberg*, seu controle é um desafio para a avicultura, e exige a adoção de medidas de controle baseadas no conhecimento das rotas de disseminação e na biologia do microrganismo.

Neste estudo, *S. Senftenberg* isoladas em granjas de frango, localizadas na região noroeste do estado de São Paulo, foram avaliadas para a identificação da similaridade genética através da técnica de PFGE, de forma a permitir a visualização de suas rotas de disseminação. Esta bactéria tem sido isolada com frequência a partir de amostras de ambiente, ração e fezes dos animais, apesar da adoção de procedimentos rígidos de biossegurança. Os resultados gerados serão utilizados para a prevenção e controle da contaminação e infecção dos lotes e no planejamento de programas de segurança animal, com impactos positivos tanto para a cadeia produtiva de carne de frango quanto para a saúde pública.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a diversidade genética das cepas de *Salmonella* Senftenberg isoladas de ingredientes de ração, ambiente de Fábrica de Ração, amostras de aviários e da fauna ao redor de granjas avícolas utilizando a técnica de PFGE.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar a similaridade genética entre as cepas de *Salmonella* Senftenberg isoladas e determinar suas rotas de disseminação.
- Determinar a interação entre a fauna ao redor das granjas com o ambiente das mesmas.
- Avaliar a capacidade discriminatória de PFGE como ferramenta de avaliação da rota de disseminação de cepas de *S. Senftenberg* em ambientes avícolas.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras

No período de dezembro de 2008 a fevereiro de 2012 foram coletadas amostras para monitoramento de *Salmonella* spp. em ambientes de fábrica de ração e granjas de aves de corte na região noroeste de São Paulo. As granjas de frango envolvidas neste estudo foram denominadas Granjas A, B, C, D, E, G, H e J. Em cada granja temos de três a seis setores distribuídos pela propriedade. Cada setor é formado por dois aviários ou galpões que são isolados por um cerca de alambrado. Dentro dos aviários de cada setor, estão alojados os vários lotes de aves de diferentes idades. A ração que alimenta as aves das oito granjas é fornecida por uma única fábrica de ração.

Também foram coletadas amostras de fezes e vísceras de animais silvestres da fauna ao redor das granjas. O ambiente do laboratório que realizou os testes de isolamento de *Salmonella* spp. foi monitorado com intuito de verificar possível contaminação cruzada entre as amostras. Os materiais necessários para coleta de amostras foram luvas de látex estéreis, suaves estéreis do tipo pró-pé, bolsa plástica estéril, tesouras e pinças estéreis para necropsia, canetas de tinta permanente para identificação das amostras, caixa de isopor para transporte e *packs* de gelo.

Na fábrica de ração foram coletadas, semanalmente: i) amostras de 25 g de farelo de soja; ii) suabe do piso externo à área de produção; iii) suabe das ratoeiras; iv) suabe da área de manutenção (piso, bancadas e ferramentas); v) 25 g de pó de ração presente na área de expedição de ração, vi) suabe de arrasto da área de expedição; vii) suabe do ciclone (equipamento que promove a limpeza de resíduos e pó presentes no milho); viii) suabe da prensa de peletização e ix) suabe de superfície da peletizadora, equipamento que realiza o tratamento físico do alimento através de exposição a altas temperaturas (entre 82 °C a 85 °C, por 1 minuto e 47 segundos) e a pressão (passagem da ração pelos furos da matriz da prensa) durante o processo de peletização, no qual o produto acabado se apresenta na forma de *pellet*. Em cada local amostrado foi utilizado um suabe pró-pé estéril, esfregando-o vigorosamente em toda superfície dos equipamentos e piso.

Nas granjas foram coletados, mensalmente: i) dois suabes de cama; ii) um suabe de equipamento; iii) um suabe de composteira; iv) uma bolsa plástica com 25 g de fezes de aves; v) uma bolsa de 25 g de poeira e vi) um *pool* de cecos por galpão. Os suabes de cama foram realizados utilizando um pró-pé estéril calçado sobre botas estéreis, e caminhando, principalmente, entre os comedouros e bebedouros. Nestes locais estava a maior concentração de aves e, por isso, havia uma maior quantidade de fezes ao longo do galpão. O suabe de equipamento foi passado vigorosamente na superfície dos bebedouros, comedouros, cortinas e telas dos aviários. Amostras de fezes de aves e poeira do galpão foram coletadas em dez pontos diferentes do aviário, totalizando a quantidade de, aproximadamente, 25 gramas por bolsa estéril. As amostras de ceco foram coletadas através de necropsia de aves mortas naturalmente (mortalidade diária normal), utilizando tesouras e pinças estéreis. Adicionalmente, foi coletado um suabe da superfície do veículo que transporta os resíduos da composteira.

Para verificar a presença de *Salmonella* spp. ao redor dos aviários, foram coletadas: i) 25 g de fezes de gato do mato; ii) um *pool* de vísceras de rato; iii) um *pool* de vísceras de seriema e iv) um *pool* de vísceras de sapo. As vísceras foram coletadas através de necropsia dos animais, que foram encontrados mortos ao redor dos galpões e em estágio inicial de decomposição.

Durante o período de vazio sanitário da granja, que consiste no tempo em que os galpões passam por um processo de higienização, também foram coletados: i) um suabe de ambiente do galpão e ii) 25 g de resíduo de cama remanescente do lote anterior.

No laboratório de análises foram coletados, semanalmente: i) um suabe de piso; ii) um suabe de bancada e iii) um suabe da superfície interna das estufas de cultura microbiológica. Durante as coletas, os materiais foram devidamente identificados e colocados em bolsas estéreis de coleta.

Os materiais coletados foram armazenados em caixa de isopor lacrada contendo *packs* de gelo (temperatura entre 4-10 °C) e imediatamente, transportados para o Laboratório de Microbiologia da empresa, onde foram submetidas aos procedimentos para o isolamento de *Salmonella* spp.

3.2 Detecção de *Salmonella* Senftenberg

Para a detecção de *Salmonella* spp. foram utilizados os “Métodos Oficiais para Análises Microbiológicas de Enfermidades Avícolas”, recomendados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento do Brasil (MAPA, 2006) e pela ISO 6579:2000, com modificações. As amostras foram inoculadas com meio de enriquecimento seletivo, utilizando o caldo Tetrionato (*Oxoid – Hampshire*, Inglaterra), acrescido de solução de iodo e solução aquosa de Verde Brilhante a 0,1% e incubadas a 37 °C, durante 24 horas. O segundo enriquecimento seletivo foi realizado com ágar semissólido *Rappaport-Vassiliadis* Modificado (MSRV) (*Oxoid – Hampshire*, Inglaterra), no qual foram inoculados 50 µL de solução de caldo Tetrionato e incubado a 41 °C, durante 24 horas. O isolamento foi realizado utilizando-se o ágar Cromogênico *Brilliance Salmonella* (*Oxoid – Hampshire*, Inglaterra) e o ágar Verde Brilhante (*Oxoid – Hampshire*, Inglaterra) (SILVA et al., 2010), que foram incubados a 37 °C, durante 24 horas. Foram feitos os testes confirmatórios através de PCR (PCR em Tempo Real) para salmonela e triagem bioquímica utilizando os meios TSI (*Triple Sugar Iron*), LIA (*Lysine Iron Agar*), SIM (teste de H₂S, indol e motilidade) e caldo uréia. Os meios de triagem bioquímica foram incubados a 37 °C, durante 24 horas. As amostras foram processadas utilizando controles negativo e positivo. Para o controle positivo foi utilizada uma cepa padrão de *S. Banana* (grupo B), que é um sorotipo incomum para avicultura.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada de acordo com o protocolo padronizado por Charlton e colaboradores (2005) com modificações adotadas pelo Laboratório de Microbiologia da empresa. As amostras foram coletadas a partir do 2º enriquecimento seletivo (MSRV), após incubação de 24 horas. A extração de DNA foi feita a partir de bactérias que se multiplicaram em cada quadrante da placa com o meio MSRV. Utilizando uma alça de inoculação de 1 µL, foi feito um “X” no local onde houve multiplicação bacteriana (**Figura 1**). Em seguida, a alça foi mergulhada no tubo com água DEPC (dietil pirocarbonato) e lavada com cuidado. O DNA das amostras foi extraído em microtubos de polipropileno, contendo 400 µL de água DEPC.

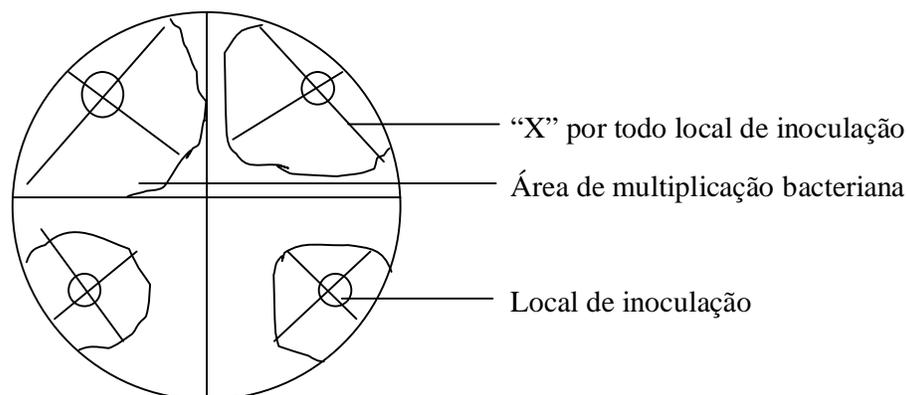


Figura 1 - Esquema da placa com ágar MSRV após multiplicação bacteriana.

Posteriormente, os tubos foram fechados e incubados durante 10 minutos em termobloco, a 100 °C. Em seguida, foram colocados no refrigerador a 4 °C, durante 5 minutos. A *master mix* foi preparada em tubo âmbar e os *primers* utilizados tiveram como alvo o gene *invA* (**Quadro 1**). Após homogeneizar os reagentes da PCR, foram transferidos 6 µL de *master mix* para cada poço da placa de 96 *wells* de PCR e mantidos no bloco frio durante a pipetagem. A placa foi coberta com papel toalha e transferida para sala de extração de ácido nucléicos, onde foram pipetados 4 µL de cada amostra em seu respectivo poço, usando uma ponteira com filtro para cada amostra. Para as amostras controles, foram pipetados 4 µL de controle interno da *master mix* em seu respectivo poço. A placa foi selada e centrifugada por aproximadamente 10 segundos para que todo o líquido se concentrasse na parte inferior do poço.

Quadro 1: *Primers* usados para a detecção de *Salmonella*.

Alvo	Sequência do primer	Referência
<i>invA</i>	F - 5' AAA CGT TGA AAA ACT GAG GA 3' R - 5' TCG TCA TTC CAT TAC CTA CC 3'	Hoorfar et al., 2000

Em seguida, a placa foi levada à sala de amplificação de ácido nucléicos e colocada em termociclador *Realplex⁴ Mastercycler* (*Eppendorf*), onde foram configurados a placa e os ciclos, como se segue. O DNA foi inicialmente desnaturado a 95 °C, durante 3 minutos e submetido a 40 ciclos, com as etapas de desnaturação a 95 °C, durante 10 segundos,

anelamento e extensão a 57 °C, durante 30 segundos e *Melt Curve* (Curva de Desnaturação do DNA) de 65 °C a 95 °C, em incrementos de 0,5 °C, durante 5 segundos. Usando como controle positivo uma cepa padrão de *Salmonella*, as cepas com a temperatura de *melting* (desnaturação) por volta de 80 °C foram consideradas como pertencentes ao gênero, pois essa temperatura varia entre os taxa bacterianos e é específico de cada um. Portanto, a análise dos resultados foi feita registrando as temperaturas de desnaturação e os valores de C_t (*Cycle Threshold*) das amostras positivas e dos controles positivos. As amostras com temperatura de desnaturação de 79 °C a 81 °C e C_t inferior a 30 foram consideradas positivas (**Figura 2**).

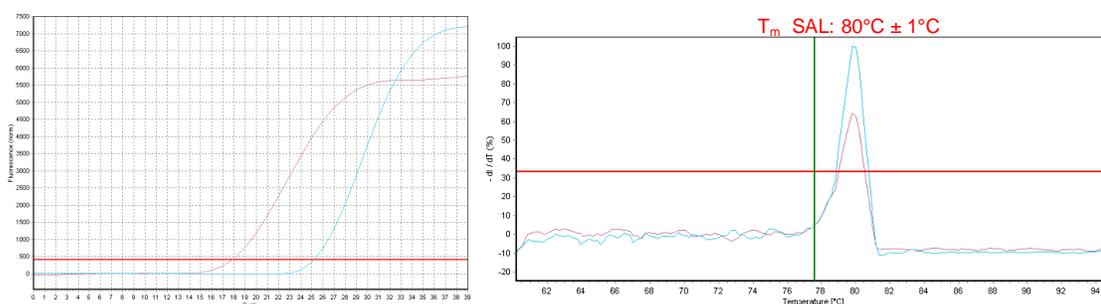


Figura 2. Exemplos de valores de C_t e temperatura de desnaturação de amostras positivas para *Salmonella*.

Os testes foram concluídos através da sorotipificação de *Salmonella* a partir de colônias repicadas em ágar nutriente utilizando antissoros somáticos e flagelares polivalentes e monovalentes de acordo com o Esquema *Kauffmann & White*. As colônias analisadas foram testadas utilizando os antissoros PolyA-S+Vi, PolyH, O:1,3,19, O:19, H:g, H:s e H:t (*Statens Serum Institute* – Copenhague, Dinamarca) e antissoros controles O:4,5; O:9 e H:d (*Statens Serum Institute* – Copenhague, Dinamarca). As cepas de *Salmonella* Senftenberg foram selecionadas para o presente estudo.

3.3 Manutenção das cepas

As *Salmonella* Senftenberg isoladas foram mantidas em coleção de cultura em freezer a -80 °C, no Laboratório de Microbiologia da FAMERP. Para tal, uma colônia isolada obtida das placas de ágar Verde Brilhante foi cultivada em caldo BHI (*Brain Heart Infusion, Oxoid – Hampshire*, Inglaterra) a 37 °C, durante 16 a 18 horas. Após este tempo, 0,5 mL de cada cultura foram transferidos para criotubos estéreis contendo 0,5 mL de glicerol a 50% estéril. Para cada isolado, o armazenamento foi realizado em triplicata.

3.4 Tipagem molecular por PFGE

As 53 *Salmonella* Senftenberg isoladas durante o monitoramento de granjas de aves de corte e de ambiente de fábrica de ração utilizadas neste estudo estão descritas abaixo no **Quadro 2**.

Quadro 2: Descrição das cepas de *Salmonella* Senftenberg utilizadas neste estudo.

Cepa	Data	Unidade	Material	Lote
L1	11/12/2008	Granja B	Suabe Cama	1
L2	16/12/2008	Fábrica	Suabe Piso Externo	
L3	17/12/2008	Granja B	Suabe Cama	2
L4	07/03/2009	Fornecedor	Farelo Soja	
L5	03/04/2009	Granja B	Suabe Cama	3
L6	17/04/2009	Fábrica	Suabe Ratoeira	
L7	22/04/2009	Fábrica	Suabe Área Manutenção	
L8	22/04/2009	Fábrica	Pó Expedição	
L9	12/05/2009	Granja B	Suabe Cama	4
L10	12/05/2009	Granja B	Vísceras Rato	4
L11	18/05/2009	Fábrica	Suabe Expedição	
L12	19/05/2009	Granja D	Vísceras Seriema	
L13	19/07/2009	Granja B	Fezes	14
L14	15/09/2009	Fábrica	Suabe Piso Externo	
L15	17/09/2009	Granja B	Fezes	13
L16	27/09/2009	Fábrica	Suabe Ciclone	
L17	23/11/2009	Fábrica	Suabe Ciclone	
L18	19/01/2010	Granja D	Suabe equipamento	5
L19	25/01/2010	Granja J	Suabe Composteira	
L20	27/01/2010	Granja D	Fezes	5
L21	01/03/2010	Granja E	Fezes Gato do Mato	
L22	01/03/2010	Granja H	Suabe Composteira	
L23	03/03/2010	Granja B	Suabe equipamento	6
L24	04/03/2010	Granja B	Suabe Cama	6
L25	04/03/2010	Granja H	Suabe Composteira	
L26	12/03/2010	Granja D	Suabe Cama	5
L27	16/03/2010	Granja B	Ceco	7
L28	22/03/2010	Granja H	Caminhão Resíduos	
L29	23/03/2010	Granja A	Poeira	8
L30	29/03/2010	Granja H	Suabe Composteira	
L31	29/03/2010	Granja H	Suabe Composteira	
L32	29/03/2010	Granja D	Suabe Cama	9
L33	30/03/2010	Granja D	Vísceras Sapo	
L34	30/03/2010	Granja G	Suabe Composteira	

(cont...) **Quadro 2:** Descrição das cepas de *Salmonella* Senftenberg utilizadas neste estudo.

Cepa	Data	Unidade	Material	Lote
L35	31/03/2010	Granja D	Poeira	9
L36	31/03/2010	Granja D	Fezes	9
L37	26/04/2010	Granja E	Suabe Galpão B - Vazio	
L38	06/05/2010	Granja E	Cama Galpão B - Vazio	
L39	15/02/2011	Granja E	Vísceras Rato	
L40	05/10/2011	Fábrica	Farelo Soja	
L41	15/11/2011	Granja C	Suabe Cama	10
L42	21/11/2011	Fábrica	Suabe Peletizadora	
L43	05/12/2011	Fábrica	Suabe Peletizadora	
L44	20/12/2011	Granja C	Suabe Cama	10
L45	02/01/2012	Fábrica	Suabe Peletizadora	
L47	18/01/2012	Granja E	Suabe Cama	12
L48	23/01/2012	Fábrica	Suabe Prensa	
L49	25/01/2012	Granja E	Suabe Cama	12
L50	14/02/2012	Granja C	Suabe Cama	11
L51	22/02/2012	Granja C	Suabe Cama	11
L52	18/03/2012	Granja C	Fezes	11
L53	28/03/2012	Granja C	Suabe equipamento	10
L54	28/03/2012	Granja C	Suabe Cama	11

A tipagem molecular das *Salmonella* Senftenberg isoladas de diferentes granjas e da fábrica de ração, em datas distintas e de cepas controles de sorogrupos diferentes do grupo E4 (de *S. Senftenberg*), foi realizada pela técnica de PFGE de acordo com o padrão de tipagem do Manual do PulseNet (CDC, 2009). Para tal, foi utilizado o protocolo descrito no **Quadro 1**, do item 7.1.3, do Anexo 7, utilizando-se a enzima de restrição *SpeI*. A condição de corrida é a assinalada como B no **Quadro 3**, do item 7.1.3, do Anexo 7, com modificação no tempo de corrida para 20 horas. Para a corrida, foram utilizados os equipamentos da *BIO-RAD*[®] *Cooling Module*, *Electrophoresis Cell*, *Chef-DR*^{®II} *Drive Module* e *Chef-DR*^{®II} *Control Module*. Os padrões de identidade genética gerados por PFGE foram analisados com auxílio do programa *BioNumerics* (*Applied Maths, Saint-Martens-Latem*, Bélgica). Desse modo, foram gerados dendogramas com os parâmetros de Otimização a 0%, Tolerância a 1% e utilizando o método UPGMA e o coeficiente de similaridade DICE. Cepas apresentando similaridade maior ou igual a 90% foram consideradas como pertencentes ao mesmo *cluster*. O critério de Tenover para a interpretação dos padrões de restrição do DNA cromossômico foi usado de forma a auxiliar à comparação entre isolados incluídos no mesmo cluster (TENOVER, et al., 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tipagem molecular de *Salmonella* Senftenberg por PFGE

As 53 *Salmonella* Senftenberg isoladas de diferentes ambientes de granjas, em datas distintas e as cepas controles de sorogrupos diferentes do grupo E4 (*S. Senftenberg*), foram tipadas por PFGE. O dendrograma gerado pelo software *BioNumerics* para as *Salmonella* Senftenberg é mostrado na **Figura 3**. Foram identificados nove diferentes *clusters* (A-I) com ao menos duas cepas e 20 isolados que não pertencem a nenhum dos *clusters* definidos. A seguir, encontra-se a provável história epidemiológica de cada um dos *clusters*:

No *cluster* A encontram-se as cepas L1 e L3, que apresentaram 95,7% de similaridade genética. A observação visual de L1 e L3 indica que estas cepas são geneticamente relacionadas, de acordo com o critério de Tenover, pois apresentam apenas uma banda de diferença. Estes dados, associados às informações epidemiológicas, sugerem a ocorrência de disseminação clonal, já que ambas foram isoladas com seis dias de diferença de suabe de cama coletados da mesma granja B, porém de lotes distintos (lote 1 e lote 2, respectivamente), alojados em galpões diferentes. O trânsito de veículos contaminados ou o fluxo incorreto de pessoas (BERCHIERI JÚNIOR & NETO, 2009) podem ser responsáveis pela disseminação de cepas de *Salmonella* entre diferentes ambientes na granja. Além disso, a transmissão horizontal é favorecida pela circulação de animais reservatórios de diferentes espécies, como aves, roedores, outros mamíferos e répteis, comumente encontrados no ambiente das granjas (KAMPELMACHER, 1987; PEREIRA et al., 1999). No ambiente das granjas estudadas é realizado o monitoramento periódico da presença de animais silvestres carreadores de *Salmonella*, e, de fato, diversos roedores, aves e anfíbios carreadores já foram encontrados.

O *cluster* B é composto pelas cepas L8, L35, L12 e L17. As cepas L8 e L35 apresentaram 100% de similaridade e a observação visual também indica que estas cepas são geneticamente indistinguíveis, de acordo com os critérios de Tenover. A cepa L8 foi isolada de amostra de pó coletado na área da expedição da fábrica de ração em abril de 2009, e a cepa L35 foi isolada de amostra de poeira de ração coletada na Granja D em março de 2010, durante a criação do lote 9. A Granja D está situada a 140 km de distância da fábrica de ração. Tal fato sugere que as aves da Granja D tenham sido colonizadas pela cepa L8 após o consumo de ração contaminada e esta cepa foi capaz de persistir nos ambientes da granja e da fábrica.

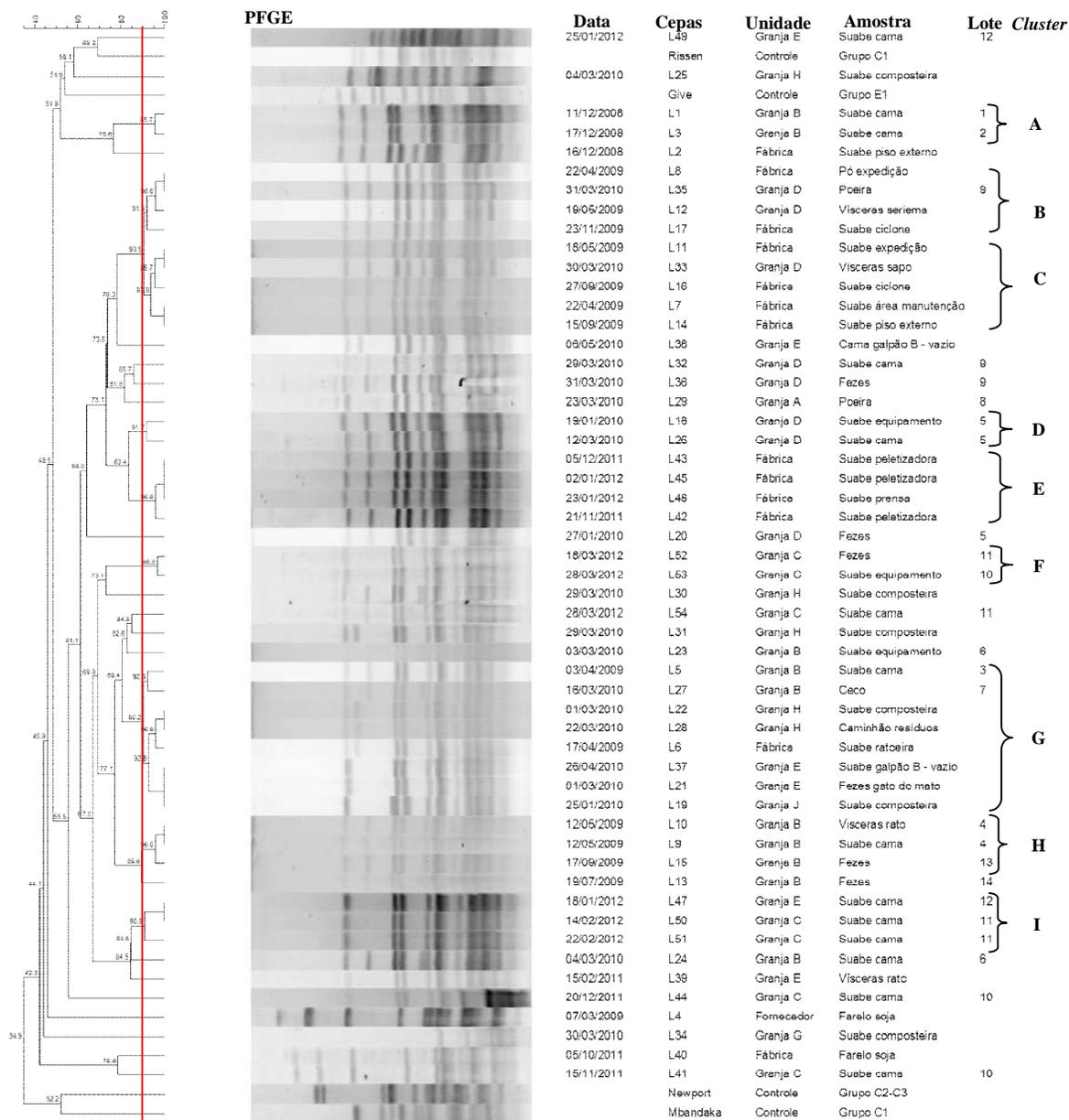


Figura 3. Dendrograma com os perfis de PFGE de 53 *Salmonella* Senftenberg. [A linha vermelha traça o limite de similaridade (90%), considerada para a formação de *clusters* no dendrograma.]. A-I: 9 *clusters*.

Apesar de L8 não ter sido detectada em amostras de ração, acreditamos que esta cepa de *S. Senftenberg* poderia estar presente, já que foi detectada na poeira de ração coletada na área de expedição da fábrica. Pedersen e colaboradores (2008) enfatizam a introdução de *S. Senftenberg* em granjas através de ração contaminada, bem como a sua reincidência em plantéis avícolas. A persistência de *S. Senftenberg* em silos de rações e em outras áreas da fábrica foi previamente descrita (NESSE et al., 2003; LÖFSTRÖM et al., 2006).

A cepa L12 foi isolada de vísceras de seriema em maio de 2009 e apresentou 96% de similaridade às cepas L35 e L8, diferindo por apenas uma banda. É possível que L12 tenha circulado entre aves de algum lote alojado na Granja D e tenha, posteriormente, colonizado a seriema através da ingestão de insetos ou roedores contaminados. A disseminação de cepas de *Salmonella* paratíficas em propriedades avícolas através de pombos, seriemas, moscas, roedores e outros animais, foi previamente descrita (BERCHIERI JÚNIOR & NETO, 2009).

A cepa L17 foi isolada em novembro de 2009 de suabe do ciclone da fábrica, que é o equipamento utilizado para retirar os resíduos do milho destinado à produção da ração. A cepa L17 apresentou 91,9% de similaridade com L8, indicando uma disseminação deste clone na fábrica de ração, o que já foi previamente descrito por Maciorowski e colaboradores (2004) e Löfström e colaboradores (2006). Alguns trabalhos apontam a contaminação por *Salmonella* em amostras de milho, usado para a produção de ração como fonte para a introdução desta *Salmonella* na fábrica de ração (VANCAUWENBERGE et al., 1981; NESSE et al., 2003).

No *cluster* C encontram-se as cepas L11, L33, L16, L7 e L14. Exceto por L33, que foi isolada de vísceras de sapo capturado na Granja D, todas as cepas do *cluster* E foram isoladas na fábrica de ração, entre abril e setembro de 2009. Inicialmente, a cepa L7 foi isolada de suabe realizado na área de manutenção dos equipamentos da fábrica em abril de 2009. Em seguida, L11 foi recuperada de uma amostra de suabe realizado no local onde a ração é expedida para as granjas, e apresentou 93,8% de similaridade genética com L7. Posteriormente, em setembro de 2009, as cepas L14 e L16 foram isoladas em amostras de suabes realizadas no piso externo da fábrica de ração (área de produção) e do ciclone, respectivamente. Estes dados reforçam a capacidade de permanência de *S. Senftenberg* em ambientes de fábrica de ração (ANELLIS et al., 1954; NG et al., 1969), já que vários procedimentos de limpeza e desinfecção são realizados diariamente. Considerando que a introdução de *S. Senftenberg* em granjas de produção de frangos ocorre, na maioria dos casos, através de ração contaminada, Shiota e colaboradores (2012) recomendam uma rotina de monitoramento e aplicação de medidas estritas de controle de qualidade em nível de fábrica

de ração. Essa prática visa prevenir a colonização das instalações avícolas com *Salmonella* Senftenberg que pode, futuramente, ser causa de surtos (SHIROTA et al., 2012).

É interessante observar que a cepa L33, isolada de vísceras de sapo, que foi encontrado na Granja D em março de 2010, apresentou 100% de similaridade com L11, isolada de suabe da expedição de ração da fábrica, em maio de 2009. É possível que L11, oriunda da fábrica de ração, tenha colonizado as aves de algum lote da Granja D. Por conseguinte, sugere-se que tal cepa tenha circulado entre os animais do entorno da Granja, colonizando as vísceras do sapo analisado. Em um trabalho de Chambers e Hulse (2006), *S. Senftenberg* também foi isolada de sapos.

No *cluster* D, encontram-se as cepas L18 e L26 com 91,7% de similaridade genética, isoladas do lote 5 da Granja D. A observação visual de L18 e L26 indica que estas também são geneticamente relacionadas, apresentando duas bandas de diferença marcante entre si. A cepa L18 foi isolada de suabe de equipamento em janeiro de 2010, e a cepa L26, de suabe de cama pouco menos de 2 meses após. Esse dado sugere que este clone se manteve presente no ambiente do galpão por toda a vida deste lote 5 de frango, desde o alojamento até a saída. Este resultado está concordando com outros, que relatam a capacidade de persistência de *S. Senftenberg* no ambiente avícola por mais de 30 meses (PEDERSEN et al., 2008).

O *cluster* E é formado pelas cepas L43, L45 e L48, que apresentaram 100% de similaridade entre si, e pela cepa L42, com 96% de identidade genética com as demais. A observação confirma a identidade genética entre L43, L45 e L48 e a relação próxima entre estas e L42, que difere pela presença de uma única banda. Estas cepas foram isoladas na fábrica de ração, na área de peletização da ração entre novembro de 2011 a janeiro de 2012. As cepas L42, L43 e L45 foram isoladas de suabes coletados nas paredes externas dos condicionadores da peletizadora, que são os locais onde se injeta o vapor d'água para o cozimento da ração, numa temperatura entre 82 °C a 85 °C, por 1 minuto e 47 segundos. Após este processo de cozimento, a massa da ração é passada pela prensa (processo físico de pressão de 1,5 atm) para produção dos *pellets*, local de onde foi isolada a cepa L48.

Estes dados reforçam a capacidade de resistência de *Salmonella* Senftenberg a elevadas temperaturas e pressão e ao tratamento químico com ácidos orgânicos. As cepas do *cluster* C demonstraram capacidade de persistir no equipamento da fábrica mesmo quando submetidas aos ácidos orgânicos usados na matéria-prima (2 kg/ton) e na ração (3kg/ton) e a elevadas temperaturas associadas a pressão da matriz da prensa. De acordo com Koyuncu e colaboradores (2013), a eficiência de diferentes ácidos orgânicos na redução de *Salmonella* varia significativamente entre as diversas matrizes alimentares, além de estar sujeita a

variações relacionadas às temperaturas de tratamento. Estes autores ainda consideram que o tratamento com ácidos é eficiente na redução da população de *Salmonella*, mas não é suficiente para eliminar totalmente o micro-organismo. Sabe-se que a capacidade de formação de biofilme pode favorecer a sobrevivência de *Salmonella* em um ambiente hostil por vários meses ou anos (PEDERSEN et al., 2008; KOYUNCU et al., 2013). Em um trabalho conduzido por Vestby e colaboradores (2009), foi observada a capacidade de *S. Senftenberg* em formar biofilme, o que pode explicar sua permanência na fábrica de ração.

O *cluster* F foi formado pelas cepas L52 e L53, que apresentaram similaridade genética de 96,8%. Ambas foram isoladas em março de 2012 na Granja C, de fezes de aves do lote 11 e de suabe de equipamento durante o alojamento do lote 10, respectivamente. Os dados cronológicos indicam que houve um veículo comum para a contaminação dos lotes 10 e 11, possivelmente a ração. O papel da ração como importante fonte disseminação de *Salmonella* foi previamente discutido, considerando-se os ingredientes usados, os equipamentos da fábrica e a presença de animais nas plantas como veículos para a introdução de *Salmonella* na ração animal (KOYUNCU et al., 2013).

O *cluster* G foi composto por 8 cepas, sendo uma cepa isolada do ambiente da fábrica de ração (L6), e as demais cepas (L5, L27, L22, L28, L37, L21 e L19) geneticamente correlacionadas, isoladas das Granjas B, E, H e J.

As cepas L5 e L27, foram isoladas de suabe de cama de frango do lote 3 e do ceco de uma ave do lote 7, respectivamente. As amostras foram coletadas na Granja B entre abril de 2009 e março de 2010 e estas cepas apresentaram 92,3% de similaridade e duas bandas de diferença visual, sendo consideradas geneticamente relacionadas. Este dado também ilustra a capacidade de persistência de *S. Senftenberg*, e a diferença de duas bandas pode representar a ocorrência de microevolução dentro deste clone (TENOVER et al., 1995). Segundo Barrett e colaboradores (2006), cepas bacterianas podem sofrer alterações genéticas a ponto de gerar diferentes subtipos a partir da mesma cepa. Quando são observadas variações de uma a três bandas, sugere-se que a cepa que originou o surto tenha persistido no ambiente por período suficiente para gerar variantes (BARRET et al., 2006).

As cepas L22 e L28, que apresentaram 100% de similaridade, foram isoladas na Granja H, de suabe de composteira, que é o local onde se faz a decomposição das aves que morrem diariamente e de suabe da caçamba do caminhão que transporta resíduos de compostagem, respectivamente, em março de 2010. As cepas L22 e L28 pertencem ao grupo de cepas que apresentam 90,2% de similaridade com L5 e L27, e não mais que três bandas de

diferença. As cepas L37 (originada da Granja E) e L19 (originada da Granja J) apresentaram 100% de similaridade e foram isoladas entre os meses de janeiro e abril de 2010.

É interessante observar que a cepa L6, isolada de suabe de uma ratoeira posicionada na fábrica de ração em abril de 2009, apresentou 96% de similaridade com L22 e L28, isoladas na Granja H em 2010, e 90,2% de similaridade com L5 e L27 isoladas da Granja B. Este fato indica a fábrica de ração como a possível fonte deste *cluster* de *S. Senftenberg* para as Granjas B, E, H e J, como previamente discutido. Como citado anteriormente, as rações animais são importantes fontes de disseminação de *Salmonella* em ambientes de produção (KOYUNCU et al., 2013) e diversos fatores influenciam no risco de introdução de *Salmonella* na ração animal, incluindo ingredientes e ambientes de fábricas contaminados e circulação de pássaros, répteis e de roedores carreadores (DAVIES et al., 1997; BISGAARD, 1998; JENSEN & ROSALES, 2002, PEDERSEN et al., 2008; BERCHIERI JÚNIOR & NETO, 2009; BOUMART et al., 2012). É possível que L6 tenha se disseminado a partir do ambiente da fábrica, através da ração ou dos veículos de transporte de ração, sendo introduzida na Granja H, localizada a 68 km de distância. A circulação de veículos contaminados ou o fluxo incorreto de pessoas (BERCHIERI JÚNIOR & NETO, 2009; LASSNIG et al., 2012) podem ser responsáveis pela disseminação de cepas de *Salmonella* entre diferentes ambientes na granja. Segundo Lassnig e colaboradores (2012), materiais avícolas também são importantes fatores de disseminação horizontal de *Salmonella* spp.

As cepas L37, L21 e L19 do *cluster* G apresentaram 100% de similaridade genética entre si. As duas primeiras foram isoladas da Granja E em março e abril de 2010 e L19 foi isolada da Granja J, a 430 km de distância. A cepa L21 é originada de fezes de gato do mato coletadas nos arredores da Granja E, e L37 foi isolada de um suabe do Galpão B, que se encontrava em período de quarentena ou vazio sanitário no momento da coleta. Consideramos a possibilidade de os animais do lote que estava alojado no Galpão B antes da quarentena ter ingerido ração contaminada com *Salmonella* Senftenberg geneticamente relacionada com a cepa L6 e a mesma ter se perpetuado no ambiente (PEDERSEN et al., 2008; BOUMART et al., 2012). De fato, L6 e L37 apresentam 92,6% de similaridade e apenas duas bandas de diferença. O gato selvagem deve ter adquirido a cepa L21 ao circular nos arredores do galpão B da Granja E.

No caso da cepa L19, isolada de suabe de composteira, em janeiro de 2010, na Granja J, que está a 430 km distância da Granja E, consideramos a possibilidade de algum plantel de aves ter ingerido ração contaminada com *Salmonella* Senftenberg geneticamente relacionada com a cepa L6, e a mesma ter se perpetuado no ambiente (PEDERSEN et al., 2008;

BOUMART et al., 2012), a ponto de contaminar a composteira, que é o local onde se faz a decomposição das aves que morrem diariamente.

O *cluster* H agrupou as cepas L10, L9 e L15. As duas primeiras apresentaram 100% de similaridade genética entre si. A cepa L10 foi isolada de vísceras de rato encontrado nos arredores do galpão que alojava o lote de aves 4, e L9 foi isolada de suabe de cama do aviário. Ambas as cepas foram isoladas da Granja B em maio de 2009. A cepa L15 foi isolada de fezes de lote 13 da Granja B, em setembro de 2009, apresentando 96% de similaridade genética em relação às cepas L9 e L10. O isolamento de L15 de fezes de aves alojadas em outro galpão (lote 13) indica a disseminação desta cepa por animais reservatórios, como aves silvestres, roedores, outros mamíferos e répteis (KAMPELMACHER, 1987; PEREIRA et al., 1999), além de veículos contaminados ou pelo fluxo incorreto de funcionários (BERCHIERI JÚNIOR & NETO, 2009).

O *cluster* I é formado pelas cepas L47, L50 e L51. As cepas L47 e L50, isoladas de suabe de cama do lote 12 apresentaram 100% de identidade genética entre si e foram isoladas de granjas localizadas em áreas distintas (Granjas E e C) localizadas a aproximadamente 45 km de distância, o que sugere uma fonte comum. Entre as Granjas C e E não ocorre compartilhamento de equipamentos, sendo a ração a possível fonte comum de *Salmonella* Senftenberg.

As cepas L4 e L40, que não pertencem a nenhum *cluster*, foram isoladas de farelo de soja em março de 2009 e em outubro de 2011, respectivamente. Diferentes sorotipos de *Salmonella* são frequentemente encontrados em ingredientes de ração, especialmente em fontes ricas em proteína (WIERUP & HÄGGBLÖM, 2010), como o farelo de soja. Por esta razão, na empresa estudada, o farelo de soja, que é uma matéria-prima usada na preparação da ração destinada à alimentação das aves, é submetido a tratamento químico para descontaminação, com produto contendo 9% de ácido propiônico e 33% de formaldeído. Este tratamento é determinado de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Ração adotadas pela empresa, que se baseia na recomendação de Carrique-Mas e colaboradores (2007) para uso do formaldeído para inativação de *Salmonella* em ração e matéria-prima. O processo de descontaminação é dividido em duas etapas, sendo que a primeira aplicação de ácidos orgânicos ocorre durante o descarregamento da matéria-prima, sendo adicionados 2 kg do produto para cada tonelada dos ingredientes vegetais, como o milho, o farelo de soja e o farelo de trigo, e a segunda aplicação do produto ocorre durante a produção da ração, sendo então adicionados 3 kg para cada tonelada de ração produzida.

Após o tratamento químico, a ração é submetida a tratamento térmico, com exposição a temperaturas entre 82 °C e 85 °C, durante 1 minuto e 47 segundos. Segundo Jones e Richardson (2004), o tratamento térmico entre 80 °C a 85 °C por 1 minuto elimina *Salmonella* na maioria dos casos. Adicionalmente, durante a etapa final de peletização, a ração sofre pressão de 1,5 atm. De acordo com Himathongkham e colaboradores (1996), a peletização e a extrusão são eficientes para reduzir a carga de contaminantes em rações e seus ingredientes. Desta forma, acreditamos que as etapas de tratamento químico e térmico tenham sido suficientes para a eliminação destas cepas, que não foram encontradas em nenhuma das demais granjas estudadas.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

a) As *Salmonella* Senftenberg isoladas de ingredientes de ração, ambiente de Fábrica de Ração e amostras de aviários e animais da fauna ao redor de granjas avícolas apresentam diferentes identidades genéticas, e estão distribuídas em diferentes *clusters* de acordo com a tipagem por PFGE. Estes dados indicam a presença de diferentes clones de *Salmonella* Senftenberg nas diferentes localidades avaliadas neste estudo.

b) Uma única cepa de *Salmonella* Senftenberg foi capaz de disseminar de um ponto comum, a Fábrica de rações, para quatro diferentes granjas por um período de um ano, como observado no *cluster* G.

c) A fauna ao redor das granjas interage com o ambiente das mesmas, como evidenciado nos *clusters* D, E, G e H, que mostram cepas isoladas de seriema, sapo, gato do mato e rato fortemente relacionadas às cepas isoladas nos ambientes das granjas.

d) A associação dos resultados de PFGE juntamente às informações cronológicas e epidemiológicas se apresenta como uma boa ferramenta de avaliação da rota de disseminação de cepas de *S. Senftenberg* em ambientes avícolas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. **Emerging Infectious Disease**, v.12, n. 7, p.1180-1181, 2006. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/7/pdfs/>>. Acesso em: 15 ago. 2012.
- ALMEIDA, F. et al. Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella* Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 145–151, 2013.
- ALMEIDA, I. A. Z. C. et al. *Salmonella*: sorotipos identificados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de 1990 – 1999. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.59, n. 1/2, p.33-37, 2000.
- ANDREATTI FILHO, R. L. Alimentos funcionais na produção avícola. In: ANDREATTI FILHO, R. L. (Org.). **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Rocca, 2006. cap.6, p. 41-51.
- ANELLIS, A., LUBAS, J., RAYMAN, M. M. Heat resistance in liquid eggs of some strains of the genus *Salmonella*, v.19, p. 377-395, 1954. In: **Journal of Food Science**. Disponível em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1954>>. Acesso em: 20 set. 2013.
- APUA – Alliance for the Prudent Use of Antibiotics. **Practitioner guidelines**, 2006. Disponível em:<<http://www.tufts.edu/med/apua/Practitioners/healthcare.html>>. Acesso em: 17 ago. 2012.
- AUSUBEL, F. M. Current protocols in molecular biology. **John Wiley & Sons Inc.** New York, 1994.
- BAGER, F. et al. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v.31, p. 95-112, 1997.
- BAGER, F.; HELMUTH, R. Epidemiology of quinolone resistance in *Salmonella*. *Vet. Res.* v. 32, p. 285-290, 2001.
- BARRETT, T. J.; GERNER-SMIDT, P.; SWAMINATHAN, B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. **Foodborne Pathog. Dis**, v. 3, p. 20–31, 2006.
- BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal of Pharmacology**, v.153, suppl. 1, p. S347-S357, 2008.
- BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. (Org.). **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. p.185-194.
- BERCHIERI JÚNIOR, A. et al. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**, v.30, n. 3, p. 221-231, 2001.

- BERCHIERI JÚNIOR, A.; NETO, O. C. F. Salmoneloses. **Doenças das Aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. 436p.
- BOUMART, Z. et al. Heterogeneity of persistence of *Salmonella enterica* serotype Senftenberg strains could explain the emergence of this serotype in poultry flocks. **Plos One Journal**, v.7, n. 4, p. 1-10, 2012.
- BOUNAR-KECHIH, S. et al. Antimicrobial resistance of 100 salmonella strain isolated from *Gallus gallus* in 4 wilayas of Algeria. **Poult. Sci**, v. 91, n. 5, p. 1179-1185, 2012.
- BRASIL. Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PamVet-PR. **Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários na avicultura de postura no Estado do Paraná**. Curitiba, 2005. 24p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil**. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF – Brasília, 2008. 188 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Balança Comercial – Exportações brasileiras do agronegócio: União Européia 27**. Brasília, DF, 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/internacional/indicadores-e-estatisticas/balanca-comercial>>. Acesso em: 29 mai. 2012.
- BUCHALA, F. G. et al. Ocorrência de reação sorológica contra *Salmonella Pullorum* em aves de “fundo de quintal” do Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 1-5. 2006.
- BUTOLO, J. E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. Campinas: CBNA, 2002. 430p.
- CHANG, N.; CHUI, L. A standardized protocol for the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**, v. 31, p. 275–279, 1998.
- CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A. M. M.; FALCAO, J. P. Genetic diversity, virulence genes and microbial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiology**, v. 32, p. 254-264, 2012.
- CAO, S. et al. Comparative analysis of intestinal microbial community diversity between healthy and orally infected ducklings with *Salmonella enteritidis* by ERIC-PCR. **World Journal of Gastroenterology**, v.14, n. 7, p. 1120-1125, 2008.
- CAPOZZI, V.; SPANO, G. Horizontal gene transfer in the gut: Is it a risk? **Food Research International**, v.42, p.1501-1502. 2009.
- CARATTOLI, A. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, suppl. 1, p. 117-123, 2008.

CARLE, G. F.; FRANK, M.; OLSON, M. V. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. **Science**, v. 232, p. 65-68, 1986.

CARRIQUE-MAS, J. J.; BEDFORD, S.; DAVIES, R. H. Organic acid and formaldehyde treatment of animal feeds to control *Salmonella*: efficacy and masking during culture. **J. Appl. Microbiol**, v. 103(1), p. 88-96, 2007.

CATTOIR, V. et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p. 394-397, 2007.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Salmonella Surveillance: Annual Summary** (Bulletin outlines the classification scheme for nontyphoidal Salmonella and reports detailed information on all the reported cases during 2005). Disponível em:<http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/salmonella_surveillance.html>. Acesso em: 21 set. 2012.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Salmonella Surveillance: Annual Summary** (Bulletin outlines the classification scheme for nontyphoidal Salmonella and reports detailed information on all the reported cases during 2006). Disponível em:<http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/salmonella_surveillance.html>. Acesso em: 25 set. 2012.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **PulseNet PFGE Manual: The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance – One Day (24-28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei*, and *Shigella flexneri* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) 2009.** Disponível em:<http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/salmonella_surveillance.html>. Acesso em: 2 out. 2012.

CHAMBERS, D. L.; HULSE, A. C. *Salmonella* serovars in the herpetofauna of Indiana County, Pennsylvania. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 72, p. 3771-3773, 2006.

CHARLTON, B. R. et al. Comparison of a *Salmonella* enteritidis-specific polymerase chain reaction assay to delayed secondary enrichment culture for the detection of *Salmonella* enteritidis in environmental drag swab samples. **Avian Diseases**, v. 49, n. 3, p. 418-422, 2005.

CHEN, L. F.; CHOPRA, T.; KAYE, K. S. Pathogens resistant to antibacterial agents. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 4, p. 817-845, 2009.

CIANFLONE, N. F. C. Salmonellosis and the GI tract: more than just peanut butter. **Current Gastroenterology Reports**, v.10, p. 424-431, 2008.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (Wayne, PA, USA). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**. 3. ed. approved standard M31–A3, 2008.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (Wayne, PA, USA). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing** - Eighteenth informational supplement M100-S19, 2009.

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute (Wayne, PA, USA). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing** – Twenty-First Informational Supplement M100-S21. Clinical Laboratory Standards Institute, v. 31, n. 1, 2011.

CORNELI, J. **Avaliação de promotores de crescimento alternativos em substituição aos convencionais sobre o desempenho, características de carcaça e morfometria intestinal em frangos de corte**. 2004. 58 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2004.

D'AOUST, J. Y. *Salmonella*. In: DOYLE, M. P. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. cap. 9, p. 327-445.

D'AOUST, J. Y. *Salmonella*. In: LUND, B. M.; BAIRDPAKER, T. C.; GOULD, G W. **The Microbiological Safety and Quality of Food**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. cap. 45, p. 1233-1299.

DONADO-GODOY, P. et al. Prevalence, Risk Factors, and Antimicrobial Resistance Profiles of *Salmonella* from Commercial Broiler Farms in Two Important Poultry-Producing Regions of Colombia. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 5, p. 874-883, 2012.

DUTIL, L. 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. Disponível em:<<http://www.cdc.gov/eid>>. Acesso em: 20 ago. 2012.

EUA (ESTADOS UNIDOS da AMÉRICA). Food and Drug Administration. **NARMS Retail Meat Annual Report**. Silver Spring, 2006. 100 p. Disponível em: <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/ucm061975.htm>>. Acesso em: 29 maio 2012.

FAAIR SCIENTIFIC ADVISORY PANEL. Policy Recommendations. In: BARZA, M., GORBACH, S.L. The Need to Improve Antimicrobial Use in Agriculture: Ecological and Human Health Consequences. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, suppl. 3, p. S76-S77, 2002.

FÀBREGA, A. et al. Quinolone resistance in the food chain. **International Journal Antimicrobiol Agents**, v. 31, p. 307-315, 2008.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Animal Food Production: Code of Practice to Minimize and Contain Antimicrobial Resistance**, 2005. Disponível em:< <http://www.fao.org/docrep/012/i1111e/i1111e00.htm>>. Acesso em: 28 jul. 2012.

FARIA, D. E. et al. Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte: 1. Probióticos. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n. 1, p. 1-6, 2009.

FERRARI, R. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* strains isolated in Brazil. **Journal Infection Developing Countries**, v. 5, p. 496-498, 2011.

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

FRANCO, B. D. G. M.; LANGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, p. 182, 1996.

FRICKE, W. F. et al. Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic *Escherichia coli* strains in *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates from poultry. **Applied Environmental Microbiology**, v.75, n. 18, p. 5963-5971, 2009.

FSIS - Food Safety and Inspection Service/Estados Unidos. *Salmonella enteritidis* risk assessment. Shell Eggs and Egg Products. **U.S. Department of Agriculture**, Food Safety and Inspection Service, Washington, DC 20250. 1998. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/ophs/risk/>>. Acesso em: 19 mar. 2010.

GESER, N. et al. Fecal carriage of extended-spectrum B-lactamase-producing Enterobacteriaceae in swine and cattle at slaughter in Switzerland. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 3, p. 446-449, 2011.

GOMES, D. M. **Resíduos de antibióticos promotores de crescimento em produtos de origem animal**, 2004. 69 p. (Especialização) - Centro de Excelência em Turismo/Qualidade de Alimentos, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2004.

GONZALEZ, F. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrB19* in nontyphoidal *Salmonella enterica* strains isolated in Venezuela. **J Infect Dev Ctries**, 6(5), p. 462-464, 2012.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. In: **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**. Collaborating Center for Reference and Research on (*Salmonella*), 9ed, 2007. Disponível em: <http://www.pasteur.fr/sante/clre/codrecnr/salmoms/WKLM_2007.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2012.

HAMADA, S. et al. Studies on chick salmonellosis. II. *Salmonella* Senftenberg infection in chicks. **Japanese Journal of Veterinary Research**, 6(4), p. 181-195, 1959.

HAO, H. et al. Drug resistance and related genes of chickenborne *Salmonella* to quinolone and fluoroquinolones. **Acta Microbiologica Sinica**, 51(10), p. 1413, 2011.

HARADA, K.; ASAI, T. Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. **Journal Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-10, 2010.

- HARBOTTLE, H. et al. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. **Journal Clinical Microbiology**, v.44, p. 2449-2457, 2006.
- HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. The changing epidemiology of resistance. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.64, suppl. 1, p. i3-i10, 2009.
- HEDBERG, C.W. Challenges and opportunities to identifying and controlling the international spread of *Salmonella*. **J. Infect. Dis**, v. 204, p. 665– 666, 2011.
- HENDRIKSEN, R. S. et al. **Extremely drug-resistant *Salmonella enterica* Serovar Senftenberg infections in patients in Zambia.** *J Clin Microbiol*, v. **51**, p. 284-286, 2013.
- HIMATHONGKHAM, S.; PEREIRA, M. G.; RIEMANN, H. Heat destruction of *Salmonella* in poultry feed: effect of time, temperature, and moisture. **Avian Diseases**, v. 40, p. 72-77, 1996.
- HOLLIS, R. J. et al. Comparative evaluation of an automated ribotyping instrument versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 34, p. 263- 268, 1999.
- HOORFAR, J.; AHRENS, P.; RADSTROM, P. Automated 5' Nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3429-3435, 2000.
- HOPKINS, K. L.; DAVIES, R. H.; THRELFALL, E. J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. **International Journal Antimicrobiol Agents**, v. 25, p. 358-373, 2005.
- HU, Q.; COBURN, B. *Salmonella enterica* serovar Senftenberg human clinical isolates lacking SPI-1. **Journal Clinical Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1330-1336, 2008.
- HUGH-JONES, M. E. Epidemiological studies on *Salmonella* Senftenberg: II. Infections in farm animals. **Journal of Hygiene**, v. 67, p. 89-94, 1969.
- HUME, M. E. et al. Poultry digestive microflora biodiversity as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. **Poult. Sci.** 82, p. 1100–1107, 2003.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). **Microorganisms in Foods, 6 – Microbial Ecology of Food Commodities.** 2. th. New York: Kluwer Academic & Plenum Publishers, cap.1, p. 1-106, 2005.
- ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; LIMA, E. A.; OKABAYASHI, S. Antimicrobianos: usos preventivos e curativos em avicultura. In: NETTO, J. P.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. **Farmacologia Aplicada à Avicultura: Boas Práticas no Manejo de Medicamentos.** São Paulo: Roca, 2005. p. 115-147.
- JAY, J. M. **Modern Food Microbiology.** 6. th. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. pp.1-53, 170, 363-420, 679.

- KAMPELMACHER, E. H. Poultry disease and public health. **British Poultry Science**, v.28, n. 1, p. 3-13, 1987.
- KARCZMARCZYK, M. et al. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* food and animal isolates from Colombia: identification of a *qnrB19*-mediated quinolone resistance marker in two novel serovars. **FEMS Microbiology Letters**, v. 313, p. 10-19, 2010.
- KAUFFMANN, F. Kauffmann-White schema. In: Serological diagnosis of *Salmonella* species. Copenhagen: Willians & Wilkins, p. 59-123, 1972.
- KAY, D. et al. Catchment microbial dynamics: the emergence of a research agenda. **Prog. Phys Geog.** v. 31, p. 59–76, 2007.
- KIM, H. B. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 639-645, 2009.
- KLEIN, E. Bacterium of swine-plague, v.5, n.1, p. 1-13, 1884. In: **Journal of Physiology**. Disponível em: <<http://jp.physoc.org/content/5/1/1.long>>. Acesso em: 16 abril 2013.
- KONINGSTEIN, M. et al. The interaction between prior antimicrobial drug exposure and resistance in human *Salmonella* infections. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p. 1819-1825, 2010.
- KOYUNCU, S. et al. Organic acids for control of salmonella in different feed materials. **BM Vet. Res**, v. 9, p. 81-89, 2013.
- LASSNIG, H. et al. Prevalence of *Salmonella* spp. in Austrian broiler flocks in the context of the EU-wide baseline survey 2005-2006. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v.125, (3-4), p. 129-37, 2012.
- LAYTON, A. N.; GALYOV, E. E. *Salmonella*-induced Enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications. **Expert Reviews Molecular Medicine**, v. 9, n. 18, p. 1-17, 2007.
- L'ECUYER, P. B. et al. Nosocomial outbreak gastroenteritis due to *Salmonella* Senftenberg. **Clin Infect Dis** v. 23, p. 734-742, 1996.
- LE MINOR, L. E. *Salmonella* in: Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th. Philadelphia: Williams & Wilkns, p. 186-187, 1994.
- LIEBANA, E. et al. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. **J Clin Microbiol**, v. 39, p. 3609-3616, 2001.
- LIU, F. et al. Novel Virulence Gene and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic (CRISPR) Multilocus Sequence Typing Scheme for Subtyping the Major Serovars of *Salmonella enterica* subspecies *enteric*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, n. 6, p. 1946–1956, 2011.

LÖFSTRÖM, C. et al. Improvement and validation of RAPD in combination with PFGE analyses of *Salmonella enterica* spp. enterica serovar Senftenberg strains isolated from feed mills. **Veterinary Microbiology**, v. 114, (3-4), p. 345–351, 2006.

LYNNE, A. M. et al. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolated from food animals. **Foodborne Pathog Dis**, v. 6, p. 207–215, 2009.

MAÑAS, P. et al. Survival of *Salmonella* Senftenberg 775W to current liquid whole egg pasteurization treatments. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 593-600, 2003.

MARIN, C.; HERNANDIZ, A.; LAINEZ, M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. **Poultry Science**, v. 88, n. 2, p. 424–431, 2009.

MACIOROWSKI, K.G. et al. Incidence, sources, and control of foodborne *Salmonella* spp. in poultry feeds. *Worlds Poult Sci, J* 60, p. 446–457, 2004.

MATSUBARA, E. N. **Condição higiênico-sanitária de meias-carcaças de suínos após o abate e depois do resfriamento e análise da utilização de lista de verificação para avaliar boas práticas no abate de suínos**. 2005. 152 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MEAD, P. S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, n. 5, p. 607-625, 1999. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/>>. Acesso em: 13 mar. 2013.

MORETRO, T. et al. Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1005-1012, 2009.

MOURA, A. M. G. **Avaliação da eficácia de bacterinas comerciais no controle da infecção por *Salmonella* Enteritidis em galinhas de postura comercial**. 2007. 53 p. Dissertação (Mestrado)– Faculdade Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, 2007.

MUELLER-DOBLIES, D.; CLOUTING, C.; DAVIES, R. H. Investigations of the Distribution and Persistence of *Salmonella* and Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli* in Turkey Hatcheries in the UK. **Zoonoses Public Health**, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1863-2378>>. Acesso em: 13 mar. 2013.

MURPHY, R. Y. et al. Thermal inactivation of *Salmonella* Senftenberg and *Listeria innocua* in ground chicken breast patties processed in an air convection oven. **Poultry Science**, v.80, n. 4, p.515-521, 2001.

NAKAYA, H. et al. Life threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone-resistant *Salmonella enteric typhimurium* with mutations in both *gyrA* and *parC*. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n. 2, p. 255-257, 2003. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/>>. Acesso em: 15 abril 2013.

NAYAK, R. et al. Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. **International Journal Food Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 51-62, 2004.

NESSE, L. L. et al. Molecular analyses of *Salmonella enterica* isolates from fish feed factories and fish feed ingredients. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 1075-1081, 2003.

NG, H.; BAYNE, H. G.; GARIBALDI, J. A. Heat resistance of *Salmonella*: the uniqueness of *Salmonella* Senftenberg 775W. **Applied Microbiology**, v. 17, p. 78-82, 1969.

OIE – World Organization for Animal Health. **Terrestrial Animal Health Code**, 2010. Disponível em: <http://web.oie.int/eng/normes/mcode/a_summry.htm>. Acesso em: 21 mar. 2012.

OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 655-661, 2000.

PATERSON, D. L. et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 3, p. 473-8, 2000.

PEDERSEN, T. B.; OLSEN, J. E.; BISGAARD, M. Persistence of *Salmonella* Senftenberg in poultry production environments and investigation of its resistance to desiccation. **Avian Pathology**, v. 37, n. 4, p. 421-427, 2008.

PENG, Y. et al. Orthogonal array design in optimizing ERIC-PCR system for fingerprinting rat's intestinal microflora. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2095-2101, 2007.

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

PESSANHA, R. P., GONTIJO FILHO, P. P. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de *Enterobacteriaceae* lactose-negativa de microflora fecal de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php>>. Acesso em: 20 out. 2011.

PEZZOLI, L. et al. International outbreak of *Salmonella* Senftenberg in 2007. **Euro Surveillance**, v.12, n.6, 2007. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx>>. Acesso em: 5 out. 2012.

PITOUT, J. D. D. et al. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. **Clinical Microbiology Infection**, v. 14, n. 8, p. 755-759, 2008.

- POIREL, L.; CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid -mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-7, 2012.
- POMEROY, B. S.; NAGARAJA, K. V. Fowl typhoid. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER, W. H. (Ed.) . **Diseases of Poultry**, 9 th. Ames: Iowa State University Press. P. 87-99, 1991.
- PONTES NETTO, D. et al. **Levantamento do Uso e Comercialização de Medicamentos Veterinários em Frango de Corte no Estado do Paraná**. Curitiba: SESA/ISEP, 2005, p. 1-25.
- POPOFF, M. Y.; BOCKEMTIHL, J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. Supplement 1994 (n° 38) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v.146, p. 799-803, 1995.
- PRESCOTT, J. F. Antimicrobial use in food and companion animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 127-133, 2008.
- PRICE, L. B. et al. Elevated risk of carrying gentamicin-resistant *Escherichia coli* among U.S. poultry workers. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 12, p. 1738-1742, 2007.
- RAHAL, J. J. et al. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. **Journal American Medical Association**, v. 280, n. 14, p. 1233–1237, 1998.
- RAHMANI, M. et al. Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. **BMC Vet Res**, v. 9: 66, doi: 10.1186/1746-6148-9-66, 2013.
- RICE, L. B. et al. Molecular genetics of resistance to both ceftazidime and β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations in *Klebsiella pneumoniae* and *in vivo* response to β -lactam therapy. **Journal Infectious Diseases**, v. 173, n. 1, p. 151-8, 1996.
- RICE, L. B. Successful interventions for gram-negative resistance to extended spectrum β -lactam antibiotics. **Pharmacotherapy**, v.19, n. 8, p. 120-128, 1999.
- ROBERTS, R. B. et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. **J Infect Dis**, v. 178, p. 164–171, 1998.
- ROBICSEK, A. et al. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2872-2874, 2006.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. **Journal Infection Chemotherapy**, v. 17, n. 2, p. 149-182, 2011.
- ROE, M. T.; PILLAI, S. D. Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 622-626, 2003.

SADER, H. S. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates in Latin America: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-98). **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 4, n. 5, p. 245-254, 2000.

SADER, H. S. et al. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros: resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. **Journal Pneumologia**, v. 27, n. 2, p. 59-67, 2001.

SALMON, D. E.; SMITH, T. The bacterium of swine-plague. **American Month Microbiology Journal**, v.7, p214, 1886.

SANTOS, L. R. et al. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 102/103, p. 93-99, 2002.

SÁRKÖZY, G. Quinolones: a class of antimicrobial agents. **Vet. Med. Czech**, v. 46, (9-10), p. 257-274, 2001.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States – unspecified agents. **Emerging Infection Diseases**, v.17, n. 1, p. 7-15, 2011. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/1/p2-1101_article.htm>. Acesso em: 10 jan. 2013.

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.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

SHIROTA, K. et al. Epizootiologic role of feeds in the epidemiology of *Salmonella* Senftenberg contamination in commercial layer farms in eastern Japan. **Avian Dis**, v. 56 (3), p. 516-520, 2012.

SHIVAPRASAD, H. L. **Pullorum disease and fowl typhoid**. In: CALNEK, B. W. Diseases of poultry. Ames: Iowa State University Press, 1997, p. 82-96.

SILVA, J. M. L. **Salmonelose aviária**. In: Encontro empresarial de atualização em patologia avícola – Salisbury, 1989, Campinas. Anais... Campinas, 1989, p. 59-69.

SILVA, R. G. **Farmacocinética e determinação de resíduos de enrofloxacina e seu metabólico em tecidos de frangos**. 2004. 127 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química Unicamp, 2004.

SINGER, R. S. et al. Modeling the relationship between food animal health and human foodborne illness. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 79, p. 186-203, 2007.

SMET, A. et al. Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, p. 295-316, 2010.

- SNOEYENBOS, G. H.; WILLIAMS, J. E. **Salmonellosis**. In: B. W. CALNEK (Ed.). *Diseases of Poultry*. 9th. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 72-73.
- SON, I. Analysis of pulsed field gel electrophoresis profiles using multiple enzymes for predicting potential source reservoirs for strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolated from humans. **Infection, Genetics and Evolution**, (16), p. 226-233, 2013.
- SOSTARICH, A. M. et al. Impact of multiresistance of Gram-negative bacteria in bloodstream infection on mortality rates and length of stay. **Infection**, v. 36, n. 1, p. 31-35, 2008.
- SOULSBY, L. Antimicrobials and animal health: a fascinating nexus. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, suppl. 1, p. i77-i78, 2007.
- STERZO, E. V.; VARZONE, J. R. M.; ROSANA, F. Salmoneloses Aviárias. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 12, n. 2, p. 132, 2008.
- STEPAN, R. M. et al. Molecular and comparative analysis of *Salmonella enterica* Senftenberg from humans and animals using PFGE, MLST and NARMS. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 153, p. 1-9, 2011.
- STRAHILEVITZ, J. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 664-689, 2009.
- SZMOLKA, A. et al. First Report on IncN Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene *qnrS1* in Porcine *Escherichia coli* in Europe. **Microbial Drug Resistance**, v.17, n. 4, p. 567-573, 2011.
- TALBOT, G. H. et al. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 657-668, 2006.
- TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial typing. **J. Clin. Microbiol**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.
- TESSARI, E. N. C. et al. Incidência de *Salmonella* spp em pintos de corte recém-nascidos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 279-281, 2003.
- VANCAUWENBERGE, J. E.; BOTHAST, R. J.; KWOLEK, W. F. Thermal inactivation of eight *Salmonella* serotypes on dry corn flour. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 42, p. 688-691, 1981.
- VELDMAN, K. et al. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 6, p. 1278-1286, 2011.

VESTBY, L. K. et al. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories. **Bmc Vet Res**, v. 5, p. 20, doi. 1746-6148-5-20, 2009.

VOETSCH, A. C. et al. Food Net estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, suppl. 3, p. S127-134, 2004.

XU, H.; LEE, H. Y.; AHN, J. Cross-protective effect of acid-adapted *Salmonella enterica* on resistance to lethal acid and cold stress conditions. **Lett. Appl. Microbiol**, v. 47, p. 290-297, 2008.

YU, L. et al. The analysis of ERIC-PCR genomic polymorphism of *Salmonella* isolated strains in pig carcass. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, n. 13, p. 1694-1698, 2011.

ZHAO, J. et al. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. **Antimicrobiol Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4219-4224, 2010.

WHICHARD, J. M. et al. Evaluation of antimicrobial resistance phenotypes for predicting multidrug-resistant *Salmonella* recovered from retail meats and humans in the United States. **Journal Food Protection**, v. 73, n. 3, p. 445-451, 2010.

WIERUP, M.; HÄGGBLÖM, P. An assessment of soybeans and other vegetable proteins as source of salmonella contamination in pig production. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, p. 1-9. 2010.

WHO – World Health Organization (Genebra, Suíça). **WHO Policy Perspectives on Medicine: Containing antimicrobial resistance**. Genebra, 2001. 6p. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js7920e/>>. Acesso em: 29 maio 2012.

WU, J. J. et al. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants QnrA, QnrB, and QnrS among Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese Hospital. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 51(4), p. 1223-1227, 2007.

7 ANEXOS

7.1 Procedimentos de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE)

7.1.1 Preparação dos *plugs* com o DNA bacteriano

1. Utilizar colônias frescas (24-48 horas de incubação), que devem estar distantes umas das outras na placa, para a preparação do inóculo.
2. Preparar uma suspensão do microorganismo em TSB ou MHB (± 10 mL), transferindo 2-4 colônias¹ e, após, incubar os tubos Falcon na estufa a 37 °C durante a noite (no mínimo, 12 horas).
3. Numerar tubos eppendorfs (1,5 mL) de acordo com o número das amostras e pesá-los em balança analítica.
4. Depois de incubadas, centrifugar as culturas líquidas por 15 minutos a 3000 rpm. Desprezar o líquido sobrenadante, ressuspender o centrifugado em 1 mL de salina 0,9% estéril, vortexar e transferir a suspensão para os tubos previamente pesados.
5. Centrifugar os eppendorfs em microcentrifuga por 3 minutos a 13000 rpm e aspirar o máximo de salino possível.
6. Pesá-lo em balança analítica e adicionar o volume de salina em “ μ l” igual ao peso em “mg” das células do centrifugado². Homogeneizar bem no “vortex”.
7. Dissolver a agarose *Low Melt* 2% em termobloco a 50 °C com o “mix” ligado.
8. Adicionar 5 μ l da suspensão de células em 300 μ l do tampão TEN + 100 μ l de lisozima (se necessária) e homogeneizar bem no *vortex*.
9. Adicionar 340 μ l da agarose *Low Melt* 2% já dissolvida e misturar bem com a pipeta. É importante ser rápido neste passo para a agarose não solidificar novamente. Se tiver muita amostra, deixar a agarose no termobloco.
10. Adicionar a suspensão gentilmente nos moldes para *plugs* da Bio-Rad. Cuidar para preenchê-los por completo, impedindo a formação de bolhas.
11. Deixar os moldes esfriando por 15 minutos a 5 °C.
12. Adicionar 2 mL de tampão EC aos poços da placa de microdiluição de 12 ou 24 poços e identificá-los de acordo com o número dos *plugs*.
13. Com cuidado, remover os *plugs* dos moldes e colocá-los nos respectivos espaços da placa de microdiluição com o tampão EC.
14. Incubar os *plugs* a 37 °C por 5 horas ou *overnight*.
15. Aspirar o EC dos poços, enxaguar os *plugs* com 5 mL de tampão CHEF TE, aspirar o CHEF TE dos poços e lavar os *plugs* novamente com o CHEF TE, deixando 10-30 minutos em temperatura ambiente³.
16. Aspirar o CHEF TE e observar se os *plugs* não estão grudados um em cima do outro. Caso estejam, ir desgrudando com a pipeta do próximo passo.
17. Cobrir os *plugs* com 2 mL de tampão ES e 0,1 mL de Proteinase K (solução preparada logo anteriormente ao uso nesta etapa) em cada poço.
18. Enrolar a placa de microdiluição em papel filme e incubá-la a 50 °C *overnight*.

¹ Caso o crescimento do microorganismo seja lento, pode-se utilizar mais colônias.

² Por exemplo: peso do tubo vazio = 0,97 g; peso do tubo com o centrifugado = 1,0 g. A diferença resulta em 0,03 g, ou 30 mg. Portanto, adicionar 30 μ l de salina.

³ Todas as lavagens (aspirações e adições de tampões) podem ser com pipetas Pasteur de plástico.

19. Aspirar o tampão dos poços onde estão os *plugs* e enxaguá-los com CHEF TE. Cobrir os *plugs* novamente com CHEF TE e deixar 1 hora a temperatura ambiente. Repetir o procedimento 4 vezes.
20. Enrolar a placa de microdiluição em papel filme e armazená-la a 5 °C até o momento da digestão. Os *plugs* podem ficar armazenados em CHEF TE a esta temperatura durante meses, se necessário.

7.1.2 Limpeza do material utilizado acima

1. Colocar os moldes usados para preparação dos *plugs* em solução de hipoclorito 10% por 1 hora.
2. Lavar os moldes com água corrente, cuidando para não sobrar restos de agarose.
3. Enxaguá-los com água destilada e colocá-los para secar em papel toalha na estufa a 35-50 °C.

7.1.3 Digestão do DNA bacteriano com enzimas de restrição

1. Numerar a tampa de uma placa de microdiluição com 96 poços de acordo com o número dos *plugs* que serão digeridos.
2. Usar mais de uma placa caso as digestões necessitem temperaturas diferentes para incubação de diferentes enzimas de restrição.
3. Colocar 200 µl de tampão DNS nos espaços que serão utilizados.
4. Cortar os *plugs* do tamanho apropriado, de acordo com o tamanho do pente e do aparelho de PFGE. O tamanho normal dos *plugs* é 1 x 1/3, onde 1 corresponde à largura do dente do pente.
5. Remover o tampão DNS logo que o último *plug* for colocado na placa. Substituir com tampão DNS fresco e incubar em temperatura ambiente por 1 hora.
6. Repetir o passo anterior por 4 vezes, trocando o DNS a cada hora⁴.
7. Substituir o DNS com 50 µl do “tampão de enzima de restrição”, que não contém a enzima (ver receita no **Quadro 2**)⁵.
8. Incubar por 1 hora a 5 °C.
9. Substituir este tampão sem a enzima de restrição por 50 µl do “tampão com a enzima de restrição” (ver receita no **Quadro 2**)⁶.
10. Enrolar a placa em papel filme e incubá-la por 1-2 horas a 5 °C.
11. Incubar por 12-20 horas na temperatura apropriada (**Quadro 1**), conforme sugerido pela empresa produtora da enzima.
12. No **Quadro 3** estão as características de cada condição de corrida B e C.

⁴ Os *plugs* podem ser lavados mais de 4 vezes com o DNS e podem ser incubados a 5 °C durante a noite, no próprio DNS, caso não possa ser feita a digestão enzimática no mesmo dia.

⁵ No **Quadro 1** estão as enzimas de restrição recomendadas de acordo com o gênero e/ou espécie bacteriana. Os tampões com e sem a enzima de restrição podem ser preparados com várias horas de antecedência e devem ser armazenados a 5 °C. a enzima de restrição só deve ser adicionada ao tampão quando este for colocado sobre os *plugs*. A enzima degrada com facilidade e deve ser mantida no freezer até o momento da digestão.

⁶ Observar se todos os *plugs* estão cobertos pelo tampão com a enzima. Se for preciso, com a ajuda de uma ponteira, deitá-los no fundo dos poços com o tampão.

Quadro 1. Condições das principais enzimas de restrição utilizadas.

Enzima (°C digestão)	Tamanho dos fragmentos (kb)	Switch-times
<i>Sma</i> I (25 °C)	50 - 250	C
<i>Spe</i> I (37 °C)	50 - 300	B / C
<i>Xba</i> I (37 °C)	50 - 400	B

Quadro 2. Receitas dos tampões com ou sem enzima de restrição.

Sem enzima de restrição		Com enzima de restrição
5 µl	<i>Buffer</i> 10x	5 µl
0,5 µl	BSA – se necessário	0,5 µl
0	Enzima de restrição	1-5 µl

*: Completar com água MilliQ ou *UltraPure* para um volume final de 50 µl. Calcular os volumes, multiplicando sempre pelo número de amostras a serem testadas (+2).

*: O ideal é atingir 20 unidades da enzima de restrição por digestão. Algumas enzimas, como a *Spe*I, são muito caras, e 10 unidades funcionam muito bem (adicionando somente 1 µl da enzima)!

Quadro 3. Condições de corrida dos géis de agarose.

Condição corrida	Switch-time (inicial - final)	Volts/cm	Tempo de corrida	Separação dos fragmentos em kb
B	5.0 – 60.0	6.0	23 horas	50 – 500
C	5.0 – 30.0	6.0	23 horas	<50 – 500

7.1.4 Preparação do gel de agarose⁷

1. Junto com os *plugs* preparados com o DNA bacteriano deve ser corrido um marcador de peso molecular – *Lambda DNA ladder*⁸ é o mais comumente utilizado.
2. Preparar a agarose de acordo com as receitas do **Quadro 4**. Cobrir o frasco, impedindo a evaporação durante o aquecimento em microondas (\pm 2 minutos). Deixar esfriar em banho-maria a 58-60 °C.
3. Montar o molde do gel numa bancada reta e nivelar com a ajuda do nível (*bulls-eye level*). Prender o pente na barra de acrílico, deixando um espaço de 1-2 mm entre o final do pente e o molde do gel – para não furar o gel quando o pente for colocado nele.
4. Ajustar o pente horizontalmente entre duas estantes pequenas e colocar os *plugs* e os marcadores moleculares na ponta dos dentes do pente e na ordem em que serão corridos no gel.
5. Usar papel filtro ou pipeta para remover qualquer excesso de líquido dos *plugs*.

⁷ Sempre fazer um pouco a mais de gel para a fixação dos *plugs* no pente e também para fechar os orifícios deixados pelo pente após este ser retirado do gel.

⁸ Deve ser armazenado em freezer e, quando utilizado, ser cortado bem fino e colocado nas extremidades das amostras no pente de corrida.

6. Retirar 10 mL de agarose do frasco grande e colocar num tubo de ensaio. Desta alíquota, gotejar agarose em cima de cada *plug*, prendendo-os no pente. Esperar aproximadamente 10 minutos para solidificar a agarose.
7. Gentilmente, virar o pente com os *plugs* presos nos dentes para a posição vertical e colocá-lo sob o molde, em uma das extremidades do gel.
8. Despejar a agarose dissolvida no molde do gel, pela extremidade oposta do pente, o mais longe possível dos *plugs*.
9. Deixar o gel solidificando por \pm 30 minutos. Com cuidado, remover o pente e examinar se os *plugs* ficaram presos nos espaços vazios do gel.
10. Pegar a amostra de agarose separada no tubo de ensaio e preencher todos os espaços vazios do gel, onde estarão presos os *plugs*.

Quadro 4. Receitas do gel de agarose.

	2 géis grandes	1 gel grande	2 géis pequenos	1 gel pequeno
TBE 10x	14,75 mL	8,625 mL	11,5 mL	5,8 mL
Água destilada	305,24 mL	163,87 mL	218,5 mL	109,3 mL
Agarose	3,2 g	1,72 g	2,3 g	1,2 g

7.1.5 Como ligar o aparelho e correr o gel de agarose

1. Usar o nível para nivelar a cuba do aparelho.
2. Colocar na cuba 1900 mL de H₂O destilada com a proveta e 100 mL de tampão TBE 10x com a pipeta (obtendo-se um TBE 0,5x), espalhando bem o tampão pelo centro da cuba para não afetar os eletrodos.
3. Ligar o aparelho na unidade principal.
4. Ligar a bomba (*pump*) no máximo (100) – para circular bem o tampão por alguns minutos – e observar se o termômetro está bem posicionado dentro da cuba.
5. Ligar o Chiller e ajustá-lo à temperatura apropriada (13 °C) para a corrida.
6. Com luvas, colocar o gel na cuba, retirando todas as bolhas que possam estar debaixo do gel.
7. Fechar a tampa da cuba corretamente.
8. Deixar o gel “equilibrando” no aparelho por 30-60 minutos, para que ele atinja a temperatura de 13 °C.
9. Ajustar o tempo (switch time) inicial e final, o tempo de corrida, a voltagem – conferir dados no **Quadro 3** – e dar início à corrida, apertando o *start* no aparelho.
10. Observar após 1 hora se o gel está correndo bem, se a temperatura está adequada e se existe corrente (algum número diferente de zero).
11. Quando terminar a corrida, desligar o aparelho na ordem reversa: Chiller, bomba e aparelho principal.
12. Tirar com cuidado o gel do aparelho e colocá-lo num recipiente para corar. Adicionar ao recipiente 250 mL de água destilada e 20 µl de brometo de etídio, deixando à temperatura ambiente por 1 hora. Desprezar o brometo de etídio em um galão especial e enxaguar o gel com água destilada. Cobrir o gel com água destilada (sem o brometo de etídio) e deixar descorando por mais 1 hora.
13. Visualizar o gel sob luz UV e fotografá-lo.

Não autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 16/10/2013

Leonardo Sestak