

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULHO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Salmonella* spp. EM OVOS BRANCOS PARA CONSUMO
HUMANO**

Paula Letícia Campello

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIENCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Salmonella* spp. EM OVOS BRANCOS PARA CONSUMO
HUMANO**

Paula Letícia Campello

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Área de Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2012

C193s Campello, Paula Leticia.
Salmonella spp. em Ovos Brancos para Consumo Humano/Paula Leticia Campello.- -Jaboticabal , 2012.
Vi, 76f. : il. ; 28cm

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientador: Angelo Berchieri Junior

Banca examinadora: Nilce Maria Soares, Oswaldo Durival Rossi
Junior

Bibliografia

1. *Salmonella* spp.. 2. Ovos. 3. Supermercado. I. Título. II
Jaboticabal- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU – 619:616.981.49:637.4

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAULA LETICIA CAMPELLO – Nascida em 03 de abril de 1986, natural de Nhandeara, Estado de São Paulo, formou-se em Medicina Veterinária em janeiro do ano de 2009, pela Universidade Camilo Castelo Branco, Fernandópolis-SP. Ingressou no mestrado em agosto de 2010, na FCAV/UNESP/Jaboticabal no programa de Medicina Veterinária na área de Medicina Veterinária Preventiva, com ênfase em saúde pública e Salmoneloses humanas.

Email: paulacampello@hotmail.com

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Angelo Berchieri Junior pela orientação, paciência e compreensão.

A Professora Massai por sua inestimável colaboração.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal: Adriana, Bruna, Bruno, Diego, Janine, Oliveira, Priscila e Rafael pelo auxílio e apoio.

As amigas Cecília, Ana Carolina, Amanda, Andressa, Clarissa, Monaliza, Raisal, Ana Paula, Barbara, Geovana, Rafaela e Isabela, por todos os momentos inesquecíveis compartilhados.

A minha família pelo apoio, paciência e carinho.

Ao Augusto Reigota Blanco pela ajuda e horas dedicadas.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS.....	iv
	RESUMO.....	v
	SUMMARY.....	vi
I.	INTRODUÇÃO.....	1
II.	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
	2.1 Salmonelose e sua Importância Mundial.....	3
	2.2 Legislação.....	5
	2.3 Gênero <i>Salmonella</i>	6
	2.4 Epidemiologia.....	9
	2.5 Patogênese.....	12
	2.6 Saúde Pública.....	15
	2.7 Resistência a Antimicrobianos.....	19
	2.8 Aplicação de Métodos Moleculares para Detecção de <i>Salmonella</i> spp. em Ovos.....	20
III.	OBJETIVOS.....	24
	3.1 Objetivo Geral.....	24
	3.2 Objetivos Específicos.....	24
IV.	MATERIAL E MÉTODOS.....	25

4.1	Delineamento Experimental.....	25
4.1.1	Parâmetros Estatísticos para Amostragem.....	25
4.2	Processamento das amostras.....	26
4.3	Análise Microbiológica.....	26
4.3.1	Enriquecimento Seletivo.....	26
4.3.2	Semeadura em Placas.....	27
4.3.3	Testes bioquímicos presuntivos.....	27
4.3.4	Caracterização antigênica da estirpe bacteriana – prova sorológica.....	27
4.4	Análise Molecular utilizando-se a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	28
4.4.1	Obtenção do DNA.....	28
4.4.2	Utilização do <i>primer invA</i> para pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. através da PCR.....	28
4.4.3	Utilização de <i>primers</i> IE1 e <i>fliC</i> para pesquisa de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Salmonella</i> Typhimurium através da PCR.....	29
4.4.4	Amplificação dos genes <i>invA</i> , IE1 e <i>fliC</i>	32
4.4.5	Análises dos produtos amplificados.....	33
4.5	Antibiograma.....	33
4.6	Análise Estatística.....	34
V.	RESULTADOS.....	35
5.1	Análise Microbiológica.....	35
5.2	Análise Molecular pela PCR.....	37

5.3	Antibiograma.....	38
VI.	DISCUSSÃO.....	40
VII.	CONCLUSÃO.....	49
VIII.	REFERÊNCIAS.....	51

LISTA DE TABELAS

		Página
1	Valores amostrais totais com base no número de ovos brancos para consumo recebidos semanalmente.....	26
2	Concentração dos reagentes empregados na PCR para amplificação do gene <i>invA</i>	29
3	Concentração de reagentes empregados na PCR para amplificação do gene IE1.....	30
4	Concentração de reagentes utilizados na PCR para amplificação do gene <i>fliC</i>	31
5	Sequência <i>Primers</i> utilizados na PCR.....	32
6	Sorovares isolados de ovos brancos de acordo com a colheita considerando os estabelecimentos em que eram comercializados.....	35
7	Número de amostras positivas para <i>Salmonella</i> spp. em relação ao número total de amostras por supermercado.....	36
8	Prevalência de contaminação por <i>Salmonella</i> spp em ovos....	37
9	Resistência das estirpes de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de ovos brancos à antimicrobianos.....	39

***Salmonella* spp. EM OVOS BRANCOS PARA O CONSUMO HUMANO**

RESUMO: *Salmonella* spp. é um dos patógenos mais comumente encontrados em infecções de origem alimentar em seres humanos. Ovos, produtos contendo ovos e carne de aves são os principais veículos de transmissão do microrganismo, representando um desafio para saúde pública. Com o intuito de pesquisar *Salmonella* spp. em ovos brancos destinados ao consumo humano foram analisadas, por meio de análise microbiológica convencional e pela Reação em Cadeia pela Polimerase, 340 amostras compostas por cinco ovos cada, de quatro diferentes estabelecimentos comerciais. Foram observadas, do número total de amostras, cinco contaminadas pela bactéria (1,47%), sendo três provenientes do supermercado A (2,9%), uma do supermercado B (1,3%) e uma do supermercado D (1,3%) tanto na pesquisa bacteriológica quanto na PCR, não se isolando a bactéria em nenhuma das amostras do supermercado C. Os sorovares isolados nas amostras provenientes do supermercado A e B foram *Salmonella* Mbandaka e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* 6,7: z10:- e *Salmonella* Braenderup no supermercado D. No teste para analisar o comportamento dos isolados frente a antimicrobianos, todas as estirpes apresentaram resistência a pelo menos três dos antimicrobianos testados. Os resultados demonstraram que ovos contaminados estão chegando à mesa dos consumidores, representando um risco a saúde da população.

Palavras- chave: *Salmonella* spp., Ovos, Infecção Alimentar, Salmonelose Humana

***Salmonella* spp. IN WHITE EGGS FOR HUMAN CONSUMPTION**

SUMMARY: *Salmonella* spp. is one of the most common pathogens found in food-borne infections in humans. Products containing eggs and poultry meat are the main vehicles of transmission of microorganisms, representing a challenge for public health. In order to search for *Salmonella* spp. white eggs for human consumption were analyzed by methods of conventional microbiological analysis and by the Polymerase Chain Reaction, 340 samples composed of five eggs, of four different establishments. Of the total samples, five were contaminated by bacteria (1.47%). Three of them were from supermarket A (2.9%), one from supermarket B (1.3%) and one from supermarket D (1.3%), all contaminated in bacteriological analyzes and in PCR, and the bacteria was not isolated in the samples of the supermarket C. The serovars isolated in samples from the supermarket A and B were *Salmonella* Mbandaka and *Salmonella enterica* subspecies enterica 6,7: z10: - and *Salmonella* Braenderup at the supermarket D. In a test to analyze the behavior of isolated bacteria against antimicrobial agents, all strains were resistant to at least three of the antimicrobials tested. The results showed that contaminated eggs are coming to the consumers table, representing a risk to health.

Keywords: *Salmonella* spp., Eggs, Food Infection, Human Salmonellosis

I. INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva avícola representa um dos seguimentos de maior importância no mercado agropecuário brasileiro. Desde 2006, a carne de frango é o produto de origem animal com maior volume de exportação, com uma produção de 12. 230 milhões de toneladas e exportação de 3.791 milhões de toneladas (31%) em 2010 (UBABEF, 2011).

Mesmo com uma exportação de ovos e produtos de ovos ainda tímida, de 27.721 toneladas no ano de 2010 (UBABEF, 2011), esses avanços acabam exigindo evoluções no campo de sanidade animal e controle microbiológico dos alimentos principalmente em relação a microrganismos do gênero *Salmonella*.

A salmonelose é considerada uma grave zoonose com distribuição cosmopolita. Produtos avícolas como carne, ovos e seus derivados são citados como principais veiculadores desse patógeno. Segundo EFESA (2009), ovos e derivados foram responsáveis por 42% dos surtos causados por *Salmonella* spp. em na Europa.

Os sintomas das infecções por *Salmonella* spp. em seres humanos frequentemente são autolimitantes, podendo apresentar cólicas abdominais, vômito, febre e diarreia, no entanto, o quadro em crianças, idosos e imunossuprimidos pode se agravar evoluindo para septicemia e óbito.

Os sorovares mais frequentemente envolvidos em infecções alimentares de seres humanos na União Europeia são *Salmonella* Enteritidis (SE), *Salmonella* Typhimurium (STM), *Salmonella* Infantis (SI), *Salmonella* Hadar e *Salmonella* Virchow (SV) (EFSA, 2007).

Relatos de surtos de salmonelose causados por ovos e produtos a base de ovos são frequentes no Brasil e no mundo. Devido a esse fato, autoridades internacionais estão impondo medidas rigorosas de monitoramento e barreiras sanitárias, com a finalidade de reduzir a contaminação de produtos avícolas por *Salmonella* spp.

Visando a certificação de inocuidade dos produtos de origem animal, métodos de diagnóstico rápidos e precisos são cada vez mais utilizados na pesquisa de patógenos, com destaque para métodos moleculares que apresentam grande sensibilidade e especificidade.

Neste contexto o presente trabalho investigou a presença de *Salmonella* spp. em ovos brancos para consumo humano por meio de metodologia de isolamento microbiológico convencional e molecular utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Salmonelose e sua Importância Mundial

A avicultura brasileira é considerada como um dos segmentos do agronegócio nacional com maior investimento em tecnologia e pesquisa nas últimas quatro décadas (ABEF, 2011). O cenário do mercado avícola modernizou-se devido, principalmente, às exportações que exigiram melhorias no sistema de controle microbiológico, sobretudo quanto à contaminação por *Salmonella* spp. em produtos de origem animal, sendo considerada um dos patógenos mais frequentemente envolvidos em infecções de origem alimentar em seres humanos (PANISELLO et al., 2000).

A redução do número de casos de infecções alimentares humanas é um dos principais objetivos das entidades responsáveis pela saúde pública em vários países. Como estudos epidemiológicos mostram, a carne e os ovos de aves são fontes importantes de patógenos como *Salmonella* spp., sendo um desafio para os setores de vigilância sanitária e saúde pública (DE JONG & EKDAHL, 2006).

GREIG & RAVEL (2009), analisando informações governamentais e publicações científicas oriundas de vários países como da União Européia (EU), Estados Unidos da América (EUA), Canadá, Austrália e Nova Zelândia no período entre 1988 e 2007, concluíram que de 4.093 surtos de infecção alimentar em humanos registrados, 70% foram causados por *Salmonella* spp.

Mesmo com o constante investimento em monitoria e controle, *Salmonella* spp. continua sendo a maior causa de infecção alimentar no Brasil e no mundo. Nos Estados Unidos, estima-se que, por ano, ocorram cerca de 6,5 milhões de casos de infecções e 9.000 óbitos em consequência das enfermidades transmitidas por alimentos (PATRICK et al., 2004).

De acordo com MAJOWICZ et al. (2010), estima-se que 93,8 milhões de casos de gastroenterite devido a *Salmonella* spp. ocorrem mundialmente a cada ano, com 155.000 mortes, sendo 80,3 milhões desses casos transmitidos por alimentos.

Segundo HUNGES et al. (2007), entre 1992 e 2003, no país de Gales, *Salmonella* spp. foi responsável por 52% dos casos de infecção alimentar notificados. Na França, em 2005, *Salmonella* spp. foi o principal agente etiológico de hospitalização e morte por infecção alimentar bacteriana (VAILLANT et al., 2005).

O *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), relata que o gênero *Salmonella* é responsável por cerca de 1,4 milhões de doentes, 15.000 hospitalizações e 400 mortes ano nos Estados Unidos da América (GAST, 2008).

No Brasil, segundo o Serviço de Vigilância em Saúde, entre 1999 e 2008, 6.062 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) foram registrados, acometendo 117.330 pessoas, com média de sete doentes por surto e 64 óbitos. Oitenta e três por cento das notificações se deram nas regiões Sul e Sudeste. Com a maior parte das ocorrências no Rio Grande do Sul, seguido por São Paulo, Paraná e Santa Catarina, sendo *Salmonella* spp. responsável por 1.275 (21%) das notificações. Ovos crus ou mal cozidos foram os causadores de 910 (15%) do total de ocorrências por DTA (BRASIL, 2008).

Salmonella enterica sorovar Enteritidis e Typhimurium são os mais isolados de seres humanos, sendo responsáveis por 57-67% dos casos relatados por ano, mundialmente (WHO, 2008).

Os sorovares mais frequentemente encontrados em episódios de salmoneloses humanas na União Européia (UE) em 2008 foram *Salmonella* Enteritidis (58%), *Salmonella* Typhimurium (21,9%), *Salmonella* Infantis (1,1%), *Salmonella* Virchow (0,7%) e *Salmonella* Newport (0,7%). Estando 17,6% dos casos relacionados a outros sorovares (EFSA, 2010b).

Na Europa, a maior parte das salmoneloses humanas está associada ao consumo de ovos, sendo *Salmonella* Enteritidis responsável por 40,9% e 7,1% são devido à ingestão de carne suína contaminada por *Salmonella* Typhimurium (EFSA, 2010b).

Entre 1985 e 1989, 78,0% das infecções causadas por *Salmonella* Enteritidis tinham como veículo de transmissão alimentos que continham ovos crus ou levemente cozidos (ALTEKRUSE et al., 1993).

Em análise de dados sobre surtos de origem alimentar em humanos, extraídos de relatórios eletrônicos internacionais de 1988 a 2007 GREIG & RAVEL (2009), identificaram que *Salmonella* Enteritidis foi o agente causador de 991 surtos, tendo o consumo de ovos implicado em 43,4% deles. *Salmonella* Typhimurium foi responsável por 270, com 18,2% causados por ovos, e outros sorovares de *Salmonella* spp. por 657 surtos, sendo 13,6% associados ao consumo de ovos.

EBEL & SCHOSSER (2000), estimaram que nos EUA um em cada 20.000 (0,005%) ovos estaria contaminado por *Salmonella* spp. Com uma produção de mais de 90 bilhões de ovos por ano, 4,5 milhões de ovos estariam contaminados (USDA / NASS, 2010).

De acordo com relato publicado pela EFSA (2010a), a prevalência média de ovos contaminados por *Salmonella* spp. nos países da Comunidade Européia foi de 0,8% em 2006 (e mais de 90% dos isolados correspondiam a *S. Enteritidis*).

2.2. Legislação

Com o avanço do comércio internacional de alimentos a aplicação de medidas de controle para segurança alimentar passou a ser implantada tanto em produtos que abastecem o mercado interno quanto para os de exportação, seguindo os critérios de controle presentes em documentos internacionais como *Codex Alimentarius* e legislações governamentais (SILVA, 2007).

A União Européia estabelece regras para comercialização de ovos por meio da legislação nº 589 de 23 de junho de 2008 (CE, 2008). De acordo com essa legislação, os ovos devem ser rotulados constando informações relevantes para o consumidor e serviço de inspeção. Prevê que sejam armazenados e transportados em temperatura

constante. A validade não deve exceder a 28 dias pós-postura e a rastreabilidade deve ser assegurada.

Quanto aos aspectos microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios, a União Europeia segue o regulamento nº 2073/2005 da Comissão Europeia de 15 de novembro de 2005 (CE, 2005). Também segue o Plano de Controle para galinhas poedeiras, que dispõem sobre controle de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e outros sorovares (CE, 2003). Implantando, para o aumento da eficácia do Plano de Controle, o regulamento CE 1168/2006, que prevê a adoção de medidas para detecção e controle de *Salmonella* spp. e outros agentes zoonóticos durante a produção, transformação e distribuição, definindo uma redução mínima anual de 10% na prevalência de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium nas granjas (CE, 2006; EFSA, 2010a).

Em julho de 2010 entraram em vigor nos EUA, normas visando à redução da contaminação de ovos por *Salmonella* Enteritidis, as quais abrangem toda cadeia de produção e pós-produção, que vai da manipulação inicial do produto até sua chegada ao consumidor (EUA, 2010). De 1991 a 1995 *Salmonella* Enteritidis foi isolada em 35% do plantel avícola dos EUA, tendo uma redução para 7% em 2009, devido implantação de medidas de controle e melhorias na biossegurança (BRANDEN, 2006).

No Brasil ainda se encontra em uso o Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, que dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. As especificações para classificação dos ovos foram definidas no Decreto nº 56.585 de julho de 1965. Em 1991 foi criada Resolução nº 005, que define padrões de rotulagem, obrigatoriedade de carimbo do Serviço de Inspeção Federal, peso líquido, identificação do lote, data de fabricação e data de validade. (SOUZA-SOARES & SIEWRDT, 2005). Em janeiro de 2001 foi criada a resolução nº 12 exigindo ausência de *Salmonella* spp. em 25g de amostra de qualquer alimento comercializado (BRASIL, 2001).

O Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA) criou o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que se baseia na vigilância, controle e erradicação das principais doenças aviárias importantes para saúde animal e humana, com finalidade de reduzir a presença de patógenos nos produtos avícolas (BRASIL, 2003b). Posteriormente, foi implantada normativa nº 78 responsável pela aprovação das

Normas Técnicas para o Controle e Certificação de Núcleos de Estabelecimentos Avícolas livres de *Salmonella* biovar Gallinarum e de *Salmonella* biovar Pullorum e livres ou controladas para *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (BRASIL, 2003a).

Em 2009 entrou em vigor a resolução nº 35 de 17 de julho, que dispõe sobre a obrigatoriedade de instruções de conservação e consumo na rotulagem dos ovos, onde devem estar presentes de forma clara informações sobre refrigeração e danos a saúde se o produto for consumido cru ou mal cozido (BRASIL, 2009).

2.3. Gênero *Salmonella*

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Salmonella* fazem parte da família *Enterobacteriaceae*. São bacilos curtos, Gram-negativos, não esporulados, móveis, em sua maioria, contendo flagelos peritríquios, com exceção dos biovars *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum que são imóveis. As colônias típicas multiplicam-se em meios de cultura para enterobactérias medindo em torno de 2-4 mm de diâmetro, são arredondadas com bordas lisas, um pouco elevadas e brilhantes (HOLT, 1994).

São aeróbios ou anaeróbios facultativos, multiplicando-se bem em ambas as condições, a temperatura ideal de multiplicação é de 37°C, no entanto é observado multiplicação entre cinco a 45°C. Podem se multiplicar nos extremos de pH, sendo mais favorável pH em torno de 7 (HOLT, 1994).

Possuem capacidade para metabolizar nutrientes, produzem gás a partir da fermentação de glicose, não fermentam sacarose, malonato ou lactose a menos que, a estirpe isolada possua um plasmídio que codifique a utilização desse açúcar como fonte de energia, como é o caso de *S. arizonae*. Produz sulfeto de hidrogênio (H₂S) em sua maioria, utilizam citrato como fonte de carbono, não hidrolizam uréia, são oxidase negativa, catalase positiva, reduzem nitrato a nitrito e não produzem indol (HOLT, 1994; JONES et al., 2000; DICKEL, 2004).

A taxonomia do gênero *Salmonella* é complexa. Os sorovares são definidos e estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), com colaboração do Centro de Pesquisa e Referência do Instituto Pasteur de Paris. Novos sorovares são listados anualmente pelo esquema de Kauffman-White e diferentes sistemas podem ser empregados para seu estudo. Entretanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS), por meio do Centro de Referência e Pesquisa de *Salmonella*, recomenda uma nomenclatura que reflete os avanços da taxonomia do gênero, consistindo de duas espécies, *Salmonella enterica* contendo seis subespécies, *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, *S. enterica* subespécie *indica* e *Salmonella bongori* (POPOFF & LE MINOR, 1997, 2001).

São conhecidos mais de 2.610 sorovares de *Salmonella* spp. aproximadamente 90 são os mais comuns em casos de infecção de seres humanos e de animais. Dentre estes, alguns podem infectar as aves, causando ou não o paratifo aviário e, por meios de produtos alimentícios de origem avícola, estarem associados com casos de infecção alimentar em seres humanos (BERCHIERI JR & FREITAS NETO, 2009; GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Cerca de 1.435 sorovares da espécie de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* colonizam o trato entérico dos animais endotérmicos, enquanto a espécie *Salmonella bongori* é encontrada em animais exotérmicos e no meio ambiente (POPOFF & LE MINOR, 1997).

Os organismos do gênero *Salmonella* possuem antígenos somáticos (designados pela letra O), flagelares (designados pela letra H) e de virulência ou capsular ocasional (designado por Vi, encontrado nos sorovares Typhi, Paratyphi C e Dublin), que determinam o sorovar com referência à fórmula antigênica do esquema de Kauffman-White (PELCZAR et al., 1981; QUINN et al., 1994; OIE, 2004).

Os antígenos somáticos (O) são formados por repetidas subunidades de oligossacarídeos. Estão localizados na porção mais externa da parede celular bacteriana e correspondem à parte antigênica da camada de lipopolissacarídeos (LPS), sendo identificados por números arábicos que caracterizam os sorogrupos de *Salmonella* spp. (LE MINOR, 1984; SELANDER, et al., 1996).

Os antígenos flagelares (H) são constituídos por proteínas chamadas flagelinas, que são altamente imunogênicas e instáveis na presença de calor. Localizam-se na parte externa da parede celular, sendo responsáveis pela motilidade bacteriana, podendo estar presente na forma simples (monomérica) (H1) ou em duas formas separadas (difásica) (H2). Os antígenos flagelares H1 (flagelar fase1) presentes no gênero *Salmonella* são descritos por letras minúsculas do alfabeto e H2 (flagelar fase2) por números arábicos (LE MINOR, 1984; GAST, 1997b).

São susceptíveis à destruição quando submetidas a 55°C por 1 hora, ou a 60°C durante 15 a 20 minutos. Possuem multiplicação lenta quando expostas a baixas temperaturas sendo resistentes a desidratação e ao congelamento (HOLT, 1994; GAST, 1997b). Sensíveis à maioria dos desinfetantes comumente utilizados, incluindo o hipoclorito de sódio 1%, etanol 70%, glutaraldeído 2%, desinfetantes a base de iodo, fenóis e formoldeídos. Solução de cloreto de sódio (NaCl) a 3-4%, também inibe a multiplicação da bactéria (OIE, 2004).

2.4. Epidemiologia

Bactérias do gênero *Salmonella* possuem distribuição cosmopolita sendo responsáveis por doenças em seres humanos e animais (POPOFF & LE MINOR, 2001).

São carregadas por uma ampla variedade de hospedeiros, como animais silvestres, domésticos e o ser humano (GAST, 1997^a). Alguns sorovares estão associados, com maior frequência, a determinados hospedeiros. *Salmonella* Cholerasuis causa pneumonia, enterocolite e septicemia em suínos; *Salmonella* Dublin causa enterite mucohemorrágica, pneumonia, septicemia, aborto em bovinos e enterite necrótica, pneumonia, septicemia e mortalidade em bezerros; *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum causa o tifo aviário em galinhas; *Salmonella* Gallinarum biovar Pullorum, pulorose em galinhas e perus; *Salmonella* Abortusequi causa aborto em equinos; *Salmonella* Abortusovis aborto em ovinos. As estirpes adaptadas aos seres

humanos são *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi que causam febre tifóide e febre paratifoide, respectivamente (POPPE, 1999).

Segundo DAVIES & WRAY (1996), muitos dos sorovares do gênero *Salmonella*, podem sobreviver por semanas ou meses em esterco, cama de aves, nos equipamentos em galpões vazios, no solo ao redor dos galpões, nas excretas de aves silvestres, partículas de poeira e nos comedouros, podendo ainda, segundo esses autores, sobreviverem em ração contaminada artificialmente por 26 meses.

Os sorovares de *Salmonella* spp. considerados paratíficos para aves podem prejudicar a avicultura industrial, piorando os resultados zootécnicos, gerando perdas e dificultando a comercialização de produtos de origem avícola (BERCHIERI JÚNIOR & BARROW, 1995; NASCIMENTO et al., 1998). Podem causar infecção sistêmica em aves jovens e adultas, apresentando, dependendo da idade da ave, sintomas clínicos seguidos de lesões em fígado, baço e cecos entre outros órgãos, disseminação fecal prolongada, queda na produção e ovos contaminados (BARROW, 2000; BERCHIERI JR & FREITAS NETO, 2009).

Aves recém nascidas são muito susceptíveis a salmonelas paratíficas. Os sinais clínicos são raramente observados em aves com mais de quatorze dias de vida, em alguns casos, observa-se retardo no crescimento e mortalidade. Em casos severos pode ser confundida com pulorose ou outra enfermidade bacteriana causadora de septicemia (BERCHIER JUNIOR & FREITAS NETO, 2009).

Salmonelas paratíficas podem contaminar o conteúdo dos ovos antes da oviposição. Segundo THIAGARAJAN et al. (1994), *Salmonella* Enteritidis pode colonizar os folículos pré-ovulatórios pela interação com as células da granulosa ovariana. A contaminação do ovo se dá pela presença da bactéria nos folículos ovarianos e no oviduto, resultando em contaminação da gema e da albumina.

A clara, em geral, não apresenta contaminação, pois contém elementos naturais que dificultam a multiplicação bacteriana, como lisozima, ovotransferrina e deficiência em ferro, elemento essencial para a multiplicação do microrganismo. Contudo, a manipulação da clara no preparo de alimentos pode romper esse equilíbrio e favorecer a multiplicação de *Salmonella* spp. (SHIVAPRASAD et al., 1990; BARROW & LOVELL,

1991). De acordo com GANTOIS et al. (2008), *S. Typhimurium* pode persistir no albúmen do ovo, sendo mais resistente a lisozima do que *S. Enteritidis*.

Segundo GANTOIS et al. (2008) e KELLER et al. (1997) *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium possuem potencial para colonizar o trato reprodutivo de galinhas. No entanto, apenas *S. Enteritidis* foi isolada de ovos após postura. Resultado semelhante foi obtido em inoculação de *S. Typhimurium*, por via oral e intravenosa em galinhas poedeiras, não se observando contaminação nos ovos (BAKER, 1980).

OKAMURA et al. (2001b), infectaram galinhas poedeiras pela via intravenosa com seis sorovares de *Salmonella* spp., não havendo resultados positivos em análise pós-infecção. No entanto em nova tentativa com inoculação por via vaginal, foram detectados ovos com interior e casca positivos por *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (OKAMURA et al., 2001a).

Segundo pesquisa sobre a prevalência de *Salmonella* spp. em ovários de galinhas nos EUA, *S. Heidelberg* foi encontrada em 56% dos isolados, seguida por *S. Agona* 13%, *S. Oranienburg* 6,1%, *S. Mbandaka* 5,2%, *S. Kentucky* 3,5%, *S. Montevideo* 3,5%, *S. London* 2,6%, e *S. Enteritidis* 2,4% (BARNHART et al., 1991).

A contaminação também pode ocorrer durante a passagem do ovo pela cloaca, pelo contato com fezes contaminadas, devido à imaturidade da cutícula que não oferece proteção eficiente contra a penetração de bactérias pelos poros da casca, ou devido ao contato, no meio ambiente, com material contaminado. A diferença de temperatura entre o ambiente e ovo pós-eclosão cria uma pressão negativa favorecendo a penetração de bactérias (MESSENS, 2005).

Na França, CHEMALY et al. (2009), investigaram a presença de *Salmonella* spp. em 150 ovos provenientes de 28 granjas de matrizes consideradas positivas para *Salmonella* spp. Em 11 (39,35) delas, encontram pelo menos um ovo com a casca contaminada (1,05%).

No interior do ovo, a multiplicação de *Salmonella* é facilitada pela temperatura de armazenamento. No albúmen, a bactéria apresenta multiplicação a 20 °C, sendo incapaz de se multiplicar em temperaturas inferiores a 10 °C. Multiplica-se rapidamente na gema que é rica em ferro e outros nutrientes essenciais para o desenvolvimento bacteriano. A idade do ovo também representa um fator de risco adicional, ovos velhos

apresentam deterioração da membrana vitelina, facilitando a migração das bactérias (ACMSF, 1993; GANTOIS et al., 2009). A permeabilidade da membrana da gema aumenta em temperaturas de armazenamento acima de 10 ° C (HUMPHREY, 1994).

A infecção da progênie, por transmissão transovariana e horizontal, é um importante aspecto da epidemiologia das salmoneloses aviárias. Ovos contaminados poderão ser incubados juntamente com ovos de boa qualidade e durante o nascimento, provocar contaminação cruzada, resultando no aumento de pintainhos infectados (WRAY & DAVIES, 1998).

Segundo OPITZ et al. (1992), as principais fontes de infecções de lotes de poedeiras comerciais são pintos oriundos de matrizes infectadas, infecções cruzadas nos incubatórios e contaminações ambientais nas granjas. Nas granjas haverá disseminação horizontal entre os lotes de aves, pelo contato direto ave-a-ave, ingestão de fezes ou cama, água de bebida e por equipamentos contaminados, além de pessoas, roedores e insetos. Instalações contaminadas são implicadas como importantes formas de disseminação de salmonelas paratífóides (GAST, 1997^a). Nos sistemas convencionais as gaiolas são difíceis de serem limpas e desinfetadas, abrigando a bactéria e podendo transmiti-la á novos lotes que utilizem as mesmas instalações (CARRIQUE-MAS et al., 2009).

CRIPPEN et al. (2009), analisando roedores de granjas positivas para *Salmonella* spp., encontraram 24% dos camundongos capturados, positivos para *Salmonella* Enteritidis. Posteriormente, em análise de fezes de roedores experimentalmente infectados por esse sorovar, detectaram persistência da infecção por 10 meses na população, podendo ser considerada uma ativa fonte de disseminação de *Salmonella* spp.

Rações contaminadas são fontes de *Salmonella* spp. BERCHIERI JUNIOR et al. (1984) isolaram *Salmonella* em amostras de farinhas de carne, de pena e de pena e vísceras, oriundas de três fábricas de ração no Estado de São Paulo. Em outro estudo, em uma granja avícola comercial, BERCHIERI JUNIOR et al. (1989) isolaram 22 sorovares de *Salmonella* spp. em amostras de farinha de carne, de ração, de cama de aves e de fezes de rato. Dezenove desses sorovares foram encontrados em farinha de

carne, demonstrando sua importância como fonte de contaminação para aves de granjas avícolas comerciais.

2.5. Patogênese

A transmissão para o ser humano, geralmente, ocorre pelo consumo de alimentos contaminados, principalmente carne e ovos (MILLER, 1989). Ao serem ingeridas, as bactérias colonizam o trato intestinal e invadem as células M, na placa de Peyer e eritrócitos, onde são fagocitadas por macrófagos gerando uma infecção local. Prosseguindo, *Salmonella* spp. atravessa a camada do epitélio intestinal, alcança a lâmina própria e prolifera-se, provocando inflamação. Uma resposta leucocitária polimorfonuclear limita a infecção aos intestinos e aos nódulos linfáticos mesentéricos adjacentes. A resposta inflamatória está relacionada com a liberação de prostaglandinas, que estimulam a adenilciclase, o que acarreta em aumento de secreção de água e eletrólitos, provocando diarreia aquosa. *Salmonella* spp. pode permanecer viável no interior dos macrófagos, multiplicando-se e se espalhando para os nódulos linfáticos mesentéricos através do sistema circulatório, podendo atingir o fígado, vesícula biliar, baço, ossos, meninges e outros órgãos, causando infecção sistêmica (FINLAY, 1994; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

As manifestações clínicas da infecção em seres humanos por *Salmonella* spp. variam de enterocolite a septicemia. Os sintomas, bem como a gravidade da enfermidade, dependem do sorovar envolvido e da competência dos sistemas de defesa do indivíduo infectado (FRANCO & LANDGRAF, 1996; GAL-MOR, 2010). Pessoas muito jovens, idosos ou imunodeprimidos tendem a apresentar quadros clínicos mais severos, enquanto em adultos saudáveis a enterite tende a ser autolimitante (MILLER, 1989).

A diarreia é o principal sintoma e sua intensidade varia de paciente para paciente, sendo acompanhada, algumas vezes, por dores abdominais, cólicas, febre, náusea, vômito e cefaléia (SILVA, 1991).

O gênero *Salmonella* é composto por microrganismos que possuem vários fatores de patogenicidade que propiciam a invasão e a colonização das células do hospedeiro, gerando uma série de eventos que levam ao aparecimento da doença. Esses fatores podem estar presentes no cromossomo da bactéria, ou em elementos genéticos transmissíveis, como *transposons* e plasmídios (VAN ASTEN & VAN DIJK, 2005; VIEIRA, 2009). Alguns são codificados por um grande agrupamento de genes conhecido como “*Salmonella* Pathogenicity Islands” (SPI). São descritas cerca de 19 diferentes ilhas, indicando que foram adquiridas há vários anos, como a SPI-1 e outras específicas para determinados sorovares, provavelmente adquiridas recentemente, como as SPI-7, SPI-8, SPI-15 (HENSEL, 2004; BARROW et al., 2010).

A capacidade de invasão das células hospedeiras está associada à expressão dos genes contidos na Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* 1 (SPI-1). Um dos genes envolvidos no processo de invasão é o *invA*, localizado no *operon invABCD*. Este gene codifica a proteína InvA da membrana interna da bactéria que é essencial para invasão das células epiteliais do hospedeiro (GALAN & CURTISS III, 1989). Sorovares de *Salmonella* que não possuem o gene *invA* são incapazes de expressar os genes *invABC*, impossibilitando a invasão de células de mamíferos (GALAN et al., 1992).

SPI-1 codifica o sistema de secreção tipo três (SSTT), que media a translocação de um complexo grupo de proteínas efetoras para o interior das células. Um subgrupo das proteínas efetoras media a invasão de células não fagocíticas, resultando na reorganização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira (SCHIMIDT & HENSEL, 2004). Outro papel de SPI-1 está associado à expressão de proteínas responsáveis pelo processo inflamatório no epitélio intestinal e aos sintomas de diarreia (HENSEL, 2004).

A replicação intracelular da *Salmonella* spp. está associada à expressão dos genes contidos na SPI-2 que são ativados quando a bactéria é internalizada, estando ligado a capacidade de sobrevivência no interior de células fagocíticas e de replicação no interior de vesículas de células eucariontes, sintetizando um segundo SSTT e levando à infecção sistêmica. SPI-2 é composta por duas porções diferentes. Uma delas presente apenas nos sorovares de *S. enterica* e outra comum às espécies *S. bongori* e *S. enterica* (HENSEL, 2000; SCHIMIDT & HENSEL, 2004).

Outras SPI estão associadas a captação de ferro ou magnésio, síntese de fimbrias, genes de resistência a antimicrobianos ou com funções ainda não definidas (HENSEL, 2004).

Alguns componentes da estruturas da bactéria são essenciais para expressão de sua patogenicidade. O lipopolissacarídeo está presente na superfície das bactérias Gram-negativas e é responsável pela indução de efeitos patológicos no hospedeiro, como febre, inflamação, hipotensão, leucocitose e choque séptico, sendo considerado uma endotoxina (PERRY, 1993). Os flagelos são apêndices de superfície, necessários para motilidade e invasão das células do hospedeiro induzindo a inflamação intestinal (AHMER et al., 1999; HAPFELMEIR et al., 2004). Os monômeros protéicos do filamento flagelar, conhecidos como flagelina, estimulam a resposta imune. Em *S. Typhimurium*, os genes responsáveis pelos antígenos flagelares de fase 1 e 2 são expressos pelos genes *fliC* e *fljB*, respectivamente. A inativação desses dois genes reduz a inflamação intestinal do hospedeiro (GEWIRTZ et al., 2001; IGABAL et al., 2005).

2.6. Saúde Pública

A maioria das infecções alimentares de seres humanos têm sido associadas ao consumo de ovos, alimentos preparados com ovos crus ou mal cozidos e carne de frangos contaminadas por *Salmonella* spp. (POPPE, 1994). Essas infecções são ocasionadas, principalmente, devido à mudança de hábitos alimentares, ao modo de produção desses alimentos, estocagem e distribuição (CAFFER & EIGUER, 1994).

A contaminação de produtos avícolas, como carne e ovos para consumo humano, pode ocorrer durante o abate, contato com superfícies contaminadas, durante o processamento, contaminação cruzada pela mão dos manipuladores e durante o preparo dos alimentos (SILVA, 1991).

Estudando os fatores epidemiológicos de 23 surtos de salmoneloses ocorridos no Estado de São Paulo, PERESI et al. (1998a), observaram que o agente foi veiculado em 22 (95,7 %) deles por alimentos contendo ovos.

Em agosto de 2010, foram retirados cerca de 550 milhões de ovos das prateleiras dos supermercados, nos Estados Unidos da América, por suspeita da presença de *Salmonella* spp. Os ovos foram produzidos por duas empresas, que os comercializavam sob várias marcas, distribuídas em diversas regiões do país (JONES, 2010). Ovos foram associados a casos de infecções alimentares envolvendo 3.578 pessoas, no período de primeiro de maio a 30 de novembro de 2010, em dez estados americanos. Em dezembro de 2010, 1.939 desses casos foram confirmados, onde a estirpe isolada foi *Salmonella* Enteritidis (CDC, 2010a).

No início de janeiro de 2012 foram registrados 156 casos de salmonelose no município de Batatais – SP, com um óbito, devido ao consumo de maionese caseira em um restaurante local. As amostras positivas foram encaminhadas para o Instituto Adolfo Lutz que confirmou a presença de *Salmonella* Enteritidis (CVE, 2012).

No sul da Austrália, na região metropolitana de Adelaide, foram investigados noventa e quatro casos de salmonelose ocorridos em 2008. Segundo relatos dos indivíduos acometidos, 62,8% haviam ingerido carne de frango e 47,9% ovos, antes do aparecimento dos sintomas. Foram identificados 31 sorovares, com predominância de *S. Typhimurium* em 61,7% dos casos. Em posterior análise, *S. Typhimurium* e *S. Infantis* foram isoladas de carcaças de frangos. Não foi isolada nenhuma estirpe do conteúdo interno dos ovos; no entanto *Salmonella* *Infantis* foi detectada na superfície externa de 3,5% deles (FEARNLEY et al., 2011).

Em agosto de 2010, em 18 estados dos EUA, ocorreram 44 casos, envolvendo consumo de carne de frango de uma empresa que fornecia comida pronta congelada, sendo isolado o sorovar *Salmonella* Chester (CDC, 2010b).

Em 2004, nos EUA, uma cadeia de supermercados foi apontada como responsável por infecções alimentares em nove estados devido à comercialização de carne moída contaminada por *Salmonella* *Typhimurium* (CDC, 2006). Na Austrália em 2005, fígado de cordeiro foi responsável por um surto de *S. Typhimurium* (HESS et al., 2008). Em 2007, na Europa, ocorreram 37 surtos envolvendo carne suína e derivados (EFSA, 2009).

Na Europa, nos últimos anos, houve um aumento significativo de casos humanos de infecção por *Salmonella* *Typhimurium* associados a alimentos. Em 2008, 3,9% dos

surtos relatados foram causados por esse sorovar, tendo a carne de porco como alimento veiculador. Levantamentos epidemiológicos apontam à carne suína como possível causador do recente aumento de casos na União Européia (EFSA, 2010b).

Produtos lácteos normalmente estão envolvidos em distúrbios gastrintestinais devido a problemas na pasteurização, consumo de leite cru ou derivados e contaminação pós-pasteurização. Um exemplo é o surto causado por *Salmonella* Typhimurium na Pensilvânia, EUA, em 2007, pelo consumo de leite cru. O agente foi isolado em seres humanos acometidos e no leite. Uma investigação confirmou que a fonte de *Salmonella* Typhimurium foi o leite cru e derivados crus de um laticínio (CDC, 2007).

Outros produtos relacionados à infecção por *Salmonella* spp. são frutas, verduras e legumes, referidos como potenciais veículos de infecção gastrintestinal. Eles são consumidos, em sua maioria, crus podendo se contaminar em sua produção, durante o armazenamento ou mesmo no varejo. Em 2002, tomates cultivados e embalados no estado da Virgínia (EUA), contaminados por *Salmonella* Newport, provocaram distúrbios intestinais em 510 pessoas de 26 outros estados (KRETSINGER et al., 2003). Posteriormente, em julho e novembro de 2005, a mesma estirpe causou distúrbios em pelo menos 72 pessoas em 16 estados dos EUA. Estudos realizados durante o surto de 2005, confirmaram que o tomate foi a via de transmissão e que a contaminação deveu-se a água da lagoa, utilizada na irrigação da plantação (GREENE et al., 2008).

No final de 2005, tomates servidos em um restaurante estiveram ligados a um surto por *Salmonella* Braenderup, com 82 casos confirmados. Os tomates implicados foram cultivados em dois campos na Florida, não se isolando o agente em investigações de amostras ambientais (CDC, 2005a).

Em abril de 2010, o consumo de salame causou infecção alimentar por *Salmonella* Montevideo em 272 pessoas de 44 estados dos EUA, sem nenhuma notificação de óbito (CDC, 2010c). A bactéria encontrava-se nas pimentas vermelhas e pretas utilizadas na preparação do embutido.

Surto ocasionado por *Salmonella* sorovar I 4, 5, 12: i: -, afetou 140 pessoas de 26 estados americanos, do dia primeiro de novembro de 2010 a 11 de fevereiro de

2011. A via de transmissão foi atribuída ao consumo de brotos de alfafa misturados com brotos de rabanetes e trevos crus. O alimento foi comercializado em vários estados dos EUA, sendo que 50% dos casos ocorreram em Illinois. As investigações concluíram que a estirpe de *Salmonella* spp. encontrava-se na água que irrigava a cultura (CDC, 2011a). Em julho de 2010, em 11 estados americanos, 44 indivíduos foram contaminados por *Salmonella* Newport em decorrência do consumo de brotos de alfafa crus (CDC, 2010d).

Desde a década de 1980, *Salmonella* Enteritidis tem sido um dos mais comuns agentes de infecção alimentar de seres humanos em virtude da ingestão de ovos e derivados (COGAN & HUMPHREY, 2003; EFSA, 2010a). Duzentos e noventa e oito (80%) dos 371 surtos de origem conhecida por *Salmonella* Enteritidis de 1985 á 1999, foram associados a ovos (PATRICK et al., 2004).

Salmoneloses humanas causadas por *S. Typhimurium*, envolvendo consumo de ovos, raramente são relatadas pela União Européia, totalizando 3,5% dos casos, contra 77,2% causados por *S. Enteritidis* (EFSA, 2010a).

Em 2006, 165.023 casos confirmados de salmonelose humana, foram relatados pela União Européia, através do Sistema Europeu de Vigilância (EFSA, 2009). *Salmonella* Enteritidis foi identificado como o agente etiológico responsável por 62,5% dos casos, *Salmonella* Typhimurium, 12,9% e outros sorovares foram responsáveis por menos de 2% das infecções (BRANDEN, 2006).

No Reino Unido, a epidemia devido a *Salmonella* Enteritidis PT4 teve início entre 1982 e 1983, atingindo seu pico em 1993, declinando a partir de 1997 (DEFRA, 2007). Em 2008 foram introduzidas medidas de controle para *Salmonella* spp. com adoção de programas de vacinação e controle de infecções em matrizes. Desde então, o número de infecções em humanos causados por *Salmonella* Enteritidis, especialmente PT4, diminuiu drasticamente (COGAN & HUMPHREY, 2003). Segundo a Agência de Proteção da Saúde do Reino Unido (HPA, 2010), o número de isolamentos de *Salmonella* Enteritidis PT4, foi de 15.564 em 1999 para 581 em 2009.

Os custos médicos e as perdas de produtividade devido às infecções por *Salmonella* spp. nos EUA foram estimados em um bilhão de dólares em 1987 (ROBERTS, 1988), aumentando para quatro bilhões em 1994, tendo *Salmonella*

Enteritidis como principal agente etiológico. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, os EUA possuíam a menor incidência de *S. Enteritidis* entre os países desenvolvidos (ZEIDLER, 1996).

No Brasil, investigações de surtos de infecções alimentares ocorridos em diferentes regiões e envolvendo alimentos variados, constataram que *Salmonella* Enteritidis era o principal sorovar responsável pela salmonelose humana (PERESI et al., 1998b; GELLI et al., 1998).

Segundo TAUNAY et al. (1996), foram identificadas no Estado de São Paulo, de 1950 a 1990, 45.862 estirpes de *Salmonella*, sendo 31.517 isoladas de infecções humanas e 14.345 isoladas de material de outras origens. *Salmonella* Enteritidis correspondeu a um percentual de 0,4% dos sorovares isolados. Já no período de 1991 a 1995, TAVECHIO et al. (1996) avaliaram 5.490 estirpes de origem humana e 3.236 de material não humano. *Salmonella* Enteritidis correspondeu a 1,2% dos isolados em 1991, 2% em 1992, 43,3% em 1994 e 64,5% em 1995.

2.7. Resistências a Antimicrobianos

O aumento da resistência antimicrobiana tem implicações importantes na saúde pública. Estudos moleculares tornaram possível traçar a rota desta resistência, que pode ser adquirida por mutações no DNA cromossomal ou por aquisição de material genético extracromossômico por meio de plasmídios e transposons (VÁZQUEZ et al., 2002).

Drogas antimicrobianas, às quais os animais de produção são expostos, exercem uma pressão seletiva que conduz a seleção de estirpes resistentes. O uso indiscriminado e a administração de doses subterapêuticas em rações animais como promotores de crescimento agravam mais o processo de resistência (SMITH et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2005). A presença de estirpes resistentes em produtos de origem animal pode ameaçar a eficácia de antimicrobianos em humanos (COHEN & TAUXE, 1986; SMITH et al., 2002).

Durante décadas, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol foram os agentes antimicrobianos recomendados para o tratamento de infecções graves causadas por *Salmonella* spp. Hoje altas taxas de resistência a esses medicamentos têm dificultado o tratamento dessas infecções. Nos Estados Unidos a resistência à tetraciclina passou de 9% em 1980 a 24% em 1990 enquanto à ampicilina de 10% a 14%, no mesmo período (SMITH et al., 2002). Há relato de um caso fatal num paciente infectado com *Salmonella* resistente ao cloranfenicol (COHEN & TAUXE, 1986).

No Reino Unido, a resistência de *S. enterica* sorovar Typhimurium a antimicrobianos é alta, com 45% dos isolados resistentes à tetraciclina, 40% às sulfonamidas e 17% apresentando resistência à ampicilina. Esta multiresistência tem sido associada à disseminação de um clone de *S. enterica* sorovar Typhimurium denominado de DT104 (MOLBAK et al., 1999).

Os níveis de resistência aos antimicrobianos denotam o efeito nocivo da utilização indiscriminada dessas drogas em granjas avícolas (BERCHIERI JUNIOR et al., 1987).

MENDONÇA et al. (2011), analisaram 32 estirpes de *Salmonella* Minnesota, provenientes de uma unidade de abate de frango localizada em Nuporanga SP, isoladas tanto da granja responsável pelo fornecimento das aves, quanto do abatedouro. Observaram que 100% das estirpes eram resistentes à lincomicina, 93,75% à tetraciclina e a sulfonamida, 28,12% à amoxicilina, 6,25% à gentamicina e a trimetropima e 3,125% à ceftazimida. Trinta estirpes (93,75%) apresentaram resistência a três ou mais antibióticos, caracterizando-se como multirresistentes.

FLORES et al. (2011), analisando o perfil de resistência de estirpes de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Senftenberg, adquiridas em granja comercial de frango de corte, observaram múltipla resistência à penicilina, eritromicina, lincomicina e oxaciclina.

Em análise de 200 amostras de ração avícola BERCHIERI JUNIOR et al. (1993) verificaram que as estirpes de *Salmonella* spp., isoladas em 20 (10%) das amostras de ração, possuíam resistência à tetraciclina, 75% à cefalotina, 46,5% à ampicilina, 21,4% à amicacina e sulfazotrim, 17,9% ao cloranfenicol e 6,3% à cefoxitina. BERCHIERI JUNIOR, et al. (1985) testaram o comportamento de 139 estirpes de *Salmonella* spp.

isoladas de amostras de farinha de origem animal, frente a antimicrobianos, verificando que 100% das estirpes isoladas possuíam sensibilidade ao cloranfenicol e sulfato de colistina e resistência a sulfazotrim, bacitracina e penicilina.

2.8. Aplicação de Métodos Moleculares para Detecção de *Salmonella* spp. em Ovos.

Os métodos analíticos para pesquisa de *Salmonella* spp. em ovos e outros produtos, se definem por diagnóstico microbiológico, com isolamento em meios seletivos e identificação do agente utilizando-se testes bioquímicos e sorológicos (SOURMET et al., 1999). Porém, metodologias de diagnóstico executáveis em curto período, constituem-se em estratégias muito utilizadas (RIJPENS, 1999; FRESCHI et al., 2005).

A amplificação do DNA por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) trouxe mais rapidez e precisão ao diagnóstico (SANTOS 2001; RODRIGUES, 2002) obtendo maior aceitação entre as demais técnicas moleculares, devido sua alta sensibilidade e especificidade, se tornando uma estratégia confiável e de melhor custo benefício para detecção de *Salmonella* spp. em carnes, fezes, tecidos, sangue, leite e ovos, com metodologias de manipulação distintas, visando inativar possíveis inibidores da reação (FADL et al., 1995; WOODWARD & KIRWAN, 1996; RIJPENS, 1999).

A PCR foi descrita por Kary Mullis em 1986, caracterizando-se pela síntese de ciclos repetidos de desnaturação do DNA, anelamento dos oligonucleotídeos (“*primers*” que definem o DNA alvo a ser amplificado) e extensão dos *primers*, formando a base para detecção de sequências específicas de ácidos nucléicos (PERSING, 1991).

Comparando a análise bacteriológica convencional com a PCR, GOUVEA (2009) analisou 34 amostras de peitos de frango artificialmente contaminadas com *Salmonella* spp. e 31 amostras de carcaças de frango adquiridas no varejo. Das amostras artificialmente contaminadas, 97% se confirmaram positivas no exame microbiológico e 100% na PCR. Duas amostras adquiridas no varejo apresentaram resultados positivos

no exame microbiológico que não foram confirmados pela PCR. Não havendo diferença estatística entre os dois métodos.

FLORES et al. (2003) compararam a técnica de análise bacteriológica convencional à PCR na análise de amostras de ovos obtidas em propriedades rurais em Santa Maria, no Estado do Rio Grande do Sul e constataram que a PCR é tão eficiente quanto o método bacteriológico, com tempo de análise muito inferior, com rapidez e precisão.

HOORFAR et al. (1999) relataram que a PCR não é vulnerável a reações atípicas e não depende de variações fenotípicas evitando, assim, resultados falso-negativos fornecidos pela técnica microbiológica.

GALAN et al. (1992) efetuaram a caracterização molecular de um dos genes de invasão de *Salmonella*, denominado *inv*, como o primeiro de um *operon* de genes arranjados na mesma unidade transcricional, que codificaria proteínas relacionadas à penetração celular presente na maior parte de sorovares do gênero *Salmonella*. Sendo denominado gene alvo para detecção de *Salmonella* spp. (SALEHI, et al., 2005).

SANTOS et al. (2001) avaliaram a especificidade, seletividade e sensibilidade dos oligonucleotídeos iniciadores derivados do gene *invA* na detecção de nove culturas padrão de *Salmonella* spp., obtendo uma amplificação de DNA em todas as amostras analisadas.

WANG & YEH (2002) descreveram uma sequência de nucleotídeos para detecção de *Salmonella* Enteritidis com inserção no gene *IE*, denominando o par de primers *IE1L* e *IE1R*. Vinte e quatro estirpes de *Salmonella* Enteritidis foram testadas juntamente com diversos sorovares de *Salmonella* e diferentes espécies bacterianas. Todas as amostras de *S. Enteritidis* geraram produtos de PCR com peso molecular de 316pb, não apresentando nenhum resultado falso positivo.

CHIOU & OU (1996), utilizaram a técnica de PCR, com dois pares de oligonucleotídeos, cromossomal *invA* e plasmidial *spvC* e exame bacteriológico para analisar amostras de fezes de 57 crianças com gastroenterite. Quarenta pacientes encontravam-se infectados por *Salmonella* spp. Trinta e oito amostras foram positivas pela PCR e trinta e duas no exame microbiológico. Duas amostras apresentaram resultado positivo na cultura e não foram detectadas na PCR, supondo-se a presença

de compostos inibitórios, como bilirrubina, não suficientemente reduzidos pela diluição utilizada.

VON RUCKERT (2006), utilizando a técnica de PCR para detecção de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos durante o abate, detectou 27 amostras positivas em 90 analisadas.

Em análise de 86 amostras de carne de frango, 104 de carne de peru e 54 de carne moída FRATAMICO (2003) detectou através do método de PCR, utilizando o gene *invA*, 35,5% das amostras de carne de frango positivas para *Salmonella* spp., 28,8% positivas das amostras de carne de peru e 6,5% das amostras positivas de carne moída. Outros três diferentes testes foram usados sendo que a PCR apresentou maior sensibilidade e confiabilidade.

III- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Avaliar a presença de *Salmonella* spp. em ovos brancos destinados ao consumo humano.

3.2- Objetivos Específicos

3.2.1. Avaliar amostras de ovos brancos provenientes de supermercados quanto à presença de *Salmonella* spp. por meio de análise microbiológica convencional.

3.2.2. Análise molecular por meio da reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), utilizando gene *invA* para pesquisa de *Salmonella* spp., gene IE1 para pesquisa de *Salmonella* Enteritidis e gene *fliC* para pesquisa de *Salmonella* Typhimurium.

3.2.3. Análise da reação das estirpes isoladas frente à ação de antimicrobianos.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

Os ovos brancos destinados ao consumo foram adquiridos em quatro supermercados (identificados pelas letras A, B, C e D), situados na cidade de Jaboticabal-SP. Foram realizadas quatro colheitas em cada supermercado, com intervalos de 21 dias entre cada uma, correspondendo a 16 visitas. O número de ovos colhidos foi baseado no recebimento semanal da mercadoria pelo estabelecimento (Tabela 1).

Os estabelecimentos comerciais escolhidos para aquisição dos ovos foram selecionados por possuírem diferentes origens e diferentes distribuidores do produto. Os ovos eram comercializados em bandejas de papelão de doze unidades embaladas com plástico filme. As colheitas foram realizadas de janeiro a junho de 2011.

4.1.1. Parâmetros estatísticos para amostragem

Para determinar o número mínimo de amostras foi utilizada a fórmula de amostragem descrita por THRUSFIELD (2007).

Fórmula para cálculo do tamanho da amostra (n)

$$n = \frac{z^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{d^2} = \frac{2^2 \cdot 1,0 \cdot 99,0}{0,5^2} \approx 1.584 = 1.700 \text{ ovos}$$

Onde: P= prevalência estimada de contaminação= 1,0%

Confiança= 95,0% → α = 5,0% → z = 1,6 ≈ 2,0

Desvio= 0,5%

Tabela 1. Valores amostrais totais com base no número de ovos brancos para consumo recebidos semanalmente.

	Supermercados				Total
	A	B	C	D	
Numero de Ovos recebidos semanais	3.000	2.100	2.520	2.100	9.720
Parcela Amostral (%)	31	21.6	25.9	21.6	100
Nº de ovos colhidos (total)	520	380	420	380	1.700
Total final de Amostras (pool 5 ovos)	104	76	84	76	340

4.2. Processamento das Amostras

Os ovos foram encaminhados ao Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-Unesp e processados imediatamente. As amostras eram compostas por cinco ovos, com conteúdo interno e casca, quebrados e homogeneizados em recipiente plástico. Os ovos foram incubados a 37°C por 24 horas.

4.3. Análise Microbiológica

4.3.1. Enriquecimento seletivo

De cada recipiente plástico, transferiu-se 2,0 mL para tubos contendo 20 mL de caldo Selenito (Oxoid® CM 8395), acrescidos de solução de novobiocina (0,004%) e 0,2 mL para tubos contendo 20 mL de caldo Rappaport- Vassiliadis (Oxoid® CM 669), também acrescido de solução de novobiocina (0,004%). Os caldos foram incubados a 37°C por 24 horas.

4.3.2. Semeadura em placas

Após o enriquecimento seletivo, alíquotas das culturas foram semeadas em placas contendo ágar Verde Brilhante (Oxoid CM 0263) e ágar Xilose-Lisina Tergitol4 (XLT4) (Difco™ 223420), que foram incubadas por 24 horas a 37°C.

4.3.3. Testes bioquímicos presuntivos

Colônias não fermentadoras de lactose foram transferidas para ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (Oxoid® CM 277) inclinado e ágar Lisina Ferro (LIA) (Oxoid® CM381) inclinado, que foram incubados a 37°C por 24 horas. As colônias que apresentaram características sugestivas do gênero *Salmonella* foram semeadas em ágar Lúria Bertani (LB) (Difco™ 240110) que foram incubadas a 37°C por 24 horas.

4.3.4. Caracterização antigênica da estirpe bacteriana - prova sorológica

As colônias bacterianas isoladas das amostras de ovos, presentes em ágar (LB), foram selecionadas para teste de aglutinação em lâmina, com soros polivalentes anti-

antígenos somáticos (O) e anti-antígenos flagelares (H) de *Salmonella* spp. (Probac do Brasil). As colônias que reagiram positivamente foram transferidas para tubos contendo ágar nutriente (Oxoid® CM3) e enviadas ao Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo/SP para tipificação do sorovar.

4.4. Análise Molecular utilizando-se a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.4.1. Obtenção do DNA

Transferiu-se 1,0 mL do cultivo inicial dos ovos nos recipientes de plástico para frascos contendo 10 mL de caldo LB (Invitrogen 12780-052). Os frascos foram incubados por 24 horas a 37°C.

Após o período de incubação, foram transferidos 2 mL da cultura para microtubos de 2,0 mL, que foram centrifugados por 3 minutos a 13.000 giros por minuto (gpm) (centrífuga Mini Spin - *Eppendorf*). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso com 100 µL de água ultra pura (SIGMA, W4502). A seguir, os tubos foram submetidos à fervura em banho seco (VHD, B2-AQ) à 100°C por 10 minutos, resfriados à temperatura ambiente e centrifugados por 30 segundos a 9.000 gpm. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de 0,5 mL, resfriados por duas horas à temperatura de 4°C e estocados a -20°C.

4.4.2. Utilização do *primer invA* para pesquisa de *Salmonella* spp. pela PCR

Com base no gene *invA* encontrado no gênero *Salmonella* (FRATAMICO, 2003), foram elaborados os *primer* para utilização na PCR, para pesquisa de *Salmonella* spp.

Tabela 2. Concentração dos reagentes empregados na PCR para amplificação do gene *invA*.

Reagentes	Volume/tubos μL	Concentração estoque	Concentração final
Água ultra pura (SIGMA, W4502)	13	-	-
Tampão (Invitrogen Y02028b)	2,0	10x concentrado	1x concentrado
MgCl ₂ (Invitrogen Y02016b)	0,6	50 mM	1,50mM
dNTP (Fermentas R0191)	0,4	10 mM	0,2mM
Iniciador 1 (Invitrogen 5208501 428D02)	0,9	42.01 nmol	1,89 nmol/ μL
Iniciador 2 (Invitrogen 5208501 428D03)	0,9	40.29 nmol	1,81 nmol/ μL
Taq DNA polimerase (Fermentas: EP0402)	0,2	5U/ μL	1U/ μL
DNA extraído do ovo	2,0	10ng/ μL	1ng/ μL
Total μL	20	-	-

4.4.3. Utilização de *primers* IE1 e *fliC* para pesquisa de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium pela PCR

As amostras que se apresentaram positivas para *Salmonella* spp. na PCR com base na amplificação do gene *invA* foram submetidas a PCR para averiguação de *Salmonella* Enteritidis com oligonucleicos iniciadores do gene IE1 (WANG & YOU,

2002) e *Salmonella* Typhimurium com oligonucleicos do gene *fliC* (dados não publicados).

Tabela 3. Concentração de reagentes empregados na PCR para amplificação do gene IE1.

Reagentes	Volume/tubos μL	Concentração estoque	Concentração final
Água ultra pura (SIGMA, W4502)	14	-	-
Tampão (Invitrogen Y02028b)	2,0	10x concentrado	1x concentrado
MgCl ₂ (Invitrogen Y02016b)	0,6	50 mM	1,50mM
dNTP (Fermentas R0191)	0,4	10 mM	0,2mM
Iniciador 1 (Invitrogen 5187277 362606)	0,4	22.21 nmol	0,44 nmol/ μL
Iniciador 2 (Invitrogen 5187277 362607)	0,4	24.15 nmol	0,48 nmol/ μL
Taq DNA polimerase (Fermentas: EP0402)	0,2	5U/ μL	1U/ μL
DNA extraído do ovo	2,0	10ng/ μL	1ng/ μL
Total μL	20	-	-

Tabela 4. Concentração de reagentes utilizados na PCR para amplificação do gene *fliC*.

Reagentes	Volume/tubos μL	Concentração estoque	Concentração final
Água ultra pura (SIGMA, W4502)	14	-	-
Tampão (Invitrogen Y02028b)	2,0	10x concentrado	1x concentrado
MgCl ₂ (Invitrogen Y02016b)	0,6	50 mM	1,50mM
dNTP (Fermentas R0191)	0,4	10 mM	0,2mM
Iniciador 1 (Invitrogen 5190045 247H10)	0,4	21.23 nmol	0,42 nmol/ μL
Iniciador 2 (Invitrogen 5190045 247H11)	0,4	22.53 nmol	0,45 nmol/ μL
Taq DNA polimerase (Fermentas: EP0402)	0,2	5U/ μL	1U/ μL
DNA extraído do ovo	2,0	10ng/ μL	1ng/ μL
Total μL	20	-	-

Tabela 5. Sequência *Primers* utilizados na PCR.

Alvo	Iniciadores	Sequência	<i>Amplicon</i> (pb)	Referência
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i> (iniciador direto)	5' - CGG TGG TTT TAA GCG TAC TCT T - 3'	796	(FRATAMICO, 2003).
	<i>invA</i> (iniciador reverso)	5' - CGA ATA TGC TCC ACA AGG TTA - 3'		
<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>fliC</i> (iniciador direto)	5' - CCC GCT TAC AGG TGG ACT AC - 3'	433	Dados não publicados
	<i>fliC</i> (iniciador reverso)	5' - ACG GGG TTT TCG GTG GTT GT - 3'		
<i>Salmonella</i> Enteritidis	IE1 (iniciador direto)	5' - AGT GCC ATA CTT TTA ATG AC - 3'	316	(WANG & YOH, 2002)
	IE1 (iniciador reverso)	5' - ACT ATG TCG ATA CGG TGG G - 3'		

4.4.4. Amplificação dos genes *invA*, IE1 e *fliC*

A amplificação foi realizada em termociclador (MyCycler – Thermal cycler - Bio-Rad). As etapas consistiam de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos repetidos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 58°C por um minuto para pareamento, 72°C por um minuto para extensão, com extensão final a 72°C por 7 minutos.

4.4.5. Análises dos produtos amplificados

As amostras foram submetidas, juntamente com marcador de peso molecular GeneRuler 100pb ladder (Fermentas SM0241/2/3) à eletroforese em gel de agarose a 1% (Fermentas R0491) preparado em TAE (tampão acetato EDTA) e corado com GelRed Nucleic Acid Gel Stain® 10.000x (Biotium 41003) de acordo com protocolo do fabricante, sob uma corrente elétrica de 70V por 1 hora e 40 minutos (Powerpac HC – Bio-Rad). A verificação dos fragmentos de DNA, após a migração em eletroforese, foi realizada em aparelho fotodocumentador (Stratagene Eagle Sight Eagle Eye II).

4.5. Antibiograma

Estirpes isoladas de *Salmonella* spp. dos ovos foram submetidas a análise de sensibilidade à antimicrobianos, seguindo-se o método de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966).

As colônias bacterianas isoladas foram transferidas para 10 mL de caldo infusão cérebro-coração (BHI) (Oxoid CM1032) e incubadas sob agitação a 37°C *overnight*. Após período de incubação, o inóculo foi centrifugado e a turbidez do foi ajustada ao equivalente a 0,5 da escala McFarland, que corresponde a, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, em solução salina 0,85%.

A suspensão bacteriana foi espalhada na superfície de ágar Mueller-Hinton (MH) (Oxoid CM0337), com suabe estéril, permanecendo em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram inseridos, com auxílio de pinça previamente flambada, discos impregnados com seguintes antimicrobianos: tetraciclina (30mcg), cefalotina (30mcg), ampicilina (10mcg), amoxicilina (10mcg), ácido nalidixo (30mcg), gentamicina (10mcg), cloranfenicol (30mcg), estreptomicina (10mcg), penicilina g (10un), sulfazotrim

(25mcg), amoxicilina + ácido clavulânico (30µg), sulfametoxazol + trimetropim (25µg), resguardando espaço de 2 cm do disco para a borda da placa e de 3 cm entre um disco e outro. As placas foram incubadas a 37°C por 24h.

A interpretação dos resultados foi realizada através de critérios específicos estabelecidos para cada agente antimicrobiano a fim de classificar as estirpes como sensíveis, intermediárias ou resistentes, utilizando a tabela padrão para interpretação de halos de inibição estabelecida pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (CLSI M100-S21, 2011). A leitura dos halos de inibição foi realizada em milímetros com auxílio de uma régua.

4.6. Análise Estatística

Os dados relativos à contaminação das amostras de ovos foram analisados pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (GREENWOOD & NIKULIN, 1996) e pela Razão de Prevalência para avaliar a prevalência do fator de risco na variação amostral com o respectivo Intervalo de Confiança com confiança de 95% (CORNFIELD, 1951).

V. RESULTADOS

5.1. Análise Microbiológica

A presença de *Salmonella* spp. foi investigada em 340 amostras de ovos provenientes de quatro supermercados da cidade de Jaboticabal-SP que recebiam ovos de diferentes origens. Dos quatro estabelecimentos, três apresentaram, ao menos, uma amostra positiva para *Salmonella* spp.

Foram isolados os sorovares *Salmonella* Mbandaka e *Salmonella enterica* subespécie enterica 6,7: z₁₀- nos supermercados A e B e *Salmonella* Braenderup no supermercado D. Não houve isolamento de *Salmonella* spp. nas amostras obtidas no supermercado C (Tabela 6).

Tabela 6. Sorovares isolados de ovos brancos de acordo com a colheita considerando os estabelecimentos em que eram comercializados.

	Supermercado				Sorovar isolado
	A	B	C	D	
Colheita 1	+	-	-	-	S. Mbandaka
Colheita 2	+	-	-	+	S. Mandaka; <i>S. enterica</i> subespécie enterica 6,7: z ₁₀ - ; S. Braenderup
Colheita 3	+	+	-	-	<i>Salmonella</i> spp.; S. Mandaka; <i>S. enterica</i> subespécie enterica 6,7: z ₁₀ -
Colheita 4	-	-	-	-	—

- Ausência de *Salmonella* spp.

+ Presença de *Salmonella* spp.

Tabela 7. Número de amostras positivas para *Salmonella* spp. em relação ao número total de amostras por supermercado.

Número de amostras positivas/número de amostras totais	Supermercado				Total
	A	B	C	D	
	3/104a	1/76b	-/84	1/76b	5/340

- Ausência de *Salmonella* spp. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (χ^2 , $p < 0,05$).

Das amostras obtidas no supermercado A, na primeira colheita, uma continha *Salmonella* Mbandaka, na segunda colheita uma amostra continha *Salmonella* Mbandaka e *Salmonella enterica* subespécie enterica 6,7: z10:-, na terceira colheita isolou-se *Salmonella* spp. No supermercado B, na terceira colheita, uma amostra continha *Salmonella* Mbandaka e *Salmonella enterica* subespécie enterica 6,7: z10:- e no supermercado D, na segunda colheita uma amostra continha *Salmonella* Braenderup.

Em uma mesma amostra, tanto do supermercado A quanto do supermercado B, na segunda e terceira colheitas, respectivamente isolou-se os sorovares *Salmonella* Mbandaka e *Salmonella enterica* subespécie enterica 6,7: z10:-.

Tabela 8. Prevalência de Contaminação por *Salmonella* spp. em ovos

	Supermercado				Total de 340 amostras
	A	B	C	D	
Prevalência de Contaminação (%)	2,9a	1,3b	-	1,3b	1,47

- Ausência de contaminação por *Salmonella* spp. em amostras. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (χ^2 , $p < 0,05$).

5.2. Análise molecular pela PCR

Nas 340 amostras de ovos a PCR foi realizada em duplicata.

As amostras submetidas à análise molecular na pesquisa de *Salmonella* spp. com o gene *invA* apresentaram cinco resultados positivos para o agente. Na Figura 1 esta ilustrada a foto do gel de agarose com bandas referentes a uma amostra em duplicata contendo *Salmonella* spp.

Não foi observado resultado positivo na utilização do *primer* IE1 específico para *Salmonella* Enteritidis, nem na utilização do *primer* *fliC* específico para *Salmonella* Typhimurium presentes na Figura 2.

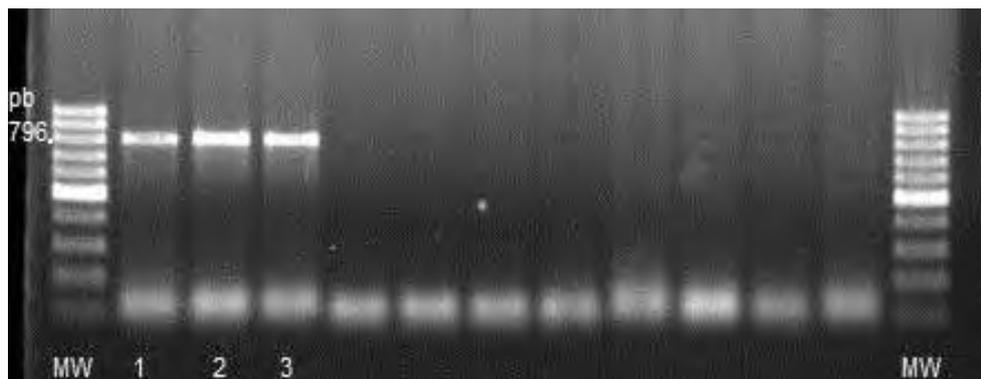


Figura 1. Eletroforograma em agarose 1%. MW: marcador de tamanho molecular (GeneRuler 100pb ladder). 1: controle positivo (796 pb), 2 e 3: amostra positiva em duplicata para *Salmonella* spp. (796 pb).



Figura 2. Eletroforograma em agarose 1%. MW: Marcador de tamanho molecular (GeneRuler 100pb ladder). 1: controle positivo SE (316 pb). 2: amostra de ovos positiva para *Salmonella* spp. 3: controle positivo ST (433 pb). 4: amostra de ovos positiva *Salmonella* spp. 5: controle negativo.

5.3. Antibiograma

As estirpes de *Salmonella* spp. isoladas dos ovos foram submetidas a testes de sensibilidade, conforme a técnica de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966).

Todas as estirpes apresentaram resistência à cefalotina, estreptomicina e penicilina g e resistência intermediária ao sulfazotrim e clorafenicol. As estirpes isoladas apresentaram maior sensibilidade à Amoxicilina + ácido clavulânico, não havendo antimicrobiano eficiente para todas as estirpes. Os dados obtidos estão descritos na tabela 9.

O sorovar de *S. Mbandaka* isolada na primeira colheita no supermercado A, apresentou resistência ao ácido nalidixico (30mcg), à cefalotina (30mcg), estreptomicina (10mcg), tetraciclina (30mcg), gentamicina (10mcg) e penicilina g (10un). Já a estirpe de *S. Mbandaka* isolada na segunda colheita no supermercado A apresentou resistência à estreptomicina (10mcg) gentamicina (10mcg), penicilina g (10un) e *S. enterica* 6,7: z10:-, também isolada no supermercado A na segunda colheita, apresentou resistência ao ácido nalidixico (30mcg), à cefalotina (30mcg), estreptomicina (10mcg), penicilina g (10un). A estirpe de *S. Braenderup* isolada do supermercado D na segunda colheita apresentou resistência ao ácido nalidixico (30mcg), à cefalotina (30mcg), estreptomicina (10mcg), penicilina g (10un). A estirpe de *S. Mbandaka* isolada no supermercado B na terceira colheita apresentou resistência a cefalotina (30mcg), estreptomicina (10mcg), tetraciclina (30mcg), penicilina g (10un) e a estirpe de *S. 6,7: z10:-*, também isolada no supermercado B na terceira colheita, apresentou resistência à cefalotina (30mcg), estreptomicina (10mcg) gentamicina (10mcg) e penicilina g (10un).

Tabela 9. Resistência das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de ovos brancos à antimicrobianos.

		SFT (25mcg)	NAL (30mcg)	CLO (30mcg)	CFL (30mcg)	EST (10mcg)	TET (30mcg)	GN (10mcg)	AMO (10mcg)	AMC (30µg)	PN (10un)	SXT (25µg)	AMP (10mcg)
1	S. Mbandaka	I	R	I	R	R	R	R	S	S	R	I	S
2	S. 6,7: Z10:-	I	R	I	R	R	S	S	I	S	R	I	S
3	S. Mbandaka	I	I	I	R	R	I	I	I	S	R	I	S
4	S. Braenderup	I	R	I	R	R	S	I	S	I	R	I	I
5	S. Mbandaka	I	I	I	R	R	R	I	I	S	R	I	I
6	S. 6,7: Z10:-	I	I	I	R	R	S	R	S	S	R	S	I

I- resistência intermediária; R- resistente; S- sensível. Antibióticos: Tetraciclina (TET), cefalotina (CFL), ampicilina (AMP), amoxicilina (AMO), ácido nalidixico (NAL), gentamicina (GN), cloranfenicol (CLO), estreptomina (EST), penicilina g (PN), sulfazotrim (SFT), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), sulfametoxazol + trimetopim (SXT).

VI. DISCUSSÃO

A epidemiologia das salmoneloses é complexa. Envolve seres humanos, animais, ambiente e suas interações. Microrganismos do gênero *Salmonella* são os principais causadores de enfermidades de origem alimentar em várias partes do mundo (WHO, 2012). Embora alimentos como carne vermelha e vegetais frescos, sejam também reconhecidos como veiculadores de *Salmonella* spp. para os seres humanos, ovos e produtos alimentícios contendo ovos ou carne de frango são frequentemente associados a casos de infecção alimentar (COX & PAVIC, 2010).

Os ovos são contaminados pela via transovariana ou pela passagem pela cloaca, devido ao contato com fezes ou então, no meio ambiente também em função do contato com fezes ou material contaminado pelas fezes e através da manipulação nas granjas e nos pontos de venda (GANTOIS, et al. 2009).

Relatos do isolamento de *Salmonella* spp. em ovos são variáveis, mas demonstram a grande importância desse veículo nas infecções alimentares causadas por esse patógeno em seres humanos (LANGONI et al., 1995).

Das 340 amostras compostas por cinco ovos, provenientes de quatro fornecedores, analisadas nesse estudo por meio de pesquisa microbiológica, cinco (1,47%) apresentaram contaminação por *Salmonella* spp. Relatos de níveis de contaminação inferiores são frequentes na literatura, como demonstrado por POPPE et al. (1998), que em análise de 1.512 ovos no Canadá encontraram 0,07 a 0,4% de contaminação das amostras por *Salmonella* spp. e por FEHLHABER & JANETSCHKE (1995), que encontraram 0,47% das amostras de casca e 0,22% das amostras de conteúdo interno de ovos contaminados ao analisarem 22.776 ovos provenientes de supermercados, à semelhança do que observaram ao examinarem 5.339 ovos experimentalmente contaminados (4,19% de amostras de cascas e 0,20% de amostras do conteúdo interno dos ovos positivas). LITTLE et al. (2008) analisaram 1.588 amostras de *pool* de seis ovos provenientes de restaurantes no Reino Unido e isolaram

Salmonella spp. em 0,38% das amostras. GAMA et al. (2003) em 500 ovos analisados de cada um de cinco lotes de aves para postura comercial, encontraram um ovo positivo para *S. Enteritidis* e para *Salmonella enterica* cepa rugosa (0,2%) proveniente de um dos lotes e dez ovos positivos para cepa rugosa (2%) em outro lote.

Níveis superiores de contaminação foram descritos por OLIVEIRA & SILVA (2000) que em análise de 124 amostras de ovos provenientes de estabelecimentos comerciais localizados na cidade de Campinas - SP encontraram doze das amostras de casca (9,6%) e quatro das amostras de gema (3,2%) contendo *S. Enteritidis*, único sorovar isolado na pesquisa. LANGONI et al. (1995), encontraram 3,95%, de amostras de ovos comerciais no município de Botucatu- SP, contaminadas por *Salmonella* spp. e FLORES et al. (2003) detectaram 1,66% de contaminação em 360 ovos, divididos em amostras contendo seis unidades, em Santa Maria- RS.

Os resultados obtidos nesse estudo, de 2,9% de contaminação das amostras provenientes do supermercado A, 1,3% do supermercado B e 1,3% do supermercado D, totalizando 1,47% de contaminação por *Salmonella* spp. são superiores ao total de contaminação de ovos para consumo humano estimado em outros países como descrito por EBEL & SCHOSSER (2000) de 0,005% de contaminação nos EUA, pela EFESA (2010a) de 0,8% nos países da União Europeia e pelo CDC (2009) de 0,01% de contaminação dos ovos por *Salmonella* spp. na região Nordeste dos EUA. No entanto, estão entre os níveis de contaminação estimados por HUMPHREY (1994) que relata que em diferentes lotes de aves para postura comercial a contaminação dos ovos produzidos varia de 0,1 a 10%, estando entre o número estimado de contaminação para ovos naturalmente infectados descrito por KELLER et al. (1995) e OKAMURA et al. (2001a) que relatam em aves naturalmente infectadas a contaminação dos ovos varia de 0 a 2%.

Para HUMPHREY (1994) e GAST (2003), diversos fatores contribuem para que o número de ovos contaminados por *Salmonella* spp. seja variável, como o tamanho da amostra analisada, a técnica de isolamento utilizada e o período de amostragem, além da dificuldade do isolamento em ovos se a população bacteriana for baixa. Segundo alguns autores, as diferenças geográficas, o clima, as práticas de produção de ovos e o manejo dos lotes de uma determinada região, refletem na presença de diferentes

sorovares de *Salmonella* spp. em aves e seres humanos (KHAKHARIA et al., 1997; ANGULO & SWERDLOW, 1999).

Nesse estudo foram isolados os sorovares *Salmonella* Mbandaka de três amostras, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* 6,7: z10:- de duas amostras e *Salmonella* Braenderup de uma amostra. Outros autores relatam o isolamento desses sorovares em ovos, como no trabalho realizado por LITTLE et al. (2008) que isolaram *Salmonella* Mbandaka em análise de 1.588 amostras de ovos no Reino Unido.

Os sorovares isolados no presente trabalho estão amplamente difundidos em granjas produtoras e no meio ambiente. ZANCAN et al. (2000) detectaram 77% de 1.611 caixas de transporte de pintainhas, contaminadas por *Salmonella* spp., sendo *S.* Mbandaka o sorovar mais comum. GALDINO (2010) por meio de análise de mecônio de caixas de transporte de pintinhas de um dia isolou *S.* Mbandaka e *S.* enterica 6,7: Z10:- em quatro lotes de oito inspecionados. SNOW et al. (2007), isolaram *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Mbandaka, dentre outros sorovares, em 11,7% de lotes de aves para postura comercial no Reino Unido. Em lotes de frango de corte SNOW et al. (2008), relataram prevalência de contaminação de 10,7%, com identificação do sorovar *S.* Mbandaka entre outros. Em análise realizada pelo Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) no período de 1979 a 1991, 110 (4,79%) de 2.293 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de rações e seus insumos (farinhas de origem animal), oriundas de várias partes do país, estavam contaminadas por *S.* Mbandaka, um dos sorovares predominantes na pesquisa (HOFER, 1998).

Salmonella Mbandaka, *Salmonella* Braenderup e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* 6, 7: z10: - podem ser disseminadas por via vertical e por via horizontal, com destaque, como veículo de transmissão, ingredientes utilizados na fabricação de rações avícolas (HOFER et al., 1997; CARRIQUE-MAS et al., 2009). GAMA et al. (2003) isolaram de fezes de aves com mais de 10 semanas de idade, monitoradas desde um dia de vida, *S.* Infantis, *S.* Mbandaka e *S.* enterica cepa Rugosa, sugerindo que a infecção possa ser proveniente do consumo de ração contaminada, devido a idade das aves. BERCHIERI JÚNIOR et al. (1984, 1989, 1993) e SOUZA (2000) demonstraram a participação de rações e seus componentes como fonte de *Salmonella* spp. para as aves de granjas comerciais. Os autores isolaram diversos sorovares de

Salmonella spp. de amostras de farinha de carne, pena, pena e vísceras, oriundas de diferentes fábricas de ração do Estado de São Paulo e Minas Gerais, estando entre eles *Salmonella* Mbandaka. Estes autores consideraram a farinha de carne como o principal veículo de *Salmonella* spp. para granjas avícolas.

Resultados obtidos em diversas pesquisas demonstram a ampla distribuição dos sorovares isolados neste trabalho, com destaque para *S. Mbandaka* que frequentemente é isolada de variadas fontes, tornando sólida a possibilidade da contaminação dos ovos serem proveniente de lotes de aves para postura comercial contaminados por *Salmonella* spp. Dados presentes nos trabalhos de BIFFI et al. (2011) que ao avaliarem vinte oito amostras de diversas origens, tais como suabes de arrasto, farinha de carne e vísceras, ração, resíduos de incubatório e órgãos de aves, no estado do Paraná encontraram três amostras contaminadas por *S. Mbandaka* e por STOPPA (2011) que ao analisar dois abatedouros de frango de corte no Estado de São Paulo, isolou dez sorovares no abatedouro A entre eles *S. Mbandaka* e doze sorovares no abatedouro B, reforçam a eventualidade da ampla distribuição do sorovar *S. Mbandaka* no meio avícola.

Em 2009, ovos e produtos a base de ovos foram responsáveis por 22,8% dos casos de infecção por *Salmonella* spp. em seres humanos no Brasil e produtos mistos contendo ovos por 16,3% (COVEH, 2009). Desde 1994 ovos e produtos contendo ovos são a fonte mais comum de infecções humanas por *S. Enteritidis* (GANTOIS et al., 2009; CDC, 2011b; CVE, 2011), no entanto esse sorovar não foi isolado nessa pesquisa. Esse fato sugere que medidas para o controle de *S. Enteritidis* estão sendo realizadas, com maior frequência, em granjas produtoras. Um exemplo é a vacinação dos lotes de aves para postura. GALDINO (2010) pesquisou a presença de *Salmonella* spp. em quatro lotes vacinados com bacterina oleosa contra *S. Enteritidis* e quatro lotes não vacinados. Em um dos lotes vacinados foi isolado o sorovar *S. Havana*, enquanto, em um dos lotes não vacinados foi isolado os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Havana*, porém a vacinação dos lotes não descarta a implantação de um programa de biossegurança efetivo, tendo em vista que a vacina confere uma proteção limitada contra o sorovar (MASTROENI et al., 2000).

A legislação atual no Brasil está direcionada para o controle e erradicação de *Salmonella* biovar Gallinarum, *S.* biovar Pullorum, *S.* Enteritidis e *S.* Typhimurium em lotes de aves reprodutoras de linhagens puras, bisavós e avós e lotes de aves matrizes (BRASIL, 2003a). A Legislação vigente não contempla os demais sorovares, qual estão disseminados no meio avícola, como os sorovares isolados nesse estudo.

Diversos relatos de casos de gastroenterite humana envolvendo os sorovares isolados nesse estudo são descritos na literatura. O sorovar *S.* Mbandaka esteve entre os quinze mais isolados de amostras clínicas humanas no Brasil, no período de 1996 a 2003 (FERNANDES et al., 2006). No Canadá, durante quatro anos, diversos casos de infecções alimentares causadas por *S.* Mbandaka acometeram centenas de pessoas, envolvendo diferentes tipos de alimentos (WRHA, 2007). Na Suíça em 1993, URFER et al. (2000) investigaram pacientes acometidos por *Salmonella* Braenderup devido ao consumo de torta contaminada, concluindo, através de fatores epidemiológicos e características moleculares, que a presença do sorovar em alimentos representa um grave risco a saúde pública devido sua alta patogenicidade. No Japão em 2008, casos de infecção alimentar devido ao consumo de tamagotoji (ovos moles, com legumes mistos e carne), causados pelo sorovar *S.* Braenderup foram investigados por MIZOGUCHI et al (2011), que incriminaram os ovos pasteurizados, utilizados no preparo do alimento, como o veículo do agente, sugerindo que apesar de ocorrerem falhas na pasteurização, os ovos vinham contaminados de suas origens, demonstrando que, apesar de não ser frequente, *S.* Braenderup é isolada em ovos e produtos de ovos, sendo que HARA-KUDO & TAKATORI (2009) relataram que 8,3% de ovos líquidos pasteurizados no Japão estão contaminados por *Salmonella* spp.

Relatos de casos clínicos descrevem que infecções por *Salmonella* Braenderup causam severos distúrbios gastrointestinais em seres humanos, com sintomas graves em crianças menores de dez anos. ALCOCER et al. (2006), isolaram, no estado do Paraná, *Salmonella* Braenderup em 16% das amostras de carcaças de frango analisadas e o CDC relata que em 2004 nos EUA, vários foram os veículos de infecção alimentar por *S.* Braenderup, envolvidos em casos humanos (CDC, 2005b).

Tempo e temperatura de armazenagem são fatores importantes para que *Salmonella* spp. presente na superfície da casca penetre para o interior dos ovos

(STALDEMAN, 1986; SILVA, 1995). O transporte dos ovos no Brasil, das granjas para entrepostos ou para os estabelecimentos comerciais é realizado em caminhões-baú, sem controle de temperatura, permanecendo em temperatura ambiente durante todo o período de comercialização (BARBOSA et al., 2008). A refrigeração, em todas as fases da cadeia produtiva de ovos, é obrigatória nos EUA, porém no Brasil não há exigência para realização desse procedimento (BORGES et al., 2009). No presente trabalho, os ovos provenientes dos supermercados A, B e D, que apresentaram amostras contaminadas por *Salmonella* spp., eram armazenados em temperatura ambiente e os ovos provenientes do supermercado C, onde não foi isolado *Salmonella* spp., eram armazenados sob refrigeração. Estudos indicam que o armazenamento de ovos em baixas temperaturas, sem flutuação, foi benéfico para o controle de *Salmonella* spp. (ZHANG et al., 2011), no entanto a ausência do patógeno no supermercado C não pode ser ratificada à refrigeração.

Os efeitos da refrigeração em ovos experimentalmente contaminados por *Salmonella* Enteritidis foram observados por BARROS et al. (2001) que em 252 ovos armazenados em diferentes temperaturas detectaram que os ovos armazenados a 25°C apresentaram contaminação da casca e do conteúdo interno em todo período de análise, já os ovos armazenados a 8°C apresentaram apenas contaminação de casca. Esses dados vão de acordo com resultados obtidos por HAMMACK et al. (1993) que ratificam o efeito benéfico da refrigeração de ovos no controle da migração de *Salmonella* spp. da casca para a gema. No entanto autores defendem que ovos armazenados sob refrigeração favorecem, devido a condensação da água na casca dos ovos, a penetração das bactérias da superfície para o interior (FORSYTHE et al., 1953; ICMSF, 1998). Resultados obtidos por OLIVEIRA & SILVA (2000) demonstraram que em ovos artificialmente contaminados por *Salmonella* Enteritidis a gema foi colonizada 24 horas após a contaminação em ovos refrigerados e 48 horas em ovos mantidos em temperatura ambiente. Contudo, o armazenamento em temperatura ambiente permitiu que o microrganismo chegasse à gema na maioria dos ovos e com maior taxa de multiplicação.

Métodos de diagnóstico moleculares, como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem grande capacidade para identificação e diferenciação de estirpes

bacterianas, como os sorovares de *Salmonella* spp. No presente trabalho na análise pela PCR das 340 amostras de ovos em duplicata com iniciadores do gene *invA* para pesquisa de *Salmonella* spp. foram detectadas cinco amostras contaminadas pelo agente, sendo essas as mesmas amostras que apresentaram contaminação por *Salmonella* spp. na análise microbiológica convencional. Resultados positivos na utilização de iniciadores do gene *invA* para pesquisa de *Salmonella* spp. foram obtidos por FLORES et al. (2003) que em 60 amostras de seis ovos do tipo colonial analisadas, encontraram 4,98% das amostras contaminadas pela bactéria. Os resultados da utilização do gene *invA* para pesquisa do gênero *Salmonella* podem ser considerados confiáveis com base no experimento realizado por RAHN et al. (1992), que detectaram com sucesso 626 estirpes de *Salmonella* spp. de 630 testadas, a partir de colônias isoladas e incorporadas direto na PCR, com sensibilidade de 99,4% e especificidade de 100%.

Não foram obtidos resultados positivos na utilização dos iniciadores do gene *IE1* para pesquisa de *Salmonella* Enteritidis e do gene *fliC* para pesquisa de *Salmonella* Typhimurium na PCR das cinco amostras positivas para *Salmonella* spp. detectadas pelo gene *invA*, porém a PCR se faz uma importante ferramenta para triagem da contaminação de produtos de origem animal, uma vez que possui a capacidade de identificar e determinar os sorovares. É válido citar que alguns autores relatam que os componentes presentes na casca dos ovos podem causar interferências nos resultados apresentados pela PCR (ROSSEN, et al. 1992; FEHLHABER & JANETSCHKE, 1995). Essas interferências foram observadas por FLORES et al. (2001) que ao analisarem 100 ovos com casca e 100 ovos sem casca experimentalmente contaminados por *S. Typhimurium*, detectaram, através da PCR, contaminação de 66 ovos com casca e 73 sem casca.

Atualmente são observadas estirpes de *Salmonella* spp. resistentes aos antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções humanas. Devido ao problema que esse fato apresenta a saúde pública, diversos autores estudam o comportamento de patógenos frente a antimicrobianos a fim de identificar estirpes resistentes (TESSI et al., 1997; ÂNGULO et al., 1999; FERNANDES et al, 2003). O teste para observação do comportamento das estirpes isoladas frente a drogas antimicrobianas, realizado nesse

trabalho, demonstrou que todas as estirpes isoladas apresentaram multirresistência á pelo menos três dos antimicrobianos testados, sendo que a estirpe de *S. Mbandaka* isolada do supermercado A na primeira colheita apresentou resistência a 50% dos antimicrobianos utilizados nesse estudo. Relatos de estirpes de *Salmonella* spp. multirresistentes aos antimicrobianos testados no presente estudo são frequentes na literatura, porém diferentes níveis de resistência são descritos, como nos trabalhos realizados por FILIOUSSIS et al (2008) que traçaram o perfil de resistência, pela metodologia molecular, frente a antimicrobianos de cinco estirpes de *S. Mbandaka* isoladas de suínos na Grécia, observando que todas as estirpes eram resistentes à tetraciclina, quatro eram resistentes à trimetropim + sulfametoxazol e três à ampicilina e à amoxicilina + ácido clavulânico. BIFFE et al (2011) submeteram 15 estirpes isoladas de diversos materiais avícolas a teste de sensibilidade frente a antimicrobianos, estando entre os isolados o sorovar *S. Mbandaka*, observando que 57,14% das estirpes apresentaram resistência à tetraciclina e 7,14% apresentaram resistência à gentamicina. PERESI et al. (1999) observaram que 13,79% dos isolados de *Salmonella* spp. obtidos de carcaças de frango comercializadas em São Paulo, entre 1995 e 1996, foram resistentes a um ou mais dos antimicrobianos testados.

Em via contrária, alguns trabalhos demonstram que muitos antimicrobianos possuíam ação efetiva sobre os microrganismos do gênero *Salmonella*, como descrito por PERESI et al. (1998c), que avaliaram estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos e de pacientes envolvidos em surtos ocorridos na Região Noroeste do Estado de São Paulo, entre 1993 e 1997, e encontraram sensibilidade, da maior parte dos isolados, a todos os antimicrobianos testados e CASTRO et al. (2002) que ao analisarem 1.138 estirpes de *Salmonella* spp. de origem humana, coletadas entre 1985 e 1999, em Ribeirão Preto-SP, relataram que a resistência da bactéria aos agentes antimicrobianos usualmente empregados no tratamento humano foi baixa, com exceção à tetraciclina a qual as estirpes de *Salmonella* spp. testadas apresentaram 35% de resistência.

Dados encontrados em diversas pesquisas atentam para o número de estirpes de *Salmonella* spp. resistentes a ação de antimicrobianos amplamente utilizados na

medicina humana, podendo gerar danos a saúde pública e problemas nas interações medicamentosas para o tratamento de humanos e animais.

Os resultados obtidos nesse experimento demonstram que ovos contaminados estão chegando à mesa dos consumidores. Dados estatísticos evidenciam que em 12.000 ovos recebidos mensalmente pelo supermercado A, se provenientes da mesma origem, 69 conjuntos de cinco ovos estariam contaminados por *Salmonella* spp. e em 8.400 ovos recebidos mensalmente pelos supermercados B e D, 22 conjuntos de cinco ovos estariam contaminados, sendo que o risco de se adquirir cinco ovos contaminados por *Salmonella* spp. no supermercado A é 2,2 vezes maior do que no supermercado B e D. Embora não tenha sido isolado *Salmonella* spp. nas amostras de ovos provenientes do supermercado C os riscos de contaminação não devem ser descartados, pois apenas uma porcentagem dos ovos do estabelecimento foram selecionados para pesquisa.

A contaminação dos ovos pode ter sido proveniente de aves para postura comercial infectadas, demonstrando a grande importância da via de transmissão transovariana e da contaminação no meio ambiente, podendo também ser decorrente da manipulação do produto pelos trabalhadores, através de mãos e utensílios contaminados, no manejo geral da granja, na armazenagem do produto, embalagem, transporte ou no estabelecimento comercial, deixando expressa a necessidade do controle dos sorovares paratíficos em todos os segmentos da cadeia produtiva, como nas granjas nos armazéns e nos distribuidores finais, afim de que produtos contaminados não cheguem ao consumidor e final gerando problemas a saúde pública e descrença na qualidade dos produtos de origem avícola.

A presença de ovos contaminados representa um grande risco à saúde humana, principalmente se manipulados de forma inadequada, podendo ocasionar uma contaminação cruzada, contaminando outros alimentos e aumentando o risco de infecções alimentares.

VII. CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais adotadas no presente trabalho, concluiu-se que:

- Ovos contaminados estão presentes em estabelecimentos comerciais.
- A contaminação dos ovos pode ser derivada de lotes de aves para postura comercial infectados por *Salmonella* spp. ou das mãos dos manipuladores, na granja, na embalagem, no transporte, distribuição e comercialização do produto.
- Alguns sorovares (como S. Mbandaka) demonstram estarem difundidos no meio avícola, pois foram isolados de ovos de diferentes origens.
- A PCR demonstrou ser um eficiente método para pesquisa de *Salmonella* spp. em ovos, uma vez que apresentou o mesmo resultado que o método bacteriológico preconizado para pesquisa do agente, com menor tempo de execução e maior custo benefício.
- Apesar de *Salmonella* Enteritidis ser o sorovar mais frequentemente encontrado em ovos e *Salmonella* Typhimurium ser mais resistente às ações das enzimas presentes na clara, os sorovares não foram isolados na pesquisa, levando a crer que medidas de controle para esses sorovares estão sendo realizadas nas granjas.
- As estirpes isoladas na pesquisa apresentaram resistência a três ou mais dos antimicrobianos testados, sendo que o mesmo sorovar (S. Mbandaka) apresentou diferentes níveis de resistência, demonstrando que o manejo nas granjas está intimamente ligado ao nível de resistência dos sorovares presentes no meio e que

estirpes de *Salmonella* spp. resistentes aos antimicrobianos usualmente utilizados na medicina humana estão presentes em produtos de origem animal.

VI. REFERÊNCIA

ABEF. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos. **Relatório Anual 2006**. São Paulo. P. 38, 2006. Disponível: <http://www.abef.com.br> . Acesso em 02 de fevereiro de 2011.

ALCOCER, I.; OLIVEIRA, K. M. P.; VIDOTTO, M. C.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Discriminação de sorovares de *Salmonella* spp. isolados de carcaças de frango por REP e ERIC-PCR e fagotipagem do sorovar Enteritidis. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 414-420, 2006.

ACMSF. Report of Salmonella in eggs. Advisory committee on the microbiological safety of food microbiology reports, 1993.

AHMER, B. M.; VAN REEUWIJK, J.; WATSON, P. R.; WALLIS, T. S.; HEFFRON, F. *Salmonella* Sir A is a Global Regulator of Genes Mediating Enteropathogenesis. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 971-982, 1999.

ALTEKRUSE, S.; KOEHLER, J.; HICKMAN-BREENER, F.; TAUXE, R.V.; FERRIS, K. A comparison of *Salmonella* Enteritidis phage types from egg-associated outbreaks and implicated laying flocks. **Epidemiology Infection**, v.110, p.17-22, 1993.

ANGULO, F. J.; SWERDLOW, D. L. Epidemiology of human *Salmonella* enterica serovar enteritidis infections in the United States. In: SAEED, A. M.; GAST, R. M.; POTTER, M. R. (Eds.) *Salmonella* enterica serovar enteritidis in humans and animals: epidemiology, patho- genesis, and control. Ames: Iowa State University Press, p. 33-41, 1999.

ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; COHEN, M. L. Significance and sources of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in humans in the United States: the need for prudent use of antimicrobial agents, including restricted use of fluoroquinolones, in food animals. In: Agriculture's Role in Managing Antimicrobial Resistance Conference, 1999, Canada. In. **Annals...** of the Agriculture's Role in Managing Antimicrobial Resistance Conference, Canada, p. 14-28, 1999.

BAKER, R. C; GOFF, J. P; MULNIX, E. J. Salmonellae recovery following oral and intravenous inoculation of laying hens. **Poultry Science**, v. 59, n. 5, p.1067–1072, 1980.

BARBOSA, N. A. A.; SAKOMURA, N. K.; MENDONÇA, M. O.; FREITAS, E. R.; FERNANDES, J. B. K. Qualidade de ovos comerciais provenientes de poedeiras comerciais armazenados sob diferentes tempos e condições de ambientes. *ARS Veterinária*. v. 24, n. 2. p.127-133, 2008.

BARNHART, H. M.; DREESEN, D. W.; BASTIEN, R.; PANCORBO, O. C. Prevalence of *Salmonella* Enteritidis and other serovars in ovaries of layer hens at time of slaughter. **Journal of Food Protection**, v.54, n. 7, p. 488–491, 1991.

BARROS, M. R.; ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; SAMPAIO, H. M.; CROCCI, A. J. Sobrevivência de *Salmonella* enteritidis em Ovos Contaminados Artificialmente, Após Desinfecção e Armazenados em Diferentes Temperaturas. **Revista Brasileira de Ciências Avícolas** ,v.3, n.3, 2001.

BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Review Science Technology Office International Epizootic**, v.19, p.351-75, 2000.

BARROW, P. A.; JONES, M. A.; THOMSON, M. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of Bacterial Infection in Animals**, 4 ed. Ames: Blackwell Publishing, p. 231-266, 2010.

BARROW, P. A.; LOVELL, M. A. Experimental Infection of egg-laying hens with *Salmonella enterica* phage type 4. **Avian Pathology**, v. 20, p. 335-348, 1991.

BERCHIERI JUNIOR, A.; BARROW, P. A. Patologia e métodos de diagnósticos de SE em aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 1995 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Curitiba. **Anais...** Campinas: FACTA. p.1-5, 1995.

BERCHIERI JUNIOR, A.; ADACHI, S. Y.; CALZADA, C. T.; PAULILO, A. C.; SCHOKEN-ITURRINO, R. B.; TAVECHIO, A. T. Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.9, p.9-12, 1989.

BERCHIERI JUNIOR, A.; IRINO, K.; NEME, S. N.; CALZADA, C. R.; FERREIRA, S. A.; PESSÔA, G. V. A. Contaminação por *Salmonella* em farinhas de carne de origem animal utilizadas no preparo de ração. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.4, p.83-5, 1984.

BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, S. A.; IRINO, K.; QUINTANA, J. L.; SANTOS, A.J. *Salmonella* in poultry feeds in Brazil. **Revista de Microbiologia**, v.24, n.1, p.22-25, 1993.

BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, N. E.; DI FABIO, E.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. Doença das Aves. Campinas: **FACTA**. 2ª ed. Cap.4.1, p. 435-454, 2009.

BERCHIERI JUNIOR, A.; PAULILLO, A. C.; FERNANDES, S. A.; IRINO, K. Y.; PESSOA, G. V. A. Sensibilidade a antimicrobianos por *Salmonella* isoladas de farinhas de origem animal utilizadas no preparo de rações. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.16, n.1, p.56-60, 1985.

BERCHIERI JUNIOR, A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; PAULILLO, A. C.; IRINO, K.; FERNANDES, S. A.; ÁVILA, F. A.; PESSOA, G. V. A.; CALZADA, C. T. *Salmonella* em um abatedouro avícola. **ARS Veterinária**, v.3, n.1, p.81-7, 1987.

BIFFI, C. P.; STEFANI, L. M.; MATTIELLO, C. A.; FERREIRA, P. S. Diferentes Níveis de Resistência Antimicrobiana em cepas de *Salmonella* de Origem avícola. **CAV-UDESC**, 2011.

BORGES, K. A.; PINTO, A. T.; DA SILVA, E. N. Efeito da oscilação de temperatura e umidade do ar no comportamento de *Salmonella* Enteritidis em ovos de galinha contaminados. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, n. 1, p. 25-30, 2009.

BRADEN, C. R. *Salmonella* enterica serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 512–517, 2006.

BRASIL. Resolução nº 35. Ovos. Instruções de Conservação e Consumo. **Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, RDC, 2009.

BRASIL. Resolução nº 12 de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento Técnico princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Instrução Normativa 78. **Diário oficial da União, República Federativa do Brasil**, Brasília – DF, 5 nov. edição número 215, 2003a.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal. Coordenação Geral de Laboratório Animal. Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 226, 2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - **SVS**. 2008. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31758>. Acesso em: 01 fevereiro 2011.

CAFFER, M. I.; EIGUER, T. *Salmonella enteritidis* in Argentina. **International Journal Food Microbiology**, v.21, p.15-19, 1994.

CARRIQUE-MAS, J. J.; BRESLIN, M.; SNOW, L.; MCLAREN, I.; SAYERS, A. R.; DAVIES, R. H. Persistence and clearance of different *Salmonella* serovars in buildings housing laying hens. **Epidemiology and Infection**, c.137, p. 837–846, 2009.

CARRIQUE-MAS, J. J.; DAVIES, R. H. *Salmonella* Enteritidis in commercial layer flocks in Europe: Legislative background, on-farm sampling and main challenges. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 10, n. 1, 2008.

CASTRO, F. A.; SANTOS, V. R.; MARTINS, C. H. G.; FERNANDES, S. A.; ZAIA, J. E.; MARTINEZ, R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes in patients from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, between 1985 and 1999. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 5, p. 244-251, 2002.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Associated salmonellosis in humans turtle United States. Morbidity and Mortality 2006-2007. Weekly Report, v. 56, n. 26, p. 649-652, 2007.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Multistate Outbreak *Salmonella* Typhimurium infection associatedy intake meat milled EUA, 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 55, p.180-182, 2006.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Investigation Update. Multistate Outbreak of Human *Salmonella* serotype I 4, 5, 12: i - infection include Sprouts Alfalfa. **(Update final)**, February, 2011a.

CDC. Center for Disease Control and Preventio . *Salmonella* serotype Enteritidis. General Information. General Information – **National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases**, 2011b. Disponível em:

http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonella_enteritidis
/ Acesso em: 10 março de 2012.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Investigation Update: Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Enteritidis Infections Associated with Shell Eggs 2010. **(Final posting)**. December, 2010a.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Investigation Update. Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Chester Infections. **(Final posting)**. September, 2010b.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of human *Salmonella* Braenderup Infections associated roma tomatoes. 2005a.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak Attributed to *Salmonella* Braenderup Johnson, Douglas, and Ford Country, Kansas, June 2004, 2005b.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Montevideo Infections. **(Update Final)**. Mayo, 2010c.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Newport include Sprouts Alfalfa Raw. June, 2010d.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Disease Listing, *Salmonella* Enteritidis, **Generall Information**. CDC Bacterial, Mycotic Diseases, 2009.

CE. Regulamento 589/2008 da Comissão de 23 de Junho de 2008. Legislação que estabelece as regras de execução do regulamento (CE) nº1234/2007 do Conselho do que respeita as normas de comercialização dos ovos. **Jornal Oficial da União Européia**, 2008.

CE. Regulamento nº1168/2006 da Comissão de Julho de 2006 que dá execução ao Regulamento (CE) nº2160/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere ao objetivo comunitário de redução da prevalência de determinados sorotipos de *Salmonella* em galinhas poedeiras de *Gallus gallus* e que altera o Regulamento (CE) nº 1003/2005. **Official Journal of the European Union**, 2006.

CE. Regulamento nº2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005. Legislação que estabelece os critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. **Official Journal of the European Union**, 2005

CE. Regulation (EC) nº 2160/2003 of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the control of Salmonella and other specified food borne zoonotic agents. **Official Journal of the European Union**, v. 325, p. 1–15, 2003.

CHEMALY, M.; HUNEAU-SALAUN, A.; LABBE, A.; HOUDAYER, C.; PETETIN, I.; FRAVALO, P. Isolation of Salmonella enterica in laying-hen flocks and assessment of eggshell contamination in France. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 10, p. 2071–2077, 2009.

CHIU, C. H.; OU, J. T. Rapid Identification of *Salmonella* Serovars in Feces by Specific Detection of Virulence Genes, *invA* and *spvC*, by an Enrichment Broth Culture-Multiplex PCR Combination Assay. **Journal of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, v. 34, p. 2619-2622, 1996

COHEN, M. L.; TAUXE, R. Drug-resistant Salmonella in the United States: an **Epidemiologic Perspective**. **Science**, v. 33, p. 964-969, 1986.

COGAN, T. A.; HUMPHREY, T. J. The rise and fall of *Salmonella* Enteritidis in the UK. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 114S–119S, 2003.

COVEH. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por

Alimentos no Brasil, 1999 – 2009*. **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009.

CORNFIELD, J. A method of estimating comparative rates from clinical data. Applications to cancer of the lung, breast and cervix. **J.Nat.Cancer Inst.**, v.1 1 ,p.268-75,1951.

COX, J. M.; PAVIC, A. Advances in enteropathogen control in poultry production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 745–755, 2010.

CRIPPEN, T. L.; SHEFFIELD, C. L.; ESQUIVEL, S. V.; DROLESDEY, R. E.; ESQUIVEL, J. F. The acquisition and internalization of *Salmonella* by the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, p. 65-72, 2009.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar- DDTHA/CVE. Resultados da Investigação de Surto de Diarréia por *Salmonella* Enteritidis em Batatais, SP, Janeiro de 2012. **BECVE**, v. 2 n. 3, 10 de fevereiro de 2012.

Disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/boletim/txt/bol0312_noticias.htm
Acesso 20/02/2012.

CVE. Centro de Vigilância de Doenças transmitidas por água e alimentos. *Salmonella* Enteritidis/Salmonelose. **Informe Net DTA 2011. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo**. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/13SEnteritidis_rev2011.pdf Acesso em: 11 março de 2012.

DAVIES, R.H.; WRAY, C. Persistence of *Salmonella* Enteritidis in poultry units and poultry food. **British Poultry Science**, v.37, p.589-96, 1996.

DE JONG, B.; EKDAHL, K. Human salmonellosis in travelers is highly correlated to the prevalence of *Salmonella* in laying hen flocks. **Euro surveillance weekly releases**, 2006.

DEFRA. UK **National Control Programme for *Salmonella* in Layers (*gallus gallus*)**, 2007.

DICKEL, E. L. **Utilização da microbiologia convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico–sanitário do processo de abate**, 2004, f. 133. Tese (Doutorado) em Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

EBEL, E; & SCHLOSSER, W. Estimating the annual fraction of eggs contaminated with *Salmonella* Enteritidis in the United States. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 51–62, 2000.

EFSA. European Federation of Sea Anglers. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in European Union in 2006. **EFSA Journal**, v. 130, p. 1-2, 2007.

EFSA. European Food Safety Authority. The Community Summary Report on food borne outbreaks of the European Union in 2007. **The EFSA Journal**, n. 271, 2009.

EFSA. Scientific opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in laying hens. **The EFSA Journal**, v. 8, n. 4, p. 1546, 2010a.

EFSA. Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. **EFSA Journal**, v. 8, n. 1, p. 1–368, 2010b.

EUA. FEDERAL REGISTER. 21 CFR Parts 16 and 118, Prevention of *Salmonella* Enteritidis in Shell Eggs During Production, Storage, and Transportation; Final Rule. **Department of Health and Human Services**. Food and Drug Administration. Rules and Regulation, v. 74, n. 130. July 9, 2010.

FADL, A. A.; NGUYEN, A. V.; KHAN, M. I. Analysis of *Salmonella* Enteritidis Isolates by Arbitrarily primed PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 4, p. 987-989, 1995.

FEARNLEY, E.; RAUPACH, J.; LAGALA, F.; CAMERON, S. *Salmonella* in Meat Poultry, Eggs in Humans Adelaide South Australia, 2008. **Food and Environmental Laboratory**, 2011.

FEHLHABER, K.; JANETSCHKE, P. Higiene veterinária de los alimentos. **Acribia** : Zaragoza, p. 660, 1995.

FERNANDES, S. A.; GHILARDI, A. C.; TAVECHIO, A. T.; MACHADO, A. M. O.; PIGNATARI, A. C. C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 59-63, 2003.

FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C. R.; DIAS, A. M. G.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; MELO, L. C. V. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.4, p.179-184, 2006.

FILIOUSSIS, G.; PETRIDOU, E.; JOHANSSON, A.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; KRITAS, S. K. Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka strains, isolated from a swine finishing farm in Greece. **African Journal of Microbiology Research**, v. 2, p. 313-315, November, 2008.

FINLAY, B. B. Cell biology of *Salmonella* pathogenesis. In: Miller, V. L.; KAPER, J. B.; PORTNOY, D. A.; ISBERG, R. R. Molecular genetics of bacterial pathogenesis: **American society for microbiology**, Washington, DC, p. 249-261, 1994.

FLORES, F.; LOVATO, M.; WILSMANN, C. G.; GAZONI, F. L.; WERLE, G.; SAGAAVE, L. Perfil de Resistencia Antibiótica de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Senftenberg Isoladas em Frango de Corte. UFMS, RG. Conferência de Ciências e Tecnologia Avícola. **Anais... Prêmio Lamas. FACTA**, 2011.

FLORES, M. L.; NASCIMENTO, V. P.; KADER, I. I. T. A.; CARDOSO, M.; SANTOS, L. R.; LOPES, R. F. F.; WALD, V. B.; BARBOSA, T. M. C. Análise da Contaminação por *Salmonella* em Ovos do tipo Colonial através da reação em cadeia pela Polimerase. **Ciência Rural**, RS, v. 33, n. 3, p. 553-557, 2003.

FLORES, M. L.; NASCIMENTO, V. P.; KADER, I. I. T. A.; SANTOS, L. R.; PONTES, A. P.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Métodos de Extração de DNA para a Detecção de *Salmonella* em Ovos de Galinhas, Com e Sem Casca, Através da Reação em Cadeia pela Polimerase. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.315-318, 2001.

FORSYTHE, R. H.; AYRES, J. C.; RADLO, J. L. Factors affecting the microbiological populations of shell eggs. **Food Technol.**, 7, 49-56, 1953.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. **Atheneu**, São Paulo, p.182, 1996.

FRATAMICO, P. M. Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* assays for detection of *Salmonella* spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. **Molecular and Cellular Probes**, n. 17, p. 215–221, 2003.

FRESCHI, C. R.; CARVALHO, L. F. O. S.; OLIVEIRA, C. J. B. Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella*

Typhimurium in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). **Braz. J. Microbiol.**, v. 36, p. 363-367, 2005.

GALAN, J. E.; GINICHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family. **Journal Bacteriology**, v. 174, p. 4338-4340, 1992.

GALAN, J. E.; CURTISS III, R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. **Proceedings of National Academy of Science from USA**, v. 86, p. 6383-6387, 1989.

GALDINO, V. M. C. A. **Pesquisa de *Salmonella* spp. em Lotes de Galinhas de Postura Comercial Vacinadas e Não Vacinadas Contra *Salmonella* Enteritidis.** Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista (UNESP) Jaboticabal, 2010.

GAL-MOR, O. *Salmonella enterica*. The Infectious Disease Research Laboratory. Sheba Medical Center, Israel, 2010. Disponível em: <http://eng.sheba.co.il> Acessado em 18/10/11.

GAMA, N. M. S. Q.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; FERNANDES, S. A. Occurrence of *Salmonella* sp in laying hens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 5, n. 1, p. 15-21, 2003.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F.; GAST, R.; HUMPHREY, T. J. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. 718–738, 2009.

GANTOIS, I.; EECKHAUT, V.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. A. Comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. **Avian Pathology**, v. 37, n. 4, p. 399–406, 2008.

GAST, R. K.; PORTER JÚNIOR, R. E.; HOLT, P. S. Applying tests specific yolk antibodies to predict contamination by *Salmonella* Enteritidis in eggs from experimentally infected laying hens. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 41, n. 1, p. 195-202, 1997a.

GAST, R. K. *Salmonella* Infections. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; McDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. **Diseases of poultry**. 10 ed. Ames: Iowa State University Press, p. 81-129, 1997b.

GAST, R. K. *Salmonella* Infections. Paratyphoid Infections. In: SAIF, Y. M. (Ed.) **Disease of Poultry**. 12 ed. Iowa. Blackwell Publishing, p. 636-635, 2008.

GAST, R. K. *Salmonella* infections. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEAR, C. W. (Ed.) **Diseases of poultry**. ed. 11, Ames: Iowa University Press, cap. 16, p. 567-613, 2003.

GELLI, D. S.; JAKABI, M.; SAKATA, H. Salmonelas isoladas de alimentos no período de 1985-1996 no Estado de São Paulo, Brasil. In: Congresso Latino Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos, 1998, Água de Lindóia, SP. **Anais...** São Paulo : Sociedade Brasileira de Microbiologia, v. 1, p. 105-154, 1998.

GOUVEA, R. **Comparação Entre Isolamento Bacteriológico Convencional e PCR na Detecção de *Salmonella* spp. em Amostras de Carne de Frango Artificialmente Contaminadas e de Campo**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Fluminense, 2009.

GREENE, S. K.; DALY, E. R.; TALBOT, E. A.; DEMMER, L. J.; HOLZBAU, S.; HILL, T. A.; PATEL, N. J.; WALDERHAUG, M. O.; HOEKSTRA, R. M.; LYNCH, M. F.; PAINTER, J. A. Recurrent multistate outbreak of *Salmonella* Newport associated with tomatoes from contaminated fields, 2005. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 2, p. 157-165, 2008.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of food borne outbreak data reported internationally for source attribution, **International Journal of Food Microbiology**, v.130, p. 77–87, 2009.

GREENWOOD, P .E.; NIKULIN, M. S. In John Wiley & Sons. **A Guide To Chi-Squared Testing**. New York, p. 280, 1996.

GUIBOURDENCHE, M.; RIGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKMÜHL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Supplement 2003-2007 (nº47) to the White-Kauffmann-Le Minor Scheme. **Research in Microbiology**, 2010.

HAMMACK, T. S.; SHERROD, P. S.; BRUCE, V. R. Research note: Growth of *Salmonella enteritidis* in grade A eggs during prolonged storage. **Poultry Science**, v.72, p.373-377, 1993.

HAPFELMEIR, S.; EHRBAR, K.; STECHER, B.; BARTHEL, M.; KREMER, M.; HARDT, W. D. Role of the Salmonella Pathogenicity Island 1 Effector Proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* subspecies serovar Typhimurium Colitis in Streptomycin-pretreated mice. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 795–809, 2004.

HARA-KUDO, Y.; TAKATORI, K. Microbial quality of liquid egg and Salmonella infection status in Japan. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi. J Food Hyg Soc Jpn*, v. 50, p. 34-40, 2009.

HENSEL, M. *Salmonella* Pathogenesis Island 2. **Mol. Microbiology.**, v. 36, p. 1015-1023, 2000.

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *Inter. J. Med. Microbiology.*, v. 294, p. 95-102, 2004.

HESS, I. M.; NEVILLE, L. M.; MCCARTHY, R.; SHADBOLT, C. T.; MCANULTY, J. M. .*Salmonella* Typhimurium 197 outbreak associated with consumption of lambs liver in Sydney, NSW. **136 Epidemiology and Infection**, p. 461-467, 2008.

HPA. Health Protection Agency. Epidemiological Data, *Salmonella*. 2010. Disponível em:

<http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/Salmonella/EpidemiologicalData/> Acessado em 08-06-2011.

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

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, p. 21-27, 1998.

HOLT, J. G. **Bergey's**: manual of determinative bacteriology. 9.ed. Baltimore: Williams & Williams. p.1867, 1994.

HUGHES, C.; GILLESPIE, I. A.; O'BRIEN, S. J. Food borne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–2003. **Food Control**. v. 18, p. 766–72, 2007.

HUMPHREY, T. J. Contamination of eggs Shell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 31-40, 1994.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Huevos y ovoproductos. In: ICMSF. Ecología microbiana de los productos alimentarios. (Microorganismos de los Alimentos 6). Ed. **Acribia**, Zaragoza, c.15, p. 451-493, 1998.

IGABAL, M.; PHILBIN, V. J.; WITHANAGE, G. S.; WIGLE, P.; BEAL, R. K.; GOODCHILD, M. J.; BARROW, P.; MCCONNELL, I.; MASKELL, D. J.; YOUNG, J.; BUMSTEAD, N.; BOYD, Y.; SMITH, A. L. Identification and functional characterization of chicken Toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2344–2350, 2005.

JONES, D. EUA fazem recall de ovos por suspeita de salmonela. **Ciência e Saúde Notícias**. Disponível em:

<http://noticias.uol.com.br/ultnot/cienciaesaude/ultimasnoticias/estado/2010/08/20/eua-fazem-recall-de-ovos-por-suspeita-de-salmonela.jhtm> Acesso: 17-10-2010

JONES, Y. E.; McLAREN, I. M.; WRAY, C. Laboratory Aspects of *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. **Salmonella in domestic animals**. New York: CABI Publishing, cap. 23, p. 393-405, 2000.

KELLER, L. H.; SCHIFFERLI, D. M.; BENSON, C. E.; ASLAM, S.; ECKROADE, R. J. Invasion of chicken reproductive tissues and forming eggs is not unique to *Salmonella* Enteritidis. **Avian Diseases**, v. 41, n. 3, p. 535–539, 1997.

KELLER, L. H.; BENSON, C. E.; KROTEK, K.; ECKROADE, R. J. *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2443-2449, 1995.

KHAKHARIA, R.; WOODWARD, D.; JOHNSON, W. M.; POPPE, C. *Salmonella* isolated from humans, animals and others sources in Canada. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 119, p. 15-23, 1997.

KRETSINGER, K.; NOVIELLO, S.; MOLL, M. Tomatoes sicken hundreds: multistate outbreak of *Salmonella* Newport. **Anais Epidemic Intelligence Service Annual Conference 52**, Atlanta, Georgia. USA, 2003.

LANGONI, H., PRADO, R.A.T., PINTO, J.P.A.N. Isolamento de salmonelas em ovos de galinha oferecidos no comércio de Botucatu - S.P. **Hig. Alimentar**, v. 9, p.45-47, 1995.

LE MINOR, L. *Salmonella* Lignières. In: MUURRAY, R. G. E. **Bergey's**: manual of systematic bacteriology. Baltimore: Willims & Wilkins, p. 427-58, 1984.

LITTLE, C. L.; RHOADES, J. R.; HUCKLESBY, L.; GREENWOOD, M.; SURMAN-LEE, S.; BOLTON, F. J.; MELDRUM, R.; WILSON, I.; McDONALD, C. DE PINNA, E.; THRELFALL, E. J.; CHAN, C. H. Survey of *Salmonella* Contamination of Raw Shell Eggs Used in Food Service Premises in the United Kingdom, 2005 through 2006. **Journal of Food Protection**, ed. 8, v.71, n.1, January, p. 19-26, 2008.

MAJOWICZ, S. E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F. J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S. J.; JONES, T. F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R. M.; for the International Colaboration on Enteric Disease "Burden of Illness" Studies. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. **Food Safety**, 2010.

MASTROENI, P.; CHABALGOITY, J. A.; DUNSTAN, S. J.; MASKELL, D. J.; DOUGAN G. *Salmonella*: Immune responses and vaccines. **Vet. J.**, Cambridge, v. 161, n. 2, p. 132-164, 2000.

MENDONÇA, E. P.; NALEVAIKO, P. C.; MONTEIRO, G. P.; FONSECA, B. B.; MELO, R. T.; COELHO, L. R.; ROSSI, D. A. Resistência Antimicrobiana de *Salmonella* Minnesota Isoladas de uma Cadeia de Produção Avícola. Universidade Federal de Uberlândia. Conferência de Ciência e Tecnologia Avícola, **Anais... Prêmio Lamas. FACTA**, 2011.

MESSENS, W. Eggshell penetration by *Salmonella*: A review. **World's Poultry Science Journal**, v. 61, p. 71-84, 2005.

MILLER, J. F.; MEKALANOS, J. J.; FALKOW, S. Coordinate Regulation and Sensory Transduction in the Control of Bacterial Virulence. **Science**, v. 243, p. 916-922, 1989.

MIZOFUCHI, Y.; SUZUKI, E.; TSUCHIDA, H.; TSUDA, T.; YAMAMOTO, E.; NAKASE, K.; DOI, H. Outbreak of *Salmonella Braenderup* Infection Originating in Boxed Lunches in Japan in 2008. **Acta Medica Okayama**, v. 65, n. 2, p.63-69, 2011.

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

NASCIMENTO, V. P; PIPPI SALLE, C. T; MORAES, H. L. S. *Salmonella Enteritidis*: Diagnóstico e implicação em saúde pública. In: Seminário Internacional de Patologia e Produção Avícola, 6., 1998, Santiago. **Anais...Santiago: AMEVEA-Chile.** p.17-27, 1998.

OIE. Escritório Internacional de Epizootias. Salmonellosis. Manual of diagnostic test ANDRADE et al, 1995 **vaccines for terrestrial animals**, 5 ed., 2004.

OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. **Avian Diseases**, v. 45, p. 61–69, 2001a.

OKAMURA, M.; MIYAMOTO, T.; KAMIJIMA, Y.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Differences in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs intravaginally inoculated hens and in vitro adherences to vaginal explants between *Salmonella Enteritidis* and other *Salmonella* serovars. **Avian Diseases**, v. 45, n. 4, p. 962–971, 2001b.

OLIVEIRA, S. D.; FLORES, F. S.; SANTOS, L. R.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella Enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food,

human and poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 297-305, 2005.

OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. Salmonela em Ovos Comerciais: Ocorrência, Condições de Armazenamento e Desinfecção da Casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 52, n. 6, 2000.

OPITZ, H. M.; SINGER, J. T.; HENZLER, D. J. Epidemiologia de salmonelas em ponedoras. **Indústria Avícola**, v. 49, p. 16-8, 1992.

PANISELLO, P.J.; ROONEY, R.; QUANTIC, P.C. Application of food borne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 59, p. 221-234, 2000.

PATRICK, M. E.; ADCOCK, P. M.; GOMEZ, T. M.; ALTEKRUSE, S. F.; HOLLAND, B. H.; TAUXE, R. V . *Salmonella* Enteritidis infections, United States, 1985–1999. **Emergence Infect Disease**, v. 10, p.1–7, 2004.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. Infecções humanas transmitidas pelos alimentos e pela água. In: PELCZAR, M; REID, R; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, v. 2, p. 689-722, 1981.

PERESI, J. T. M., LIMA, I. A. Z. C.; TAVECHIO, A. T; FERNANDES, S. A.; GELLI, D. S. *Salmonella*: determinação de sorotipos e resistência a agentes microbianos de cepas isoladas de carcaças de frango comercializadas na região de São José do Rio Preto-SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.41-6, 1999.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; CARVALHO, I. S. *Salmonella* Enteritidis: Ocorrência de 28 surtos de enfermidades transmitidas por alimentos no Noroeste do Estado de São Paulo. In: Congresso Latino Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos. Águas de Lindóia, SP. **Anais...** São Paulo : Sociedade Brasileira de Microbiologia, v.1, p. 154-279, 1998a.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; CARVALHO, I. S. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 477-483, 1998b.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; MARQUES, D. F.; RODRIGUES, E. C. A.; FERNANDES, A. S.; GELLI, D. S.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 1-12, out. 1998c.

PERRY, M. B. Some Structural Aspects of the Antigenic O-Polysaccharide Components of *Salmonella* Somatic Lipopolysaccharide. In CABELLO, F. et al. ed. **Biology of Salmonella**, 1 ed. New York: Plenum Press. p. 63-68, 1993.

PERSING, D. H. Polymerase Chain Reaction : Trenches to Benches. **Journal of Clinical Microbiology**, Minesota, EUA, v. 29, n. 7, p. 1281-1285, 1991.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. Formules antiigeniques des serovars de *Salmonella*. Paris: **WHO**, p.1-15, 1997.

POPOFF M. Y.; LE MINOR, L. Fórmulas antigênica da *Salmonella* sorovares. 8 ed. Paris: **Centro Colaborador da OMS para Referência e Pesquisa em Salmonella**, 2001.

POPPE, C. *Salmonella enteritidis* in Canada. **International Journal Food Microbiology**, v. 21, p. 1-5, 1994.

POPPE, C. Epidemiology of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis In: SAEED, A. M.; GAST, R. K.; POTTER, M. E.; WALL, P. G. **Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals**. Ames: Iowa State University Press, p. 3-18, 1999.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. Enterobacteriaceae. In: QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. Clinical veterinary microbiology. **Wolfe**, p. 209-236, 1994.

RAHN, K.; DE GRANDIS, S. A.; CLARKE, R. C.; McEWE, S.A.; GALAN, J. E.; GINOCCHIO, C.; CURTIS, R.; GYLES, C. L. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 6, p. 271-279, 1992.

RIJPENS, N. Rapid Detection of Stressed *Salmonella* spp. in Dairy and Egg Products Using Immunomagnetic Separation and PCR. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 46, p. 37-44, 1999.

ROBERTS, T. Salmonellosis control: Estimated economic costs. **Poultry Science**, v. 67, p. 936-943, 1988.

RODRIGUES, L. B. **Levantamento sorológico e detecção de *Salmonella* em granjas de postura comercial de pequeno porte em um município Estado do Rio Grande do Sul**. 2002. Dissertação (Mestrado Faculdade de Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

ROSSEN, L.; NORSKOV, P.; HOLMSTROM, K.; RASMUSSEN, D. E. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v.17, p.37-45, 1992.

SALEHI, T. Z.; MAHZOUNIEH, M.; SAEEDZADEH, A. Detection of *invA* Gene in Isolated *Salmonella* from Broilers by PCR Method. **International Journal of Poultry Science**, v. 20, n. 8, p. 557-559, 2005.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; PILOTTO, F.; SILVA, N. N.; SALLE, C. T. P.; LOPES, L. F. F. Identificação de

Salmonella através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Arquivos da Faculdade de Veterinária da **UFRGS**, v. 29, n. 2, p. 87-92, 2001.

SELANDER, R. K.; LI, J.; NELSON, K. Evolutionary genetics of *Salmonella enterica*. In: NEIDHARDI, F. C.; CURTISS, R.; INGRAHAM, J. L.; LIN, E. C. C.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W. S.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H. E. *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology. Washington: **American Society for Microbiology**, v. 2, p. 2691-2707, 1996.

SCHIMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity Island in Bacterial Pathogenesis. **Clinical Microbiology**, v. 17, p. 14-56, 2004.

SILVA, E. N. Salmonelose: problemas atuais de patologia aviária e saúde pública. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1991, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, p. 37-47, 1991.

SILVA, E. N. *Salmonella* Enteritidis em aves e saúde pública. **Hig. Alimentar**, v.9, p.7-13, 1995.

SILVA, O. R. **Modelo Teórico de Estimativa de Risco de *Salmonella* Enteritidis em Sistema Integrado de Produção de Frango de Corte e Tipagem Molecular de *Salmonella* spp. Oriundas de Aves e Rações Submetidas a Diferentes Tratamentos com Ácidos Orgânicos.** Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade de São Paulo, 2007.

SHIVAPRASAD, H. L.; TYMONEY, J. F.; MORALES, B. L.; BAKER, R. C. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis Infection in Laying Chickens. I. Studies on Egg Transmission, Clinical Signs, fecal Shedding, and Serologic Responses. **Avian Diseases**, v. 34, p. 548-547, 1990.

SMITH, D. L.; HARRIS, A. D.; JOHNSON, J. A.; SILBERGELD, E. K.; MORRIS JR., J. G. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 99, n. 9, p. 6434-6439, 2002.

SNOW, L. C.; DAVIES, R. H.; CHRISTIANSEN, K. C.; CARRIQUE-MAS, J. J.; WALES, A. D.; O'CONNOR, J. L.; COOK, A. J. C.; EVANS, S. J. Survey of *Salmonella* prevalence on commercial layer farms in the United Kingdom. **Veterinary Record**, London, v. 161, n. 14, p. 471-476, 2007.

SNOW, L. C.; DAVIES, R. H.; CHRISTIANSEN, K. H.; CARRIQUE-MAS, J. J.; COOK, A. J. C.; TEALE, C. J.; EVANS, S. J. Survey of the prevalence of *Salmonella* on commercial broiler farms in the United Kingdom. **Veterinary Record**, London, v. 163, n. 22, p. 649-654, 2008.

SOUMET, C.; ERMEL, G.; ROSE, V.. Identification by multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains of environmental swabs of poultry houses. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 29, p. 1-6, 1999.

SOUZA, E. R. N. **Estudo da presença de *Salmonella* sp em poedeiras submetidas a muda forçada**. 2000. 37f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

SOUZA-SOARES, L. A.; SIEWERDT, F. Aves e Ovos. Universidade da **UFPEL**, Pelotas, p. 13-23, 2005.

STADELMAN, W. J. The preservation of quality in shell eggs In: STADELMAN, W.J. **Egg science and technology**. 3.ed. Westport: AVI, p.63-96, 1986.

STOPPA, G. F. Z. **Pesquisa de *Salmonella* spp. Em Abatedouros Avícolas**. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) Universidade Estadual Paulista UNESP, Jaboticabal, 2011.

TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. Changing Patterns of *Salmonella* serovars: Increase of *Salmonella* Enteritidis in São

Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 5, p. 315-322, 1996.

TAUNAY, A. E.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 2, p. 119-127, 1996.

TESSI, M. A.; SALSI, M. S.; CAFFER, M. I.; MOLGUILEVSKY, M. A. Drug resistance of Enterobacteriaceae isolated from chicken carcasses. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 8, p. 1001-1005, 1997.

THIAGARAJAN, D.; SAEED, A. M.; ASEM, E. K. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella* Enteritidis in laying hens. **Poultry Science**, v. 73, p. 89-98, 1994.

VAILLANT, V.; VALK, H.; BARON, E.; ANCELLE, T.; COLIN, P.; DELMAS, M. C. Foodborne Infections in France. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, p. 221-32, 2005.

VAN ASTEN, A. J. A. M.; VAN DIJK, J. E. Distribution of "classic" Virulence Factors among *Salmonella* spp. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 251-259, 2005.

VÁZQUEZ, N. J.; LÓPEZ, V. Y.; SUÁREZ, G. F.; ESLAVA, C.; VERDUGO, R. A. Caracterización y clonación de los genes que expresan una enterotoxina LT en *Salmonella* Gallinarum. **XVII Congreso Centroamericano y Del Caribe de Avicultura**, La Habana, Cuba, 2002.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de Patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

VON RUCKERT, D. A. S. Comparação dos Métodos Microbiológico Convencional, Imunoanálise e Reação em Cadeia Polimerase no Monitoramento de *Salmonella* spp. em Frangos de Corte Durante o Abate. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, MG, 2006

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. **Relatório anual** (2010-2011), 2011.

URFER, E.; ROSSIER, P.; MÉAN, F.; KRENDING, M. J.; BURNENS, A.; BILLE, P.; FRANCIOLI, P.; ZWAHELEN, A. Outbreak of *Salmonella* Braenderup gastroenteritis due to contaminated meat pies: clinical and molecular epidemiology. **Clinical Microbiol Infect**, v.6, p. 536-542, 2000.

USDA/NASS. Chickens and eggs 2009 summary. February 2010. Disponível em: [http:// usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/ChickEgg/ChickEgg-02-25-2010.pdf](http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/ChickEgg/ChickEgg-02-25-2010.pdf)
Acesso em Julho, 2011.

WANG, S. J.; YEH, D. B. Designing of polymerase chain reaction primers for the detection of *Salmonella* Enteritidis in foods and faecal samples. **Applied Microbiology**, n. 34, p. 422-427, 2002.

WRAY, C.; DAVIES, R. H. Environmental problems in poultry production: dust and pests. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD-BORNE *SALMONELLA* IN POULTRY, 1998, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore: American Association of Avian Pathologists, p. 94-104, 1998.

WRHA. Winnipeg Regional Health Authority. Outbreak of *Salmonella* Mbandaka in Manitoba, Summer 2007 October 12, 2007. National Enteric Surveillance Program. *Salmonella* Mbandaka summary table, 2007.

WOODWARD, M. J.; KIRWAN, S. E. S. Detection of *Salmonella* Enteritidis in Eggs by the Polymerase Chain Reaction. **Veterinary Record**, London, v. 138, p. 411-413, 1996.

WHO. World Health Organization. *Salmonella* epidemiology, 2008. Disponível em: <http://www.safe-poultry.com/salmonellaepidemiology.asp> Acesso em Maio, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Drug-resistant *Salmonella*. Fact Sheet, n. 139, Revised, 2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/> Acesso em: 15 março de 2012.

ZANCAN, F. T.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; FERNANDES, S. A.; GAMA, N. M. S. Q. *Salmonella* spp. investigation in transport boxes of day-old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 230-232, 2000.

ZEIDLER, G. Who's afraid of the Salmonella wolf? **World Poultry**. p. 4-9, 1996.

ZHANG, W.; ZHENG, J.; XU, G. Toward better control of *Salmonella* contamination by taking advantage of the egg's self-defense system: a review, **Journal of Food Science**, v.76, n. 3, p. 76-81, 2011.