

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**JÉSSICA LAURA MIRANDA PEIXOTO**

**SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E DIVERSIDADE  
GENÉTICA de *Salmonella* Heidelberg ISOLADAS DE AMBIENTE E  
CARÇAÇAS DE FRANGO DE CORTE**

**UBERLÂNDIA  
MAIO - 2019**

**JÉSSICA LAURA MIRANDA PEIXOTO**

**SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E DIVERSIDADE  
GENÉTICA de *Salmonella* Heidelberg ISOLADAS DE AMBIENTE E  
CARÇAÇAS DE FRANGO DE CORTE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Medicina Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para a obtenção do título de Médica Veterinária.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daise Aparecida Rossi

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Eliane Pereira Mendonça

**UBERLÂNDIA**

**MAIO – 2019**

**JÉSSICA LAURA MIRANDA PEIXOTO**

**SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E DIVERSIDADE  
GENÉTICA de *Salmonella* Heidelberg ISOLADAS DE AMBIENTE E  
CARÇAÇAS DE FRANGO DE CORTE**

Trabalho de conclusão de curso aprovado para  
a obtenção do título de Médica Veterinária -  
Faculdade de Medicina Veterinária da  
Universidade Federal de Uberlândia – pela  
banca examinadora formada por:

Uberlândia, 24 de maio de 2019.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daise Aparecida Rossi

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Torres de Melo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Belchiolina Beatriz Fonseca

**UBERLÂNDIA**

**MAIO – 2019**

*“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem sucedidos! – Provérbios 16”*

*“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e, de repente, você estará fazendo o impossível!  
– São Francisco de Assis”*

**Aos meus pais, pelo incentivo aos estudos e pelo exemplo de vida! Obrigada por serem minha fortaleza!**

**Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por ter me abençoado com a vida em uma família tão repleta de luz, união e amor. Também agradeço pela inteligência, proteção e sabedoria derramados sobre mim para que eu chegasse até aqui, na realização de um grande sonho, me tornar Médica Veterinária!

Em segundo lugar, agradeço a minha família! Aos meus pais, Carlos e Marli, que sempre me apoiaram, confiaram, incentivaram e me deram tudo o que eu precisava para chegar até aqui! Aos meus irmãos, Joicy e David, que também sempre me apoiaram e deram forças durante essa trajetória! Não estaria aqui sem vocês!

Aos mestres e profissionais, que me acompanharam desde o curso técnico em agropecuária (IFTM - 2014), muito obrigada por todos os ensinamentos e incentivo! Não poderia deixar de destacar uma pessoa que é muito especial para mim, uma grande amiga, professora e profissional, Inês Gomide. Muito obrigada minha amiga, por todos os ensinamentos, conselhos, apoio e oportunidades!

Aos mestres da FAMEV – UFU, muito obrigada por todo o conhecimento compartilhado, por todos os ensinamentos! Cada professor (a) transmite um legado, deixa uma marca, nos impulsiona para a construção de excelentes profissionais, que farão a diferença no mercado sempre respeitando e trabalhando em prol da nossa causa, os animais, e indiretamente cuidando da saúde humana. Em especial, gostaria de agradecer ao Professor Fernando Cristino, por todos os ensinamentos passados a mim, pela grande amizade, conselhos e oportunidades. Agradeço a todos os professores (as), técnicos, e a cada pessoa que contribuiu de forma direta ou indireta na minha trajetória.

À minha orientadora, Professora Daise, muito obrigada pela grande oportunidade em trabalhar com você! Agradeço pelos ensinamentos, orientação, oportunidades, conselhos, paciência e carinho de todos esses anos. Obrigada por ter me apresentado à família LABIO e aberto as portas para mim. Também agradeço a cada componente da família LABIO. Em especial, a minha co-orientadora, Eliane. Muito obrigada por toda a ajuda, conselhos e ensinamentos.

Por fim, não poderia deixar de agradecer as amizades que a UFU me deu, e que no dia a dia de vida universitária faz uma grande diferença, porque um entende o outro, dá carinho, atenção, conselhos, ânimo e calma na hora das tempestades, pois no final das contas, um mar calmo não faz um bom marinheiro né! Obrigada Camilinha, Ju Tomazela, Mari, Juliana Melo, Wesley, Dúlio, Hélio, e tantos outros de convivência e parceria diária! Ao Médico Veterinário Emerson, muito obrigada pelo estágio concedido, por todos os ensinamentos, amizade, conselhos e oportunidades!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa de estudo concedida para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores e membros da banca de defesa, agradeço pela disponibilidade em participar da mesma, por realizar a leitura do trabalho e as respectivas correções.

Parece que foi ontem em que eu recebia a aprovação para embarcar nesse grande sonho, e agora estou finalizando essa trajetória. Só tenho a agradecer a todas as pessoas que contribuíram para eu estar aonde estou hoje e na construção da profissional em que me tornei, a qual sempre buscarei aprimorar a fim de exercer a profissão com excelência!

*“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente estruído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão! – São Francisco de Assis”*

## RESUMO

A avicultura é um dos principais setores do agronegócio brasileiro, classificando o país como o maior exportador e o segundo maior produtor mundial. Diante do destaque da produção no cenário nacional e internacional, o controle da sanidade e das enfermidades das aves é de suma importância, pois impacta diretamente a saúde pública e a economia. Nesse contexto, a salmonelose é considerada uma das doenças de origem alimentar mais comuns e uma zoonose complexa que afeta a saúde pública mundial. O sorovar paratífico *S. Heidelberg* tem sido identificada, no Brasil, em aves e produtos derivados desde 1982. Objetivou-se determinar a susceptibilidade a onze antimicrobianos assim como a relação filogenética entre 67 cepas de *S. Heidelberg* isoladas na região sul do Brasil. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada por meio do teste de disco difusão, e a relação filogenética entre as cepas por meio do RAPD. As maiores porcentagens de resistência apresentadas pela *S. Heidelberg* nesse estudo, foi de 100% ao ácido nalidíxico e a tetraciclina, 98,5% ao sulfato de colistina, 80,6% a amoxicilina/ácido clavulânico e a ceftazidima, e 62,7% ao ceftiofur. Todos os isolados foram classificados como multirresistentes. A alta resistência encontrada promove um alerta sobre a problemática do uso de antimicrobianos em frangos e quanto ao perigo que esse sorovar representa para a saúde pública. Na análise de similaridade genética observou-se elevada proximidade entre as cepas e foi possível identificar dois *clusters* e um isolado distinto. Este apresentou proximidade genética inferior a 80%. Essa análise ficou restrita a 12/67 isolados, devido a técnica utilizada.

**Palavras – chave:** Avicultura; RAPD; Resistência; Salmonelose

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO .....	8
2- OBJETIVOS .....	9
2.1- Objetivo geral .....	9
2.2- Objetivos específicos .....	9
3- REVISÃO DE LITERATURA .....	9
3.1- <i>Salmonella</i> spp.: aspectos gerais.....	9
3.2- Epidemiologia de <i>Salmonella</i> e a importância do sorovar <i>S. Heidelberg</i> para a saúde pública .....	11
3.3- Resistência antimicrobiana em <i>Salmonella</i> sp. ....	12
3.4- Tipagem molecular e a técnica de RAPD ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> ).....	14
4- METODOLOGIA .....	17
4.1- Amostras .....	17
4.2- Susceptibilidade aos antimicrobianos .....	18
4.3- Análise filogenética das cepas de <i>S. Heidelberg</i> : <i>RAPD-PCR</i> ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> ) .....	19
4.4- Análise dos resultados .....	20
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
6- CONCLUSÕES .....	27
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28



## 1- INTRODUÇÃO

*Salmonella* é um dos micro-organismos zoonóticos mais envolvidos em doenças alimentares no mundo, possuindo relevância para a saúde pública e economia. As salmoneloses são consideradas zoonoses complexas e de caráter pandêmico, assim, para os órgãos de saúde, a prevenção é mais vantajosa do que o tratamento (SHINOHARA et al., 2008). Dentre as cepas envolvidas em doença humana e prevalentes nos plantéis brasileiros, destaca-se o sorovar *S. Heidelberg*, sorovar paratífico em emergência, que é responsável por doenças humanas de maior gravidade quando comparada a outros sorovares paratíficos (ROTHROCK et al., 2014; BACK, 2016).

Desde 1982, *S. Heidelberg* tem sido identificado no Brasil, em aves e produtos derivados. A prevalência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango congeladas e comercializadas em várias cidades brasileiras demonstrou que este sorotipo estava entre os 18 mais comuns, representando 6,4% das amostras positivas (MEDEIROS et al., 2011). *S. Heidelberg* dispara entre os sorovares mais isolados em aves no sul do Brasil (BACK, 2016).

*S. Heidelberg* está apresentando resistência antimicrobiana a diferentes classes, como  $\beta$ -lactâmicos, subclasse das cefalosporinas e penicilinas. Essa resistência é um problema emergente para a saúde pública, acarretando tratamentos humanos mais complexos e caros. Nos EUA, *S. Heidelberg* é frequentemente isolado em carnes de varejo e predominantemente de produtos avícolas, apresentando resistência a pelo menos uma classe de antimicrobianos, enquanto no Canadá, está entre os três mais encontrados. Isso demonstra o quanto o sorovar pode estar relacionado a infecções alimentares, sendo problema emergente na saúde pública mundial (CDC, 2013; HOFER et al., 1997; ROTHROCK et al., 2014).

O Brasil possui inúmeras plantas de abate e processamento de frango de corte, distribuídas por todo o país, com produção destinada ao comércio nacional e internacional. Também é o maior exportador de carne de frango do mundo e o segundo maior produtor (ABPA, 2018).

Uma forma adequada de verificar fontes comuns de contaminação e disseminação de cepas dentro de um sistema produtivo é a utilização de métodos de genotipagem molecular. Dentre eles destacam-se técnicas como o PFGE (*Pulsed Field Gel Eletrophoresis*), ribotipagem e o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (MARTINS et al., 2006; REZK et al., 2012; SON et al., 2013). Caracterizar *S. Heidelberg* isolados ao longo da cadeia produtiva é reconhecidamente importante na compreensão dos perigos. Conhecer suas formas de disseminação permite estimar fontes comuns de contaminação, além de estimar o risco que oferecem à população.

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- Objetivo geral**

Determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos e a relação filogenética entre 67 cepas de *S. Heidelberg* isoladas em indústrias avícolas da região sul do Brasil.

### **2.2- Objetivos específicos**

Identificar em cepas de *S. Heidelberg* isoladas de frangos de corte:

- A susceptibilidade aos antimicrobianos: ácido nalidíxico, amoxicilina/ácido clavulânico, ceftazidima, ceftiofur, ciprofloxacina, enrofloxacina, gentamicina, imipenem, sulfametoxazol/trimetoprim, sulfato de colistina e tetraciclina, estabelecendo perfis de resistência;
- A relação filogenética entre as cepas;
- A relação entre os perfis de resistência e a filogenia dos isolados

## **3- REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1- *Salmonella* spp.: aspectos gerais**

O gênero *Salmonella* é assim nomeado em homenagem ao seu descobridor, Daniel Elmer Salmon, cientista americano e microbiologista veterinário do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. É reconhecido como agente da doença há mais de 125 anos (CDC, 2015). Essas bactérias fazem parte da microbiota normal do trato intestinal das aves. Sua ocorrência nos produtos finais varia de acordo com o manejo durante a criação e a tecnologia no abate, implicando em riscos para o consumidor e dificuldade quanto às exportações. Esse gênero pertence à família Enterobacteriaceae, caracterizados como bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporulados, oxidase negativos e catalase positivos. A maioria dos sorovares apresentam motilidade por conta de flagelos peritríquios, porém, os sorovares entéricos *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são imóveis em razão de serem isentos de flagelos (D'AOUST & MAURER, 2007).

Embora a temperatura ótima para o crescimento da *Salmonella* seja 37°C, essas bactérias conseguem crescer na faixa de 7°C e 45°C. O pH varia entre 4 e 9 sendo que o ideal é 7. Bioquimicamente, a maioria dos sorovares são fermentadores de glicose, manose e dulcitol. Esses produzem ácidos, gás e H<sub>2</sub>S, não produzem urease e indol, além de não serem fermentadores da lactose e sacarose. Utilizam citrato, descarboxilam lisina e ornitina e são vermelho de metila positivos. O aquecimento a 60°C por cerca de 15 a 20 minutos geralmente destrói a bactéria que é sensível a altas temperaturas, enquanto o processo de congelamento não provoca a destruição completa, apenas reduz significativamente a quantidade de células viáveis (JAY, 2005; D'AOUST & MAURER, 2007)

As espécies *S. enterica* e *S. bongori* constituem o gênero *Salmonella*. A primeira espécie é dividida em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*). O gênero foi assim dividido baseado na hibridização do DNA (ácido desoxirribonucleico) e pelas características eletroforéticas com enzimas multilocus (JAY, 2005).

A divisão do gênero *Salmonella* em espécies é pouco utilizada nos estudos epidemiológicos, assim utiliza-se o esquema de Kaufmann & White na rotina. Esse esquema realiza a divisão do gênero em sorotipos, baseado na

composição antigênica e relacionado aos antígenos somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi). Os antígenos (O) caracterizam os sorogrupos e são designados por números arábicos, enquanto o antígeno (Vi) existe somente em um tipo sorológico e o antígeno flagelar (H) pode ocorrer em duas fases, assim na fase 1 este é designado por letras minúsculas do alfabeto enquanto na fase 2 é designado por números arábicos (FERREIRA, 2008).

### **3.2- Epidemiologia de *Salmonella* e a importância do sorovar *S. Heidelberg* para a saúde pública**

A contaminação dos produtos de origem animal desencadeia uma infecção alimentar que atualmente afeta a saúde pública mundial, a salmonelose. Esta é uma zoonose complexa de caráter pandêmico, sendo o seu controle de grande interesse para a saúde pública e também para a economia.

A alta incidência da salmonelose nos EUA acarreta um custo estimado entre \$1,3 a \$4,0 bilhões por ano que é decorrente de despesas médicas, queda na produtividade e ausência no trabalho (SHINOHARA et al. 2008). Na União Europeia notifica-se a cada ano mais de 90.000 casos de salmonelose que acarretam alto gasto econômico. Segundo a EFSA - *European Food Safety Authority*, o gasto econômico global relacionado a essa infecção alimentar ultrapassa três bilhões de euros por ano (EFSA, 2014).

Os sorotipos que infectam indiferentemente o homem e uma grande variedade de animais são os principais responsáveis pelas infecções de origem alimentar. A principal forma de transmissão da *Salmonella* para o homem é por meio do consumo de alimentos contaminados, porém a transmissão oro-fecal pode ocorrer, assim como pelo contato com animais infectados, destacando principalmente a relação entre veterinários e trabalhadores de granjas e fazendas (SHINOHARA et al., 2008).

Com propósito epidemiológico distribui-se o gênero em três grupos, sendo que o primeiro contém as espécies que infectam somente o homem, os agentes da febre tifóide e paratifóide, que são as doenças mais graves

causada pelo gênero. Já o segundo grupo possui os sorovares adaptados ao hospedeiro, como *S. Gallinarum* (aves), *S. Dublin* (bovinos) e *S. Abortus-equi* (equinos), enquanto o terceiro grupo é responsável pelos sorovares não adaptados, ou seja, sem preferência de hospedeiro, são patogênicos aos humanos e aos animais, como *S. Heidelberg* e *S. Enteritidis*. Os alimentos de origem animal comumente incriminados na transmissão da *Salmonella* são a carne de aves e bovinos, leite e ovos. As possíveis vias de contaminação dos ovos são a transovariana, translocação a partir do peritônio para a gema ou oviduto, penetração do micro-organismo proveniente da cloaca na casca do ovo, lavagem de ovos e manipuladores de alimentos (JAY, 2005; SHINOHARA, 2008; SMITH; SERIK & AJAYI, 2016).

A carcaça do frango pode ser contaminada durante as operações do abate por meio do patógeno que estava presente tanto no ambiente de criação das aves como nas penas, no intestino e na pele, assim como pela contaminação cruzada dentro de cozinhas industriais e domiciliares (COLLA et al., 2012). Além das aves, o trato intestinal de muitos animais é reservatório para o micro-organismo que ainda sobrevive em diversos ambientes, possuindo dessa forma alto potencial de disseminação (EFSA, 2014).

Os sintomas apresentados pela maioria das pessoas infectadas surgem em torno de doze a quatorze horas após a ingestão do alimento contaminado, e consistem em náuseas, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e diarreia que são geralmente acompanhados por fraqueza, fadiga muscular, febre moderada, nervosismo e sonolência que persistem por cerca de dois a três dias (BUCKLE; WALKER & BLACK, 2012).

### **3.3- Resistência antimicrobiana em *Salmonella* sp.**

A avicultura enfrenta na atualidade situações de emergência em toda a cadeia de produção de aves relacionada com a resistência antimicrobiana de patógenos. Um dado preocupante com relação a resistência está relacionado a transmissão de *Salmonella* ao homem via consumo de alimentos de origem animal. O intenso uso de antimicrobianos na medicina humana e veterinária

ocasiona uma pressão de seleção, favorecendo o surgimento de cepas resistentes e, com isto, reduz as opções terapêuticas disponíveis (LAI et al., 2014). A cadeia de produção avícola é afetada diretamente, já que importadores, como a União Européia, banuiu o uso dos antimicrobianos como promotores de crescimento animal, pois a resistência a várias classes de antimicrobianos pode ser devido à resistência cruzada com antibióticos de uso veterinário (PALERMO NETO, 2014).

O sorovar *S. Heidelberg* apresenta resistência a diferentes antimicrobianos, como a cefoxitina, ceftriaxona, amoxicilina, ácido clavulânico e ampicilina, que são representados em duas sub-classes dos  $\beta$ -lactâmicos: as cefalosporinas e as penicilinas. Os  $\beta$ -lactâmicos possuem ação na parede celular bacteriana. Interferem na síntese da camada de peptidoglicano por meio de diferentes mecanismos que impedem a união das cadeias peptídicas. Atuam exclusivamente sobre bactérias que possuem atividade biossintética da parede celular, ou seja, aquelas em fase de crescimento e reprodução. (ALTERTHUM, 2008; CARATTOLI, 2008). Essa resistência é um problema emergente para a saúde pública, acarretando tratamentos mais complexos e caros. Estima-se que os Estados Unidos tenham uma despesa de \$365 milhões por ano com doenças provocadas por salmonelas não tifóide resistentes aos antimicrobianos (ROTHROCK et al., 2014).

Um dos sorovares de *Salmonella* relacionada com infecções alimentares em humanos é *S. Heidelberg*, que é capaz de produzir doenças mais graves quando comparada a outros sorovares paratíficos. Esse sorovar parece ser mais invasivo, o que implica em um maior potencial patogênico, que é agravado pela resistência antimicrobiana, considerada um problema emergente. Em 2014, nos Estados Unidos, o sorovar apresentou resistência a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas (sulfametoxazol/sulfisoxazole) e tetraciclina (CDC, 2014a).

Nos Estados Unidos, em março de 2013 foi notificado um surto por *S. Heidelberg* envolvendo 634 pessoas de 29 estados. As cepas apresentaram resistência a antimicrobianos, e isso pode estar relacionado ao elevado número

de hospitalização dos indivíduos infectados. Esta resistência além de dificultar o tratamento, também eleva o custo para o sistema de saúde (CDC, 2014b).

Em um estudo realizado por Cardoso et al. (2015) entre o período de 2000 a 2010, utilizando 609 carcaças de frango resfriadas oriundas de diferentes abatedouros comerciais do Estado de São Paulo, 89 amostras (14,6%) apresentaram contaminação por *Salmonella* spp. No ano de 2006, a maior porcentagem de amostras positivas foi para *S. Enteritidis*, e em seguida para *S. Heidelberg*. Entre 2009 e 2010 a *S. Enteritidis* permaneceu como o sorovar de maior prevalência em resultados de ribotipagem, e a *S. Heidelberg* também de destacou.

*S. Heidelberg* está entre os cinco principais sorotipos associados a salmonelose humana e também se encontra entre os sorovares mais comumente isolados de aves (CDC, 2008; FDA, 2010).

### **3.4- Tipagem molecular e a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)**

A avaliação da disseminação de patógenos ao longo da cadeia produtiva de alimentos é importante para que as indústrias possam atuar na prevenção e na implantação de programas mais eficazes de controle. A utilização de métodos moleculares de subtipagem para a caracterização e agrupamento de micro-organismos baseados em suas características genotípicas tem se tornado comuns em laboratórios de saúde pública.

A tipagem molecular é definida como a utilização de técnicas de biologia molecular com o objetivo de realizar a caracterização bacteriana. O uso destas ferramentas permite o rastreamento de determinado micro-organismo em investigações epidemiológicas, fornecendo informações importantes sobre a característica do patógeno, além de dados sobre a similaridade entre isolados, a origem e disseminação das cepas (ALVES et al., 2003).

Vários métodos moleculares têm sido utilizados para a tipagem de *Salmonella*, dentre estes, ribotipagem (MARTINS et al., 2006), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) (SON et al., 2013), Enterobacterial Repetitive

Intergenic Consensus – PCR (ERIC-PCR) (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012), Multilocus Sequence Typing (MLST) (NODA et al., 2011) e o Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (REZK et al., 2012).

A técnica de RAPD tem sido muito utilizada para estudos epidemiológicos envolvendo cepas de *Salmonella* isoladas ao longo do processo produtivo de frangos (NAWAR; KHEDR, 2014).

A técnica também conhecida por amplificação randômica de DNA polimórfico foi desenvolvida nos Estados Unidos por dois grupos independentes. Williams et al. (1990) descreveram a técnica no contexto de análise Mendeliana demonstrando a identificação de marcadores genéticos para mapeamento e patentearam a tecnologia pelo nome mais comum, RAPD. Welsh & McClelland (1990) propuseram uma denominação mais apropriada à técnica, AP-PCR (*Arbitrarily Primed - Polymerase Chain Reaction*), pois os *primers* possuem sequência arbitrária, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso, mas em lugares específicos no genoma. O experimento desse segundo grupo de pesquisadores foi gerar impressões digitais (*fingerprints*) genômicos, simples e reproduzíveis para a identificação de linhagens por meio da utilização de géis de eletroforese em poliacrilamida de maior poder de resolução unido aos *primers* um pouco mais longos. Independente das pequenas variações no nome e na metodologia, a técnica utilizando *primers* de sequência arbitrária abriu uma nova perspectiva para a análise genômica de indivíduos e populações além de permitir a realização de análise genética em espécies que não eram contempladas anteriormente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A metodologia da técnica RAPD consiste na amplificação de DNA utilizando um par de iniciadores com baixa relação de complementariedade ao DNA alvo. A reação ocorre em condições de baixa estringência, permitindo aos *primers* se anelarem em vários locais ao longo da dupla fita de DNA, obtendo assim muitos fragmentos amplificados e revelando a diversidade genética dos micro-organismos, o que possibilita a comparação entre isolados de diferentes tipos de amostras (MARTINEZ & TADDEI, 2008).



A técnica RAPD é basicamente uma variação do protocolo de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), distinguindo-se em duas características: utiliza um *primer* único ao invés de um par, e o primer único tem sequência arbitrária, sendo assim, a sua sequência alvo é desconhecida. Para que ocorra a amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado, duas sequências de DNA complementares ao primer arbitrário devem estar suficientemente anexos (< 4000 pares de base) e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase. Devido a grande quantidade de DNA produzido, o segmento pode ser visualizado diretamente na forma de uma banda num gel de eletroforese. Geralmente a eletroforese é conduzida em gel de agarose e a visualização é feita com brometo de etídio em luz ultravioleta, porém, de forma alternativa podem ser utilizados géis de poliacrilamida de alta resolução e as bandas serem visualizadas por autoradiografia ou coloração com nitrato de prata. Cada primer arbitrário se dirige a síntese de vários segmentos de DNA, simultaneamente em diversos pontos do genoma, originando várias bandas no gel (FERREIRA; GRATTAPAGLIA,1998).

Uma das principais vantagens práticas da técnica RAPD é a simplicidade e rapidez, pois, a técnica consegue ser dez vezes mais eficiente em tempo e mão de obra quando comparado a técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), cujos marcadores baseiam-se na hibridização do DNA, enquanto o RAPD se baseia na amplificação do mesmo. O RAPD é mais eficiente devido à possibilidade de se detectar polimorfismo pela visualização direta das bandas no gel, o que elimina todas as etapas de transferência de DNA para membranas, hibridização com sondas e autoradiografia. Outra grande vantagem da técnica é a quantidade mínima de DNA necessária para a análise genotípica de um indivíduo ou de um micro-organismo, além de ser mais sensível na detecção de polimorfismo no DNA por se basear na técnica de PCR. Além disso, o RAPD oferece uma técnica alternativa de clonagem de segmentos genômicos, que é simples e eficiente, no qual os segmentos uma vez amplificados e separados por eletroforese podem ser isolados do gel e mantidos na forma de uma biblioteca genômica “in

vitro” sem necessidade de vetores, e amplificados por PCR quando necessário. Além do que já foi citado, o custo da técnica também é uma vantagem, pois é menor em termos de valor dispendido por dado genotípico quando comparada ao RFLP e consiste em uma tecnologia acessível que pode ser utilizada cotidianamente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A principal limitação da técnica RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Em alguns casos, o desconhecimento prévio da base genética das bandas RAPD, assim como a elevada sensibilidade de detecção também podem ser uma limitação. A elevada sensibilidade de detecção pode limitar a capacidade de se realizar a análise dos mesmos marcadores em indivíduos geneticamente distantes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA,1998).

## **4- METODOLOGIA**

### **4.1- Amostras**

Avaliou-se 67 cepas de *S. Heidelberg* já sorotipadas e previamente isoladas na região sul do Brasil por empresa avícola brasileira com ciclo completo de produção de frangos de corte. As cepas foram isoladas no ano de 2016, entre os meses de maio e julho, e depositadas na bacterioteca do Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. O produto final (carcaça, cortes e derivados) produzido pela indústria é comercializado no mercado interno e também destinado à exportação.

Os isolados foram identificados quanto à data e local de isolamento, sendo provenientes de granjas de frangos de corte (fezes, suabes de arrasto do aviário, caixas de transporte, entre outras) e de abatedouro (carcaças, cortes cárneos e ambiente). A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada nos 67 isolados, enquanto a análise filogenética ficou restrita a doze isolados.

## 4.2- Susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade das cepas aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco difusão, utilizando-se o protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019). Utilizou-se a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 como cepa controle.

A preparação e padronização dos inóculos foi realizada seguindo o método de suspensão direta das colônias. Colônias puras crescidas em Agar Triptona de Soja (TSA) (Difco®) foram transferidas para tubos contendo 2mL de solução de NaCl 0,85% (Synth®). A turbidez foi ajustada e comparada à da solução padrão de MacFarland a 0,5, correspondente a aproximadamente  $10^8$  UFC/mL. Em seguida, os inóculos foram semeados com auxílio de suabes estéreis em toda a superfície do ágar Mueller Hinton (MH). As placas permaneceram no fluxo laminar por 5 a 15 minutos, à temperatura ambiente, para que o inóculo fosse completamente absorvido pelo ágar antes da aplicação dos discos.

Após absorção, adicionou-se os seguintes discos de antimicrobianos: ácido nalidíxico (30 µg) (quinolona), amoxicilina/ácido clavulânico (10µg) (β-lactâmico/penicilina + inibidor de beta-lactamases), ceftazidima (30 µg) (β-lactâmico – cefalosporina de 3ª geração), ceftiofur (30 µg) (β-lactâmico – cefalosporina de 3ª geração), ciprofloxacina (5 µg) (fluoroquinolona), enrofloxacina (5 µg) (fluoroquinolona), gentamicina (10 µg) (aminoglicosídeo), imipenem (10 µg) (β-lactâmico – carbapenem), tetraciclina (30 µg) (tetraciclina), sulfato de colistina (10 µg) (polimixina), sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg) (sulfonamida e diamino-pirimidina) (LABORCLIN®). A seleção dos antimicrobianos foi baseada no uso dessas drogas na medicina veterinária e humana assim como em relatos de resistência.

A incubação foi realizada em estufa bacteriológica a 37°C por 18-20 horas e, em seguida, mediu-se os diâmetros dos halos de inibição (em milímetros) para classificação dos micro-organismos como sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano testado.

Isolados de *Salmonella* resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos foram classificados como multirresistentes (BRASIL, 2007).

#### **4.3- Análise filogenética das cepas de S. Heidelberg: *RAPD-PCR* (Random Amplified Polymorphic DNA)**

A extração do DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit comercial DNA Purification Kit (Promega<sup>®</sup>) de acordo com as instruções do fabricante. Realizou-se uma cultura *overnight* a 37°C de cada um dos isolados, adicionando uma colônia pura, previamente crescida em ágar TSA, em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (Oxoid). Desta cultura, 1 mL foi transferida para um tubo de 1,5 mL e em seguida, centrifugada a 13.000-16.000×g por 2 minutos para sedimentação das células. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 600µL de solução de lise nucleica, sendo a mistura incubada a 80°C durante 5 minutos para promover a lise celular. Ao atingir a temperatura ambiente, adicionou-se ao tubo contendo o lisado celular 3 µL de solução de RNase, que foi invertido de 2 a 5 vezes para homogeneização, seguida da incubação a 37°C de 15 a 60 minutos. Após, adicionou-se 200 µL da solução de precipitação de proteínas ao lisado de células tratadas com RNase, que posteriormente foi agitado vigorosamente em alta velocidade por 20 segundos para misturar a solução de precipitação de proteínas com o lisado de células. Após imersão em gelo por 5 minutos a mistura foi centrifugada a 13.000-16.000×g durante 3 minutos.

O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol, misturado suavemente por inversão e centrifugada a 13.000-16.000 × g durante 2 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente, e o tubo escorrido em papel absorvente e adicionado de 600 µL de etanol 70% à temperatura ambiente. Após o tubo ser invertido cuidadosamente várias vezes para lavar o sedimento de DNA, foi centrifugado a 13.000-16.000 x g durante 2 minutos, e o etanol aspirado cuidadosamente. Novamente, o tubo foi escoado em papel absorvente e o *pellet* deixado para secar por 10-15 minutos, finalizando com a adição de 100

μL de solução de reidratação de DNA ao tubo, incubado a 65°C por 1 hora e armazenamento do DNA a 2-8°C. A quantificação do DNA foi realizada em aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) em comprimento de onda de 260nm, observando a relação 260/280 a fim de verificar a integridade do DNA (relação entre 1,8-2,0).

Para a realização da técnica de RAPD-PCR utilizou-se o protocolo descrito por Oliveira et al. (2007), tendo como controle positivo, a cepa ATCC 13076 de *S. Enteritidis*. O DNA previamente extraído foi utilizado para a análise molecular pelo uso de dois *primers* individualmente, descritos por Lin et al. (1996), sendo eles, 23L (5' - CCGAAGCTGC - 3') e P1254 (5' - CCGCAGCCAA - 3').

A técnica de RAPD-PCR foi realizada a partir de um volume final de 25μL contendo 1μL de DNA da amostra à 50 ng/μL, 2,5 μL de tampão 10X, 0,75 μL de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 μL de 10 pmol/μL da sequência *forward* e *reverse* de cada *primer* (Invitrogen®), 0,25 μL de 20 mM do *mix* de dNTPs (Invitrogen®), 0,25 μL de Taq (5U/μL) (Invitrogen®) e 17,75 μL de H<sub>2</sub>O ultrapura. A concentração utilizada para os iniciadores foi de 50 pmol para P1254 e 30 pmol para 23L. A reação PCR foi conduzida dentro das seguintes condições: um ciclo de 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Realizou-se as reações de PCR em termociclador (Eppendorf®) e os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 120 minutos, sendo o gel corado com *Sybr Safe* (Invitrogen®), utilizou-se o marcador de 100 PB, e posteriormente o gel foi visualizado em transluminador UV (Loccus Biotecnologia®).

#### **4.4- Análise dos resultados**

Os resultados foram tabulados e submetidos à análise por meio da estatística descritiva, com cálculo das porcentagens de resistência antimicrobiana e construção de perfis de resistência.

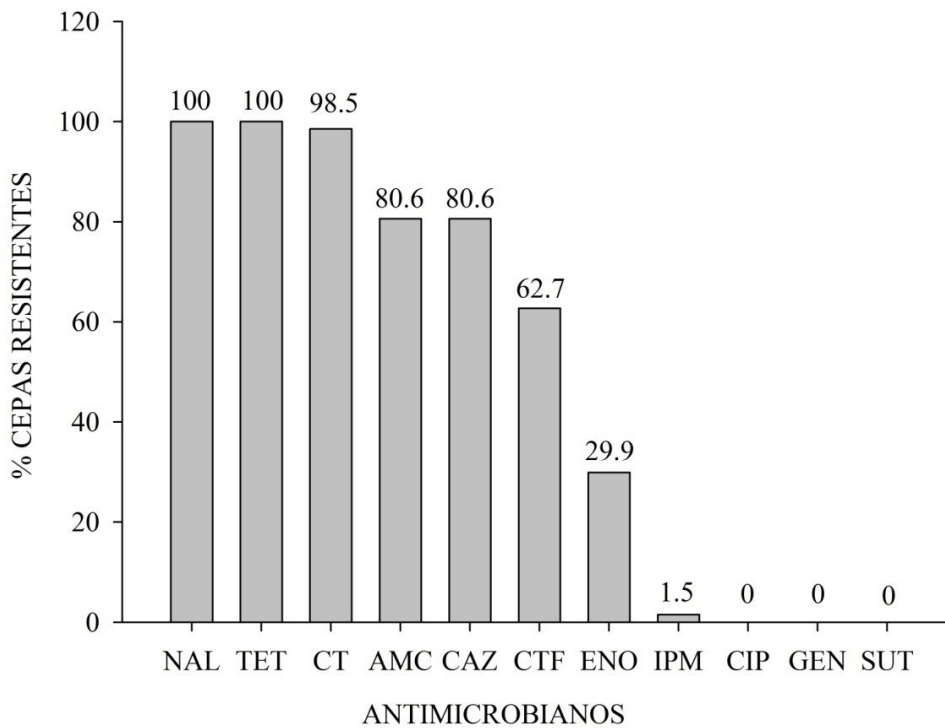
Para a análise de similaridade genética entre as cepas pela técnica RAPD utilizou-se a análise pelo Programa GelCompar II (*Comparative Analysis of Electrophoresis Paattens*), versão 1.5 (*Applied Maths Korthrijk, Belgium*). Os perfis de bandas obtidos no gel captados pelo programa foram utilizados para construir uma matriz de similaridade por comparação entre pares de cepas usando o coeficiente de similaridade de Dice, adotando-se 1% de tolerância para cada *primer* separadamente. A análise final foi baseada na média de experimentos (*average from experiments*) pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arighmetic Mean*) para construção do dendrograma, em que os isolados foram agrupados em *clusters* quando apresentaram homologia superior a 80% ou em genótipos distintos quando inferior a 80%, enquanto os de homologia superior a 99% foram classificados como clones. As cepas foram comparadas considerando o local de isolamento, data de coleta e perfil de resistência.

## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos percentuais de resistência para os antimicrobianos testados nas 67 cepas de *S. Heidelberg* estão apresentados na figura 1. Estes percentuais são referentes ao somatório dos isolados classificados como resistentes e intermediários pelo teste de disco difusão.

Os maiores índices de resistência correspondem ao ácido nalidíxico (quinolonas) e tetraciclina (tetraciclina), em que 100% das cepas demonstraram resistência, seguida pelo sulfato de colistina (classe das polimixinas) com índice de resistência de 98,5% (66/67). Para a amoxicilina/ácido clavulânico ( $\beta$ -lactâmico/penicilina + inibidor de beta-lactamases) e ceftazidima ( $\beta$ -lactâmico - cefalosporina de 3<sup>a</sup> geração) observou-se o índice de 80,6% (54/67), enquanto no ceftiofur ( $\beta$ -lactâmico – cefalosporina de 3<sup>a</sup> geração), observou-se 62,7% (42/67). Os menores percentuais de resistência foram encontrados para a enrofloxacina (fluoroquinolona), 29,9% (20/67), e imipenem ( $\beta$ -lactâmico – carbapenem), com 1,5% (01/67). Todas as cepas foram

sensíveis a ciprofloxacina (fluoroquinolona), a gentamicina (aminoglicosídeo), e ao sulfametoxazol/trimetoprim (sulfonamida e diamino-pirimidina).



**Figura 1.** Frequência (%) de resistência antimicrobiana em *Salmonella* Heidelberg previamente isoladas e sorotipadas em aviário de frango de corte e abatedouro. NAL: ácido nalidíxico (30 µg); AMC: amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg); CAZ: ceftazidima (30 µg); CTF: ceftiofur (30 µg); CIP: ciprofloxacina (5 µg); ENO: enrofloxacina (5 µg); GEN: gentamicina (10 µg); IPM: imipenem (10 µg); SUT: sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg); CT: sulfato de colistina (10 µg); TET: tetraciclina (30 µg). Resistentes: somatório dos isolados classificados como resistentes e intermediários pelo teste de disco difusão.

Todas as 67 cepas (100%) de *Salmonella* foram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos e classificadas como multirresistentes – tabela 1 (BRASIL, 2007).

A maior porcentagem de resistência encontrada para o ácido nalidíxico (quinolona) e tetraciclina (tetraciclina), condiz com um estudo realizado por Mattiello (2013). Também foi observada resistência da *S. Heidelberg* a esses antimicrobianos, além da multirresistência, o que implica diretamente em um problema de saúde pública.

**Tabela 1:** Perfis de resistência aos antimicrobianos em 67 cepas de *Salmonella* Heidelberg previamente isoladas e sorotipadas em aviário de frango de corte e abatedouro.

Perfis	Resistência a antimicrobianos <sup>1</sup>	Classes <sup>2</sup>	N (%)
A1	TET CT CTF CAZ AMC NAL	4	9 (13,4)
A2	TET (CT) CTF CAZ AMCNAL	4	1 (1,5)
A3	TET (CT) CTF CAZ AMC NAL (ENO)	4	1 (1,5)
A4	TET CT (CTF) CAZ AMC NAL	4	11 (16,4)
A5	TET (CT) CAZ AMC NAL (ENO)	4	1 (1,5)
A6	TET (CT) (CTF) CAZ AMC NAL	4	7 (10,4)
A7	TET CT CAZ AMCNAL	4	3 (4,5)
A8	TET CT (CTF) CAZAMCNAL (ENO)	4	5 (7,5)
A9	TET CT CAZ AMC NAL	4	1 (1,5)
A10	TET (CT) (CTF) CAZ AMC NAL (ENO)	4	2 (3)
A11	TET (CT) CAZ AMC NAL	4	4 (6)
A12	TET CT CTF CAZ AMC NAL (ENO)	4	1 (1,5)
A13	TET CT CAZ AMC NAL (ENO)	4	3 (4,5)
A14	TET CT CTFCAZ AMC NAL ENO	4	2 (3)
A15	TET CT (CTF) CAZ AMC NAL ENO	4	1 (1,5)
A16	TET CT NAL ENO IPM	4	1 (1,5)
A17	TET CT (CTF) CAZ AMC	3	1 (1,5)
A18	TET CT NAL	3	9 (13,4)
A19	TET CTF CAZ AMC NAL (ENO)	3	1 (1,5)
A20	TET CT NAL (ENO)	3	1 (1,5)
A21	TET CT NAL ENO	3	1 (1,5)
A22	TET (CT) NAL	3	1 (1,5)
TOTAL			67 (100)

<sup>1</sup>Perfis entre parênteses: cepas com resistência intermediária aos antimicrobianos. NAL: ácido nalidíxico (30 µg); AMC: amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg); CAZ: ceftazidima (30 µg); CTF: ceftiofur (30 µg); ENO: enrofloxacina (5 µg); IPM: imipenem (10 µg); CT: sulfato de colistina (10 µg); TET: tetraciclina (30 µg).; <sup>2</sup> Número de classes de antimicrobianos a que as cepas apresentaram resistência.

No Brasil, as tetraciclina foram proibidas como aditivos na alimentação animal desde 1998, no entanto, ainda são utilizadas terapeuticamente, o que pode exercer pressão seletiva sobre os micro-organismos. Assim, a resistência a esse antimicrobiano é esperada por já ter sido muito utilizado na produção animal (BRASIL, 2009; MUHAMMAD et al., 2010; VOSS-RECH et al., 2015).

A resistência à classe das fluoroquinolonas e cefalosporinas implica em problemas na saúde pública, pois ambas são utilizadas no tratamento de infecções humanas graves. Assim, a resistência a estas drogas pode causar sérias complicações no tratamento (HUR et al., 2012; KILONZO-NTHENGE et



al., 2013; LAI et al., 2014). Os resultados desse estudo demonstram que 29,9% (20/67) dos isolados apresentaram resistência a enrofloxacina (fluoroquinolona), alertando para o uso racional dos antimicrobianos, a fim de se evitar altos níveis de resistência. No entanto, 100% dos isolados foram sensíveis a ciprofloxacina, que também pertence a classe das fluoroquinolonas.

As cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração (ceftazidima e ceftiofur) foram ineficientes na inibição de 80,6% (54/67) e 62,7% (42/67) dos isolados, respectivamente, o que é preocupante, pois essa classe agrupa algumas drogas de escolha para o tratamento de quadros graves de salmonelose (CDC, 2015). O ceftiofur é um antimicrobiano de uso exclusivo na medicina veterinária, enquanto a ceftazidima é utilizada tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (BRASIL, 2009a; CASTELA, 2013).

A utilização do sulfato de colistina como aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal foi proibida em 2016, sendo seu uso permitido somente na terapêutica em infecções com sintomatologia clínica, por possível impacto na saúde humana (BRASIL, 2016). Esse antimicrobiano pertence à classe das polimixinas, a qual as cepas apresentaram resistência de 98,5% (66/67). É possível que essa alta resistência seja consequência do seu uso como promotor de crescimento até 2016. A resistência a esta droga deve ser acompanhada para verificar se a suspensão da pressão de seleção para as cepas resistentes pelo seu uso será de reverter a resistência adquirida.

Estudos recentes demonstram a existência de genes de resistência a colistina no genoma de *Salmonella*, sequenciadas para genes de resistência antimicrobiana. Em 2015, *Escherichia coli* apresentou um gene de resistência transferido por plasmídeo, e posteriormente mais sete genes foram identificados em Enterobacteriaceae. Recentemente, o nono gene foi identificado na *Salmonella* enterica, sorovar *S. Typhimurium*. Este foi isolado de um paciente humano (CARROLL et al., 2019).

A alta resistência encontrada nesse estudo é preocupante, assim, deve-se realizar a análise da CIM (Concentração Inibitória Mínima) ou sequenciamento genético para obter dados mais apurados e consequentemente verificar a resistência real quanto a colistina, que é

considerada um antimicrobiano reservado para o tratamento de infecções graves, resultando assim em um grande problema para a saúde pública.

A análise de similaridade genética de *S. Heidelberg* demonstrou elevada proximidade entre as cepas (Figura 2), indicando que, provavelmente, há fontes comuns de contaminação.

Foram identificados dois *clusters* e um isolado que apresentou perfil distinto, assim não foi agrupado com as demais cepas devido à proximidade genética ser inferior a 80%.

O primeiro *cluster* (*cluster X*) agrupou seis cepas com homologia de 85,8%, presentes tanto no ambiente de criação do frango de corte quanto nas carcaças. Já o segundo *cluster* (*cluster Y*) agrupou cinco cepas com homologia de 80,9%, todas provenientes do ambiente de criação das aves.

Identificou-se um subgrupo clonal no *cluster X* (>99% de similaridade) identificado como o subgrupo A, composto pelas cepas 13 e 14, ambas isoladas no aviário. Curiosamente, estas cepas apresentaram a mesma data de isolamento, porém eram provenientes de locais diferentes, uma de Capinzal (Santa Catarina) e a outra de Toledo (Paraná), ambas apresentando resistência ou resistência intermediária aos mesmos antibióticos (perfis similares de resistência antimicrobiana). Uma hipótese para cepas tão próximas geneticamente estarem presentes em locais distintos é a possibilidade das aves terem uma origem comum, por exemplo, do mesmo incubatório. Além disso, outras possíveis fontes de contaminação são as caixas de transporte e ração.



**Figura 2-** Dendrograma comparativo de *S. Heidelberg* utilizando coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1% e método UPGMA com otimização de 0,80%. *Clusters* X a Y, agruparam isolados com homologia superior a 80%. Perfis A, B e C – grupos clonais, com homologia superior a 99%. . NAL: ácido nalidíxico (30 µg); AMC: amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg); CAZ: ceftazidima (30 µg); CTF: ceftiofur (30 µg); CIP: ciprofloxacina (5 µg); ENO: enrofloxacina (5 µg); GEN: gentamicina (10 µg); IPM: imipenem (10 µg); SUT: sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg); CT: sulfato de colistina (10 µg); TET: tetraciclina (30 µg)

Já o *cluster* Y apresentou dois subgrupos clonais (>99% de similaridade), o primeiro composto pelas cepas 10, 11 e 12 (subgrupo B), todas isoladas do ambiente de criação das aves, apresentando mesma origem, datas próximas de isolamento e mesmos perfis de resistência. O outro subgrupo clonal foi composto pelas cepas 2 e 3 (subgrupo C), também provenientes do mesmo local, data de isolamento, mesmo tipo de amostra, e com perfis de resistência similares.

A análise filogenética ficou restrita a apenas doze isolados devido as dificuldades encontradas na repetibilidade da tipagem molecular das demais cepas com o uso da técnica RAPD. Assim, apesar de seu baixo custo e ser relativamente fácil sua utilização deve-se considerar as dificuldades na repetibilidade para estudos de alguns sorovares de *Salmonella*.

## **6- CONCLUSÕES**

Todos os isolados foram classificados como multirresistentes por apresentarem resistência a três ou quatro classes de antimicrobianos diferentes, alarmando para o perigo que representam para a saúde pública, pois implica em dificuldades no tratamento de quadros de salmonelose causadas por essas cepas.

O uso do RAPD permitiu a análise de 12/67 isolados, devido a dificuldades na repetibilidade dos demais isolados. Assim, a realização de novos estudos com outros *primers* é interessante, pois poderia aumentar o poder discriminatório da técnica utilizada.

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2018**. Disponível em:< <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2018>>. Acesso em: 20 fev 2019.

ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, p.79-85, 2008.

ALVES, A.; HENRIQUE, I.; SANTOS, A.; TACÃO, M.; CORREIA, A. **Tipagem Genética de Microrganismos**. Aveiro, 27 p. 2003. Disponível em:<<http://www.cesam.ua.pt/files/Manual%20Metodos%20de%20Tipagem.pdf>> . Acesso em: 13 set 2018.

BACK, A. **Salmonella Heidelberg é líder absoluta entre variantes no sul do país**. Revista O presente rural. Paraná. n. 15, p.22, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico**. Brasília, 2007. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/0pas\\_web/modulo1/conceitos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/0pas_web/modulo1/conceitos.htm)>. Acesso em: 02 set 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Instrução Normativa Nº 26, de 09 de julho de 2009**. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Diário Oficial da União, DF, 10 jul. 2009, seção 1, p. 14.

BRASIL. **Programa de análises de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal: Relatório 2006 – 2007**. Agência Nacional de

Vigilância Sanitária (ANVISA).2009a. Disponível em:<  
[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395364/PAMVet-  
+Monitoramento+de+Res%C3%ADduos+em+Leite+Exposto+ao+Consumo+-  
+Relat%C3%B3rio+2006-2007/4777c371-e5b5-42e0-9c3f-43670009a802](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395364/PAMVet-+Monitoramento+de+Res%C3%ADduos+em+Leite+Exposto+ao+Consumo+-+Relat%C3%B3rio+2006-2007/4777c371-e5b5-42e0-9c3f-43670009a802)>.  
Acesso em: 10 mai 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA.  
**Instrução Normativa Nº45, de 22 de novembro de 2016.** Proíbe em todo o território nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Diário Oficial da União, DF, 30 nov 2016, seção 1, p. 6.

BUCKLE, G. C.; WALKER, C. L. F.; BLACK, R. E. **Typhoid fever and paratyphoid fever:** Systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010. Journal of Global Health, 2012. Disponível em:<  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3484760/>>. Acesso em: 10 out 2018.

CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A. M.M.; FALCÃO, J. P. **Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of Salmonella Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil.** Food Microbiology, v. 32, n. 2, p. 254-64, 2012. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22986188> >. Acesso em: 29 out 2018.

CARATTOLI, A. **Animal reservoirs for extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers.** Clinical Microbiology and Infection, v. 14, suppl 1, p. 117-123, 2008.

CARDOSO, A. L. S.P.; KANASHIRO, A. M. I.; STOPPA, G. F. Z.; CASTRO, A. G. M.; LUCIANO, R. L.; TESSARI, E. N. C.

**Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010.** Revista Científica de Medicina Veterinária, 2015.

CASTELA, H.A.G.B. **Contribuição para o estudo da utilização terapêutica de antibióticos na clínica de animais de companhia.** Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2013.

CARROLL, L.M.; GABALLA, A.; GULDIMANN, C.; SULLIVAN, G.; HENDERSON, L.O.; WIEDMANN, M. **Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate.** Clinical Science and Epidemiology, 2019. Disponível em: <<https://mbio.asm.org/content/mbio/10/3/e00853-19.full.pdf>>. Acesso em: 20 mai 2019.

CDC- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. ***Salmonella* surveillance: annual summary, 2006.** U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 2008.

CDC- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Outbreak of *Salmonella heidelberg* infections linked to a single poultry producer - 13 States, 2012–2013.** Atlanta, USA. 2013. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6227a3.htm?s\\_cid=mm6227a3\\_e](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6227a3.htm?s_cid=mm6227a3_e)>. Acesso em: 06 set 2018.

CDC- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National antimicrobial resistance monitoring system for enteric bacteria (NARM): Annual Retail Meat Report for 2014 (Final Report) 2014a.** Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/narms/reports/annual-human-isolates-report-2014.html>>. Acesso em: 29 ago 2018.

CDC- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate outbreak of multidrug-resistant *Salmonella Heidelberg* infections linked to foster farms brand chicken (Final Update)**. Atlanta, USA. 2014b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-10-13/>>. Acesso em: 31 ago 2018.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. ***Salmonella***. 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/index.html>>. Acesso em: 31 ago 2018.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 29th. ed. CLSI supplement M100. Wayne, 2019.

COLLA, F. L.; RODRIGUES, L. B.; BORSOI, A.; DICKEL, E. L.; NASCIMENTO, V. P. do; SANTOS, L. R. dos. **Isolamento de *Salmonella Heidelberg* em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte**. São Paulo: Arquivos do Instituto Biológico. v.79, n.4, p.603-606, 2012.

D'AOUST, J. Y.; MAURER, J. ***Salmonella species***. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. (Ed). Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Washington: ASM Press, 2007.

EFSA - European Food Safety Authority. **EFSA explains zoonotic diseases: *Salmonella***. 2014. Disponível em: <[http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate\\_publications/files/factsheet\\_salmonella.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheet_salmonella.pdf)>. Acesso em: 29 ago 2018.



FDA- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **National Antimicrobial Resistance Monitoring System-enteric bacteria (NARMS): 2007 executive report**. U.S. Department of Health and Human Services, Rockville, MD, 2010.

FERREIRA, E. de O.; CAMPOS, L. C. **Salmonella**. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). *Microbiologia*. 5 ed. São Paulo: Atheneu, p.329-338, 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3° ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

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

HUR, J.; JAWALE C. & LEE J.H. **Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: A review**. *Food Research International*, 2012.

JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 711 p., 2005.

KILONZO-NTHENGE, A.; ROTICH E. & NAHASHON S.N. **Evaluation of drug-resistant Enterobacteriaceae in retail poultry and beef**. *Poultry Science*. 2013.

LAI, J.; WU, C.; QI, J.; WANG, Y.; WANG, H.; LIU, Y.; SHEN, J. **Serotype distribution and antibiotic resistance of Salmonella in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012**. *International Journal of Food Microbiology*, v. 180, p. 30-38, 2014.

LIN, A.W. et al. **Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella* Enteritidis.** Journal of Clinical Microbiology, v. 34, n. 4, p. 870-876, 1996.

MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R. Métodos de diagnóstico. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia.** 5 ed. São Paulo: Atheneu, p.117-125, 2008.

MARTINS, C. H. G.; SANTOS, V. R.; CASTRO, F. A.; FERNANDES, S. A.; MARTINEZ, R. **Ribotyping of *Salmonella* Enteritidis strains reveals the spread of a single genotype in the Brazilian city of Ribeirão Preto.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 42, n.1, p. 19-23, 2006.

MATTIELLO, S. P. **Caracterização da resistência a antimicrobianos em isolados de *Salmonella enterica* provenientes de materiais de origem avícola.** Porto Alegre, 2013.

MEDEIROS, M. A. N.; OLIVEIRA, D. C. N. de; RODRIGUES, D. dos P.; FREITAS, D. R. C. de. **Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities.** Revista Panamericana de Salud Publica, v. 30, n. 6, p. 555–560, 2011.

MUHAMMAD, M.; MUHAMMAD, L. U.; AMBALI, A. G.; MANI, U. A.; AZARD, S.; BARCO, G. **Prevalence of *Salmonella* associated with chick mortality at hatching and their susceptibility to antimicrobial agents.** Veterinary Microbiology, 2010.

NAWAR, E. M.; KHEDR, A. M. **Molecular Studies on *Salmonella* species isolated from chicken.** Alexandria Journal Veterinary Science, v. 43, n. 1, p. 58-64, 2014.

NODA, T.; MURAKAMI, K.; ASAJ, T.; ETOH, Y.; ISHIHARA, T.; KURAKI, T.; HORIKAWA, K.; FUJIMOTO, S. **Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* subsp. *Enteritidis* strains in Japan between 1973 and 2004.** Acta Veterinaria Scandinava, v. 53, p. 38, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21672260>>. Acesso em: 20 nov 2018.

OLIVEIRA, F. A.; FRAZZON, A. P. G.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. **Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella Enteritidis* involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil.** Journal of Infection in Developing Countries. p. 170–176. 2007.

PALERMO NETO, J. **Os antimicrobianos e a resistência bacteriana.** Avicultura industrial, n. 07, ano 105, Edição 1235, p. 26-33, 2014. Entrevista concedida a Humberto Luis Marques e Rodolfo Antunes. Disponível em: <[http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticia/os-antimicrobianos-e-a-resistencia-bacteriana-na-avicultura/20140909083737\\_Q\\_039](http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticia/os-antimicrobianos-e-a-resistencia-bacteriana-na-avicultura/20140909083737_Q_039)>. Acesso em: 19 set 2016.

REZK, N. A.; MANSOUR, H.; GHONEIM, N. H.; RIFAAT, M. M. **Typing of *Salmonella Typhi* strains isolated from Egypt by RAPD PCR.** 3 Biotech, v. 2, n. 1, p. 17-25, 2012.

ROTHROCK, M. J. Jr.; INGRAM, K. D.; GAMBLE, J.; GUARD, J.; CICCONI-HOGAN, K. M.; HINTON, A. Jr.; HIETT, K. L. **The characterization of *salmonella enterica* serotypes isolated from the scalding tank water of a commercial poultry processing plant: recovery of a multidrug-resistant heidelberg strain.** Champaign: Poultry Science Association, 2014.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B. de; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. de C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. de L. ***Salmonella spp.*, importante agente patogênico veiculado em alimentos.** Rio de Janeiro: Ciência e Saúde Coletiva, vol.13, n.5, p.1675-1683, 2008.

SMITH, S. I.; SERIKI, A.; AJAYI, A. **typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* infections in Africa**. European journal of clinical microbiology & infectious diseases, 2016.

SON, I.; ZHENG, J.; KEYS, CE.; ZHAO, S.; MENG, J.; BROWN, EW. **Analysis of pulsed field gel electrophoresis profiles using multiple enzymes for predicting potential source reservoirs for strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolated from humans**. Infection Genetics and Evolution, v. 16, p. 226-33, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23429060> >. Acesso em: 12 nov 2018.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C.S.L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J.A.; RODRIGUES D.P. & BACK A. **A temporal study of *Salmonella enteric* serotypes from broiler farms in Brazil**. Poultry Science, 2015.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. **Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers**. Nucleic acids research, vol 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A. & TINGEY, S. V. **DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers**. Nucleic acids research, vol 18, p. 6531-6535, 1990.