



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

SABRINA LUNARA SANTOS PAVELQUESI

**Prevalência e resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. isolada de carnes de frango
comercializadas no Distrito Federal**

BRASÍLIA-DF

2021

SABRINA LUNARA SANTOS PAVELQUESI

Prevalência e resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. isolada de carnes de frango comercializadas no Distrito Federal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Mecanismos Básicos e Processos Biológicos em Saúde

Linha de pesquisa: Mecanismos Moleculares e Funcionais da Saúde Humana

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA-DF

2021

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PP337p Pavelquesi, Sabrina Lunara Santos
Prevalência e resistência antimicrobiana de Salmonella spp. isolada de carnes de frango comercializadas no Distrito Federal / Sabrina Lunara Santos Pavelquesi; orientador Izabel Cristina Rodrigues da Silva; co orientador Daniela Castilho Orsi. -- Brasília, 2021. 99 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde) -- Universidade de Brasília, 2021.

1. Salmonella. 2. Carne de aves. 3. Resistência microbiana a medicamentos. 4. Gene de virulência invA. 5. Genes de resistência antimicrobiana. I. Silva, Izabel Cristina Rodrigues da, orient. II. Orsi, Daniela Castilho, co-orient. III. Título.

SABRINA LUNARA SANTOS PAVELQUESI

Prevalência e resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. isolada de carnes de frango comercializadas no Distrito Federal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Brasília, 31 de agosto de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Daniela Castilho Orsi (Presidente)
Universidade de Brasília/Faculdade de Ceilândia

Prof. Dra. Eliana Fortes Gris
Universidade de Brasília/Faculdade de Ceilândia

Prof. Dra. Cainara Lins Draeger
Faculdade LS

Aos meus pais e à minha irmã, por terem me proporcionado o privilégio de “só” estudar;
Ao meu esposo, por dar seguimento a esse privilégio.

AGRADECIMENTOS

Agradecer somente a quem contribuiu diretamente não condiz com o meu sentimento de realização, por isso, antes de agradecer a essas pessoas, gostaria de iniciar deixando minha gratidão às pessoas que contribuíram indiretamente, seja com amor, com palavras, com compreensão, com sustento financeiro e com momentos de descontração.

Aos meus pais, Gildete e Jamilton, pessoas que tornaram possível a concretização dessa etapa, pois sempre colocaram os meus estudos em primeiro lugar, fazendo o possível para que eu obtivesse uma educação de qualidade;

À minha irmã, Karini, a maior inspiração da minha vida, emocional e intelectual, e com isso, fez o seu papel de irmã mais velha: a que inspira, que ajuda, que cuida e que faz rir;

Ao meu esposo, Wilker, o programador responsável pelo resultado dos meus gráficos personalizados e únicos, pela força quando eu me sentia esgotada, palavras de incentivo e abraço quando eu chorava, e ainda por ser as mãos que massageavam minhas costas ao final do dia;

A toda a minha família, que sempre contribuiu e estimulou meu longo percurso acadêmico, especialmente minha vó Genyr, a qual também é minha madrinha, que sempre esteve ao meu lado, me ajudando em tudo que era do seu alcance, e minha tia Adriana, quem me deu suporte financeiro para me preparar para entrar na Universidade de Brasília, e também a responsável pelo meu interesse em vigilância sanitária desde pequena;

E ao meu cunhado, Thiago, por ser exemplo de profissional (embora seja professor da matéria mais chata do mundo – história), pela demonstração de confiança e pelas críticas construtivas.

A minha primeira guia como pesquisadora e quem esteve comigo desde a orientação de iniciação científica até a concretização desse trabalho foi a minha coorientadora, professora Daniela Orsi, e, por isso, dou início por ela o meu agradecimento às pessoas que contribuíram diretamente na concretização dessa pesquisa. Dani enxergou em mim a capacidade de realizar esse trabalho, acendendo o meu desejo em seguir com a nossa pesquisa após a finalização do meu PIBIC e TCC. Além de excelente orientadora, é compreensiva e descomplicada, e teve o cuidado de estar presente em cada etapa, além de ter corrigido, pacientemente, parágrafo por parágrafo da minha dissertação;

Não menos importante, agradeço à minha orientadora, professora Izabel Cristina, pelos ensinamentos valiosos, os quais se estendem academia a fora: zelo dentro do laboratório, por ter me instigado a pensar além, por ter permitido com que eu me sentisse competente no meu trabalho, confiando a mim tarefas desafiadoras. Obrigada por toda a dedicação e esforço, por ser aquela

pessoa com a qual eu pude contar quando precisava de soluções, aquela que vai lá e resolve tudo, e que te envolve em situações fora da zona de conforto;

À minha grande amiga Letícia, que fez o caminho ser mais leve. Aquela que compartilhou o laboratório comigo durante o ano caótico de pandemia, que foi parceira quando chorei, quando morri de rir, quando foi preciso montar um novo laboratório para trabalharmos na pandemia, quando precisei de incentivo, de ideias, de ajuda para tirar os cultivos da estufa, para preparar os meios, e pra deixar o ambiente alegre. E, de quebra, ainda veio no combo o Aislan, seu esposo, quem me ajudou todas as vezes em que eu estava surtando com as ferramentas do Excel e do Word;

À minha outra parceira de laboratório, Ana Carolina, quem esteve comigo em todas as frustrações e vitórias do início da pesquisa. Compartilhou bancada, dividiu grandes responsabilidades, rastreou contaminação, construiu minicurso e escreveu artigo comigo. Ana contribuiu preciosamente para a realização deste trabalho, pois fez com que a nossa pesquisa fosse mais veloz e mais ampla;

À UnB, pelo ensino e espaços de qualidade, e ao PPGCTS pela oportunidade em vivenciar as reflexões e discussões acadêmicas durante meus dois anos como representante discente do colegiado, e, por ser um programa competente, sempre procura excelência e inovações;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

“Soon we must all face the choice between what is right and what is easy”.

(J.K Rowling - Alvo Dumbledore em
Harry Potter e o Cálice de Fogo)

RESUMO

O Brasil é o país que mais exporta carne de frango no mundo, além de possuir grande importância no quesito produção, ocupando a terceira posição no ranking mundial. Embora o país possua tamanha importância na avicultura e apresente legislações para o monitoramento de patógenos, como a *Salmonella* spp., o controle desses microrganismos no setor aviário ainda apresenta falhas. Devido a contaminação por *Salmonella* spp. em produtos de origem animal apresentar risco de saúde a população, o objetivo desse trabalho foi identificar o grau de ocorrência dessas bactérias nas carnes de frango comercializadas no Distrito Federal, uma vez que esse patógeno é um dos mais envolvidos em surtos de origem alimentar em todo o mundo. Além disso, foi avaliado o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas isoladas, e buscou-se os genes de resistência *bla*CTX, *sul2* e *tetB* nessas cepas. Foram coletadas 115 amostras de carne de frango resfriadas em supermercados, e o isolamento das cepas de *Salmonella* spp. foi realizado por método convencional de microbiologia. Posteriormente, a confirmação das cepas de *Salmonella* spp. foi realizada por meio da detecção do gene de virulência *invA* pela técnica da PCR. A avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. foi realizada por meio da técnica de disco-difusão de Kirby-Bauer, e os genes de resistência *bla*CTX, *sul2* e *tetB* foram pesquisados em todos os isolados. O total de 46,1% das amostras de carne de frango (53/115) apresentou contaminação por *Salmonella* spp., geneticamente confirmada pela detecção do gene *invA*. As 78 cepas de *Salmonella* spp. isoladas das 53 amostras de carne de frango apresentaram maior resistência à amoxicilina/ácido clavulânico (83,3%), seguido da sulfonamida (64,1%) e a tetraciclina (46,2%), sendo que 53,8% dos isolados foram multirresistentes (MDR). Os genes de resistência foram pesquisados nas 78 cepas de *Salmonella* isoladas das amostras de carne de frango, ou seja, buscou-se os genes de resistência tanto em cepas fenotipicamente resistentes, quanto em cepas sensíveis e com sensibilidade intermediária. O gene *sul2*, que confere resistência a sulfonamida, foi encontrado em 53 cepas (68,0%), o gene *bla*CTX, que confere resistência aos beta-lactâmicos, foi identificado em 39 cepas (50,0%), e o gene *tetB*, que confere resistência a tetraciclina, foi identificado em 29 cepas (37,2%). Os resultados deste estudo mostraram uma elevada ocorrência de contaminação por *Salmonella* spp. nas carnes de frango comercializadas no Distrito Federal. Esses resultados são preocupantes, uma vez que a presença dessas bactérias nesses produtos apresenta risco à saúde dos consumidores, e ainda existe a possibilidade de disseminação de resistência aos antimicrobianos aos seres humanos, limitando as opções dos fármacos utilizados no combate às infecções bacterianas.

Palavras-chave: *Salmonella*; carne de aves; doenças transmitidas por alimentos; resistência microbiana a medicamentos; gene de virulência *invA*; genes de resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Brazil is the largest exporter of chicken meat in the world, and has great importance in terms of production, occupying the third position in the world ranking. Although the country has such importance in poultry farming and has legislation for the monitoring of pathogens such as *Salmonella* spp., the control of these microorganisms in the poultry sector still has flaws. Due to contamination by *Salmonella* spp. in products of animal origin poses a health risk to the population, the aim of this study was to identify the degree of occurrence of *Salmonella* spp. in chicken meat sold in the Federal District, since this bacterium is one of the most involved in foodborne outbreaks worldwide. In addition, the antimicrobial susceptibility profile of the isolated strains was evaluated, and the *blaCTX*, *sul2* and *tetB* resistance genes were searched for in these strains. Thus, 115 samples of chilled chicken meat were collected in supermarkets, and the isolation of *Salmonella* spp. was performed using the conventional method of microbiology. Subsequently, confirmation of *Salmonella* spp. was achieved by detecting the *invA* gene by the PCR technique. The evaluation of antimicrobial susceptibility profile of *Salmonella* spp. was performed using the Kirby-Bauer disk diffusion technique, and the *blaCTX*, *sul2*, and *tetB* resistance genes were screened in all isolates. A total of 46.1% of the chicken meat samples were contaminated by *Salmonella* spp. which was genetically confirmed by detection of the *invA* gene. The 78 strains of *Salmonella* spp. isolated from a total of 53 chicken meat samples showed higher resistance to amoxicillin/clavulanic acid (83.3%), followed by sulfonamide (64.1%) and tetracycline (46.2%), and 53.8% of the isolates were multidrug-resistant (MDR). The *blaCTX*, *sul2* and *tetB* resistance genes were investigated in 78 strains of *Salmonella* isolated from chicken meat samples, that is, the resistance genes were searched for both phenotypically resistant strains, as well as for sensitive and intermediately sensitive strains. The *sul2* gene that confers resistance to sulfonamide was found in 53 strains (68.0%), the *blaCTX* gene that confers resistance to beta-lactams was identified in 39 strains (50.0%), and the *tetB* gene that confers resistance to tetracycline was identified in 29 strains (37.2%). The results of this study showed a high occurrence of contamination by *Salmonella* spp. in chicken meat sold in the Federal District. These results are worrying, since the presence of these bacteria in these products poses a risk to the health of consumers, and there is still the possibility of spreading antimicrobial resistance to humans, limiting the choice of drugs used to combat bacterial infections.

Keywords: *Salmonella*; poultry meat; foodborne illnesses; microbial drug resistance; virulence gene *invA*; antimicrobial resistance genes.

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1 - Representação tridimensional (3D) do gênero <i>Salmonella</i> spp.	24
Figura 2 - Mecanismos de invasão celular da <i>Salmonella</i> spp.	31
Figura 3 - Mecanismos de resistência antimicrobiana	36
Figura 4 - Fluxograma para isolamento de <i>Salmonella</i> spp.	42
Figura 5 - Isolamento de <i>Salmonella</i> spp. em meio de cultivo seletivo (XLD e SS).....	46
Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose mostrando a detecção do gene <i>invA</i>	49

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Desenho do primer, peso molecular e as condições de termociclagem utilizadas na PCR do gene <i>invA</i>	43
Tabela 2 - Sequência de primers, peso molecular e as condições de termociclagem utilizadas na PCR dos genes <i>blaCTX</i> , <i>sul2</i> e <i>tetB</i>	44
Tabela 3 – Distribuição de amostras de frango resfriadas contaminadas por <i>Salmonella</i> spp., considerando o tipo de corte analisado.....	50
Tabela 4 - Perfil de susceptibilidade antimicrobiana em isolados de <i>Salmonella</i> spp. recuperados de carnes de frango resfriadas	51
Tabela 5 - Número de classes de antimicrobianos dos quais as cepas de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de carnes de frango resfriadas apresentaram resistência.....	56
Tabela 6 - Perfil de resistência e multirresistência antimicrobiana das cepas de <i>Salmonella</i> isoladas das amostras de carne de frango resfriadas.....	57
Tabela 7 - Presença dos genes de resistência nos 78 isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	60
Tabela 8 - Relação entre presença e ausência do gene de resistência em isolados de <i>Salmonella</i> spp. fenotipicamente resistentes aos antimicrobianos	60

RELAÇÃO DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Prevalência de contaminação por *Salmonella* spp. nas amostras resfriadas de carne de frango resfriadas comercializadas no Distrito Federal entre os anos de 2018 a 2020..... 47

RELAÇÃO DE ANEXOS

ANEXO A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA	81
ANEXO B - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO	93
ANEXO C - QUALIS DO PERIÓDICO NA ÁREA INTERDISCIPLINAR.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitros
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APT	Água Peptonada Tamponada
BrCAST	Brasilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COVID-19	Doença do coronavírus (coronavírus disease)
DHPS	Diidropteroato-sintase
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
ESBL	Beta-lactamases de Espectro Estendido
FA	Ágar Fenilalanina
g	Gramma
IN	Instrução Normativa
LB	Caldo Lúria Bertani
LIA	Ágar Lisina Ferro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	Multidrug-resistant (multirresistente)
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitros
ng	Nanograma
nm	nanômetro
pb	Pares de Base
PCR	Reação da Cadeia em Polimerase
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RNA	Ácido Ribonucleico
SC	Caldo Selenito Cistina
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SPI	Ilhas de Patogenicidade da <i>Salmonella</i> (<i>Salmonella Patogenicity Island</i>)
SS	Ágar Salmonella-Shigella
TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro

TT	Caldo Tetracionato
UV	Ultravioleta
W	Watt
XLD	Xilose-lisina-desoxicolato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	MERCADO BRASILEIRO DA CARNE DE FRANGO.....	18
1.2	DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA).....	19
1.3	REGULAMENTAÇÕES BRASILEIRAS NO CONTROLE DE <i>SALMONELLA</i> SPP. NA PRODUÇÃO AVÍCOLA	20
1.4	<i>SALMONELLA</i> SPP. NA CADEIA DE PRODUÇÃO DA CARNE DE FRANGO	21
1.5	CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO <i>SALMONELLA</i> SPP. E OS PRINCIPAIS SOROVARES ENVOLVIDOS EM DOENÇAS	23
1.5.1	Salmonelose	25
1.5.2	Febre tifoide e paratifoide	27
1.5.3	Tifo aviário e pulurose	29
1.6	PATOGENIA E ESTRATÉGIAS DE VIRULÊNCIA DA <i>SALMONELLA</i> SPP.	30
1.7	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	32
1.7.1	Mecanismos de resistência aos antimicrobianos	35
1.7.2	Resistência antimicrobiana em <i>Salmonella</i> spp	36
1.7.3	Implicações de resistência na atualidade	39
2	OBJETIVOS	40
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
3	METODOLOGIA	41
3.1	COLETA DAS AMOSTRAS	41
3.2	MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL.....	41
3.3	MICROBIOLOGIA MOLECULAR	42
3.3.1	Extração de DNA bacteriano	42
3.3.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	43
3.3.2.1	Gene de virulência	43
3.3.2.2	Genes de resistência.....	43
3.3.3	Eletroforese em gel de agarose	44
3.4	AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA	45
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46

5	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	81
	ANEXO B - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO.....	93
	ANEXO C - QUALIS DO PERIÓDICO NA ÁREA INTERDISCIPLINAR.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 MERCADO BRASILEIRO DA CARNE DE FRANGO

O Brasil ocupa, desde 2004, a posição de maior exportador de carne de frango no mundo (USDA, 2021). No ano de 2020, o Brasil exportou 4,2 milhões de toneladas de carne de frango. Neste mesmo ano, 13,845 milhões de toneladas de carne de frango foram produzidas, sendo que 69,0% da produção foi destinada ao mercado interno e 31,0% ao mercado externo. O Brasil fechou o ano de 2020 em terceiro lugar no ranking dos países que mais produzem carne de frango no mundo (ABPA, 2021).

A carne de frango é a proteína animal mais consumida pela população brasileira desde o ano de 2007, e o consumo desse produto vem crescendo a cada ano, alcançando a marca de 45,27 kg/habitante/ano em 2020 (ABPA, 2021). Além disso, também no último ano, a carne de frango foi a proteína animal mais consumida em todo o mundo, ultrapassando pela primeira vez na história o consumo mundial da carne de porco, devido à crise vivida na China em decorrência da Peste Suína Africana, uma doença viral altamente contagiosa, sem cura ou tratamento, que atingiu o rebanho suíno no país asiático. Estimativas apontam que a China, país responsável por quase 50% da produção de carne de porco no mundo, vai demorar para se estabilizar, e a carne de frango vai se tornar oficialmente a proteína animal mais consumida em todo o mundo (IPC, 2019; USDA, 2021).

O valor acessível da carne de frango somado a praticidade de preparo, garante o amplo consumo do produto no mercado interno. Já em relação ao mercado externo, os avanços tecnológicos da produção avícola, a sanidade animal e a competitividade de custo, colocam o Brasil como líder em exportação. De acordo com Filho et al. (2011), o Brasil se manteve livre de doenças aviárias que acometeram o mundo no início do século XXI, possibilitando o ganho de mercados externos exigentes em qualidade sanitária. Estima-se que mais de 150 países importam a carne de frango brasileira, equivalendo a mais de 70% dos países de todo o mundo. Isso se deve aos avanços ocorridos na genética das aves, qualidade e segurança alimentar da carne brasileira, melhorando a eficiência da produção avícola no país (EMBRAPA, 2021; FILHO *et al.*, 2011).

1.2 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA)

Os avanços tecnológicos na avicultura brasileira permitiram grandes vantagens na cadeia produtiva, como por exemplo o melhoramento genético dos frangos, responsável por grande parte dos resultados alcançados no Brasil, possibilitando o aumento da produtividade geral. Esses avanços trouxeram vantagens como a redução da idade ao abate, aumento no peso de abate, no rendimento da carcaça e de cortes nobres, além da diminuição de perdas (EMBRAPA, 2021; FILHO *et al.*, 2011).

Tal modernização permitiu que o país se tornasse uma potência mundial nesse seguimento, no entanto, o aumento da produção, do consumo e da exportação da carne de frango traz preocupações acerca da qualidade e segurança alimentar. As DTA são causadas pela contaminação de alimentos que pode ocorrer em qualquer fase da cadeia de produção (WHO, 2021). Estima-se que anualmente 1 a cada 10 pessoas no mundo adoecem após ingerir alimentos contaminados e 420.000 pessoas morrem em decorrência dessas doenças alimentares. Esse fato é ainda mais prejudicial em crianças menores de 5 anos, faixa etária responsável por 40% dos casos notificados de DTA (WHO, 2020b).

A *Salmonella* spp. é uma das bactérias que mais causam surtos alimentares em todo o mundo. Classificada também, como um dos principais patógenos identificados em carnes de frango, que, por sua vez, é um dos alimentos que mais estão relacionados com DTA. Os alimentos crus de origem animal são os mais prováveis de serem contaminados com *Salmonella* spp., especialmente a carne de frango crua ou mal cozida. Desta forma, recomenda-se para a prevenção da salmonelose, a completa cocção da carne de frango (CDC, 2020b).

No Brasil, a *Salmonella* spp. é o segundo agente etiológico mais identificado nos surtos de DTA notificados, e as carnes de aves também representam um dos maiores reservatórios de *Salmonella* spp. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). A União Europeia, bloco de países com um dos maiores índices de exportação da carne de frango do mundo, tem a *Salmonella* como a segunda zoonose mais comumente relatada, e o principal agente etiológico envolvido em surtos alimentares (EFSA/ECDC, 2021a).

A série histórica de surtos de DTA no Brasil, apresentada pelo Ministério da Saúde, relatou a *Salmonella* spp. como o principal microrganismo identificado durante o período de 2007 a 2015, sendo que em 2007, *Salmonella* spp. respondia por quase 50% dos casos de DTA, e em 2015, esse número correspondia a 15,81%. De 2016 a 2019, os dados apresentam *Escherichia coli* como o agente etiológico mais predominante em surtos de DTA, e *Salmonella* spp. o segundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a, 2020b).

Apesar da queda significativa de casos notificados, estima-se que 60 a 80% dos casos de salmonelose não são reconhecidos como surto ou diagnosticados como tal, devido a existência de casos assintomáticos e oligossintomáticos, e também devido a rápida recuperação dos acometidos, não necessitando de atenção hospitalar. Esses fatores acarretam em baixa notificação e dificuldade na investigação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a, 2020b).

1.3 REGULAMENTAÇÕES BRASILEIRAS NO CONTROLE DE *Salmonella* spp. NA PRODUÇÃO AVÍCOLA

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituiu a Instrução Normativa nº 20 de 2016, onde o artigo 1º da norma estabelece o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frango, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), a fim de reduzir a prevalência de *Salmonella* spp. na carne de frango e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor (BRASIL, 2016a).

Em 2017, no Brasil, a Polícia Federal deflagrou a Operação Carne Fraca, por suspeita de fraude na produção e comercialização da carne brasileira, por meio da venda de carne adulterada e vencida de grandes empresas do ramo da avicultura. Em decorrência desse fato, em 29 de março de 2017, por meio do decreto 9.013, foi publicado o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), há 65 anos sem atualização (BRASIL, 2017). O decreto 9.013 regulamenta a lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950, a qual dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal, estabelecendo a obrigatoriedade prévia de fiscalização de todos os produtos de origem animal (BRASIL, 1950).

A revisão atual do RIISPOA contemplou a implantação de novas tecnologias, padronização de procedimentos técnicos e administrativos, maior harmonização com a legislação internacional, interação com outros órgãos públicos de fiscalização, ordenação didática das normas para facilitar a consulta e atualização de terminologias ortográfica e técnica, exigência de ações que visem o bem-estar animal. Algumas doenças que afetavam os animais no antigo RIISPOA não estão mais presentes, porém, cuidados com patógenos infectocontagiosos, como a *Salmonella*, que é um problema atual, foram incluídos na atualização do RIISPOA (BRASIL, 2017).

A inovação do texto ainda defronta com situações de insegurança alimentar, pois na terceira fase da Operação Carne Fraca, deflagrada em 05 de março de 2018, houve a denúncia de fábricas que fraudavam laudos sobre presença da bactéria *Salmonella* na carne de frango para

exportação. De acordo com as investigações, cinco laboratórios (sendo 3 credenciados junto ao Ministério da Saúde) fraudavam resultados das análises feitas nos produtos e entregavam laudos falsos ao Serviço de Inspeção Federal (VIANNA *et al.*, 2018).

Ao final do ano de 2019, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou a Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, atualizando a lista de padrões microbiológicos para alimento, exigindo ausência de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em carnes de aves resfriadas ou congeladas (BRASIL, 2019b). A legislação vigente da União Europeia é mais rígida e estabelece ausência de *Salmonella* spp. em carnes de aves após o processo de pré-resfriamento das carcaças na cadeia produtiva (UE, 2005).

A Anvisa considerou o Brasil como não economicamente ou tecnicamente viável para exigir medidas mais rigorosas, como a ausência de todos os sorovares¹ de *Salmonella* nas aves, pois as medidas necessárias para cumprir tal exigência ainda não estão totalmente implementadas nos fornecedores de pintinhos e rações dos animais, nos aviários e nos abatedouros. Portanto, para a realidade da produção brasileira, considerou-se viável o controle baseado nos sorovares Enteritidis e Typhimurium, os quais estão mais relacionados com doenças transmitidas por alimentos (ANVISA, 2021b).

1.4 *Salmonella* spp. NA CADEIA DE PRODUÇÃO DA CARNE DE FRANGO

Existem fatores que resultam em maior ocorrência, persistência e disseminação de *Salmonella* spp. e estão relacionados com a crescente produção de carne de frango, o aumento da densidade animal nas granjas e o estresse das aves durante a criação (EFSA, 2019). A complexa epidemiologia da *Salmonella* spp. na cadeia da produção de aves envolve a transmissão vertical, via ovo, desencadeando o nascimento de pintos infectados, e envolve também a transmissão horizontal, com a contaminação das aves por meio do ambiente (BRASIL, 2011; DENAGAMAGE *et al.*, 2015; FORSYTHE, 2013; ICMSF, 2005).

Na transmissão vertical, algumas espécies de *Salmonella* possuem a capacidade de infectar os ovários e os ovidutos das aves, desencadeando uma transmissão trans ovariana, antes da formação da casca do ovo. A contaminação vertical também pode ocorrer pela penetração de *Salmonella* na casca do ovo no momento da postura, durante a passagem pela cloaca. Essas formas de contaminação podem atingir a gema do ovo, infectando o embrião em desenvolvimento. Nesse contexto, o principal meio de transmissão de *Salmonella* ao ser humano se dá a partir da ingestão

¹ Subdivisão de uma espécie ou subespécie distinguível de outras cepas com base na antigenicidade.

de ovos, ou alimentos contendo ovos sem cocção, ou com cocção ineficiente (BRASIL, 2011; FORSYTHE, 2013; ICMSF, 2005).

A transmissão horizontal da *Salmonella* spp. nas aves ocorre por meio do ambiente, água e rações contaminados, ou durante o processo de abate (DENAGAMAGE *et al.*, 2015; ICMSF, 2005). As rações contaminadas com *Salmonella* spp. são importantes fontes de contaminação das aves, e as farinhas de origem animal, como as farinhas de carnes e ossos têm se mostrado fontes comuns de contaminação com *Salmonella* spp. A frequente ocorrência de roedores e insetos nas granjas constitui um fator facilitador para a disseminação de *Salmonella*. Isso ocorre devido ao fácil acesso que os roedores têm ao local das rações, podendo assumir o papel de portadores assintomáticos, e por meio de fezes, contaminar com *Salmonella* as rações que irão servir de alimento para as aves. Já os insetos, podem entrar em contato direto com as fezes das aves e, assim, passam a albergar diversas bactérias, entre elas *Salmonella* (BRASIL, 2011; SMITH; PALUMBO; EDELSON, 1984).

Davies *et al.* (2001) investigaram por dois anos a eficácia da limpeza e desinfecção de duas empresas integradas de frangos de corte da Inglaterra. Ambas as empresas usaram um regime de desinfecção que incluiu a aplicação de um spray de desinfetante fenólico seguido de nebulização com solução de formaldeído. Ambas as empresas tiveram problemas persistentes e foram detectadas *Salmonella* Binza e *Salmonella* Ohio em suas fábricas de ração. As incubadoras de nascedouros de ambas as empresas também foram contaminadas de forma persistente com *Salmonella* Livingstone e *Salmonella* Thomasville. E em ambas as empresas, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium também foram isoladas ocasionalmente de vários locais. Os resultados deste estudo mostraram a diversidade de fontes de *Salmonella* em grandes empresas avícolas. Para controlar a contaminação do ambiente com *Salmonella* de forma eficaz, o monitoramento completo e procedimentos de prevenção são essenciais, principalmente em sistemas integrados.

No estudo experimental de Kallapura *et al.* (2014) foi sugerida também a ocorrência de transmissão da *Salmonella* spp. em aves por via fecal-respiratória. As evidências experimentais e epidemiológicas mostram que a infecção primária de *Salmonella* nas aves ocorre pela via oral-fecal. No entanto, a transmissão de *Salmonella* por inalação de aerossol indica a possibilidade de o sistema respiratório ser um potencial portal de entrada para *Salmonella* em aves.

A contaminação das aves com *Salmonella* pode ocorrer durante qualquer etapa do processamento, sendo a evisceração e o resfriamento as etapas mais críticas (PARK *et al.*, 2015). O processamento das aves compreende as etapas de insensibilização, sangria, escaldagem, depenagem, evisceração, lavagem, pré-resfriamento e resfriamento. Alguns estudos isolaram

Salmonella na água da escaldagem, na depenagem e na evisceração (COLLA *et al.*, 2012; ROTHROCK *et al.*, 2015; ZENG *et al.*, 2021). Segundo Rivera-Pérez *et al.* (2014), o processo de evisceração das aves representa um risco de contaminação cruzada ou recontaminação por *Salmonella* spp. Durante o processo de evisceração do conteúdo intestinal, pode ocorrer contaminação da carne do frango, que acaba também contaminando a água dos tanques de resfriamento (MAHARJAN *et al.*, 2019).

O método mais comum do pré-resfriamento é o chamado *chiller*, processo realizado para obter o rebaixamento imediato da temperatura das aves, por sistema de imersão em tanques de água com temperatura de saída de até no máximo 4°C (BRASIL, 1998). No estudo de Boni (2007), 10% da água do *chiller* estava contaminada por *Salmonella*. Colla *et al.* (2012) também encontraram contaminação por *Salmonella* na água do *chiller*.

Yamatogi *et al.* (2016) avaliaram a prevalência de *Salmonella* spp. em 33 amostras de carcaças de frango no estado de São Paulo. As avaliações se deram em 4 etapas da cadeia produtiva da carne de frango: 1) pós sangramento, 2) pós depenagem, 3) pós resfriamento, 4) durante a simulação de temperatura no varejo, sendo nessa última etapa, a carne armazenada a 5°C por 72 horas antes das análises. *Salmonella* foi encontrada em 100% (33/33) das amostras na primeira etapa do processamento; 39% (13/33) das amostras na segunda etapa do processamento; 58% (19/33) das amostras na terceira etapa do processamento; e 30% (10/33) das amostras na etapa de simulação da temperatura no varejo. Esses resultados apontam falhas durante as etapas de processamento, sugerindo contaminação cruzada entre as amostras.

A contaminação que ocorre durante o processo de abate, ou até mesmo o aumento da prevalência de contaminação após o processamento, ainda pode estar relacionada com a grande quantidade de aves processadas e a capacidade da *Salmonella* spp. em aderir às superfícies (ICMSF, 2005; MELLOR *et al.*, 2010). A presença de *Salmonella* spp. na carne de frango sugere falta de higiene no processamento de carne e contaminação cruzada entre máquinas e operários (MAHARJAN *et al.*, 2019).

1.5 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *Salmonella* spp. E OS PRINCIPAIS SOROVARES ENVOLVIDOS EM DOENÇAS

O termo *Salmonella* foi adotado em 1900, em homenagem a Daniel Salmon, microbiologista responsável pelo primeiro isolamento do microrganismo, em 1885, a partir do intestino de suínos (ASSUMPCÃO, 1945; SMITH; MOORE, 1894). Atualmente são conhecidos

mais de 2600 sorovares de *Salmonella*, e a maioria deles são capazes de causar doenças em seres humanos (MAPA, 2021; WHO/FAO, 2002).

O gênero *Samonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, possuindo as características dessa família: o trato intestinal de seres humanos e animais como habitat natural, morfologia de bastonetes (bacilos) gram-negativos, são anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose com ou sem produção de gás e, geralmente são móveis por flagelos. Possuem em sua camada externa uma grande quantidade de fímbrias, filamentos que auxiliam a adesão da bactéria na superfície das células do hospedeiro (Figura 1). Os microrganismos desse gênero não são formadores de esporos, apresentam diâmetro entre 0,7 a 1,5 μm e comprimento de 2 a 5 μm , crescem em temperaturas entre 8 e 45°C e em pH de 4 a 8 (BRASIL, 2011; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Figura 1 - Representação tridimensional (3D) do gênero *Salmonella* spp.



Fonte: (CDC, 2020a).

Com relação ao metabolismo, a maioria dos sorovares de *Salmonella* de interesse clínico não fermentam lactose, no entanto, as cepas podem adquirir essa propriedade por meio de transferência plasmidial. Possuem capacidade de utilizar citrato como única fonte de carboidrato, são oxidase negativas e não produzem indol, ureia ou acetoína. São catalase positivas, produzem sulfeto de hidrogênio (H_2S) a partir da redução do enxofre (S) e apresentam capacidade de descarboxilação da lisina e ornitina. Essas características metabólicas podem sofrer alterações em função do sorovar ou da subespécie (ANVISA, 2008; BRASIL, 2011; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; WHO/FAO, 2002), e possuem relevância para que seja possível realizar a identificação do gênero em meios de cultura.

A diferenciação dos sorovares é realizada por método sorológico, identificando antígenos específicos de superfície bacteriana, por meio do sistema de Kauffmann-White, publicado em 1934 (ASSUMPTÃO, 1945). A sorotipagem é baseada com base na imunorreatividade de duas

estruturas da superfície celular da bactéria, os antígenos O e H. O antígeno O é específico de um carboidrato, componente mais externo da superfície celular; o antígeno H é a porção filamentosa do flagelo bacteriano, composto por proteína, e possui duas variações, chamada de fase I (monofásica), e de fase II (bifásica). Cada antígeno O e H possui um código exclusivo, sendo possível distinguir, por meio de teste de aglutinação, cada sorovar do gênero *Salmonella* (CDC, 2011).

A *Salmonella* é dividida atualmente em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A *S. enterica*, por sua vez, é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*, possuindo, hoje, 2610 sorovares, ou seja, variedades sorológicas; a *S. bongori* possui 23 sorovares. A espécie *enterica* subespécie *enterica* é a de maior importância clínica, tanto em saúde humana quanto animal, e abrange os sorovares Enteritidis e Typhimurium, principais sorovares causadores de doenças em seres humanos, e o sorovar Gallinarum, responsável pelas doenças aviárias (MAPA, 2021).

Hofer et al. (1997), compararam a prevalência dos sorovares de *Salmonella* isolados em carnes de aves no Brasil entre os anos 1962 a 1991, e como resultado, os sorovares mais frequentes encontrados durante o período foram *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis* e *S. Infantis*, sendo que as duas primeiras não deixaram de existir durante os 30 anos da observação. Mais recentemente, entre os anos 2000 a 2016, Monte et al. (2019), encontraram com maior frequência os sorovares *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund* e *S. Enteritidis* em amostras provenientes da cadeia de produção das aves brasileiras. De maneira geral, os sorovares que mais causam prejuízos na avicultura são *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, enquanto que *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são os mais importantes sorovares causadores de doenças de origem alimentar nos seres humanos (MAPA, 2021).

1.5.1 Salmonelose

Os sorovares Enteritidis e Typhimurium, integrantes de *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, são considerados os de maior importância para a saúde pública, podendo atingir tanto os seres humanos quanto diversas espécies de animais. São os principais responsáveis pelas salmonelas zoonóticas, as quais representam o maior índice de gastroenterites em seres humanos. Além de estarem envolvidas com os maiores casos de surtos de origem alimentar, possuem também índices significativos de morbidade e mortalidade em todo o mundo (ANTUNES *et al.*, 2016; BRASIL, 2011). Atualmente, no Brasil, *S. Enteritidis* vem apresentando queda no número de casos de surtos de origem alimentar, enquanto *S. Typhimurium* teve um aumento significativo,

sendo responsável por 80% dos isolamentos de *Salmonella* em amostras de alimentos em 2018 (ANVISA, 2019).

A salmonelose ocorre pela contaminação por *Salmonella* não tifoide, ou seja, por todos os sorovares da *S. enterica*, com exceção dos sorovares Typhi e Paratyphi (hospedeiro-específicos dos seres humanos). *S. Enteritidis* tornou-se estabelecida nas aves na década de 1960, e se tornou um dos primeiros grandes alardes da segurança alimentar na década de 1980 e, antes disso, *S. Typhimurium* já era estabelecida no meio aviário (BARROW *et al.*, 2012; BÄUMLER; HARGIS; TSOLIS, 2000).

Vários outros sorovares também estão envolvidos na *Salmonella* zoonótica, como a *S. Newport*, que se tornou o segundo agente mais comumente encontrado em casos de salmonelose nos Estados Unidos em 2016, e *S. Infantis*, a qual vem apresentando um aumento substancial ao longo dos anos (CDC, 2018). *S. Infantis* também tem sido bastante notificada na União Europeia, juntamente com uma variante monofásica da *S. Typhimurium* (EFSA/ECDC, 2021a). No Brasil, *S. Newport* também ganhou importância, pois se tornou o segundo agente mais isolado em amostras humanas relacionadas a surtos alimentares. Outros sorovares muito prevalentes atualmente são *S. Agona*, *S. Heidelberg* e *S. Infantis* (ANVISA, 2019).

As aves, quando acometidas pelos sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, adquirem doenças conhecidas como paratifo aviário, responsável por grandes perdas de produtividade nas granjas, devido a rápida disseminação do microrganismo entre os animais e a alta mortalidade. Ademais, as aves assintomáticas se tornam reservatórios desses agentes bacterianos, com potencial de transferir aos seres humanos. Os sinais apresentados pelas aves, quando infectadas, são principalmente apatia, penas arrepiadas, asas caídas, amontoamento, diarreia, diminuição da postura e cegueira (ZANINELLI *et al.*, 2019).

Os seres humanos, quando infectados pelos sorovares relacionados com as salmonelas zoonóticas, adquirem gastroenterite, um quadro infeccioso tipicamente caracterizado por uma infecção autolimitada, que ocorre pela invasão das bactérias da mucosa intestinal e a multiplicação destas no local, com o período de incubação entre 6 e 72 horas. De maneira geral, os sintomas aparecem com uma febre moderada, acompanhada de náuseas, dor abdominal, cólicas e diarreia inflamatória, com ou sem a presença de sangue, e podem durar de 4 a 7 dias, sendo que, após o término dos sintomas, a *Salmonella* spp. ainda pode ser encontrada nas fezes por 4 a 5 semanas (CDC, 2020d; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Por se tratar de uma infecção autolimitada, a antibioticoterapia, na maioria das vezes, não é indicada para esses pacientes. Nesse caso, os cuidados são baseados em reposição hídrica (CDC, 2019a).

Ocasionalmente as salmonelas causadoras de gastroenterite conseguem atravessar a mucosa intestinal e, dessa maneira, penetram no sistema linfático e circulatório, alcançando a disseminação sistêmica. Algumas pessoas são mais propensas a desenvolver essa forma mais severa da doença, como os pacientes imunocomprometidos, pessoas subnutridas, idosos e crianças e, embora incomum, as infecções de maior gravidade acompanham desidratação e risco de óbito, desenvolvendo bacteremia ou outras infecções extra intestinais (ANTUNES *et al.*, 2016; CDC, 2020d). Na África Subsaariana foi relatado que a variante monofásica da *Salmonella* Typhimurium, causadora de infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, apresentou letalidade de 20 a 25% (FEASEY *et al.*, 2012). Esses casos mais graves de salmonelose representam um número alto de hospitalizações e de óbitos, quando comparados a outras DTA (ANTUNES *et al.*, 2016).

Uma vez em que a *Salmonella* spp. alcança uma disseminação sistêmica, ou em casos de a bactéria atingir pacientes susceptíveis a desenvolver a doença em maior gravidade, o tratamento com antimicrobiano é requerido. A antibioticoterapia depende da sensibilidade das cepas aos antimicrobianos disponíveis, sendo que, atualmente, o tratamento de primeira escolha é realizado com fluorquinolonas para pacientes adultos e mulheres que não estejam gestantes, e para cepas que já apresentam resistência a essa classe, ou para tratar crianças, utiliza-se a azitromicina (macrolídeo). A ceftriaxona (cefalosporina de 3ª geração) é um medicamento injetável, utilizado como alternativa (BRASIL, 2010; CDC, 2017, 2019a).

Os surtos alimentares de salmonelose geralmente se devem ao cozimento inadequado, à recontaminação dos produtos cárneos após cozimento, ou por contaminação cruzada em superfícies ou utensílios, acarretando em transferência para os alimentos prontos para consumo, aqueles que não passarão por cocção (ICMSF, 2005). No Brasil, a *Salmonella* representou 14,9% dos surtos de DTA entre 2016 e 2019, e os locais de ocorrência mais relacionados são residências, seguido de restaurantes e padarias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). A prevenção depende de boas práticas de manipulação, da refrigeração adequada dos alimentos e cozimento completo, principalmente dos produtos de origem animal altamente relacionados com *Salmonella* spp. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

1.5.2 Febre tifoide e paratifoide

A espécie *Salmonella enterica* subespécie *enterica* também engloba os sorovares Typhi e Paratyphi, causadores da febre tifoide e paratifoide, respectivamente. A febre tifoide, também chamada de febre entérica, é classificada como uma doença sistêmica invasiva que afeta

unicamente os seres humanos, sendo, portanto, disseminada por excreções de outros seres humanos. A febre paratifoide se assemelha a febre tifoide, embora menos agressiva, e é causada por *Salmonella Paratyphi A*, *Salmonella Paratyphi B* e *Salmonella Paratyphi C* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

A ocorrência da doença está diretamente ligada às condições de higiene e de saneamento, relacionadas ao consumo de água ou alimentos contaminados com fezes de seres humanos, não sendo conhecido outro reservatório, que não o homem (APPIAH *et al.*, 2020; CDC, 2017). A partir da ingestão, a bactéria penetra a mucosa intestinal, invade os fagócitos e os gânglios linfáticos, e, após o período de incubação, que pode variar de 7 a 21 dias, é disseminada por diversos órgãos, principalmente o baço, fígado e medula óssea. Inicialmente os sintomas são inespecíficos, mas, após o período de incubação, ocorre febre alta, calafrios, delírios, ulcerações, hepatoesplenomegalia, dor abdominal difusa e lesões eritematosas. Algumas complicações podem acontecer, como enterorragia, perfuração intestinal e ulceração do cólon (BRASIL, 2010).

Os sorovares Typhi e Paratyphi, causadores da febre entérica, são os mais virulentos do gênero e possuem índice de letalidade ainda alto em países onde o saneamento básico é deficiente e que possuem baixo acesso a alimentos seguros. Estima-se que ocorram 215.000 óbitos globalmente por ano, apresentando taxa de letalidade <1%, entretanto, em contextos de áreas mais pobres, com grande concentração de população refugiada ou quando não há água tratada, a taxa de letalidade da doença pode aumentar, variando de 10-30% (CDC, 2017). O problema é agravado pois aproximadamente 10% dos pacientes recuperados da doença se tornam portadores assintomáticos, excretando *S. Typhi* nas fezes por até três meses após o tratamento, e desses, 2-3% se tornam portadores crônicos, podendo excretar a bactéria por vários meses. Alguns portadores crônicos continuam disseminando a *S. Typhi* por um período indefinido, requerendo um tempo prologado de tratamento (BRASIL, 2010).

O bacilo responsável pela doença foi descoberto em 1880 (MARINELI *et al.*, 2013), e somente em 1948 a febre tifoide passou a ser uma doença tratável, quando foi introduzida a terapia com o antimicrobiano cloranfenicol (WOODWARD *et al.*, 1948). À época, outros antimicrobianos também foram utilizados para tratamento da febre tifoide, como a ampicilina (β -lactâmico), e a associação trimetoprima + sulfametoxazol (sulfonamida), entretanto, em decorrência da resistência adquirida aos antimicrobianos, relatada inicialmente em meados de 1960, houve mudanças ao longo dos anos no protocolo de tratamento (SMITH, S. M.; PALUMBO; EDELSON, 1984).

O protocolo de tratamento atual para febre tifoide é o mesmo utilizado para tratar pacientes acometidos por *Salmonella* não tifoide (fluoroquinolonas, azitromicina ou ceftriaxona), no

entanto, muitas cepas de *Salmonella* spp. já vêm apresentando elevada resistência à esses antimicrobianos (DAHIYA *et al.*, 2019; FRANÇOIS WATKINS *et al.*, 2020; KUANG *et al.*, 2018; VLIEGHE *et al.*, 2012).

Existem também vacinas contra a *S. Typhi*, no entanto, elas não possuem alto poder imunogênico e a imunidade adquirida é de curta duração. Portanto, a principal medida de controle se dá por meio do consumo de alimentos e água seguros e a lavagem frequente das mãos. No Brasil, a vacina é indicada apenas para militares que compõem o contingente brasileiro nas missões de paz, em regiões com o elevado risco epidemiológico para a ocorrência da doença (BRASIL, 2019c).

1.5.3 Tifo aviário e pulorose

A *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum são consideradas biovars² pertencentes à *S. enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum devido à grande semelhança antigênica entre elas. Ambas são hospedeiro-específicas das aves, e, por esse motivo, não são transmitidas aos seres humanos. Entretanto, são responsáveis por grandes prejuízos na produção aviária, por meio da disseminação das doenças conhecidas como tifo aviário e pulorose (CARDOSO; TESSARI, 2015).

A pulorose, causada pela *S. Pullorum*, é uma doença sistêmica de alta mortalidade, relacionada também com a redução da produção de ovos. Afeta principalmente as aves jovens, as quais apresentam sinais e sintomas como tristeza, dificuldade de respirar, penas arrepiadas, amontoamento, asas caídas, cabeça pesada, sonolência, inapetência, fezes esbranquiçadas aderidas ao redor da cloaca, crescimento retardado. As aves que se recuperam da doença tornam-se portadoras assintomáticas, eliminando esporadicamente o agente infeccioso pelas fezes, tornando difícil de diagnosticar e fácil de disseminar entre as aves do plantel (CARDOSO; TESSARI, 2015; ZANINELLI *et al.*, 2019).

O tifo aviário, causado pela *S. Gallinarum*, é mais frequentemente isolada em aves adultas, e quando acomete aves jovens, pode ser confundida com a pulorose. Os sinais e sintomas mais observados envolvem prostração, sonolência, inapetência, diarreia amarelo-esverdeada aderida às penas e cloaca, queda da postura, dispneia, anemia grave, podendo levar ao óbito. A taxa de mortalidade é de até 80% do lote (CARDOSO; TESSARI, 2015; ZANINELLI *et al.*, 2019).

² Cepas bacterianas distinguíveis de outras cepas da mesma espécie com base em caracteres fisiológicos.

Ambas as doenças, descobertas ao final do século XIX, são mundialmente distribuídas, e, apesar de estarem sob controle ou até mesmo serem consideradas erradicadas em muitos países desenvolvidos, ainda apresentam uma ameaça para as indústrias dos países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil (STELLA *et al.*, 2021). Barrow & Freitas Neto (2011) consideram improvável essa dita erradicação, diante das várias espécies de aves selvagens que podem abrigar esses sorovares, e relatam incompatibilidade nos dados oficiais, pois foram isolados esses sorovares em gaiolas e em galinhas no Reino Unido, anos após o país se considerar livre do tifo aviário e da pulorose.

Embora os biovares Gallinarum e Pullorum não causem doenças aos seres humanos, esses adquirem resistência antimicrobiana da mesma maneira que os outros sorovares de *Salmonella*, existindo, portanto, a preocupação acerca da resistência cruzada entre outros sorovares causadores de doenças aos seres humanos (SEO *et al.*, 2019).

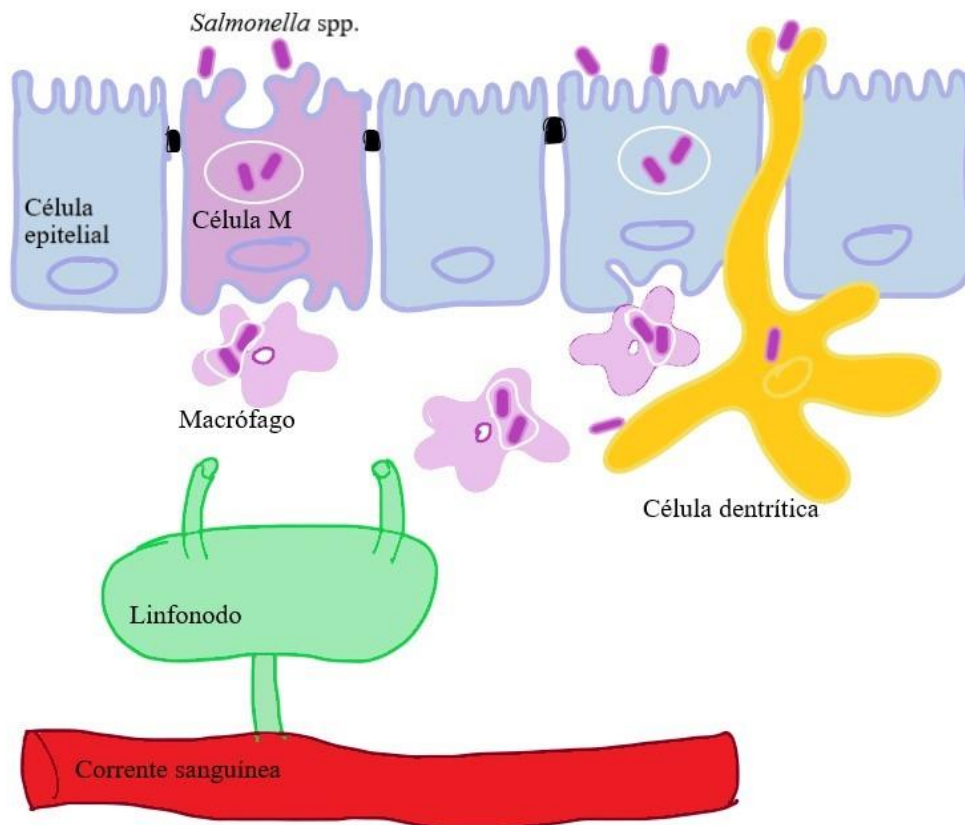
1.6 PATOGENIA E ESTRATÉGIAS DE VIRULÊNCIA DA *Salmonella* spp.

Para que ocorra infecção por *Salmonella*, um indivíduo saudável precisa ingerir em torno de 10^5 unidades formadoras de colônias da bactéria contida nos alimentos ou água contaminados. Após sobreviver ao pH estomacal, essas bactérias vão em direção ao lúmen do intestino delgado, encontram a mucosa intestinal e aderem ao epitélio por meio das fímbrias. Então, as bactérias invadem a mucosa intestinal, por meio da destruição da camada epitelial mediada por metabólitos bacterianos, e pelo transporte através do epitélio intacto. Na mucosa intestinal, vários tipos de células podem ser encontrados, como as células M e enterócitos absortivos, que são considerados as principais portas de entrada para o patógeno. Uma vez dentro do citoplasma das células intestinais, formam-se os vacúolos, onde a *Salmonella* fica envolvida, sendo capaz de se multiplicar. A interação do patógeno com o epitélio intestinal resulta no aparecimento do quadro clínico, caracterizado por diarreia, perda de eletrólitos e inflamação local do intestino. Além disso, a liberação de pirógenos pelas células de defesa causa febre (CARNEIRO; COSTA, 2020; DOS SANTOS; FERRARI; CONTE-JUNIOR, 2018; FINLAY, 1994).

A infecção causada por *Salmonella enterica*, na maioria dos casos, permanece localizada, dando origem a uma gastroenterite. Entretanto, dependendo da virulência do sorovar envolvido, o quadro pode se tornar generalizado. Algumas cepas de *Salmonella* mais invasivas conseguem atravessar a camada epitelial do intestino mediante um processo chamado de transcitose, onde são transferidas de um polo a outro da célula por meio dos vacúolos. Ao atravessar a camada epitelial do intestino, elas alcançam a camada submucosa, entrando em contato com os macrófagos e são

fagocitadas por eles (Figura 2). O patógeno ativa alguns mecanismos de virulência que permitem sua sobrevivência e replicação no interior dos macrófagos. A migração dos macrófagos infectados para órgãos como o baço e fígado, facilita a disseminação das bactérias, levando a septicemia e podendo causar a morte do hospedeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2013; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Figura 2 - Mecanismos de invasão celular da *Salmonella* spp.



Fonte: Autoria própria, (2021).

Durante todos esses estágios da infecção, bactérias do gênero *Salmonella* spp. utilizam fatores de virulência específicos envolvidos no mecanismo de patogenicidade, os quais auxiliam o microrganismo a aderir e invadir as células do hospedeiro, além de inibir as suas defesas. Tais mecanismos de patogenicidade são codificados por genes de virulência, que podem fazer parte de regiões específicas do cromossomo da bactéria, as chamadas Ilhas de Patogenicidade da *Salmonella* (*Salmonella* Patogenicity Island - SPI), como também podem estar localizados em elementos genéticos móveis, os plasmídeos (OLIVEIRA *et al.*, 2013; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; VIEIRA, 2009).

O mecanismo de virulência da *Salmonella* mais estudado é o de invasão celular, desencadeado pela presença de genes cromossômicos envolvidos em conferir essa habilidade. A consolidação da invasão da *Salmonella* spp. se dá pela capacidade que a bactéria tem de penetrar nas células epiteliais do hospedeiro, sendo esse mecanismo essencial na patogenicidade. Tal mecanismo é modulado por genes localizados na ilha de patogenicidade SPI-1. Um dos mecanismos da SPI-1 envolve os genes do operon *inv* (*invasibility*) que são considerados essenciais no processo da invasão celular (OLIVEIRA *et al.*, 2013; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; VIEIRA, 2009).

O operon *inv* é composto por sete genes: *invABCDEFG* e desses, o gene *invA* (o primeiro do operon) foi caracterizado em 1992. O estudo foi realizado em cultura de células e os autores demonstraram que as bactérias *Salmonella* Typhimurium que carregavam uma mutação no gene *invA* eram deficientes no processo de invasão celular. E quando o gene era novamente introduzido na bactéria, por meio de um plasmídeo que o carregava, a habilidade de invasão celular era restaurada. Dessa forma, os autores conseguiram comprovar que o gene *invA* é indispensável para a invasão celular e patogenicidade da bactéria (GALAN; GINOCCHIO; COSTEAS, 1992). Esses achados tornaram o gene *invA* um alvo molecular muito utilizado na identificação da *Salmonella* spp., e seu uso é recomendado pela Food and Drug Administration (FDA) (FDA, 2007).

1.7 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

O surgimento dos antimicrobianos revolucionou o tratamento das doenças infecciosas. Entretanto, atualmente, a resistência aos antimicrobianos é uma das maiores ameaças globais à saúde que a humanidade enfrenta (WHO, 2020a). A resistência é definida quando as bactérias se adaptam ao meio e desenvolvem habilidades para se defender contra as drogas que são destinadas a eliminá-las (CDC, 2019b).

O uso indiscriminado dos antimicrobianos resultaram na seleção de patógenos resistentes a esses medicamentos, levando ao surgimento de infecções difíceis de serem tratadas. Outro fator preocupante diz respeito a rápida disseminação dessas cepas resistentes, especialmente as cepas multirresistentes (resistentes a três ou mais antimicrobianos). Esse fato gera um impacto significativo na economia, pois além de óbitos, o problema também envolve internações hospitalares mais longas e necessidade de medicamentos mais caros (WHO, 2020a).

O uso dos antimicrobianos na produção animal parece trazer benefícios diversos, como a saúde, o bem-estar animal e a redução de custos na produção. Entretanto, a resistência antibacteriana está interligada com a segurança alimentar, pois o uso desses medicamentos em

animais de produção destinados à alimentação desencadeou na seleção de bactérias resistentes. Essas bactérias resistentes carregam genes de resistência que se espalham, usualmente por meio da alimentação, aos seres humanos (CARDINAL; PIRES; RIBEIRO, 2020; SALIM *et al.*, 2018; WHO, 2020a).

Vários dos antimicrobianos existentes foram e ainda estão sendo utilizados na produção animal, não apenas com a finalidade de tratar de infecções, mas também na prevenção do desenvolvimento de doenças e como promotores de crescimento. Esse uso excessivo contribui significativamente para agravar o problema da resistência aos antimicrobianos, que impacta não somente a região geográfica de utilização dos medicamentos, mas também se dissipa para várias regiões do mundo, pois os alimentos são comercializados em escala global (WHO, 2011). Vale ressaltar que os medicamentos utilizados na produção animal, tanto para fins de promoção de crescimento quanto para tratamento de infecções deixam resíduos nos animais, e no Brasil, a Anvisa estabelece os limites máximos de resíduos dos antimicrobianos usados em animais por meio da IN nº 51, de 19 de dezembro de 2019 (BRASIL, 2019a).

Dado a importância desse tema, a Organização Mundial da Saúde sugeriu que o uso dos antimicrobianos como promotores de crescimento que também possuam função na terapia humana, principalmente os de alta prioridade, sejam descontinuados, entretanto, a restrição desses medicamentos como função de promotores de crescimento é controversa e variada. A Suécia foi o primeiro país a banir o uso dos antimicrobianos, tal fato ocorreu em 1986; a União Europeia impôs a restrição total do uso dos antimicrobianos como promotores de crescimento na produção animal em 2006; nos Estados Unidos, desde 2017, também não é permitido o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, entretanto, o uso profilático e terapêutico permanece legal. Outros países que também restringiram o uso desses medicamentos são Canadá, México, Japão, Hong Kong, China e Índia. Como alternativa ao uso dos antimicrobianos como promotores de crescimento, diversos aditivos alimentares foram propostos nas dietas das aves (CARDINAL; PIRES; RIBEIRO, 2020; SALIM *et al.*, 2018; WHO, 2019).

Cardinal *et al.* (2020), avaliaram o panorama mundial do uso de promotores de crescimento na produção de aves e porcos, e concluíram que, embora a tendência mundial seja banir o uso dos antimicrobianos com essa finalidade, permitindo apenas o uso para o tratamento de doenças em animais, essa realidade não é uma tarefa fácil de ser resolvida, e encontra resistência por parte dos produtores. Essa dificuldade se dá pelo fato de que ao banir o uso desses medicamentos para finalidade de promoção de crescimento, acarreta aumento imediato dos custos da produção ao exigir a necessidade de novas estratégias para evitar queda da produção.

No Brasil não existe uma regulamentação definitiva para banir o uso dos antimicrobianos para a finalidade de promoção de crescimento, embora existam regulamentações individuais e parceladas ao longo do tempo para certos medicamentos. O primeiro antimicrobiano a ser banido no Brasil foi o cloranfenicol e seu uso passou a ser proibido para qualquer finalidade veterinária em todos os animais em 2003 (BRASIL, 2003). Em 2009, os anfenicóis (grupo que representa os medicamentos à base de cloranfenicol), as tetraciclina, os beta-lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), as quinolonas e as sulfonamidas sistêmicas passaram a ser de uso exclusivo em produtos antimicrobianos de uso veterinário, sendo vedado a utilização de tais classes antibacterianas como aditivos e melhoradores de desempenho (BRASIL, 2009). A segunda regulamentação deixa dúvidas quanto ao uso do cloranfenicol, medicamento declarado banido para qualquer finalidade veterinária, deixando a entender que o medicamento ainda pode ser usado em animais, desde que não seja como promotor de crescimento.

Outros medicamentos também foram proibidos no Brasil para uso como promotores de crescimento na alimentação animal. No ano de 2012 foi proibido o uso da espiramicina e da eritromicina, dois medicamentos pertencentes à classe dos macrolídeos (BRASIL, 2012). A colistina, antimicrobiano atualmente usado para combater bactérias multirresistentes, foi proibida em 2016 (BRASIL, 2016b), entretanto, a instrução normativa a qual se refere essa proibição, abriu brecha para a utilização do medicamento “quando da existência em estoque”, pelo prazo de dois anos a partir da publicação. O Ministério Público solicitou a suspensão do artigo que trata essa liberação, questionando quanto ao conhecimento do volume em estoque remanescente nas empresas e as implicações do uso do medicamento durante o prazo. O MAPA informou que não poderia mensurar tais implicações, e que atendeu os princípios da razoabilidade e adaptação dos setores, deixando entender, na visão do Ministério Público, que os interesses econômicos foram sobrepostos aos interesses da saúde pública (BRASIL, 2018).

Mais recentemente, no ano de 2020, a tilosina, lincomicina e tiamulina foram os últimos antimicrobianos a serem proibidos como melhoradores de desempenho no Brasil. Entretanto, a instrução normativa a qual trata essa questão, autorizou a fabricação exclusiva para exportação de aditivos melhoradores de desempenho que contenham esses antimicrobianos, deixando explícito, mais uma vez, a sobreposição da economia diante de um problema de saúde que requer esforços mundiais (BRASIL, 2020). A regulamentação que trata dos limites máximos de resíduos de medicamentos em alimentos de origem animal, permite o quantitativo de resíduos desses medicamentos proibidos para promoção de crescimento em aves em quantidades altas, variando entre 50-2000 mcg/kg, exceto o cloranfenicol (classificado como limite não recomendado) e a colistina que não é citada no documento (BRASIL, 2019a).

1.7.1 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

A resistência antimicrobiana é conceituada como a habilidade de um microrganismo em continuar a multiplicar-se ou em persistir, mesmo na presença de níveis terapêuticos de determinado agente antimicrobiano. Tal resistência ocorre de forma espontânea, sendo classificada como natural ou intrínseca, e é uma resposta evolutiva à exposição aos antimicrobianos, ou também pode ocorrer por aquisição, classificada como induzida, e é resultante de alterações nos mecanismos que eram normalmente ausentes nas bactérias (ABUSHAHEEN *et al.*, 2020; ANVISA, 2012; HOLMES *et al.*, 2016).

Os mecanismos de resistência são definidos por estratégias desenvolvidas pelos microrganismos para se defender das ações dos antimicrobianos e o uso indiscriminado dos antimicrobianos acelera esse processo. Esses mecanismos são desenvolvidos utilizando informações fornecidas pelo seu DNA, sendo que na mutação natural ocorre indução de mutação do DNA cromossômico da bactéria, e na mutação induzida ocorre introdução de genes de resistência pela aquisição de plasmídeos ou transposons. Os genes de resistência, na maioria das vezes, ocorrem em plasmídeos extracromossômicos (fragmentos de DNA circulares e autorreplicativos), gerando a possibilidade do compartilhamento do material genético entre microrganismos. Os genes de resistência também podem fazer parte dos transposons, que são segmentos de DNA que podem se mover de um local para outro do cromossomo, ou para outro cromossomo e até para o plasmídeo (CDC, 2020c; HOLMES *et al.*, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

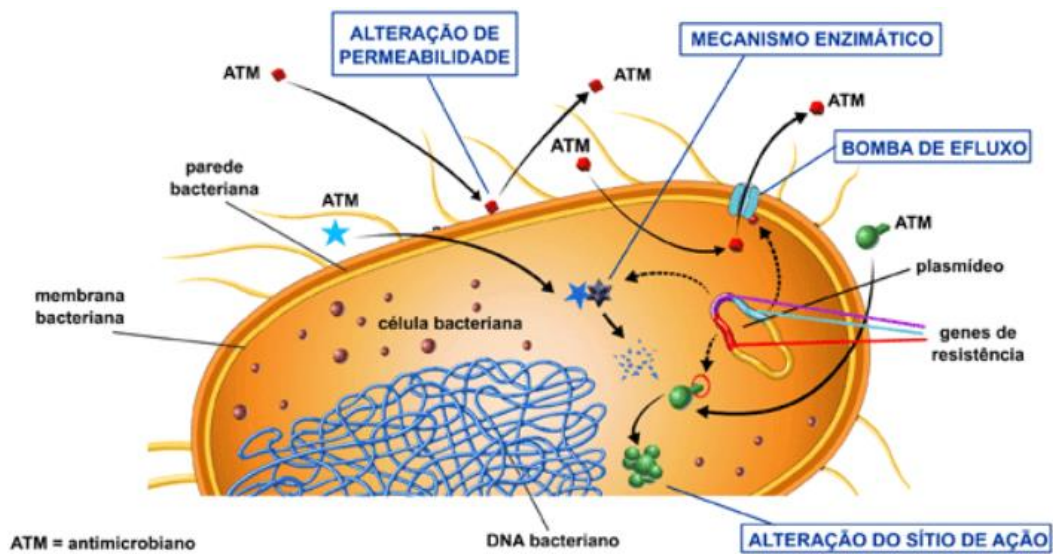
A resistência, quando mediada por mutação do DNA cromossômico, geralmente atinge somente um antimicrobiano. Já a resistência adquirida, comumente mediada por plasmídeo, na maioria das vezes é múltipla, tornando a bactéria resistente a dois ou mais antimicrobianos. Nesse caso, quando as bactérias adquirem vários genes de resistência, são conhecidas como bactérias multirresistentes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

O material genético pode ser transferido entre os microrganismos de maneira vertical, quando os genes são passados para seus descendentes por meio da reprodução, e de maneira horizontal, quando os genes são passados lateralmente para outros microrganismos. As rotas que os genes podem ser transferidos lateralmente para outros microrganismos envolvem: a) transformação, ocasião em que o material genético cromossômico, livre no meio, é trocado entre espécies; b) conjugação, mediada por um plasmídeo por meio do contato direto entre bactérias e c) transdução, quando a transferência do material genético é realizada dentro de um vírus que infecta bactérias, denominado bacteriófago. Devido à alta taxa de reprodução das bactérias, uma

vez em que estas adquirem genes de resistência, um curto período de tempo é necessário para que quase toda a população passe a ser resistente ao antimicrobiano (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Os mecanismos em que as bactérias se tornam resistentes a medicamentos envolvem: a) alteração da permeabilidade, mecanismo mais comum às bactérias gram-negativas, devido à natureza complexa da parede celular. Os microrganismos restringem o acesso do medicamento, alterando entradas ou limitando o número delas; b) alteração do sítio de ação, de forma que o antimicrobiano não seja mais capaz de se ligar ao alvo para realizar a função bactericida ou bacteriostática; c) bombas de efluxo, expulsando o antimicrobiano do meio intracelular para o meio extracelular e d) mecanismo enzimático, sendo a produção de β -lactamase o mais comum. Nesse mecanismo, os microrganismos alteram ou destroem os antimicrobianos com enzimas (Figura 3) (ANVISA, 2007a; CDC, 2020c; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Figura 3 - Mecanismos de resistência antimicrobiana



Fonte: (ANVISA, 2007b).

1.7.2 Resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp.

A Anvisa elaborou em 2012 um relatório com os percentuais de resistência bacteriana em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de amostras de carne de frango congeladas e expostas ao consumidor no Brasil, utilizando 23 fármacos representativos de diferentes classes de antimicrobianos. Os resultados demonstraram que os antimicrobianos com maior percentual de resistência à *Salmonella* spp. no cenário brasileiro foram: estreptomicina, sulfonamidas,

florfenicol, ampicilina, ácido nalidíxico, ceftiofur, aztreonam, enrofloxacina, cefoxitina, cefalotina e tetraciclina (ANVISA, 2012). Holmes et al. (2016) descreveram que a reversibilidade da resistência antimicrobiana após retirada do medicamento para uso como promotor de crescimento na produção animal não é clara, evidenciando que a minimização do surgimento de resistência aos medicamentos é essencial.

Estudos mais recentes apontam que as cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos têm apresentado elevada resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (principalmente às penicilinas e às cefalosporinas) e também às tetraciclinas, às sulfonamidas e às fluorquinolonas (GIURIATTI *et al.*, 2017; MAKHA *et al.*, 2015; VITAL; CABALLES; RIVERA, 2017; ZHU, Y. *et al.*, 2017; ZISHIRI; MKHIZE; MUKARATIRWA, 2016). Uma metanálise realizada no Brasil, comparou o perfil de susceptibilidade entre cepas de *Salmonella* não tifoide isoladas de carne de frango e amostras humanas. Verificou-se que as cepas isoladas de amostras de carne de frango apresentaram resistência bacteriana principalmente às sulfonamidas (44,3%), seguido do ácido nalidíxico (42,5%) e da tetraciclina (35,5%). E em cepas de *Salmonella* isoladas de seres humanos, o maior percentual de resistência também foi conferido às sulfonamida (46,4%), seguido da tetraciclina (36,9%) e ampicilina (23,6%) (VOSS-RECH *et al.*, 2017).

O mecanismo de resistência mais atribuído a classe dos β -lactâmicos é enzimático, e ocorre por meio da ação das enzimas β -lactamases. As β -lactamases modificam a estrutura no anel β -lactâmico, comum à essa classe de antimicrobiano, impedindo sua ligação às proteínas ligadoras de penicilina, alvo onde os β -lactâmicos ligam-se para interferir na síntese da parede bacteriana (ANVISA, 2007a). As bactérias denominadas ESBL (Beta-lactamases de Espectro Estendido) apresentam resistência tipicamente às penicilinas, cefalosporinas de 2ª geração, e também aos antimicrobianos de amplo espectro, como as cefalosporinas de 3ª geração, além de inibirem o ácido clavulânico (RAWAT; NAIR, 2010).

Os genes *blaTEM*, *blaSHV* e *blaCTX* são os mais envolvidos com resistência aos β -lactâmicos, sendo que o gene *blaCTX* tem sido frequentemente reportado nas pesquisas atuais de bactérias que apresentam resistência à essa classe. As ESBL são tipicamente codificadas em plasmídeos, mas também podem ser integradas ao DNA cromossômico (DOI; IOVLEVA; BONOMO, 2017). Além das ESBL, outro mecanismo de resistência aos β -lactâmicos muito relatado ocorre por meio da ação da enzima AmpC. Essa β -lactamase, geralmente codificada por plasmídeo, além estar relacionada com resistência aos β -lactâmicos já mencionados, também pode apresentar resistência aos carbapenens (RAWAT; NAIR, 2010).

As sulfonamidas são drogas bacteriostáticas que inibem competitivamente a enzima diidropteroato-sintase (DHPS) na síntese do ácido fólico das bactérias, mecanismo essencial para

a síntese de DNA e RNA das bactérias, impedindo, portanto, o desenvolvimento (SÁNCHEZ-OSUNA *et al.*, 2019). A resistência às sulfonamidas de ocorrência clínica, em bactérias entéricas gram-negativas ocorre por meio da codificação da proteína DHPS de baixa afinidade para sulfonamidas, alterando, portanto, o sítio de ação das sulfonamidas. Tal mecanismo é mediado principalmente pelos genes *sul1* e *sul2*, sendo que o primeiro é normalmente encontrado em elementos genéticos móveis do tipo transposons e o segundo em plasmídeos (SKÖLD, 2000). Maka *et al.* (2015) isolaram 84 cepas de *Salmonella* spp. resistentes às sulfonamidas em amostras de alimentos na Polônia e o gene *sul2* foi o mais prevalente em comparação com o gene *sul1*, estando presente em 42% das cepas. Zhu, Y. *et al.* (2017) também encontraram com maior frequência o gene *sul2* em isolados de *Salmonella* spp. de frangos de corte da China, em comparação com o gene *sul1*.

O principal mecanismo de resistência às tetraciclinas ocorre por meio da aquisição de proteínas denominadas Tet, sendo os genes *tetA* e *tetB* os mais frequentemente encontrados. Esses genes estão localizados em plasmídeos e atuam na membrana das células por proteínas de efluxo, provocando a saída quase que imediata dos medicamentos (ROBERTS, 1996). No estudo Vilela *et al.* (2019) nas cepas estudadas de *S. Dublin* isoladas de carne de frango e em seres humanos no Brasil, a resistência à tetraciclina foi associada à presença de genes *tetA* e/ou *tetB*. Já no estudo de Almeida *et al.* (2018), ao avaliarem 90 cepas de *S. Typhimurium* isoladas de amostras de alimentos e de seres humanos no Brasil, o gene *tetB* prevaleceu dentre os demais genes estudados (*tetA*, *tetC*, *tetM* e *tetD*).

Os antimicrobianos da classe das quinolonas são agentes bactericidas que atuam inibindo a síntese do DNA por meio da inibição da enzima DNA-girase, ou por meio da inibição da enzima topoisomerase IV, essenciais no mecanismo de replicação do DNA bacteriano (ANVISA, 2007a). O ciprofloxacino é o representante dessa classe que apresenta maior efetividade contra bactérias gram-negativas. Os mecanismos de resistência a esses medicamentos envolvem alteração cromossômica do DNA bacteriano, por meio da mutação dos genes que codificam os alvos primários e secundários da substância (genes *gyrA* e *gyrB* em DNA-girase e genes *parC* e *parE* em topoisomerase IV). As mutações mediadas por esses genes alteram a estrutura da proteína alvo, e conseqüentemente, a afinidade de ligação das quinolonas às enzimas, gerando a resistência bacteriana (REDGRAVE *et al.*, 2014). Diversos estudos mostram resistência contra as quinolonas mediadas por essas mutações, com uma frequência maior no gene *gyrA*, seguido do gene *parC* (DAHIYA *et al.*, 2017; DEEKSHIT *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2009; ZHU, D. *et al.*, 2019). Embora menos comum, também são descritos outros mecanismos de resistência às quinolonas, mediados

por plasmídeos, como a aquisição dos genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qndD*), do gene *aac(6')-Ib-cr*, e também dos genes *oqxAB* e *qepA* (CUYPERS *et al.*, 2018).

1.7.3 Implicações de resistência na atualidade

Dentre os medicamentos que ainda apresentam eficácia para tratar doenças causadas por *Salmonella* spp., a azitromicina é um deles. Entretanto, desde o ano de 2020, quando o mundo foi acometido pela pandemia do novo coronavírus (COVID-19), uma nova preocupação surgiu acerca desse medicamento.

Azitromicina é um antimicrobiano da classe dos macrolídeos que atua inibindo a síntese proteica bacteriana, e, quando utilizada no tratamento da *S. Typhi*, a azitromicina já se mostrou mais eficaz quando comparada ao medicamento ofloxacino, da classe das fluoroquinolonas. Esse estudo foi realizado no Vietnã, com a finalidade de comparar a eficácia de protocolos de tratamento para tratar febre tifoide em crianças em adultos (PARRY *et al.*, 2007). Embora sua indicação seja no tratamento de doenças bacterianas, esse medicamento vem sendo utilizado de maneira excessiva em pacientes acometidos pelo vírus SARS-Cov2 (causador da COVID-19) com o intuito de evitar infecções bacterianas oportunistas, as quais agravam o quadro dos pacientes acometidos, e também como imunomodulador, por já ter apresentado resultado satisfatório em infecções virais no passado (GYSELINCK *et al.*, 2021).

Posto que a azitromicina é um dos medicamentos de escolha para tratar casos de *Salmonella* tifoide e não tifoide (principalmente em crianças), torna-se preocupante o fato de haver uso indiscriminado desse antimicrobiano em diversos países do mundo, ocasionando aumento da resistência bacteriana à esse medicamento (AHMAD *et al.*, 2021). Na África subsaariana, região de extrema pobreza, escassez de saneamento básico e transmissão de doenças, a azitromicina é utilizada em massa para diminuir a mortalidade infantil. Um estudo realizado nessa região relatou que o uso repetido desse medicamento em crianças em idade pré-escolar foi responsável pela propagação da resistência aos macrolídeos, questionando os efeitos a longo prazo dessa intervenção (DOAN *et al.*, 2020).

Diante do cenário do uso generalizado da azitromicina em meio à pandemia de COVID-19, o aumento desenfreado da resistência dos microrganismos à esse medicamento tem se tornado uma grande preocupação, uma vez que esse medicamento pode deixar de ser uma opção de tratamento de importantes infecções bacterianas (KOW; HASAN, 2020). Vale ressaltar que em casos de cepas de *Salmonella* spp. resistentes à azitromicina, o único tratamento remanescente é realizado por carbapenems, como o imipenem e meropenem (AHMAD *et al.*, 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Determinar a prevalência de *Salmonella* spp. em amostras resfriadas de carnes de frango comercializadas no Distrito Federal e avaliar a susceptibilidade antimicrobiana, com detecção de genes de resistência nas cepas de *Salmonella* spp. isoladas dessas amostras.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a pesquisa de *Salmonella* spp. em amostras resfriadas de carnes de frango por meio das análises microbiológicas;
- Avaliar a presença de *Salmonella* spp. por meio de estratégias de biologia molecular (genotipagem) com a técnica de PCR para confirmação do gene de virulência *invA* nas cepas isoladas suspeitas de serem *Salmonella* spp.;
- Realizar teste de susceptibilidade antimicrobiana nas cepas de *Salmonella* spp. isoladas, com o método de disco-difusão;
- Detectar a resistência antimicrobiana por estratégias de biologia molecular pela confirmação dos genes de resistência *blaCTX*, *sul2* e *tetB* em todas as cepas de bactérias *Salmonella* spp. isoladas.

3 METODOLOGIA

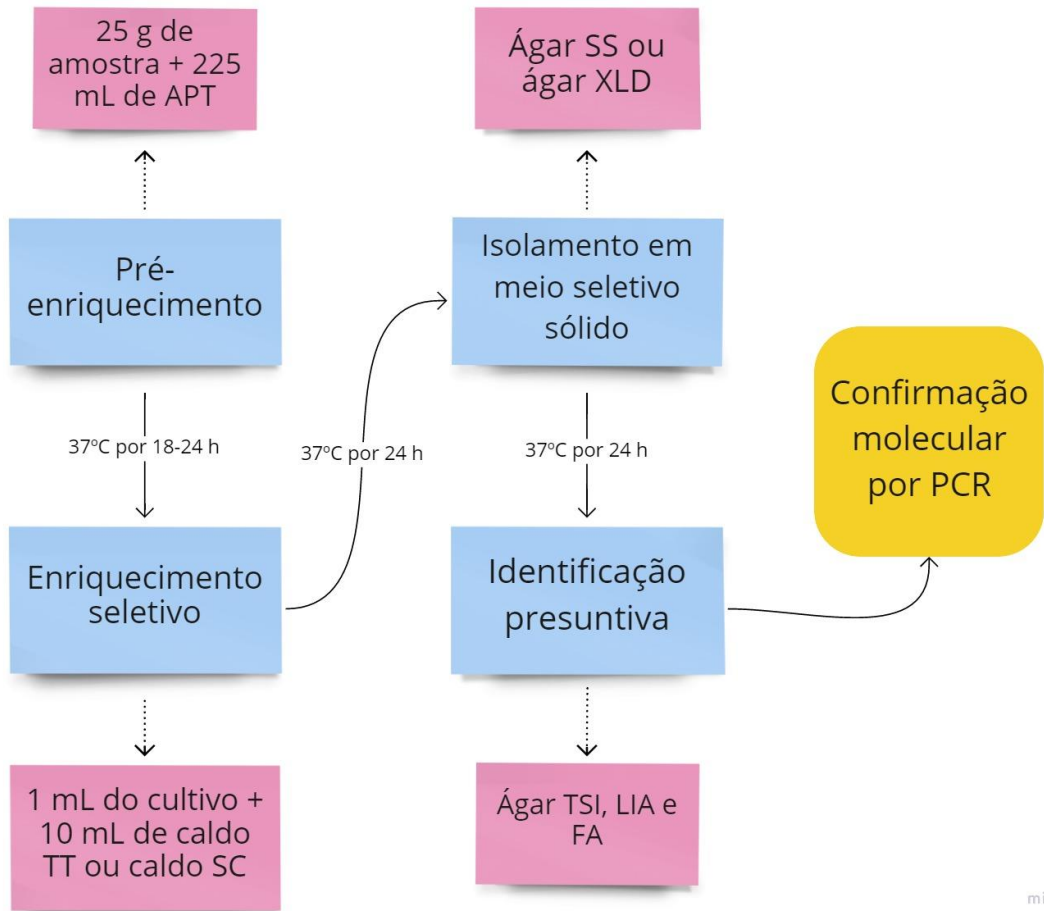
3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

No período de fevereiro de 2018 a março de 2020, foram coletadas 115 amostras resfriadas de diferentes cortes de carne de frango (coxa, sobrecoxa, peito, asa e coxinha da asa), escolhidas por conveniência, em diferentes supermercados do Distrito Federal, nas regiões do Guará, Sudoeste, Gama, Taguatinga, Águas Claras e Ceilândia. As amostras estavam expostas ao consumo em balcões resfriados dos estabelecimentos, embaladas em bandejas de isopor, e também diretamente no balcão do açougue, e, nesse caso, foram embaladas em saco plástico. Todas as amostras estavam dentro do prazo de validade, e foram transportadas ao laboratório de Controle de Qualidade da Universidade de Brasília (Faculdade de Ceilândia) sob refrigeração, em caixa de isopor, no prazo máximo de 1 hora. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o início das análises, as quais ocorreram dentro do prazo máximo de 30 minutos.

3.2 MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL

25 g de cada amostra foram inoculadas três vezes em 225 mL de água peptonada (Synth®) 0,1% (p/v) estéril, sob condições de assepsia. O preparo foi homogeneizado e incubado a 37°C por 18-24 horas. Alíquotas de 1 mL do pré-enriquecimento foram transferidas para tubos Falcon contendo 10 mL de caldo tetracionato (Himedia®) ou caldo selenito cistina (Himedia®), e foram incubadas a 37°C por 24 horas para obter o enriquecimento seletivo de *Salmonella*. Alças bacteriológicas de níquel cromo, com volume de 10 µL, foram utilizadas para realizar o isolamento das bactérias através da técnica de semeadura por esgotamento em placas de petri estéreis com ágar salmonella-shigella (SS) (Himedia®) ou ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) (Himedia®), as quais foram incubadas a 37°C por 24 horas. As placas de SS e/ou XLD com colônias sugestivas de *Salmonella* foram submetidas à identificação bioquímica presuntiva em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (Kasvi®), ágar Lisina Ferro (LIA) (Kasvi®) e ágar Fenilalanina (FA) (Kasvi®). Com o auxílio de uma agulha de inoculação de níquel cromo, as cepas foram semeadas em tubos Falcon contendo os meios de identificação bioquímica e os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas. As cepas com resultado positivo na identificação bioquímica foram reisoladas em ágar SS ou XLD, para conferência de pureza. Então, as cepas isoladas consideradas presuntivas de *Salmonella*, foram submetidas à confirmação molecular por meio da amplificação por PCR de gene de virulência *invA* específico para *Salmonella* spp.

Figura 4 - Fluxograma para isolamento de *Salmonella* spp.



Fonte: Autoria própria, (2021). Baseado no Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial de *Salmonella* spp. (BRASIL, 2011).

Notas: APT: Água Peptonada Tamponada, TT: Caldo Tetrionato, CS: Caldo Selenito Cistina.

3.3 MICROBIOLOGIA MOLECULAR

A microbiologia molecular, realizada pela técnica de PCR, foi utilizada para confirmação de *Samonella* spp. e detecção de genes de resistência.

3.3.1 Extração de DNA bacteriano

As cepas foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) (Kasvi®) a 37°C por 12-18 horas. O DNA foi extraído utilizando o kit comercial de extração PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™ - Thermo Fisher Scientific), seguindo o manual de instruções do fabricante. A

qualidade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 2%, e a concentração de DNA obtida foi quantificada utilizando o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Pittsburgh, USA). O DNA quantificado foi diluído a uma concentração média de 20 ng/μL, para as posteriores etapas de PCR.

3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.3.2.1 Gene de virulência

A confirmação de *Salmonella* spp. se deu pela presença do gene *invA*, um gene de virulência específico desse gênero de bactéria. A amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Life Express Thermal Cycler (modelo TC-98/G/H(b), BIOER, China). As reações de PCR foram realizadas a partir de um volume final de 25 μL contendo 4,0 μL do DNA genômico; 2,5 μL de tampão 10x Taq Pol (Ludwig Biotecnologia Ltda, Brasil); 1,25 μL de MgCl₂ (50 mM, Ludwig Biotecnologia Ltda, Brasil); 2 μL de dNTP (2,5 mM; Ludwig Biotecnologia Ltda, Brasil); 0,5 μL de cada oligonucleotídeo *foward* e *reverse* (Invitrogen Life Technologies, EUA, 10 pmol/μL); 0,4 μL de Taq DNA Polimerase (Ludwig Biotecnologia Ltda, Brasil); completando com água ultrapura até o volume final da reação. O desenho do *primer*, o peso molecular e as condições de termociclagem utilizadas na PCR estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Desenho do *primer*, peso molecular e as condições de termociclagem utilizadas na PCR do gene *invA*

Gene	Primers	Tamanho (pb)	Condições de termociclagem	Referência
<i>invA</i>	F: CATTGGTGATGGTCTTGTCG R: CTCGCCTTTGCTGGTTTTAG	298	Desnaturação inicial a 95°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min; 72°C por 10 min para a extensão final	(ARAÚJO, 2015)

Fonte: Autoria própria, (2021).

Notas: F: *Foward*, R: *Reverse*, pb: pares de base.

3.3.2.2 Genes de resistência

Três genes de resistência foram pesquisados: *blaCTX* associado à resistência aos antimicrobianos da classe dos β-lactâmicos; *sul2* associado à resistência aos antimicrobianos da

classe das sulfonamidas; e *tetB* associado à resistência aos antimicrobianos da classe das tetraciclínas.

As reações de PCR para os genes *blaCTX* e *sul2* foram realizadas com os mesmos parâmetros utilizados para o gene *invA*. Para o gene *tetB* utilizou-se 4,0 µL do DNA genômico; 2,5 µL de tampão 10x Taq Pol (Ludwig Biotecnologia Ltda, Brasil); 0,4 µL de MgCl₂ (50 mM, Ludwig Biotecnologia Ltda, Brasil); 1,5 µL de dNTP (2,5 mM; Ludwig Biotecnologia Ltda, Brasil); 0,6 µL de cada oligonucleotídeo *foward* e *reverse* (Invitrogen Life Technologies, EUA, 10 pmol/µL); 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (Ludwig Biotecnologia Ltda, Brasil); completando com água ultrapura até o volume final da reação de 25 µL. O desenho dos *primers*, o peso molecular e as condições de termociclagem utilizadas nas PCRs estão descritos da Tabela 2.

Tabela 2 - Sequência de *primers*, peso molecular e as condições de termociclagem utilizadas na PCR dos genes *blaCTX*, *sul2* e *tetB*

Gene	Primers	Tamanho (pb)	Condições de termociclagem	Referência
<i>blaCTX-M</i>	F: CGATGTGCAGTACCAAGTAA R: AGTGACCAGAATCAGCGG	585	Desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s, extensão a 72°C por 50 s; 72°C por 7 min para extensão final	(LI <i>et al.</i> , 2013)
<i>sul2</i>	F: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT R: GCGTTTGATACCGGCACCCGT	285	Desnaturação inicial a 95°C por 10 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, anelamento a 55°C por 50 s, extensão a 72°C por 50 s; 72°C por 10 min para extensão final	(ZHU, Y. <i>et al.</i> , 2017)
<i>tetB</i>	F: TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG R: GTAATGGGCAATAACACCG	659	Desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 25 s, anelamento a 55°C por 30 s, extensão a 72°C por 50 s; 72°C por 5 min para extensão final	(ZISHIRI; MKHIZE; MUKARAT IRWA, 2016)

Fonte: Autoria própria, (2021).

Nota: F: *Foward*, R: *Reverse*, pb: pares de base.

3.3.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram separados pela técnica de eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) (Invitrogen Life Technologies, EUA), corado com brometo de etídio. A corrida iniciou a uma potência de 50W por 15 minutos seguida de 100W por 60 minutos. Os fragmentos de DNA

separados no gel foram visualizados sob iluminação ultravioleta (UV), com um marcador de 100pb (Ludwig Biotecnologia Ltda, Brasil).

3.4 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos de interesse clínico foi realizada pela técnica qualitativa de disco-difusão de Kirby-Bauer, recomendada pelo comitê Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST) (BRCAST, 2019). As cepas foram suspendidas em caldo Mueller Hinton MH (Kasvi®) e a densidade óptica foi ajustada entre 0,08 e 0,10 (turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland) a 625 nm de absorvância, utilizando um espectrofotômetro.

Após a padronização das cepas, a suspensão do inóculo foi semeada em placa contendo ágar MH (Kasvi®), com ajuda de uma alça drigalski. Dentro de no máximo 15 minutos, os discos de antimicrobianos, adquiridos na Newprov®, foram aplicados firmemente nas placas. As concentrações e abreviações dos agentes antimicrobianos utilizadas foram: amoxicilina + ácido clavulânico (AMC, 20 + 10 µg), ceftazidima (CAZ, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), cloranfenicol (CLO, 30 µg), tetraciclina (TET, 30 µg), imipenem (IMP, 10 µg), sulfonamida (SUL, 300 µg) e ciprofloxacino (CIP, 5 µg).

Após 18 h de incubação em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, os halos foram interpretados e classificados como sensível (S), sensibilidade intermediária (I) ou resistente (R), de acordo com o padrão para enterobactérias preconizado pelo Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (CLSI, 2020). Os isolados de *Salmonella* spp. resistentes a três ou mais agentes antimicrobianos foram identificados como multirresistentes (MDR).

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste do qui-quadrado foi utilizado para determinar se houve diferença entre a ocorrência de *Salmonella* spp. em diferentes cortes de frango analisados. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o IBM® SPSS Statistics versão 28.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, do total de 115 amostras analisadas de carnes de frango resfriadas, 58 apresentaram resultados compatíveis com o gênero *Salmonella* spp. ao final dos testes microbiológicos convencionais. A Figura 5 apresenta o isolamento da *Salmonella* spp. em ágar XLD e em ágar SS.

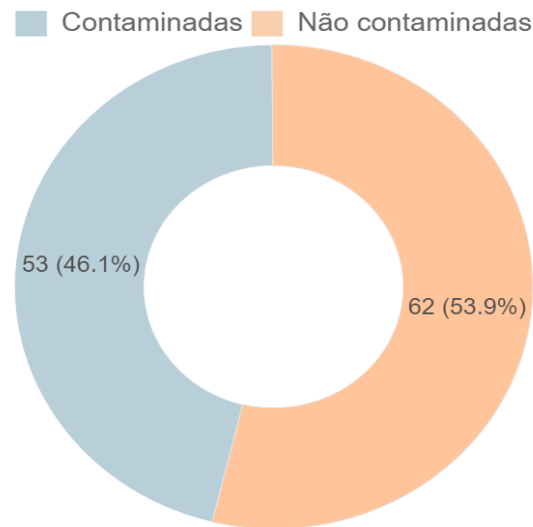
Figura 5 - Isolamento de *Salmonella* spp. em meio de cultivo seletivo (XLD e SS)



Fonte: Autoria própria, (2021).

Desse total de 58 amostras, 53 obtiveram o resultado molecular confirmativo de *Salmonella* spp. (presença do gene *InvA*), ou seja, 46,1% (53/115) das amostras de carnes de frango resfriadas comercializadas no Distrito Federal encontravam-se contaminadas por *Salmonella* spp. (Gráfico 1). De acordo com a legislação brasileira, a qual exige ausência apenas dos sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, os resultados dessas análises não podem afirmar que as 53 amostras contaminadas por *Salmonella* spp. estavam impróprias para consumo à nível nacional (BRASIL, 2019), entretanto, de acordo com as regras de exportação da carne de frango brasileira, as 53 amostras contaminadas não atendiam às exigências de exportação aos países que exigem ausência total de todos os sorovares de *Salmonella*, uma vez que, para que as regras sejam cumpridas, deve-se considerar os requisitos sanitários nacionais e os requisitos sanitários do país importador (BRASIL, 2008).

Gráfico 1 - Prevalência de contaminação por *Salmonella* spp. nas amostras resfriadas de carne de frango resfriadas comercializadas no Distrito Federal entre os anos de 2018 a 2020



Fonte: Autoria própria, (2021).

A maioria dos estudos brasileiros publicados em relação a prevalência de *Salmonella* spp. são focados em coletas de carcaças de frango em abatedouros, entretanto, é possível encontrar alguns estudos de prevalência de *Salmonella* spp. em carnes de frango coletadas no varejo. Ristori et al. (2017) mostraram 8,7% de contaminação por *Salmonella* spp. em coxas de frango resfriadas comercializadas no estado de São Paulo. Em comércios varejistas do estado do Paraná, a prevalência de *Salmonella* spp. foi de 31,7% em diferentes cortes de carne de frango congeladas (PERIN *et al.*, 2020). E no estado do Goiás, 30% de amostras de carne de frango temperadas, compradas a granel, foram positivas para a bactéria *Salmonella* spp. (SILVA, 2018).

Em diversos países, há relatos de alta prevalência de *Salmonella* spp. nas carnes de frango coletadas nos estabelecimentos de varejo. Estudos publicados no Japão, na China, no Camboja, na Malásia, na Rússia, no México e nos Estados Unidos mostram uma variação entre 18,1% a 88,2% de contaminação da carne de frango por *Salmonella* spp. (ALALI *et al.*, 2012; FURUKAWA *et al.*, 2017; GOLDEN; MISHRA, 2020; LAY *et al.*, 2011; REGALADO-PINEDA *et al.*, 2020; THUNG *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2010).

Desde o início da vigência da Instrução Normativa nº 20 de 2016 publicada pelo MAPA, a qual surgiu com o objetivo de diminuir a incidência de *Salmonella* em carcaças de frango, o Brasil registrou prevalência de *Salmonella* spp. em abatedouros registrados no SIF de 17,97% em 2017, 12,61% em 2018, e 15,08% em 2019 (MAPA, 2020). No último relatório publicado pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), 134 estabelecimentos de abate de frangos e galinhas registrados no SIF passaram pelas análises, totalizando 2.879 amostras

analisadas em 340 ciclos oficiais. Não há publicação referente ao autocontrole realizado pelos próprios estabelecimentos, no entanto, nos ciclos oficiais houve uma violação no limite de amostras aceitáveis para a presença do patógeno de 19,12% (65/340), representada por 43 abatedouros (MAPA, 2020).

Para a obtenção desses resultados, a Instrução Normativa determina que os estabelecimentos comerciais registrados no SIF devem realizar o monitoramento de *Salmonella* spp. por meio de ciclos de amostragem, enviando as amostras a um laboratório de escolha, e em alguns casos, em laboratórios credenciados; e o SIF, órgão responsável pela verificação do controle da *Salmonella* spp., será responsável pelos ciclos de amostragem oficiais. De acordo com o tamanho do estabelecimento, são realizados entre 2 a 3 ciclos oficiais por ano, aceitando o limite de 2 amostras positivas para o patógeno, de um total de 8 amostras analisadas (BRASIL, 2016a).

A contaminação por *Salmonella* spp. nos abatedouros é menor do que encontramos nesse estudo, em que quase metade das amostras de carne de frango resfriadas expostas ao varejo estavam contaminadas pelo patógeno no Distrito Federal. Tal diferença nos dados apresentados pode representar falhas de controle no pós-processamento, permitindo que as amostras cheguem aos consumidores finais mais contaminadas por *Salmonella* spp.

Corroborando com essa hipótese, Gonçalves-Tenório et al. (2018), em uma meta-análise de estudos publicados na Europa, mostraram o percentual de contaminação de alguns microrganismos nas carnes de aves resfriadas ao final das etapas de processamento e em estabelecimentos varejistas, no período de 2000 a 2017. A ocorrência de *Salmonella* spp. nas carnes de aves foi de 5,4% ao final do processamento, já em carnes expostas no varejo a prevalência foi de 10,4%.

Confrontando os dados de prevalência publicados pelo DIPOA, Borges et al. (2019), ao analisarem a presença da *Salmonella* spp. em carcaças de frango de quatro abatedouros do Rio Grande do Sul, encontraram 50% de contaminação nas 139 amostras coletadas em diferentes pontos do processamento. Baptista et al. (2018) encontraram 26,66% (16/60) de carcaças de frango contaminadas pela bactéria em abatedouros no estado do Rio de Janeiro. Já no estudo de Da Cunha-Neto et al. (2018), a ocorrência de *Salmonella* spp. foi de apenas 3,7% das amostras, em 850 carcaças de frango analisadas nos abatedouros do estado do Mato Grosso.

Essa inconsistência entre dados oficiais e estudos publicados em diversos estados deixa dúvidas quanto à correta identificação de *Salmonella* spp., podendo sugerir também falta de regularidade nas amostragens ou até mesmo adulteração de resultados, como já foi mostrado anteriormente (VIANNA et al., 2018).

Nossos resultados mostraram que os testes microbiológicos convencionais de isolamento de *Salmonella* spp. obtiveram especificidade de 91,4% (53 amostras de carne de frango resfriadas foram positivas nos testes moleculares do total de 58 amostras suspeitas na microbiologia convencional). Todas as cepas sugestivas de *Salmonella* spp. obtidas por meio da microbiologia convencional foram encaminhadas para a análise molecular para a detecção do gene de virulência *invA*, pela técnica de PCR (Figura 6).

Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose mostrando a detecção do gene *invA*



Fonte: Autoria própria, (2021).

Notas: 1: marcador de 100pb;

2-11: amplificação do gene *invA* de algumas amostras, visualizado na altura de 298pb;

12: controle negativo (CN).

Os testes microbiológicos convencionais de isolamento de microrganismos apresentam algumas dificuldades e incertezas na interpretação dos resultados, podendo levar a uma identificação enganosa, visto que algumas cepas se comportam de maneira inconsistente e diferente do previsto em suas características metabólicas. A partir de 1985, quando a identificação de bactérias por análise molecular por meio da técnica de PCR começou a ser utilizada, houve uma expansão da microbiologia, quando diversas outras espécies microbianas foram descobertas (FRANCO-DUARTE *et al.*, 2019). A aplicação de técnicas de biologia molecular ampliou a nossa capacidade de identificação microbiana. A PCR é uma técnica mais rápida e sensível que os testes microbiológicos convencionais, entretanto, o uso associado dessas duas técnicas é o recomendado, sendo possível avaliar tanto as características fenotípicas quanto genotípicas dos microrganismos, resultando na correta identificação de bactérias (FRANCO-DUARTE *et al.*, 2019).

Vários estudos utilizaram o gene *invA* como marcador molecular da *Salmonella* spp., demonstrando a sua presença em todas ou quase todas as cepas, sendo este, portanto, um bom

marcador molecular para detecção da *Salmonella* spp. por meio da PCR. Rahn et al. (1992) obtiveram sensibilidade de 99,4% para a detecção de *Salmonella* em 100 sorovares diferentes através do uso do gene *invA*. Dias de Oliveira et al. (2003), ao compararem diferentes genes de virulência da *Salmonella* Enteritidis, obtiveram 100% de sensibilidade apenas para o gene *invA*. Mais recentemente, Ammar et al. (2016) isolaram 7 sorovares de *Salmonella* de amostras de carne de frango e o único gene de virulência presente em 100% dos isolados foi o *invA*. Astolfi-Ferreira et al. (2017) pesquisaram diferentes genes de virulência em 8 sorovares de *Salmonella* isolados de aves e também encontraram sensibilidade de 100% para o gene *invA* em suas análises.

A Tabela 3 apresenta a distribuição de amostras de carnes de frango resfriadas contaminadas por *Salmonella* spp. considerando o tipo de corte analisado. Os cortes da coxa, coxinha da asa, peito e asa apresentaram resultados de contaminação variando entre 47,8% a 59,1%, e em relação os cortes da sobrecoxa, 29,6% das amostras estavam contaminadas.

Tabela 3 – Distribuição de amostras de frango resfriadas contaminadas por *Salmonella* spp., considerando o tipo de corte analisado

Cortes de carne de frango	Número de amostras analisadas (%)	Amostras contaminadas (%)	P valor
Coxa	22	13 (59,1)	0,33
Coxinha da asa	35	17 (48,6)	
Sobrecoxa	27	8 (29,6)	
Peito	23	11 (47,8)	
Asa	8	4 (50,0)	
Total	115 (100)	53 (46,1)	

Fonte: Autoria própria, (2021).

O teste do qui-quadrado mostrou que não houve diferença estatística na ocorrência de *Salmonella* spp. entre os cinco tipos de cortes de frango analisados, não havendo, portanto, associação entre as duas variáveis. Resultados semelhantes foram encontrados por Perin et al. (2020), quando foram avaliados diferentes cortes de frango em comércios varejistas do estado do Paraná, e também não foi encontrada nenhuma diferença estatística na ocorrência de *Salmonella* spp. entre os diferentes tipos de cortes avaliados.

Em nosso estudo, pelo menos uma cepa de cada amostra com resultado confirmado para *Salmonella* spp. foi isolada, totalizando 78 cepas do total de 53 amostras de carne de frango

resfriadas. Nas placas de SS ou XLD que apresentaram cepas fenotipicamente semelhantes em toda a sua extensão, uma única cepa foi recuperada; já em placas contendo cepas fenotipicamente distintas, foram coletadas duas ou mais cepas. A Tabela 4 apresenta o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. As maiores taxas de resistência foram observadas para a amoxicilina com ácido clavulânico (83,3%), sulfonamida (64,1%) e tetraciclina (46,2%) (Tabela 4).

Tabela 4 - Perfil de susceptibilidade antimicrobiana em isolados de *Salmonella* spp. recuperados de carnes de frango resfriadas

Classes de antimicrobianos		Antimicrobianos	S (N%)	I (N%)	R (N%)
β- lactâmicos	Aminopenicilinas	AMC	10 (12,8)	3 (3,8)	65 (83,3)
	Cefalosporinas 3 ^a geração	CAZ	60 (76,9)	1 (1,3)	17 (21,8)
		CTX	46 (59,0)	9 (11,5)	23 (29,5)
	Carbapanem	IMP	53 (67,9)	17 (21,8)	8 (10,3)
Sulfonamidas		SUL	27 (34,6)	1 (1,3)	50 (64,1)
Aminoglicosídeos		GEN	56 (71,8)	11 (14,1)	11 (14,1)
Tetraciclinas		TET	36 (46,2)	6 (7,7)	36 (46,2)
Anfenicois		CLO	63 (80,8)	11 (14,1)	4 (5,1)
Fluorquinolonas		CIP	27 (34,6)	38 (48,7)	13 (16,7)

Fonte: Autoria própria, (2021).

Notas: S: sensível, I: intermediária e R: resistente.

N%: número e porcentagem de cepas em relação ao total de 78 cepas.

AMC: amoxicilina/ácido clavulânico, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, IMP: imipenem, SUL: sulfonamida, GEN: gentamicina, TET: tetraciclina, CLO: cloranfenicol, CIP: ciprofloxacino.

A literatura apresenta resultados variados em relação ao perfil de resistência antimicrobiana em cepas de *Salmonella* isoladas de carne de frango. No Brasil, Giuriatti et al. (2017), ao avaliarem o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de 18 cepas de *Salmonella* Heidelberg isoladas de amostras de carne de frango em abatedouros no estado do Paraná, observaram 100% de resistência aos antimicrobianos amoxicilina/ácido clavulânico, ceftazidima, cefotaxima e tetraciclina; a fluorquinolona testada foi o enrofloxacino, e 38,9% das cepas foram resistentes à esse fármaco e 33,3% das cepas foram resistentes à gentamicina.

Uma publicação recente, também conduzida no Paraná, local onde ocorre a maior produção de carne de frango brasileira, relatou elevados índices de resistência em 98 cepas de *Salmonella* isoladas de cortes de frango congelados coletados no comércio varejista e em

abatedouros: 95% ao ácido nalidíxico; 94% às tetraciclinas; 87% à ampicilina; 84% à amoxicilina/ácido clavulânico; 79% à ceftriaxona; e 76% ao ciprofloxacino (PERIN *et al.*, 2020).

No estudo de Da Cunha-Neto *et al.* (2018), os índices de resistência para a classe dos beta-lactâmicos variaram de 6,2% para ceftiofur a 25% para ampicilina e cefalotina em 31 cepas de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango em abatedouros no estado do Mato Grosso. Os isolados apresentaram 100% de resistência a sulfonamida e apenas 9,4% das cepas foram resistentes a tetraciclina, resultado diferente do nosso estudo onde observamos 46,2% de resistência a tetraciclina.

A China apresenta diversos estudos que avaliaram o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Salmonella* isoladas em carnes de frango. Zhu, Y. *et al.* (2017) isolaram 189 cepas de *Salmonella* em carne de frango ao longo do processo de abate, e encontraram elevada porcentagem de cepas resistentes à ampicilina (87,8%), à tetraciclina (51,9%), e à sulfonamida (48,1%). Diferente do nosso estudo, poucos isolados foram resistentes à amoxicilina/ácido clavulânico (8,5%) e observou-se altos índices de resistência ao ciprofloxacino (48,7%).

Deng *et al.* (2018) avaliaram a resistência antimicrobiana em 141 cepas de *Salmonella* isoladas de carne de frango na China e encontraram apenas 28% de resistência à amoxicilina e à ampicilina. Outro estudo realizado na China também apresentou apenas 13% de resistência à amoxicilina/ácido clavulânico em 165 cepas de *Salmonella* isoladas de carne de frango, enquanto outras classes de antimicrobianos apresentaram resultados de resistência similar ao nosso estudo: 50% à tetraciclina; 47% à sulfonamida; 3% à gentamicina; e 0% ao ciprofloxacino (LI *et al.*, 2013).

Notavelmente, a amoxicilina se mostrou mais eficaz em cepas de *Salmonella* isoladas em carnes de frango na China do que no Brasil. Essa diferença pode indicar que o Brasil faz um uso mais intensivo de amoxicilina como droga terapêutica na criação avícola quando comparado com a China.

As aminopenicilinas da classe dos β -lactâmicos estão entre os antimicrobianos mais antigos e difundidos em terapia humana e animal, e são bactericidas de amplo espectro de ação. Surgiram em 1961, e eram utilizadas no tratamento de diversas infecções. À época, a amoxicilina apresentava eficácia no combate à *Salmonella*, sendo bastante utilizada no tratamento de febre tifoide (BASKER; GWYNN; WHITE, 1979; NEU, 1979). Nos dias atuais a amoxicilina ainda é uma droga bastante utilizada, entretanto para outras finalidades. A Anvisa e FDA recomendam seu uso para infecções do trato respiratório superior e inferior, trato geniturinário, pele, mucosas, e também quando associada ao tratamento de *Helicobacter pylori* e úlcera duodenal (ANVISA, 2021a; FDA, 2015).

As cefalosporinas de 3ª geração são as drogas mais utilizadas da classe dos β -lactâmicos contra bactérias gram-negativas, e atualmente são muito utilizadas em ambiente hospitalar. Seu uso é recomendado no tratamento de infecções complicadas do trato urinário, infecções de feridas e cirúrgicas, pneumonias, meningites, e infecções do sistema nervoso central (ANVISA, 2007a). Ambas as cefalosporinas utilizadas em nosso teste de susceptibilidade antimicrobiana (ceftazidima e cefotaxima) não possuem recomendação de uso em animais de produção pela Instituição Internacional de Saúde Animal (World Organization for Animal Health – OIE), entretanto, outras cefalosporinas de 3ª geração são utilizadas, como o ceftiofur e a ceftriaxona (OIE, 2019), as quais podem propiciar resistência cruzada aos outros fármacos dessa classe de antimicrobianos (DOI; IOVLEVA; BONOMO, 2017).

As sulfonamidas foram as primeiras drogas a serem utilizadas em uso veterinário em doses terapêuticas, a partir de 1948, e foram usadas por muitos anos como profilaxia de doenças aviárias; e as tetraciclinas foram as primeiras a serem utilizadas para promoção de crescimento em aves, a partir de 1951 (AGYARE *et al.*, 2019; LEES *et al.*, 2021). Esse fato justifica os altos índices de *Salmonella* spp. resistentes e esses antimicrobianos encontrados em carnes de frango, visto que o uso desses medicamentos na criação de animais de produção ocorre há muitos anos, propiciando um meio adequado para o aumento da resistência das bactérias.

Devido a resistência microbiana às sulfonamidas ter se tornado comum, esse antimicrobiano teve seu uso reduzido ao longo dos anos, sendo substituído por outras classes mais potentes no combate às infecções. Ainda assim, as sulfonamidas ainda são comumente utilizadas em tratamento de infecções no trato urinário, na prevenção de infecções em queimados, e em alguns casos de malária (ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, 2021). Já as tetraciclinas são drogas antimicrobianas conhecidas por seu amplo espectro de atividade, atuando contra microrganismos que acometem diversas regiões, como o trato respiratório, pele, olhos, sistema intestinal, linfático e urinário, além de serem a primeira escolha no tratamento de riquetsioses (MEDLINEPLUS, 2017).

Alguns dos antimicrobianos utilizados no presente estudo são considerados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como medicamentos criticamente importantes e de alta prioridade para a medicina humana, como as aminopenicilinas, carbapenens e aminoglicosídeos. E dentre os medicamentos de mais alta prioridade, encontram-se as cefalosporinas de 3ª geração e as quinolonas (WHO, 2019).

Os antimicrobianos aos quais as cepas de *Salmonella* spp. do nosso estudo apresentaram menor resistência antimicrobiana foram: cloranfenicol (5,1%), imipenem (10,3%), gentamicina (14,1%) e ciprofloxacino (16,7%). Entretanto, esses também foram os agentes que obtiveram os

maiores índices de sensibilidade intermediária. Os resultados de sensibilidade intermediária ao ciprofloxacino foram os mais expressivos, com quase 50% das cepas.

Já se reconhece um aumento de resistência ao ciprofloxacino (principal representante das fluorquinolonas) em cepas de *Salmonella* não tifoide, droga de escolha no tratamento da doença. Nos Estados Unidos, as cepas de *S. Typhi* resistentes ao ciprofloxacino alcançaram 74% das infecções (CDC, 2019b). Vários estudos também relataram índices altos de resistência as quinolonas (39 a 76%) em cepas isoladas de carnes de frango (GIURIATTI *et al.*, 2017; PERIN *et al.*, 2020; ZHU, Y. *et al.*, 2017).

Vale lembrar que, depois do ciprofloxacino, a azitromicina e ceftriaxona são as duas próximas opções de terapia medicamentosa no tratamento de infecções causadas por *Salmonella* tifoide e não tifoide (quando necessário), e a ambos os medicamentos também estão envolvidos em aumento de resistência em cepas de *Salmonella*, embora em menor escala (CDC, 2019b). Além disso, a OMS também classifica esses dois antimicrobianos como criticamente importante e de mais alta prioridade na terapêutica humana (WHO, 2019).

O imipenem, a gentamicina e o cloranfenicol foram outros três antimicrobianos com as menores taxas de resistência nesse estudo, porém a sensibilidade intermediária das cepas foi de 21,8% para o imipenem, e 14,1% para a gentamicina e para o cloranfenicol, menor apenas que os resultados de sensibilidade intermediária ao ciprofloxacino. Apesar disso, o cloranfenicol foi o antimicrobiano mais eficaz no controle das cepas, com 80,8% de sensibilidade.

O cloranfenicol é um antimicrobiano de amplo espectro de ação, utilizado em seres humanos com quadro grave de infecção e em infecções causadas por bactérias resistentes a outros antimicrobianos mais seguros (ANVISA, 2007a; MCCUBBIN *et al.*, 2021). Esse medicamento é proibido em muitos países para uso em animais de produção, porque o consumo humano de produtos de origem animal contendo resíduos de cloranfenicol pode levar a reações graves e irreversíveis, causando anemia severa com evolução para leucemia e óbito (MCCUBBIN *et al.*, 2021). No Brasil o uso de cloranfenicol na produção animal também é vetado, desde 2003 (BRASIL, 2003).

Existem relatos de uso dessa droga em países cuja proibição existe (ATTARI *et al.*, 2014). Rejtharová *et al.* (2017) avaliaram os resíduos de cloranfenicol em carne de aves após intervenção com esse fármaco, e encontraram resíduos desse medicamento após 35 dias da intervenção. A presença desses resíduos de antimicrobianos nos animais de produção configuram uma porta de entrada aos seres humanos, através da ingestão dos alimentos. Os resíduos deixados nos animais foram o fator chave para proibição desse antimicrobiano, visto que os efeitos adversos por ele provocado não são dose-dependentes (MCCUBBIN *et al.*, 2021).

A resistência bacteriana à gentamicina ainda é incomum, e, de acordo com informações oficiais, nacionais e internacionais, ocorre um desenvolvimento lento de resistência bacteriana a esse antimicrobiano (ANVISA, 2021a; FDA, 2021). A resistência a outros aminoglicosídeos é mais relatada, como a estreptomicina, uma droga mais antiga dessa classe de antimicrobianos, usada em maior escala na criação animal (LENCHENKO *et al.*, 2020). Nos dias de hoje, a gentamicina possui importância no tratamento clínico em seres humanos principalmente contra bactérias gram-negativas, em tuberculose causada por bactérias multirresistentes, em infecções do trato respiratório, urinário, gastrointestinal, pele, ossos, ocular, septicemia e infecções graves do sistema nervoso central (ANVISA, 2021a).

Apesar da baixa ocorrência de resistência bacteriana relatada à gentamicina, uma recente revisão de literatura relatou uso de aminoglicosídeos em alta escala para tratar doenças aviárias, incluindo *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Em decorrência disso, cepas de *S. Gallinarum* apresentaram 43% de resistência à gentamicina (BERHANU; FULASA, 2020).

O imipenem possui maior espectro de ação que a maioria dos β -lactâmicos, e muitas vezes seu uso é recomendado como último recurso contra microrganismos patogênicos gram-negativos multirresistentes. Seu uso em animais é proibido, e a ocorrência da resistência microbiana a esse agente já foi descrita como pressão seletiva causada por outros β -lactâmicos, como cefalosporinas de 3ª geração utilizadas na criação animal (BONARDI; PITINO, 2019; OIE, 2019).

Relatos de resistência ao imipenem em cepas de *Salmonella* isoladas de aves são recentes, e configuram uma grande preocupação de saúde. Medicamentos que não são primeira escolha no tratamento de infecções causadas por *Salmonella* não são isentos de preocupação acerca da resistência bacteriana, pois a mesma pode ser transferida aos humanos por meio da cadeia alimentar, e, além de causar doenças, os microrganismos podem atuar como veículos para transmissão de genes de resistência para outras bactérias patogênicas (FERNÁNDEZ; GUERRA; RODICIO, 2018; ROSCHANSKI *et al.*, 2018).

Dentre os isolados de *Salmonella* spp. do presente estudo, apenas uma cepa apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos, e 53,8% (42/78) foram multirresistentes (MDR), apresentando resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de classes de antimicrobianos dos quais as cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carnes de frango resfriadas apresentaram resistência

Nº de classes com resistência	Isolados de <i>Salmonella</i> spp.	
	N	(%)
0	1	1,3
1	9	11,5
2	26	33,3
3	21	26,9
4	13	16,7
5	8	10,3
MDR (soma de 3, 4 e 5)	42	53,8

Fonte: Autoria própria, (2021).

Notas: N e %: número e porcentagem de cepas em relação ao total de 78 cepas.

MDR: multirresistentes.

No Brasil em 2012, a Anvisa apresentou um estudo acerca da resistência antimicrobiana em cepas de *Salmonella* isoladas em carnes de frango congeladas expostas ao consumo em 13 estados brasileiros mais o Distrito Federal. Foram analisadas 542 amostras de carne de frango e dessas amostras foram isoladas 250 cepas de *Salmonella* que foram testadas contra 22 antimicrobianos. Os maiores percentuais de resistência foram obtidos para estreptomicina (89,3%), sulfonamidas (72,4%), florfenicol (59,2%), ampicilina (44,8%) e ácido nalidíxico (44,0%) e 69,3% das cepas foram MDR (ANVISA, 2012). A União Europeia apresentou um relatório com menor porcentagem de cepas de *Salmonella* MDR, onde 38,2% das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de aves de produção foram MDR, sendo realizado o teste de susceptibilidade dessas cepas contra 12 antimicrobianos de 10 classes diferentes (EFSA/ECDC, 2021b).

Os estudos relatam elevados índices de cepas de *Salmonella* MDR isoladas de carne de frango. No estudo de (PERIN *et al.*, 2020), 85,7% (84/98) das cepas de *Salmonella* spp. isoladas em carne de frango no estado do Paraná foram MDR. Zhu, Y. *et al.* (2017) isolaram 189 cepas de *Salmonella* em carne de frango ao longo do processo de abate na China e 60,8% dos isolados foram MDR. Deng *et al.* (2018) avaliaram a resistência antimicrobiana em 141 cepas de *Salmonella* isoladas de carne de frango na China e encontraram 43,3% de cepas MDR.

Outro aspecto muito preocupante diz respeito às oito cepas fenotipicamente resistentes a cinco classes de antimicrobianos encontradas, dentre as quais encontram-se incluídas drogas de

amplo espectro e criticamente importantes na terapia humana contra diversos microrganismos gram-negativos, como as fluorquinolonas e cefalosporinas de 3ª geração.

Além disso, 43 perfis foram observados nos isolados resistentes, e os três perfis mais frequentes foram amoxicilina/ácido clavulânico + sulfonamida (15,4%), amoxicilina/ácido clavulânico + tetraciclina + sulfonamida (7,7%), e amoxicilina/ácido clavulânico (7,7%) (Tabela 6).

Tabela 6 - Perfil de resistência e multirresistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* isoladas das amostras de carne de frango resfriadas

Perfis	Antimicrobianos	Classes	Continua nº de cepas (%)
1	AMC	Penicilinas	6 (7,7)
2	CIP	Fluroquinolonas	1 (1,3)
3	TET	Tetraciclina	1 (1,3)
4	CTX	Cefalosporinas*	1 (1,3)
5	AMC SUL	Penicilinas e sulfonamidas	12 (15,4)
6	AMC CAZ	Penicilinas e cefalosporinas*	1 (1,3)
7	AMC TET	Penicilinas e tetraciclina	2 (2,6)
8	AMC CIP	Penicilinas e fluorquinolonas	1 (1,3)
9	AMC GEN	Penicilinas e aminoglicosídeos	2 (2,6)
10	AMC IMP	Penicilinas e carbapenens	2 (2,6)
11	AMC CTX	Penicilinas e cefalosporinas*	1 (1,3)
12	TET SUL	Tetraciclina e sulfonamidas	4 (5,1)
13	SUL CTX	Sulfonamidas e cefalosporinas*	1 (1,3)
14	AMC TET SUL	Penicilinas, tetraciclina e sulfonamidas	6 (7,7)
15	AMC CAZ SUL	Penicilinas, cefalosporinas* e sulfonamidas	1 (1,3)
16	AMC CAZ TET	Penicilinas, cefalosporinas* e tetraciclina	2 (2,6)
17	AMC IMP SUL	Penicilinas, carbapenens e sulfonamidas	1 (1,3)
18	AMC SUL CIP	Penicilinas, sulfonamidas e fluorquinolonas	1 (1,3)
19	AMC GEN SUL	Penicilinas, aminoglicosídeos e sulfonamidas	1 (1,3)
20	AMC TET CTX	Penicilinas, tetraciclina e cefalosporinas*	2 (2,6)
21	AMC CIP IMP	Penicilinas, fluorquinolonas e carbapenens	1 (1,3)

Tabela 6 - Perfil de resistência e multirresistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* isoladas das amostras de carne de frango resfriadas

Perfis	Antimicrobianos	Classes	Continuação
			nº de cepas (%)
22	AMC CTX SUL	Penicilinas, cefalosporinas* e sulfonamidas	1 (1,3)
23	SUL TET GEN	Sulfonamidas, tetraciclinas e aminoglicosídeos	1 (1,3)
24	SUL TET AMC CIP	Sulfonamidas, tetraciclinas, aminoglicosídeos e fluorquinolonas	1 (1,3)
25	SUL CTX AMC CAZ	Sulfonamidas, cefalosporinas* e penicilinas	2 (2,6)
26	SUL CLO TET AMC	Sulfonamidas, anfenicois, tetraciclinas e penicilinas	1 (1,3)
27	SUL CTX TET GEN	Sulfonamidas, cefalosporinas*, tetraciclinas e aminoglicosídeos	1 (1,3)
28	SUL CTX TET AMC	Sulfonamidas, cefalosporinas*, tetraciclinas e penicilinas	2 (2,6)
29	SUL GEN AMC CIP	Sulfonamidas, aminoglicosídeos, penicilinas e fluorquinolonas	1 (1,3)
30	SUL TET IMP AMC	Sulfonamidas, tetraciclinas, carbapenens e penicilinas	1 (1,3)
31	CTX TET AMC CAZ	Cefalosporinas*, tetraciclinas e penicilinas	1 (1,3)
32	CTX GEN AMC CAZ	Cefalosporinas*, aminoglicosídeos e penicilinas	1 (1,3)
33	CTX CLO TET AMC	Cefalosporinas*, anfenicois, tetraciclinas e penicilinas	1 (1,3)
34	SUL CTX TET AMC CAZ	Sulfonamidas, cefalosporinas*, tetraciclinas e penicilinas	4 (5,1)
35	SUL CTX GEN AMC CIP	Sulfonamidas, cefalosporinas*, aminoglicosídeos, penicilinas e fluoroquinolonas	1 (1,3)

Tabela 6 - Perfil de resistência e multirresistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* isoladas das amostras de carne de frango resfriadas

Perfis	Antimicrobianos	Classes	Conclusão n° de cepas (%)
36	SUL CTX TET IMP AMC	Sulfonamidas, cefalosporinas*, tetraciclina, carbapenens e penicilinas	1 (1,3)
37	SUL CTX TET CLO CAZ	Sulfonamidas, cefalosporinas*, tetraciclina e anfenocóis	1 (1,3)
38	SUL TET AMC CIP CAZ	Sulfonamidas, tetraciclina, penicilina, fluoroquinolonas e cefalosporinas*	1 (1,3)
39	SUL TET GEN CIP CAZ	Sulfonamidas, tetraciclina, aminoglicosídeos, fluorquinolonas e cefalosporinas*	1 (1,3)
40	SUL TET IMP AMC CIP	Sulfonamidas, tetraciclina, carbapenens, penicilina e fluorquinolonas	1 (1,3)
41	SUL IMP GEN AMC CIP	Sulfonamidas, carbapenens, aminoglicosídeos, penicilina e fluorquinolonas	1 (1,3)
42	CLO CTX GEN AMC CIP CAZ	Anfenocóis, cefalosporinas*, aminoglicosídeos e penicilina	1 (1,3)
43	SUL CTX TET AMC CIP CAZ	Sulfonamidas, cefalosporinas*, tetraciclina, penicilina e fluorquinolonas	1 (1,3)

Fonte: Autoria própria, (2021).

Notas: AMC: amoxicilina/ácido clavulânico, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, IMP: imipenem, SUL: sulfonamida, GEN: gentamicina, TET: tetraciclina, CLO: cloranfenicol, CIP: ciprofloxacino;

*: cefalosporinas de 3ª geração.

Os genes de resistência *blaCTX*, *sul2* e *tetB* foram pesquisados nas 78 cepas de *Salmonella* isoladas das amostras de carne de frango resfriadas, ou seja, buscou-se os genes de resistência tanto em cepas fenotipicamente resistentes, quanto em cepas sensíveis e com sensibilidade intermediária. O gene *sul2* foi encontrado em 53 cepas (67,9%), o gene *blaCTX* foi identificado em 39 cepas (50,0%), e o gene *tetB* foi identificado em 29 cepas (37,2%) (Tabela 7).

Tabela 7 - Presença dos genes de resistência nos 78 isolados de *Salmonella* spp.

Genes de resistência	Susceptibilidade antimicrobiana			Total n (%)
	R n (%)	S n (%)	I n (%)	
<i>blaCTX-M</i>	34 (43,6) ^a	2 (2,6) ^b	3 (3,8) ^c	39 (50,0)
<i>sul2</i>	35 (44,9)	18 (23,1)	0	53 (67,9)
<i>tetB</i>	14 (17,9)	13 (16,7)	2 (2,6)	29 (37,2)

Fonte: Autoria própria, (2021).

Notas: R: resistente, S: sensível, I: sensibilidade intermediária;

^a: Contagem de cepas em relação a resistência apresentada a pelo menos um dos β-lactâmicos testados;

^b: Contagem de cepas sensíveis aos 4 β-lactâmicos testados;

^c: Contagem de cepas que não apresentaram resistência a nenhum dos 4 β-lactâmicos testados, e pelo menos uma delas apresentou sensibilidade intermediária.

Enne *et al.* (2006) reportaram que a maioria dos estudos pesquisam os genes de resistência apenas em isolados fenotipicamente resistentes. Os autores comprovaram que essa abordagem de detecção de genes de resistência aos antimicrobianos em bactérias é falha, visto que alguns genes de resistência são silenciosos nos testes *in vitro* e esses genes silenciosos podem ser transmitidos para outras bactérias. Assim, em nosso estudo, foi possível encontrar 18 cepas (23,1%) sensíveis às sulfonamidas com o gene de resistência *sul2*; 13 cepas (16,7%) sensíveis à tetraciclina com o gene *tetB*; e 2 cepas (2,6%) sensíveis aos β-lactâmicos com o gene *blaCTX*.

Realizamos também a comparação apenas entre cepas fenotipicamente resistentes às classes de antimicrobianos e a presença ou ausência dos genes correspondentes (Tabela 8).

Tabela 8 - Relação entre presença e ausência do gene de resistência em isolados de *Salmonella* spp. fenotipicamente resistentes aos antimicrobianos

Classes de antimicrobianos	Gene de resistência	Cepas R + gene (%)	Cepas R - gene (%)
β-lactâmicos	<i>blaCTX</i>	34 (48,6)	36 (51,4)
Sulfonamidas	<i>sul2</i>	35 (70,0)	15 (30,0)
Tetraciclina	<i>tetB</i>	14 (38,9)	22 (61,1)

Fonte: Autoria própria, (2021).

Notas: Cepas R + gene = número de cepas resistentes no antibiograma que apresentaram o gene de resistência; Cepas R - gene = número de cepas resistentes no antibiograma que não apresentaram o gene de resistência;

%: porcentagem em relação ao total de cepas resistentes à classe do antimicrobiano correspondente ao gene de resistência.

Em nosso estudo, 34 cepas (48,6%) resistentes a pelo menos um dos β -lactâmicos testados possuíam o gene de resistência *blaCTX* em seu material genético. Os resultados dessa análise representam 3 dos 4 antimicrobianos avaliados dessa classe (amoxicilina/ácido clavulânico, cefotaxima e ceftazidima), uma vez que a enzima CTX não possui afinidade aos β -lactâmicos carbapenens, e, portanto, as cepas desse estudo resistentes ao imipenem não entraram nessas análises. As demais cepas isoladas que não possuíam o gene *blaCTX* em seu material genético, podem estar, possivelmente, expressando o mecanismo de resistência por meio de outros genes, como o *blaTEM* ou *blaSHV*.

Os estudos têm apontado que nas bactérias da família *Enterobacteriaceae*, o gene de resistência *blaCTX* é o mais difundido. Djeffal et al. (2017), em uma comparação da presença de ESBL em isolados de *Salmonella* spp. identificadas em carnes de frango, encontraram o gene *blaCTX* em 91,6% das cepas, e 16,7% continham o gene *blaTEM*. Lee et al. (2016) encontraram o gene *blaCTX* em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carnes de pato na Coreia do Sul fenotipicamente resistentes à cefotaxima e ceftazidima, e não encontraram os genes *blaTEM* e *blaSHV* nessas cepas.

Não foi possível analisar individualmente a relação da presença do gene *blaCTX* e a resistência fenotípica de cada β -lactâmico, uma vez que quase todas as cepas resistentes à ceftazidima e cefotaxima, também eram resistentes à amoxicilina/ácido clavulânico. Nessa abordagem, uma cepa abrigando o gene *blaCTX* ao mesmo tempo em que apresenta resistência fenotípica a mais de um antimicrobiano, não revela esse gene como o único envolvido na situação. Assim, a mesma cepa também pode abrigar diferentes genes de resistência, resultando em cepas MDR (CANTÓN; RUIZ-GARBAJOSA, 2011).

Os impactos desses resultados são comentados por Nachimuthu et al. (2021). Ao avaliarem a presença de ESBL em isolados clínicos, relataram a transferência horizontal e a disseminação de genes plasmidiais. Além disso, enfatizaram que os isolados de bactérias gram-negativas que desenvolveram resistência às cefalosporinas de 3ª geração têm tornado os tratamentos clínicos mais complicados.

É importante destacar que os carbapenens são as drogas de escolha no tratamento de cepas produtoras de ESBL isoladas em seres humanos, e o aumento de cepas MDR eleva a necessidade do uso desses antimicrobianos e o conseqüente desenvolvimento de cepas resistentes a esses agentes (RAWAT; NAIR, 2010).

Ao descrever sobre as características fenotípicas das ESBL CTX-M, Bonnet (2004) destacou que essas β -lactamases geralmente conferem alto nível de resistência às aminopenicilinas e às cefalosporinas de espectro estreito. Já em relação às cefalosporinas de 3ª geração, a enzima

CTX também confere alta resistência à cefotaxima, entretanto, a ceftazidima geralmente não possui maior afinidade. Apesar disso, a autora enfatizou que isolados produtores de CTX, que não são resistentes *in vitro* à ceftazidima, podem ser resistentes *in vivo*. Portanto, os resultados de antibiograma em cepas produtoras de CTX devem ser expandidos à todas as cefalosporinas de amplo espectro.

No que se refere às 50 cepas fenotipicamente resistentes às sulfonamidas deste estudo, 70% (n = 35) carregavam o gene de resistência *sul2*. Os outros 15% podem estar relacionados com a presença de outros genes, como o *sul1* ou o *sul3*. Outros estudos reportaram o gene *sul2* como o mais prevalente em cepas de *Salmonella* isoladas de carnes de frangos. Deng et al. (2018) relataram que a prevalência dos genes *sul1* e *sul2* foi igual em cepas de *Salmonella* isoladas de carne de frango resistentes a trimetoprima na China, enquanto a presença do *sul3* foi inferior. No estudo de Maka et al. (2015), as cepas de *Salmonella* isoladas de alimentos na Polônia resistentes a sulfonamida foram testadas quanto à presença dos genes *sul1*, *sul2*, *sul3*. Nos resultados, 46,4% (39/84) das cepas apresentam o gene *sul2*, 44,0% (37/84) dos isolados carregavam o gene *sul1*, enquanto o gene *sul3* não foi detectado em nenhum dos isolados. No estudo de Zhu, Y. et al. (2017), entre 91 isolados resistentes à sulfonamida, 97,8% (n = 89) abrigaram pelo menos um dos genes *sul* (*sul1*, *sul2* ou *sul3*). O gene *sul2* teve a maior ocorrência (97,8%, n = 89) em relação aos genes *sul1* e *sul3* (ambos com 50,5%, n = 46).

E entre as 36 cepas fenotipicamente resistentes à tetraciclina neste estudo, apenas 38,9% (n = 14) carregavam o gene de resistência *tetB*. Vários genes *tet* diferentes foram descritos como conferindo resistência às tetraciclinas em bactérias. Os tipos mais frequentes de genes *tet* pertencem às classes A, B, C, D e G e esses genes são responsáveis pela codificação das bombas de efluxo de tetraciclina (ALMEIDA *et al.*, 2018). Zhu, Y. et al. (2017), ao avaliarem a presença de genes de resistência à tetraciclina em cepas de *Salmonella* isoladas de frangos de corte ao longo do processo de abate na China, encontraram o gene *tetB* em 50% do total em 98 cepas fenotipicamente resistentes à tetraciclina, porém, o gene *tetC* foi mais prevalente, encontrado em 71,4% das cepas resistentes. Zishiri; Mkhize; Mukaratirwa (2016) avaliaram a prevalência de genes de resistência antimicrobiana em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de cortes de frango da África do Sul e do Brasil e encontraram o gene *tetA* em 44% e o gene *tetB* em 28% do total de 102 cepas fenotipicamente resistentes à tetraciclina.

Ao comparar os resultados deste estudo com a literatura, pode-se afirmar que existe uma variação de perfil fenotípico de resistência e uma variação genética em cepas de *Salmonella*, de acordo com as regiões geográficas das quais as cepas são isoladas e o tipo de metodologia utilizada.

Apesar disso, os fatores pelos quais a resistência aos antimicrobianos ocorre são os mesmos, ocasionando cepas de *Salmonella* MDR que carregam múltiplos genes de resistência.

Os achados desse estudo corroboram com os achados em isolados clínicos humanos em infecções de difícil tratamento, com casos de similaridade genética entre isolados clínicos humanos e aviários de 89-100% (FERNANDES *et al.*, 2009; ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016). Desse modo, sugere-se forte relação de transferência de resistência de cepas MDR de origem humana ou animal, com a disseminação dessa resistência ocorrendo por meio de elementos genéticos móveis a variadas linhagens de bactérias, e, conseqüentemente, atualmente observa-se um aumento do número de infecções hospitalares causadas por cepas bacterianas MDR com falhas terapêuticas.

5 CONCLUSÕES

Nesse estudo observou-se uma elevada ocorrência de contaminação por *Salmonella* spp. (46,1%) nas carnes de frango resfriadas comercializadas no Distrito Federal. Além disso, elevada resistência das cepas à amoxicilina/ácido clavulânico (83,3%), sulfonamida (64,1%) e tetraciclina (46,2%) também foram observadas, sendo que 53,8% dos isolados foram multirresistentes, apresentando ineficácia a antimicrobianos muito utilizados na prática clínica. Dentre os genes de resistência buscados, o *sul2* foi o mais encontrado nos isolados de *Salmonella* spp. deste estudo, com 67,9% das cepas o contendo, seguido do gene *blaCTX*, presente em 50% das cepas, e o *tetB*, em 37,2%.

A técnica da PCR demonstrou ser uma grande aliada nas pesquisas de microrganismos em alimentos associada à metodológica clássica de microbiologia, de modo que conseguiu auxiliar com maior precisão a determinação das amostras contaminadas por *Salmonella* spp., através detecção do gene de virulência *invA*, e também apresentou resultado satisfatório na busca dos genes de resistência em cepas fenotipicamente sensíveis aos antimicrobianos.

Atualmente, o Brasil possui programas nacionais que objetivam o controle da disseminação de *Salmonella* em carnes de aves, ainda assim, de acordo com os resultados aqui apresentados, o controle do setor avícola apresenta falhas, pois foi possível identificar esses microrganismos em quase metade das amostras de carne de frango disponíveis em varejos no Distrito Federal. Assim, considerando o elevado consumo da carne de frango brasileira, nacional e internacionalmente, fica evidente a necessidade de pesquisas que mostrem a qualidade desses produtos, uma vez que os alimentos de origem animal podem apresentar índices altos de contaminação por bactérias patogênicas.

Tendo em vista o exposto, reconhece-se que as carnes de frango resfriadas comercializadas no Distrito Federal podem apresentar riscos à saúde da população, pois além de chegarem ao varejo com alto grau de contaminação por *Salmonella*, ainda portam genes de resistência antimicrobiana, os quais podem se disseminar à outras bactérias. Para pesquisas futuras, a questão desse estudo pode ser aprofundada ao realizar a identificação e prevalência dos sorovares de *Salmonella* presentes nas carnes de frango, e ainda pode-se realizar a pesquisa de outros genes de resistência antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2021**. Brasil: ABPA, 2021. Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2021/04/ABPA_Relatorio_Anual_2021_web.pdf. Acesso em: 29 jul. 2021.
- ABUSHAHEEN, M. A. *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, Arábia Saudita, v. 66, n. 6, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>
- AGYARE, C. *et al.* Antibiotic Use in Poultry Production and Its Effects on Bacterial Resistance. **Antimicrobial Resistance - A Global Threat**, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.79371>
- AHMAD, S. *et al.* A skeleton in the closet: The implications of COVID-19 on XDR strain of typhoid in Pakistan. **Public health in practice (Oxford, England)**, Paquistão, v. 2, p. 100084, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.puhip.2021.100084>
- ALALI, W. Q. *et al.* Prevalence of *Salmonella* on retail chicken meat in Russian federation. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 75, n. 8, p. 1469–1473, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-080>
- ALMEIDA, F. *et al.* Phylogenetic and antimicrobial resistance gene analysis of *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Brazil by whole genome sequencing. **PLoS ONE**, Brasil, v. 13, n. 8, p. 1–16, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201882>
- AMMAR, A. M. *et al.* Virulence genotypes of clinical *Salmonella* serovars from broilers in Egypt. **Journal of Infection in Developing Countries**, Egito, v. 10, n. 4, p. 337–346, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3855/jidc.7437>
- ANTUNES, P. *et al.* Salmonellosis: The role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, Portugal, v. 22, n. 2, p. 110–121, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>
- ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Boas práticas em microbiologia clínica**. São Paulo - SP: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), 2008. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/inicio.htm. Acesso em: 12 abr. 2021.
- ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Consolidação das Consultas Públicas nº 541 e 542. Salmonella em produtos cárneos**. Brasília, DF: Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33880/5313808/Consolidação+das+Consultas+Públicas+nº+541+e+542+Salmonella+em+produtos+cárneos.pdf/b1516a63-995f-4cb4-9f1c-738bf3691809>. Acesso em: 28 jul. 2021.
- ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Consultas**. Brasília, DF, 2021a. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/>. Acesso em: 17 jul. 2021.

ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Medidas de Prevenção e Controle da Resistência Microbiana e Programa de Uso Racional de Antimicrobianos em Serviços de Saúde**. São Paulo - SP: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), 2007a.

Disponível em:

https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/inicio.htm.

Acesso em: 30 abr. 2021.

ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Perguntas e Respostas. Padrões Microbiológicos**. Brasília: Gerência-Geral de Alimentos. Gerência de Avaliação de Risco e Eficácia de Alimentos, 2021b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/alimentos/perguntas-e-respostas/padroes-microbiologicos.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2021.

ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango - PREBAF**. Brasília: Anvisa, 2012. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/en/publicacoes?tagsName=prebaf>.

ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Resistência Microbiana - Mecanismos e Impacto Clínico**. São Paulo - SP: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), 2007b. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_entero.htm. Acesso em: 30 abr. 2021.

APPIAH, G. D. *et al.* Typhoid Outbreaks, 1989-2018: Implications for Prevention and Control. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, [s. l.], v. 102, n. 6, p. 1296–1305, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0624>

ARAÚJO, Y. F. de. Avaliação da qualidade da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) fresca e resfriada e do gel de manutenção comercializados na cidade de Brasília, Distrito Federal. **Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília**, 2015. Disponível em: <https://bdm.unb.br/handle/10483/10959>. Acesso em: 26 jun. 2021.

ASSUMPÇÃO, L. de. **Métodos De Identificação De Bacterias Do Gênero Salmonella**. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, 1945. v. 85. *E-book*. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/bihsp/article/download/89549/92376>. Acesso em: 25 mai. 2021.

ASTOLFI-FERREIRA, C. S. *et al.* A comparative survey between non-systemic *Salmonella* spp. (paratyphoid group) and systemic *Salmonella* Pullorum and *S. Gallinarum* with a focus on virulence genes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasil, v. 37, n. 10, p. 1064–1068, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001000004>

ATTARI, V. E. *et al.* Investigation of enrofloxacin and chloramphenicol residues in broiler chickens carcasses collected from local markets of tabriz, northwestern iran. **Health promotion perspectives**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 151–157, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5681/hpp.2014.020>

BAPTISTA, D. Q. *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. serotypes in broiler chickens and carcasses in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 1278–1285, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5289>

BARROW, P. A. *et al.* The long view: *Salmonella* - the last forty years. **Avian Pathology**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 413–420, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.718071>

BARROW, P. A.; FREITAS NETO, O. C. Pullorum disease and fowl typhoid-new thoughts on old diseases: A review. **Avian Pathology**, Brasil, v. 40, n. 1, p. 1–13, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.542575>

BASKER, M. J.; GWYNN, M. N.; WHITE, A. R. Comparative activities of ampicillin, epicillin and amoxycillin in vitro and in vivo. **Chemotherapy**, Switzerland, v. 25, n. 3, p. 170–180, 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000237837>

BÄUMLER, A. J.; HARGIS, B. M.; TSOLIS, R. M. Tracing the Origins of *Salmonella* Outbreaks. **Science**, Texas, v. 287, n. 5450, p. 50–52, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.287.5450.50>

BERHANU, G.; FULASA, A. Pullorum Disease and Fowl Typhoid in Poultry: A Review. **British Journal of Poultry Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 48–56, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5829/idosi.bjps.2020.48.56>

BONARDI, S.; PITINO, R. Carbapenemase-producing bacteria in food-producing animals, wildlife and environment: A challenge for human health. **Italian journal of food safety**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 7956, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4081/ijfs.2019.7956>

BONI, H. F. K. **Ocorrência de *Salmonella* spp . na cadeia avícola da região central de Mato Grosso do Sul**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2007. Disponível em: <https://repositorio.ufms.br/handle/123456789/954>. Acesso em: 28 abr. 2021.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 1–14, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>

BORGES, K. A. *et al.* Detection and quantification of *Salmonella* spp. In poultry slaughterhouses of southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 455–460, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3855/jidc.11107>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa nº 51, de 19 de dezembro de 2019**. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Brasília, Brasil: Diário Oficial da União: seção 1, publicado em 26/12/2019, edição 249, 2019a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019**. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, Brasil: Diário Oficial da União: seção 1, publicado em 26/12/2019, edição 249, 2019b. p. 1–17.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 1, de 13 de janeiro de 2020**. Resolve proibir, em todo território nacional, a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina, e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana. Brasil: Diário Oficial da União: seção 1, publicado em 23/01/2020, 2020. p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 14, de 17 de maio de 2012**. Resolve proibir em todo o território nacional a importação, fabricação e o uso das substâncias antimicrobianas espiramicina e eritromicina com finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Brasil: Diário Oficial da União: seção 1, publicado em 18/05/2012, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016**. Ficam estabelecidos o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF). Brasília, Brasil: Diário Oficial da União: seção 1, publicado em 25/10/2016, nº 205, 2016a.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009**. Resolve aprovar o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Brasil: Diário Oficial da União: seção 1, publicado em 10/07/2009, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016**. Resolve proibir, 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. Brasil: Diário Oficial da União: seção 1, publicado em 30/11/2016, 2016b.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003**. Resolve proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Brasil: Diário Oficial da União: seção 1, publicado em 30/06/2003, 2003. p. 1–15.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 27, de 27 de agosto de 2008**. Aprova os procedimentos operacionais para habilitação de estabelecimentos fabricantes de produtos de origem animal interessados em destinar seus produtos ao comércio internacional e para as auditorias e supervisões para a verificação do cumprimento dos requisitos sanitários específicos dos países ou blocos de países importadores. Brasil: Diário Oficial da União: seção 1, publicado em 27/08/2008, 2008. p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998**. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. Brasília, Brasil: Diário Oficial da União: seção, publicado em 26/11/98, 1998. p. 17–22.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância em saúde**. 3^a ed. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços, 2019c. *E-book*. Disponível em: https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf. Acesso em: 02 ago. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Integrado de Vigilância e Controle da Febre Tifoide**. 1. ed. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial da *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella***. 1^aed. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz, 2011. *E-book*.

BRASIL. Ministério Público Federal. **A pedido do MPF_SP, Justiça proíbe fabricação, comercialização e uso de suplemento para animais que expõe população a bactérias multirresistentes**. 2018. Disponível em: <https://mpf.jusbrasil.com.br/noticias/534858141/a-pedido-do-mpf-sp-justica-proibe-fabricacao-comercializacao-e-uso-de-suplemento-para-animais-que-expoe-populacao-a-bacterias-multirresistentes>. Acesso em: 17 abr. 2021.

BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Dispõe sobre o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Brasília, Brasil: Presidência da República, 2017. Disponível em: http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/RIISPOA-Decreto-9013_29_03_2017.pdf. Acesso em: 22 jun. 2021.

BRASIL. **Lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950**. Dispões sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. Rio de Janeiro: Presidência da República, 1950. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/11283.htm. Acesso em: 15 jun. 2021.

BRCAS - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Manual Antibiograma 2019**. Brasília: Laborclin, 2019. Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>. Acesso em: 11 out. 2020.

CANTÓN, R.; RUIZ-GARBAJOSA, P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. **Current Opinion in Pharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 477–485, 2011. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.07.007>

CARDINAL, K. M.; PIRES, P. G. da S.; RIBEIRO, A. M. L. R. Growth promoter in boiler and pig production. **Pubvet**, Brasil, v. 14, n. 3, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n3a532.1-11>

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Salmoneloses Aviárias: Revisão. **Revista Eletrônica Nutritime**, Brasil, v. 12, n. 3, p. 4049–4069, 2015. Disponível em: http://nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/ARTIGO304a.pdf. Acesso em 02 ago. 2021.

CARNEIRO, D. O.; COSTA, M. S. F. Características de patogenicidade da *Salmonella* Enterica: uma revisão de literatura. **Visão Acadêmica**, Brasil, v. 21, n. 1, p. 72–79, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5380/acd.v21i1.71940>

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças. **Advice to Clinicians | Multistate Outbreak of *Salmonella* Infections Linked to Raw Chicken Products**. Estados Unidos: CDC, 2019a. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/infantis-10-18/advice.html>. Acesso em: 25 jun. 2021.

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças. **Biggest Threats and Data | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC**. Estados Unidos, 2019b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html>. Acesso em: 25 jun. 2021.

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças. **Details - Public Health Image Library (PHIL)**. Estados Unidos, 2020a. Disponível em: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=23313>. Acesso em: 30 abr. 2021.

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças. **Foods That Can Cause Food Poisoning**. Estados Unidos, 2020b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/communication/leafy-greens.html#:~:text=During 2014 to 2018%2C 51,were linked to romaine lettuce>. Acesso em: 1 mar. 2021.

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças. **How Antibiotic Resistance Happens | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC**. Estados Unidos, 2020c. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html>. Acesso em: 25 jun. 2021.

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças. **National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2016**. Atlanta, Geogia: US Department of Health and Human Services, CDC: [s. n.], 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/salmonella-surveillance.html>. Acesso em: 24 jun. 2021.

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças. **National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Surveillance Overview**. Atlanta, Geogia: US Department of Health and Human Services, CDC: [s. n.], 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/VES-2012-0452>. Acesso em: 25 jun. 2021.

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças. ***Salmonella* and Food**. Estados Unidos, 2020d. Disponível em: <https://www.cdc.gov/features/salmonella-food/index.html>. Acesso em: 1 mar. 2021.

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças. **Yellow Book. Chapter 4 Travel-Related Infectious Diseases**. Estados Unidos, 2017. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/typhoid-and-paratyphoid-fever>. Acesso em: 24 jun. 2021.

CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI supplement M100, 2020.

COLLA, F. L. *et al.* Isolamento de *Salmonella* Heidelberg em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, Brasil, v. 79, n. 4, p. 603–606, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1808-16572012000400018>

- CUYPERS, W. L. *et al.* Fluoroquinolone resistance in *Salmonella*: insights by whole-genome sequencing. **Microbial genomics**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. e000195, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000195>
- DA CUNHA-NETO, A. *et al.* *Salmonella* isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state of Mato Grosso, Brazil: Antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization by repetitive sequence-based PCR system. **Poultry Science**, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 1373–1381, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps/pex406>
- DAHIYA, S. *et al.* Characterisation of Antimicrobial Resistance in *Salmonellae* during 2014–2015 from Four Centres Across India: An ICMR Antimicrobial Resistance Surveillance Network Report. **Indian Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 61–68, 2017. Disponível em: https://doi.org/https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_16_382
- DAHIYA, S. *et al.* Current antibiotic use in the treatment of enteric fever in children. **The Indian journal of medical research**, [s. l.], v. 149, n. 2, p. 263–269, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_199_18
- DAVIES, R. *et al.* Observations on the distribution and control of *Salmonella* species in two integrated broiler companies. **Veterinary Record**, [s. l.], v. 149, n. 8, p. 227–232, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/vr.149.8.227>
- DEEKSHIT, V. K. *et al.* Differential expression of virulence genes and role of *gyrA* mutations in quinolone resistant and susceptible strains of *Salmonella* Weltevreden and Newport isolated from seafood. **Journal of Applied Microbiology**, India, v. 119, n. 4, p. 970–980, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.12924>
- DENAGAMAGE, T. *et al.* Risk Factors Associated with *Salmonella* in Laying Hen Farms: Systematic Review of Observational Studies. **Avian Diseases**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 291–302, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1637/10997-120214-Reg>
- DENG, W. *et al.* Antibiotic Resistance in *Salmonella* from Retail Foods of Animal Origin and Its Association with Disinfectant and Heavy Metal Resistance. **Microbial Drug Resistance**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 782–791, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0127>
- DIAS DE OLIVEIRA, S. *et al.* Detection of Virulence Genes in *Salmonella* Enteritidis Isolated From Different Sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v. 34, n. 1, p. 123–124, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v34s1/irq42.pdf>
- DJEFFAL, S. *et al.* Prevalence and clonal relationship of ESBL-producing *Salmonella* strains from humans and poultry in northeastern Algeria. **BMC Veterinary Research**, França, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1050-3>
- DOAN, T. *et al.* Macrolide and Nonmacrolide Resistance with Mass Azithromycin Distribution. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 383, n. 20, p. 1941–1950, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002606>
- DOI, Y.; IOVLEVA, A.; BONOMO, R. A. The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. **Journal of travel medicine**, Estados Unidos, v. 24, n. 1, p. S44–S51, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jtm/taw102>

DOS SANTOS, A. M. P.; FERRARI, R. G.; CONTE-JUNIOR, C. A. Virulence Factors in *Salmonella* Typhimurium: The Sagacity of a Bacterium. **Current Microbiology**, Brasil, v. 76, p. 762–773, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1510-4>

EFSA/ECDC - European Food Safety Authority/European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, European Commission, v. 19(2), n. 6406, p. 286, 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>

EFSA/ECDC - European Food Safety Authority/European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. **EFSA Journal**. European Commission, v.19(4), n. 6469, 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6490>.

EFSA - European Food Safety Authority. *Salmonella* control in poultry flocks and its public health impact. **EFSA Journal**, European Commission, v. 17, n. 2, p. 155, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5596>

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Carne de Aves**. Brasil, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-de-aves>. Acesso em: 26 fev. 2021.

ENCYCLOPEDIA BRITANNICA. **Sulfa Drug**. [S. l.]: Encyclopaedia Britannica, Inc, 2021. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/sulfa-drug>. Acesso em: 19 jul. 2021.

ENNE, V. I. *et al.* Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 50, n. 9, p. 3003–3010, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00137-06>

FDA - Food and Drug Administration. **BAM Chapter 5: Salmonella**. [S. l.]: FDA, 2007. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>. Acesso em: 5 jul. 2021.

FDA - Food and Drug Administration. **FDA-Approved Drugs**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=062420>. Acesso em: 19 jul. 2021.

FDA - Food and Drug Administration. **Highlights of prescribing information - Amoxil®Package Insert**. [S. l.: s. n.], 2015. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/50542s02950754s01950760s01950761s016lbl.pdf. Acesso em: 7 jul. 2021.

FEASEY, N. A. *et al.* Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: An emerging and neglected tropical disease in Africa. **The Lancet**, Reino Unido, v. 379, n. 9835, p. 2489–2499, 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61752-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61752-2)

FERNANDES, S. A. *et al.* CTX-M-2-Producing *Salmonella* typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 317–321, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0050>

- FERNÁNDEZ, J.; GUERRA, B.; RODICIO, M. R. Resistance to Carbapenems in Non-Typhoidal *Salmonella* enterica Serovars from Humans, Animals and Food. **Veterinary sciences**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 40, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vetsci5020040>
- FILHO, J. I. dos S. *et al.* Capítulo 2 - Os 35 anos que mudaram a avicultura brasileira. In: SOUZA, J. C. P. V. B. *et al.* **Sonho, Desafio e Tecnologia - 35 anos de contribuições da Embrapa Suínos e Aves**. 1. ed. Cancórdoa - SC: Embrapa Suínos e Aves, 2011. p. 473. *E-book*. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/909722/sonho-desafio-e-tecnologia-35-anos-de-contribuicoes-da-embrapa-suinos-e-aves>. Acesso em 21 jun. 2021.
- FINLAY, B. B. Molecular and Cellular Mechanisms of *Salmonella* Pathogenesis. **Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals**, Canadá, p. 163–182, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0233475518060063>
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- FRANCO-DUARTE, R. *et al.* Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms-From Past to Present. **Microorganisms**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 130, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- FRANÇOIS WATKINS, L. K. *et al.* Update on Extensively Drug-Resistant *Salmonella* Serotype Typhi Infections Among Travelers to or from Pakistan and Report of Ceftriaxone-Resistant *Salmonella* Serotype Typhi Infections Among Travelers to Iraq - United States, 2018-2019. **Morbidity and mortality weekly report**, Estados Unidos, v. 69, n. 20, p. 618–622, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6920a2>
- FURUKAWA, I. *et al.* Prevalence and characteristics of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail poultry meat in Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 239–247, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2016.164>
- GALAN, J. E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: Homology of *InvA* to members of a new protein family. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 174, n. 13, p. 4338–4349, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.174.13.4338-4349.1992>
- GIURIATTI, J. *et al.* *Salmonella* Heidelberg: Genetic profile of its antimicrobial resistance related to extended spectrum β -lactamases (ESBLs). **Microbial Pathogenesis**, Brasil, v. 109, p. 195–199, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.040>
- GOLDEN, C. E.; MISHRA, A. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. In alternative and conventionally produced chicken in the United States: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 83, n. 7, p. 1181–1197, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/JFP-19-538>
- GONÇALVES-TENÓRIO, A. *et al.* Prevalence of pathogens in poultry meat: A meta-analysis of European published surveys. **Foods**, [s. l.], v. 7, n. 5, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods7050069>

GYSELINCK, I. *et al.* Rationale for azithromycin in COVID-19: an overview of existing evidence. **BMJ Open Respiratory Research**, Bélgica, v. 8, n. 1, p. e000806, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2020-000806>

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J. da; REIS, E. M. F. dos. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasil, v. 17, n. 2, p. 55–62, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-736x1997000200003>

HOLMES, A. H. *et al.* Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, Reino Unido, v. 387, n. 10014, p. 176–187, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in Foods 6**. 2. ed. Nova York, Estados Unidos: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. ISSN 0028-0836. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/224196b0>

IPC - International Poultry Council. **Poultry is king of proteins in IPC outlook**. Estados Unidos, 2019. Disponível em: <https://internationalpoultrycouncil.org/2019/03/08/poultry-is-king-of-proteins-in-ipc-outlook/>. Acesso em: 25 fev. 2021.

KALLAPURA, G. *et al.* Evaluation of the respiratory route as a viable portal of entry for *Salmonella* in poultry via intratracheal challenge of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium. **Poultry Science**, México, v. 93, n. 2, p. 340–346, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03602>

KOW, C. S.; HASAN, S. S. Use of Azithromycin in COVID-19: A Cautionary Tale. **Clinical drug investigation**, [s. l.], v. 40, n. 10, p. 989–990, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40261-020-00961-z>

KUANG, D. *et al.* Emerging high-level ciprofloxacin resistance and molecular basis of resistance in *Salmonella* enterica from humans, food and animals. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 280, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.001>

LAY, K. S. *et al.* Prevalence, numbers and antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* serovars and *Campylobacter* spp. in retail poultry in Phnom Penh, Cambodia. **Journal of Veterinary Medical Science**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 325–329, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0373>

LEE, S. K. *et al.* Resistance of strains producing extended-spectrum β -lactamases among *Salmonella* from duck carcasses at slaughterhouses in three major provinces of South Korea. **Foodborne Pathogens and Disease**, Coreia, v. 13, n. 3, p. 135–141, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2042>

LEES, P. *et al.* A history of antimicrobial drugs in animals: Evolution and revolution. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 137–171, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jvp.12895>

LENCHENKO, E. *et al.* Poultry *Salmonella* sensitivity to antibiotics. **Systematic Reviews in Pharmacy**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 170–175, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5530/srp.2020.2.26>

LI, R. *et al.* Prevalence and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. **International Journal of Food Microbiology**, China, v. 163, n. 1, p. 14–18, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.020>

LIN, C. C. *et al.* Analysis of ciprofloxacin-resistant *Salmonella* strains from swine, chicken, and their carcasses in Taiwan and detection of parC resistance mutations by a mismatch amplification mutation assay PCR. **Journal of Food Protection**, Taiwan, v. 72, n. 1, p. 14–20, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.1.14>

MAHARJAN, S. *et al.* Microbial quality of poultry meat in an ISO 22000:2005 certified poultry processing plant of Kathmandu valley. **International Journal of Food Contamination**, [s. l.], v. 6, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40550-019-0078-5>

MAKA, L. *et al.* Resistance to sulfonamides and dissemination of sul genes among *Salmonella* spp. isolated from food in Poland. **Foodborne Pathogens and Disease**, Polônia, v. 12, n. 5, p. 383–389, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1825>

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Anuário dos Programas de Controle de Alimentos de Origem Animal do DIPOA**. Brasília, DF: Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/anuario-dos-programas-de-controle-de-alimentos-de-origem-animal-do-dipoa/anuario-dos-programas-de-controle-de-alimentos-de-origem-animal-volume-6.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2021.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Salmonelas**. Brasil, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/salmonelas>. Acesso em: 24 mar. 2021.

MARINELLI, F. *et al.* Mary Mallon (1869-1938) and the history of typhoid fever. **Annals of gastroenterology**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 132–134, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24714738>

MCCUBBIN, K. D. *et al.* Unsafe “crossover-use” of chloramphenicol in Uganda: importance of a One Health approach in antimicrobial resistance policy and regulatory action. **Journal of Antibiotics**, [s. l.], v. 74, n. 6, p. 417–420, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41429-021-00416-3>

MEDLINEPLUS. **Tetracycline**. [S. l.], 2017. Disponível em: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682098.html>. Acesso em: 19 jul. 2021.

MELLOR, G. E. *et al.* Relative prevalence of *Salmonella* Sofia on broiler chickens pre and post processing in Australia. **Poultry Science**, Austrália, v. 89, n. 7, p. 1544–1548, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00387>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico 32**. Distribuição temporal dos surtos notificados de doenças transmitidas por alimentos - Brasil, 2007-2015; Informe sobre surtos notificados de doenças transmitidas por água e alimentos - Brasil, 2016-2019. Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2020a. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/17/Boletim-epidemiologico-SVS-32.pdf>. Acesso em: 11 set. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico 34**. Febre tifoide, Brasil, 2010 a 2019. Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, v.51, 2020b. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/31/Boletim-epidemiologico-SVS-34.pdf>. Acesso em: 11 set. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasília, Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2019. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf>. Acesso em: 11 jul. 2021.

MONTE, D. F. *et al.* Genomic Features of High-Priority *Salmonella* enterica Serovars Circulating in the Food Production Chain, Brazil, 2000–2016. **Scientific Reports**, Brasil, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45838-0>

NACHIMUTHU, R. *et al.* CTX-M-type ESBL-mediated resistance to third-generation cephalosporins and conjugative transfer of resistance in Gram-negative bacteria isolated from hospitals in Tamil Nadu, India. **Access microbiology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 142, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000142>

NEU, H. C. Diagnosis and treatment: drugs five years later. Amoxicillin. **Annals of internal medicine**, United States, v. 90, n. 3, p. 356–360, 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-90-3-356>

OIE - World Organization for Animal Health. **OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance**. Paris. EUA: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, 2019. Disponível em: <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/a-oie-list-antimicrobials-july2019.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.

OLIVEIRA, A. P. de *et al.* *Salmonella* enterica: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Centro Científico Conhecer**, Brasil, v. 9, n. 16, p. 1947–1972, 2013. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2013a/agrarias/salmonella.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2021.

PARK, H. J. *et al.* Prevalence Analysis and Molecular Characterization of *Salmonella* at Different Processing Steps in Broiler Slaughter Plants in South Korea. **Journal of food science**, Coreia, v. 80, n. 12, p. M2822–M2826, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13106>

PARRY, C. M. *et al.* Randomized Controlled Comparison of Ofloxacin, Azithromycin, and an Ofloxacin-Azithromycin Combination for Treatment of Multidrug-Resistant and Nalidixic Acid-Resistant Typhoid Fever. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 819 LP – 825, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00447-06>

PERIN, A. P. *et al.* Occurrence, quantification, pulse types, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* sp. isolated from chicken meat in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 335–345, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00188-x>

RAHN, K. *et al.* Amplification of *invA* gene of *Salmonella* by polymerase chain reaction as a specific method for detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 271–279, 1992. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90002-F](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-F)

RAWAT, D.; NAIR, D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. **Journal of global infectious diseases**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 263–274, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0974-777X.68531>

REDGRAVE, L. S. *et al.* Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 438–445, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>

REGALADO-PINEDA, I. D. *et al.* Three-year longitudinal study: Prevalence of *Salmonella* enterica in chicken meat is higher in supermarkets than wet markets from Mexico. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods9030264>

REJTHAROVÁ, M. *et al.* Persistence of chloramphenicol residues in chicken muscle tissue after a therapeutic dose administration. **Food Additives and Contaminants - Part A**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 547–551, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1253113>

RISTORI, C. A. *et al.* Assessment of Consumer Exposure to *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Meat Products at Retail in the City of Sao Paulo, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 447–453, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2270>

RIVERA-PÉREZ, W.; BARQUERO-CALVO, E.; ZAMORA-SANABRIA, R. *Salmonella* contamination risk points in broiler carcasses during slaughter line processing. **Journal of Food Protection**, Costa Rica, v. 77, n. 12, p. 2031–2034, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-052>

ROBERTS, M. C. Tetracycline resistance determinants: Mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiology Reviews**, Estados Unidos, v. 19, n. 1, p. 1–24, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(96\)00021-6](https://doi.org/10.1016/0168-6445(96)00021-6)

ROCHA, F. R.; PINTO, V. P. T.; BARBOSA, F. C. B. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 301–311, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0180>

ROSCHANSKI, N. *et al.* Retrospective Analysis of Bacterial Cultures Sampled in German Chicken-Fattening Farms During the Years 2011–2012 Revealed Additional VIM-1 Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* and a Serologically Rough *Salmonella* enterica Serovar Infantis. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 538, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00538>

ROTHROCK, M. J. *et al.* 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. **Poultry Science**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 467–472, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps/peu060>

SALIM, H. M. *et al.* Global restriction of using antibiotic growth promoters and alternative strategies in poultry production. **Science Progress**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 52–75, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3184/003685018X15173975498947>

SÁNCHEZ-OSUNA, M. *et al.* Origin of the mobile di-hydro-pterolate synthase gene determining sulfonamide resistance in clinical isolates. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 3332, p. 1–15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03332>

SEO, K. W., *et al.* Molecular characteristic of antimicrobial resistance of *Salmonella* Gallinarum isolates from chickens in Korea, 2014 to 2018. **Poultry Science**, [s. l.], v. 98, n. 11, p. 5416-5423. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps/pez376>

SILVA, F. B. da. **Pesquisa de *Salmonella* spp e *Escherichia coli* em cortes de frango temperado comercializados no município de Rio Verde, Goiás**. 2018. Dissertação - Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2018. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/9188/5/Dissertação - Flávio Barbosa da Silva - 2018.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2021.

SKÖLD, O. Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends. **Drug Resistance Updates**, Suécia, v. 3, n. 3, p. 155–160, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>

SMITH, S. M.; PALUMBO, P. E.; EDELSON, P. J. *Salmonella* strains resistant to multiple antibiotics: therapeutic implications. **Pediatric Infectious Disease**, Estados Unidos, v. 3, n. 5, p. 455–460, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00006454-198409000-00017>

SMITH, T.; MOORE, V. A. **Infectious Swine Diseases**. Washington, Estados Unidos: Secretary of Agriculture, Government Printing Office, 1894. Disponível em: <https://naldc.nal.usda.gov/download/5421276/PDF>. Acesso em: 28 jun. 2021.

STELLA, A. E. *et al.* Salmonelose Aviária. **Research, Society and Development**, Brasil, v. 10, n. 4, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.13835>

THUNG, T. Y. *et al.* Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in raw chicken meat at retail markets in Malaysia. **Poultry Science**, [s. l.], v. 95, n. 8, p. 1888–1893, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps/pew144>

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre, Brasil: Artmed, 2017.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

UE - União Europeia. **Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs** [S. l.]: Official Journal of the European Union, 2005. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=ES>. Acesso em: 29 jun. 2021.

USDA - United States Department of Agriculture. **Foreign Agricultural Service - Custom Query**. Department of Agriculture, Estados Unidos, 2021. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>. Acesso em: 25 fev. 2021.

VIANNA, J. *et al.* **Carne Fraca: ex-diretor-presidente da BRF é preso em nova fase da operação.** Paraná - BR: RPC Curitiba, G1 PR, TV Globo e GloboNews, 2018. Disponível em: <https://g1.globo.com/pr/parana/noticia/pf-vai-as-ruas-para-cumprir-mandados-da-nova-fase-da-operacao-carne-fraca.ghtml>. Acesso em: 15 mar. 2021.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, Brasil, v. 33, n. 4, p. 406–414, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.15343/0104-7809.20094406414>

VILELA, F. P. *et al.* Genotypic resistance to quinolone and tetracycline in *Salmonella* Dublin strains isolated from humans and animals in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, Brasil, v. 25, n. 2, p. 143–151, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0329>

VITAL, P. G.; CABALLES, M. B. D.; RIVERA, W. L. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. isolates from fresh produce and the impact to food safety. **Journal of Environmental Science and Health - Part B**, Filipinas, v. 52, n. 9, p. 683–689, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1331676>

VLIEGHE, E. R. *et al.* Azithromycin and Ciprofloxacin Resistance in *Salmonella* Bloodstream Infections in Cambodian Adults. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. e1933, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001933>

VOSS-RECH, D. *et al.* Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* isolated from human and poultry-related samples in Brazil: 20-year meta-analysis. **Foodborne Pathogens and Disease**, Brasil, v. 14, n. 2, p. 116–124, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2228>

WHO/FAO - World Health Organization/Food and Agriculture Organization. **Risk assessments for *Salmonella* in eggs and broiler chickens: interpretative summary.** [S. l.]: World Health Organization, 2002. (Microbiological risk assessment series ; no. 2). *E-book*. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42618>. Acesso em: 02 jul. 2021.

WHO - World Health Organization. **Antibiotic resistance.** World Health Organization, 2020a. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=What is antimicrobial resistance%3F,spring%20spread%2C%20severe%20illness%20and%20death](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=What%20is%20antimicrobial%20resistance%3F,spring%20spread%2C%20severe%20illness%20and%20death). Acesso em: 9 mar. 2021.

WHO - World Health Organization. **Food-borne diseases.** World Health Organization, 2021. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1. Acesso em: 1 mar. 2021.

WHO - World Health Organization. **Food safety.** World Health Organization, 2020b. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 1 mar. 2021.

WHO - World Health Organization. **Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe.** [S. l.]: WHO Regional Office for Europe, 2011. ISSN 1098-6596. Disponível em: <https://www.euro.who.int/en/publications/abstracts/tackling-antibiotic-resistance-from-a-food-safety-perspective-in-europe>. Acesso em: 07 jun. 2021.

WHO - World Health Organization. **WHO list of critically important antimicrobials for human medicine (WHO CIA list).** World Health Organization, 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325036>. Acesso em: 19 abr. 2021.

WOODWARD, T. E. *et al.* Preliminary report on the beneficial effect of chloromycetin in the treatment of typhoid fever. **Annals of Internal Medicine**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 131–134, 1948. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.7326/0003-4819-29-1-131>

YAMATOGLI, R. S. *et al.* Qualitative and Quantitative Determination and Resistance Patterns of *Salmonella* from Poultry Carcasses. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 79, n. 6, p. 950–955, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-489>

YANG, B. *et al.* Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 141, n. 1–2, p. 63–72, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.015>

ZANINELLI, R. L. *et al.* Salmoneloses na produção avícola - revisão bibliográfica. **Ciência Veterinária Unifil**, Brasil, v. 1, n. 3, p. 154–163, 2019. Disponível em: <http://periodicos.unifil.br/index.php/revista-vet/article/view/992>. Acesso em: 02 ago. 2021.

ZENG, H. *et al.* *Salmonella* prevalence and persistence in industrialized poultry slaughterhouses. **Poultry Science**, Bélgica, v. 100, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.01.014>

ZHU, D. *et al.* Prevalence of fluoroquinolone resistance and mutations in the *gyrA*, *parC* and *parE* genes of *Escherichia coli* isolated from ducks in China. **BMC Microbiology**, China, v. 19, n. 1, p. 271, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1659-4>

ZHU, Y. *et al.* Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. **International Journal of Food Microbiology**, China, v. 259, n. July, p. 43–51, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.023>

ZISHIRI, O. T.; MKHIZE, N.; MUKARATIRWA, S. Prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* spp. isolated from commercial chickens and human clinical isolates from south Africa and Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Brasil, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4102/ojvr.v83i1.1067>

ANEXO A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Pavelquesi et al., Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.15, n.1) p. 1 - 12 jan - mar (2021)

Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal
Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity
ISSN: 1981-2965



Qualidade microbiológica de linguiças de frango do tipo frescal comercializadas no Distrito Federal, Brasil

Microbiological quality of fresh chicken sausages marketed in the Federal District, Brazil

Sabrina Lunara Santos Pavelquesi¹, Bruna Ianka Bernardes de Jesus Gomes¹,
Stephanie Ramos Franca¹, Izabel Cristina Rodrigues da Silva¹, Daniela Castilho Orsi^{1*}

Resumo: As linguiças frescas estão entre os embutidos cárneos mais consumidos pela população brasileira devido ao preço acessível. Esse estudo avaliou a qualidade microbiológica de linguiças de frango frescas comercializadas no Distrito Federal. As análises realizadas foram: contagem total de bactérias mesófilas e psicrotóficas, determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus* e pesquisa de *Salmonella* spp. Os resultados mostraram que das 16 amostras de linguiça de frango analisadas, 10 amostras (62,5%) estavam impróprias para o consumo de acordo com a legislação brasileira, sendo que 9 amostras (56,3%) apresentaram elevada contagem de microrganismos mesófilos (> 6,0 log UFC/g) e 4 amostras (25,0%) estavam contaminadas com *Salmonella* spp. As bactérias *Salmonella* spp. foram geneticamente confirmadas através da detecção de gene *Inva* por PCR. Das 16 amostras de linguiça de frango analisadas neste estudo, 9 amostras (56,3%) estavam contaminadas por bactérias *S. aureus* (confirmadas geneticamente através da detecção de gene *Nuc* por PCR), sendo que 3 amostras (18,8%) apresentaram elevada contagem dessas bactérias (3,9-4,0 log UFC/g). Assim, o uso de matérias primas contaminadas, a falta de higiene durante o processamento e o armazenamento inadequado da linguiça frescal comprometem a sua qualidade e podem trazer risco a saúde do consumidor, pois a presença de bactérias patogênicas pode causar doenças de origem alimentar.

Termos para indexação: linguiça de frango; contaminação de alimentos; *Salmonella*.

Abstract: Fresh sausages are one of the meat products most consumed by the Brazilian population due to their affordable price. This study evaluated the microbiological quality of fresh chicken sausages marketed in the Federal District. The analyzes performed were: total count of mesophilic and psychrotrophic bacteria, determination of total coliforms and thermotolerant coliforms, count of *Staphylococcus aureus* and research of *Salmonella* spp. The results showed that of the 16 samples of chicken sausage analyzed, 10 samples (62.5%) were unfit for consumption according to Brazilian legislation, with 9 samples (56.3%) showing a high count of mesophilic microorganisms (> 6.0 log CFU / g) and 4 samples (25.0%) were contaminated with *Salmonella* spp. The bacteria *Salmonella* spp. were genetically confirmed by detection of the *Inva* gene by PCR. Of the 16 samples of chicken sausage analyzed in this study, 9 samples (56.3%) were contaminated by *S. aureus* bacteria (confirmed genetically through the detection of *Nuc* gene by PCR), and 3 samples (18.8%) presented high count of these bacteria (3.9-4.0 log CFU/g). Thus, the use of contaminated raw materials, the lack of hygiene during processing and the inadequate storage of fresh sausages compromises their

Artigo

Pavelquesi et al., Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.15, n.1) p. 1 - 12 jan - mar (2021)

quality and may pose a risk to consumer health, as the presence of pathogenic bacteria can lead to food-borne diseases.

Index terms: chicken sausage; food contamination; *Salmonella*.

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20210005>

Autor para correspondência email: danielacastilhoorsi@gmail.com

Received for publication 10.01.2020; approved on 30.012.2020

¹ Aluna de Mestrado em Ciências e Tecnologias da Saúde (UNB/FCE) - email: sabrinalunara@gmail.com

² Aluna de Graduação em Farmácia (UNB/FCE) - email: brunaiankaa@gmail.com

² Aluna de Graduação em Farmácia (UNB/FCE) - email: stephaninh@gmail.com

³ Professora na Universidade de Brasília (UNB/FCE), Laboratório de Controle de Qualidade - email: belbiomedica@gmail.com

³ Professora na Universidade de Brasília (UNB/FCE), Laboratório de Controle de Qualidade, Centro Metropolitano, Conjunto A, lote 01, Ceilândia, CEP: 72220-900, Brasília, DF, Brasil.*

Introdução

As linguiças frescas, também conhecidas como linguiças do tipo frescal, estão entre os produtos embutidos mais consumidos pela população brasileira devido ao preço acessível (CORREIA et al., 2014). As carnes mais utilizadas na produção dessas linguiças são de porco e de frango (CABRAL et al., 2014). O consumo de produtos contendo carne de frango como hambúrgueres, salsichas, nuggets, almôndegas e linguiças, aumentou nas últimas décadas, como resultado dos investimentos da indústria de alimentos em processar a carne de frango para prolongar sua vida útil (SHARMA et al., 2017).

A linguiça frescal é um produto embutido curado e cru, portanto, não sofre nenhum processo de cozimento durante sua produção e apresenta alta atividade de

água. Assim, esse produto tem um prazo de validade limitado e deve ser mantido em temperatura de refrigeração. As linguiças frescas são produtos perecíveis, pois são fabricadas a partir de carne moída fresca, assim, são favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos deterioradores e patogênicos e têm um alto teor de gordura favorável à oxidação lipídica (ALBERTI e NAVA, 2014; CABRAL et al., 2014; ED-DRA et al., 2018; HUGO e HUGO, 2015)

As prováveis fontes de contaminação microbiológica da linguiça frescal compreendem as carnes, os envoltórios, os condimentos, a manipulação, as máquinas, os utensílios, bem como a água utilizada em todas as operações do processamento (BEZERRA et al., 2012). O processo de produção da linguiça frescal envolve várias etapas de

Pavelquesi et al., Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.15, n.1) p. 1 - 12 jan - mar (2021)

manipulação do produto e caso essas etapas não sejam realizadas corretamente aumenta-se a chance de contaminação microbiológica por bactérias patogênicas, comprometendo a qualidade do produto (ED-DRA et al., 2018; VALIATTI et al., 2016).

A qualidade final da linguiça frescal também é dependente das temperaturas usadas para manter a cadeia de frio. Vários estágios da cadeia de frio, como transporte e salas de estocagem representam pontos críticos para os produtores. Varejistas nem sempre conseguem manter adequada à cadeia de frio, o que acarreta aumento dos riscos microbiológicos para produtos cárneos como a linguiça frescal (SOUZA, 2014).

O aumento da produção e do consumo de linguiça frescal faz com que surja uma preocupação em relação à segurança alimentar desse produto, visto que tais embutidos podem ser veiculadores de microrganismos causadores de doenças transmitidas por alimentos como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus* (ED-DRA et al., 2018; MERLINNI et al., 2012). Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de

linguiças de frango do tipo frescal comercializadas no Distrito Federal.

Material e Métodos

Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas

Foram coletadas dezesseis amostras de linguiças de frango do tipo frescal de diferentes marcas comerciais, dentro do prazo de validade e expostas ao consumo nos balcões refrigerados, em diferentes supermercados do Distrito Federal. Todas as amostras foram analisadas em três repetições, ou seja, foram retiradas três alíquotas de cada embalagem. Para o preparo das amostras, foram pesadas 25 g em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado, obtendo-se desta forma a primeira diluição (10^{-1}). A partir da primeira diluição obtiveram-se as demais diluições decimais (até 10^{-4}).

Para a contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas, as diluições de cada amostra foram semeadas, pelo método de superfície, no meio de cultivo Ágar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h para bactérias mesófilas e a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 7 dias para bactérias psicrotróficas.

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais

Pavelquesi et al., Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.15, n.1) p. 1 - 12 jan - mar (2021)

e de coliformes termotolerantes, as amostras foram analisadas conforme a técnica de tubos múltiplos, iniciando-se com o teste presuntivo, que consiste na inoculação de cada diluição das amostras em caldo Lauril Sulfato Tryptose. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 h. A positividade do teste caracterizou-se pela turvação do caldo com a produção de gás nos tubos de Durham. Alíquotas dos tubos positivos no teste presuntivo foram inoculadas, simultaneamente, em tubos de ensaio contendo caldo verde brilhante bile lactose a 2% (para a confirmação de coliformes totais) e caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h para o teste de coliformes totais e em banho-maria a 45°C por 24 h para o teste de coliformes termotolerantes.

Para a contagem de *S. aureus*, cada uma das diluições das amostras foi semeada, pelo método de superfície, no meio de cultivo Agar Sal Manitol. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. As colônias isoladas suspeitas de *S. aureus* foram reisoladas em tubos de Agar Sal Manitol e submetidas à coloração de Gram e identificação molecular através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Todos os resultados obtidos foram

expressos em média de log UFC/g ou média de log NMP/g. Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição 10⁻¹ das amostras foi incubada à 37°C por 24 h. Após a incubação, alíquotas do caldo de enriquecimento foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo selenito cistina. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semearam-se placas de Petri contendo o meio de cultivo Agar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. no XLD foram transferidas para tubos inclinados contendo o meio de cultivo Agar Três Açúcares e Ferro (TSI). Os tubos de TSI que apresentaram reações típicas de *Salmonella* foram submetidos às provas bioquímicas em Agar Lisina Ferro e Agar Fenilalanina. As cepas isoladas suspeitas de *Salmonella* spp. foram submetidas à identificação molecular por meio da técnica de PCR.

Identificação molecular de *S. aureus* e *Salmonella* spp.

Para extração do DNA, as colônias isoladas foram inoculadas, individualmente, em caldo Luria Bertani e incubadas a 37°C por 18 h. A extração do

Pavelquesi et al., Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.15, n.1) p. 1 - 12 jan - mar (2021)

DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto no kit comercial Plasmid DNA purification MACHEREY-NAGEL[®]. A qualidade e a quantidade de DNA extraídos foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA[®]). Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne[®] modelo TC-512. As condições de termociclagem foram 50°C por 2 min., 95°C por 2 min. e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg., seguida de 60°C por 30 seg., para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 seg. para a extensão dos fragmentos.

Foram utilizados 2,5 µL de tampão (10 mM de Tris e 50 mM de KCl), 0,7 µL

de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot[®], 5 U/µL), 1,5 µL de oligonucleotídeos forward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação, com a amplificação de 10 ng de DNA extraído da amostra bacteriana. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNAI/HindIII (JENA[®]). Para a identificação de *Salmonella* spp. foi utilizado o fragmento de 298 pares de base referente ao gene *invA* e para a identificação de *S. aureus* foi utilizado o fragmento de 105 pares de base referente ao gene *Nuc* (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados na PCR para identificação dos genes *invA* e *Nuc*

Primer	Sequência 5' - 3'	Produto amplificado	Bactéria
<i>invA</i> forward	CTCGCCTTTGCTGGTTTTAG		
<i>invA</i> reverse	CTCGCCTTTGCTGGTTTTAG	298 pb	<i>Salmonella</i> spp.
<i>Nuc</i> forward	TGTTTGATGATGCATTTGCTG		
<i>Nuc</i> reverse	AAAGGGCAATACGCAAAGAG	105 pb	<i>S. aureus</i>

Resultados e Discussão

Os resultados das análises microbiológicas das dezesseis amostras de linguiça de frango do tipo frescal analisadas no presente estudo estão apresentados na Tabela 2. A legislação brasileira (BRASIL, 2019) considera para produtos cárneos crus à base de carne moída ou picada de aves como linguiças frescas, como limite aceitável para microrganismos mesófilos valores que não excedam 6,0 log UFC/g. No total das 16 amostras de linguiça de frango analisadas neste estudo, 9 amostras (56,3%) apresentaram elevada contagem de bactérias mesófilas com valores médios variando de 6,7 a 8,6 log UFC/g, e portanto, estavam impróprias para o consumo.

Em relação as bactérias psicrotróficas, 7 amostras (43,8%) apresentaram elevadas contagens com valores médios variando de 6,6 a 8,3 log UFC/g

No estudo de Sharma et al. (2017) foi observado um aumento significativo da contagem de microrganismos mesófilos em linguiças de frango frescas durante o período de estocagem de 20 dias em temperatura de 4°C, sendo que até os 10 dias de estocagem a contagem de microrganismos mesófilos se manteve

abaixo de 6,0 log UFC/g e em 15 dias de estocagem essa contagem aumentou para 6,9 log UFC/g. Já no estudo de Serrano et al. (2018) das 39 amostras de linguiças frescas comercializadas na Suíça, 35 amostras (89,7%) apresentaram contagem de bactérias mesófilas maior que 6,0 log UFC/g.

O estudo de Correia et al. (2014) mostrou um aumento da contagem de bactérias psicrotróficas em linguiças frescas de 2,7-2,8 log UFC/g (no tempo zero de estocagem) para 8,6-9,6 log UFC/g (em 10 dias de estocagem) a 7°C. As bactérias psicrotróficas apresentam desenvolvimento em temperaturas de refrigeração, sendo capazes de deteriorar e diminuir a vida útil de alimentos refrigerados (BEZERRA et al., 2012).

A legislação brasileira (BRASIL, 2019) não estabelece um padrão microbiológico para enumeração de coliformes totais para a linguiça frescal, porém assim como as bactérias mesófilas e psicrotróficas, este grupo é um indicador da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos (ALBERTI e NAVA, 2014; SERRANO et al., 2018). Neste estudo, 4 amostras (25,0%) apresentaram condições insatisfatórias de higiene pelo elevado número de coliformes totais (acima de 3,0 log NMP/g).

Pavelquesi et al., Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.15, n.1) p. 1 - 12 jan - mar (2021)

Tabela 2. Análises microbiológicas das amostras de linguiça de frango do tipo frescal

Amostras	Bactérias mesófilas (log UFC/g)	Bactérias psicrotróficas (log UFC/g)	Coliformes totais (log NMP/g)	Coliformes termotolerantes (log NMP/g)	<i>S. aureus</i> (log UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp.
1	5,8 ± 0,01	5,8 ± 0,01	1,6 ± 0,63	0,2 ± 0,01	1,5 ± 0,42	Ausência
2	5,3 ± 0,11	5,0 ± 0,13	1,7 ± 0,50	0,5 ± 0,48	4,0 ± 0,06	Presença
3	4,8 ± 0,24	5,3 ± 0,41	2,4 ± 0,72	0,6 ± 0,32	3,9 ± 0,05	Ausência
4	5,7 ± 0,03	5,1 ± 0,05	1,5 ± 0,42	0,4 ± 0,38	1,8 ± 0,21	Ausência
5	2,8 ± 0,22	3,0 ± 0,13	1,2 ± 0,89	0,1 ± 0,01	ND	Ausência
6	4,9 ± 0,81	6,6 ± 0,01	1,4 ± 0,21	0,1 ± 0,01	1,3 ± 0,00	Ausência
7	7,2 ± 0,03	5,2 ± 0,18	3,1 ± 0,00	ND	ND	Ausência
8	7,2 ± 0,01	5,8 ± 0,02	1,7 ± 0,38	ND	4,0 ± 0,06	Ausência
9	7,5 ± 0,01	4,2 ± 0,10	1,9 ± 0,43	0,7 ± 0,20	ND	Ausência
10	6,2 ± 0,45	7,0 ± 0,17	3,1 ± 0,23	0,9 ± 0,45	ND	Presença
11	8,6 ± 0,23	7,4 ± 0,14	1,8 ± 0,92	ND	ND	Ausência
12	8,2 ± 0,37	7,9 ± 0,05	3,1 ± 0,01	0,7 ± 0,22	0,7 ± 0,99	Ausência
13	8,2 ± 0,15	7,8 ± 0,08	2,9 ± 0,28	0,2 ± 0,40	0,7 ± 0,99	Ausência
14	8,2 ± 0,06	7,7 ± 0,72	2,4 ± 0,80	1,1 ± 0,30	ND	Presença
15	3,9 ± 0,11	4,7 ± 0,11	2,6 ± 0,17	1,0 ± 0,99	ND	Ausência
16	6,7 ± 0,10	8,3 ± 0,20	3,1 ± 0,00	1,1 ± 0,99	1,3 ± 0,99	Presença

Os resultados foram expressos como médias ± desvio padrão de três repetições; ND = não detectado

Pavelquesi et al., Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.15, n.1) p. 1 - 12 jan - mar (2021)

No estudo de Silva et al. (2016) as amostras de linguiça frescal bubalina produzidas na Ilha do Marajó (Pará), apresentaram valores elevados de coliformes totais (acima de 3,0 log NMP/g) e segundo os autores esses resultados indicaram deficiências higiênicossanitárias no processamento dessas linguiças.

Para os coliformes termotolerantes a legislação brasileira (BRASIL, 2019) estabelece um limite de 3,7 log NMP/g para a linguiça de frango frescal. A

Resultados semelhantes a este estudo foram reportados por Bezerra et al. (2012), onde as 28 amostras de linguiça frescal analisadas encontraram-se dentro dos limites aceitáveis para coliformes termotolerantes. Porém, outros estudos reportaram contagens mais elevadas de coliformes termotolerantes em amostras de linguiças frescas. No estudo de Merlini et al. (2012), das 40 amostras de linguiça frescal analisadas, 20 amostras (50%) apresentaram excesso de coliformes termotolerantes e estavam impróprias para o consumo. No estudo de Alberti e Nava (2014), observou-se que 67% das linguiças frescas obtidas em supermercados no município de Xaxim (Santa Catarina) apresentaram valores insatisfatórios para coliformes termotolerantes. E no estudo de Souza et al. (2014), 16 amostras de linguiças frescas (40%) comercializadas

presença de coliformes termotolerantes é indicativa de contaminação fecal direta ou indireta no alimento, sendo *E. coli* a principal bactéria representante desse grupo (ALBERTI e NAVA, 2014; SOUZA et al., 2014). Todas as amostras deste estudo apresentaram um número aceitável de coliformes termotolerantes: 13 amostras (81,3%) com valores entre 0,1 e 1,1 log NMP/g e 3 amostras (18,8%) não apresentaram coliformes termotolerantes.

no oeste do Paraná estavam inaceitáveis para o consumo devido ao excesso de coliformes termotolerantes.

Das 16 amostras de linguiça de frango analisadas neste estudo, 9 amostras (56,3%) estavam contaminadas por bactérias *S. aureus*, sendo que 3 amostras (18,8%) apresentaram elevada contagem dessas bactérias (3,9-4,0 log UFC/g). O limite permitido pela legislação brasileira era de 3,7 log UFC/g (BRASIL, 2001), porém com a recente atualização da legislação (BRASIL, 2019) não existe mais um limite microbiológico para *S. aureus* nas linguiças frescas.

No estudo de Valiatti et al. (2016), das 30 amostras de linguiças frescas analisadas comercializadas em supermercados do município de Ji-Paraná (Rondônia), 2 amostras (6,7%) apresentaram contagem de *S. aureus* acima

Pavelquesi et al., Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.15, n.1) p. 1 - 12 jan - mar (2021)

de 3,7 log UFC/g. A presença de bactérias *S. aureus* na linguiça frescal indica falta de higiene do manipulador, pois essa bactéria está comumente presente na microbiota humana. A bactéria *S. aureus* é transmitida aos alimentos principalmente pelas condições inadequadas de higiene, possibilitando também contaminações cruzadas por contato com equipamentos, utensílios e com a matéria-prima (SERRANO et al., 2018; VALIATTI et al., 2016). O estudo de Correia et al. (2014) avaliou o efeito da concentração de nitrito (50, 150 e 200 ppm) frente à contaminação proposital por *S. aureus* em linguiças frescas armazenadas a 7 e 12°C e estocadas por 10 dias. Os resultados demonstraram que em 10 dias de estocagem as contagens de *S. aureus* foram elevadas variando de 4,5 a 5,7 log UFC/g, mostrando que a temperatura de refrigeração e as concentrações de nitrito utilizadas não exerceram controle efetivo das bactérias *S. aureus*. A presença elevada de bactérias *S. aureus* nos alimentos pode causar risco a saúde, pois muitas cepas são produtoras de toxinas estafilocócicas termoresistentes e podem causar intoxicação alimentar no consumidor (SERRANO et al., 2018; VALIATTI et al., 2016).

As bactérias *S. aureus* foram confirmadas nas amostras de linguiças de

frango através da identificação do gene *Nuc*, que codifica uma termonuclease produzida por *S. aureus*, sendo essencial para a sua patogênese e exclusivo para as bactérias dessa espécie (KIEDROWSKI et al., 2011).

A legislação brasileira (BRASIL, 2019) não permite a presença de *Salmonella* spp. em linguiças frescas. No presente estudo, 4 amostras (25,0%) estavam contaminadas com *Salmonella* spp. e, portanto, estavam impróprias para o consumo.

Resultados similares foram reportados no estudo de Cabral et al. (2014), onde investigou-se a presença de *Salmonella* em 80 amostras de linguiças frescas de frango e de porco e a positividade foi de 26%, sendo que os autores também utilizaram o gene *InvA* para a confirmação molecular de *Salmonella* spp.

Ainda nesse estudo, a embalagem original ou a embalagem nas bandejas de poliestireno realizada pelos supermercados não teve influência significativa nas taxas de contaminação dessas linguiças com *Salmonella*, sugerindo que a matéria prima contaminada e as práticas inadequadas de higiene durante o processo de fabricação são os principais fatores que aumentam a contaminação da linguiça frescal por *Salmonella*.

Pavelquesi et al., Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.15, n.1) p. 1 - 12 jan - mar (2021)

No estudo de Cavalin et al. (2018), *Salmonella* spp. foi isolada em 13 amostras (28,3%) de linguiças frescas de porco e os autores sugeriram que a presença dessa bactéria nas amostras ocorreu devido a contaminação da planta de processamento e ou das matérias primas utilizadas na fabricação das linguiças. Valiatti et al. (2016) reportaram que das 30 amostras de linguiças frescas comercializadas em Ji-Paraná, (Rondônia), 6 amostras (20%) apresentaram *Salmonella* spp. A presença de *Salmonella* nos alimentos gera risco a saúde do consumidor, sendo essa bactéria entérica responsável por quadros frequentes de surtos de doenças alimentares no Brasil (DRAEGER et al., 2019).

As bactérias *Salmonella* foram confirmadas nas amostras de linguiças de frango através da identificação do gene *invA* que contém sequências exclusivas para esse gênero. A presença do gene *invA* indica que a *Salmonella* possui um eficiente mecanismo de entrada e invasão do epitélio intestinal e essa invasão é um fator de virulência essencial no processo de infecção causado por tal patógeno, assim, o gene *invA* é reconhecido como padrão internacional para detecção de *Salmonella* (MOURA, et al., 2014; SHANMUGASAMY, et al., 2011).

Conclusões

Os resultados do estudo mostraram que das 16 amostras de linguiça de frango analisadas, 10 amostras (62,5%) estavam impróprias para o consumo de acordo com a legislação brasileira, sendo que 9 amostras (56,3%) apresentaram elevada contagem de microrganismos mesófilos (> 6,0 log UFC/g) e 4 amostras (25,0%) estavam contaminadas com *Salmonella* spp.

Em relação as bactérias *S. aureus*, 9 amostras (56,3%) estavam contaminadas por essas bactérias, sendo que 3 amostras (18,8%) apresentaram contagem elevada de *S. aureus* (3,9-4,0 log UFC/g).

Por ser um alimento amplamente consumido no Brasil, a cadeia produtiva das linguiças frescas deveria ser mais rigorosa em relação à qualidade das matérias primas, higiene na produção e manutenção da cadeia do frio, podendo com essas medidas minimizar a contaminação microbiana e melhorar a qualidade desse produto.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Pavelquesi et al., Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.15, n.1) p. 1 - 12 jan - mar (2021)

Referências Bibliográficas

- ALBERTI, J.; NAVA, A. Avaliação higiênicossanitária de linguiças tipo frescal comercializadas a granel por supermercados e produzidas artesanalmente no município de Xaxim, SC. *Unoesc & Ciência*, Joaçaba, v. 5, n. 1, p. 41-48, 2014.
- BEZERRA, M.V.P.; ABRANTES, M.R.; SILVESTRE, M.K.S.; SOUSA, E.S.; ROCHA, M.O.C.; FAUSTINO, J.G.; SILVA, J.B.A. Avaliação microbiológica e físico-química de linguiça toscana no município de Mossoró, RN. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 79, n. 2, p. 297-300, 2012.
- BRASIL, Agência Nacional Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-ndeg-60-de-23-de-dezembro-de-2019.pdf/view>
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. *Diário oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, nº7 p. 45-53, de 10 de janeiro de 2001.
- CABRAL, C.C.; CONTE-JUNIOR, C.A.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. *Salmonella* spp. contamination in fresh pork and chicken sausages marketed in Niterói and Rio de Janeiro, Brazil. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, v. 9, n. 3, p. 243–249, 2014.
- CAVALIN, P.B.B.; SARMIENTO, J.J.P.; KOBAYASHI, R.K.T.; NAKAZATO, G.; OCAÑA, A.N.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Detection of *Salmonella* spp. and diarrheagenic *Escherichia coli* in fresh pork sausages. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 39, n. 4, p. 1533-1546, 2018.
- CORREIA, L.M.M.; PEREIRA, J.G.; PINTO, J.P.A.N.; BARCELLOS, V.C.; BERSOT, L.S. Behavior of *Staphylococcus aureus* and autochthone microbiota in fresh sausages added of sodium nitrite and stored under refrigeration. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 44, n. 10, p. 1880-1885, 2014.
- DRAEGER, C.L.; AKUTSU, R.C.C.A.; ZANDONADI, R.P.; DA SILVA, I.C.R.; BOTELHO, R.B.A.; ARAÚJO, W.M.C. Brazilian foodborne disease national survey: Evaluating the landscape after 11 years of implementation to advance research, policy, and practice in public health. *Nutrients*, v. 11, p. 2-10, 2019.
- ED-DRA, A.; FILALI, F.R.; BOUYMAJANE, A.; BENHALLAM, F.; ALLAoui, A.E.; CHAIBA, A.; GIARRANTANA, F. Antibiotic susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolated from sausages in Meknes, Morocco. *Veterinary World*, v. 11, n. 10, p. 1459–1465, 2018.
- HUGO, C.J.; HUGO, A. Current trends in natural preservatives for fresh sausage products. *Trends in Food Science & Technology*, v. 45, n. 1, p. 12–23, 2015.
- KIEDROWSKI, M.R.; KAVANAUGH, J.S.; MALONE, C.L.; MOOTZ, J.M.; VOYICH, J.M.; SMELTZER, M.S.; BAYLES, K.W.; HORSWILL, A.R. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, v. 6, n. 11, p. 1-16, 2011.

Pavelquesi et al., Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.15, n.1) p. 1 - 12 jan - mar (2021)

- MERLINNI, L.S.; BEGOTTI, I.L.; MERLINI, N.B.; CAETANO, I.C.S. Avaliação higiênicossanitária de linguiças tipo frescal produzidas artesanalmente na região noroeste do Paraná. Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, n. 15, p. 344-352, 2012.
- MOURA, M.S.; OLIVEIRA, R.P.; MELO, R.T.; MENDONÇA, E.P.; FONSECA, B.B.; ROSSI, D.A. Genes de virulência e diversidade genética em *Salmonella* spp. isoladas de amostras de origem suína. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.66, n.5, p.1367-1375, 2014.
- SERRANO, N. S., SWEIFEL, C., CORTI, S. STEPHAN, R. Microbiological quality and presence of foodborne pathogens in raw milk cheeses and raw meat products marketed at farm level in Switzerland. Italian Journal of Food Safety, v. 7, p. 110–115, 2018.
- SHANMUGASAMY, M.; VELAYUTHAM, T.; RAJESWAR, J. InvA gene specific PCR for detection of *Salmonella* from broilers. Veterinary World, v. 4, n. 12, p. 562-564, 2011.
- SHARMA, H.; MENDIRATTA, S.K.; AGARWAL, R.K.; KUMAR, S.; SONI, A. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of various essential oils in fresh chicken sausages. Journal of Food Science and Technology, v. 54, n. 2, p. 279–292, 2017.
- SILVA, A.P.M.; BIBIANO, J.N.; PORTAL, R.S.; SILVA, J.C.C.; NEVES, I.D.L.; FIGUEIREDO, E.L. Avaliação microbiológica da linguiça artesanal bubalina produzida na Ilha do Marajó, Pará, Brasil. Scientia Plena, v. 12, n. 06, p. 1–6, 2016.
- SOUZA, S.A. Avaliação dos efeitos de diferentes temperaturas de congelamento e armazenamento sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais de linguiça suína tipo frescal. 2014. 61 p. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, 2014.
- SOUZA, M.; PINTO, F. G. S.; BONA, E. A. M.; MOURA, A. C. Qualidade higiênicossanitária e prevalência de sorovares de *Salmonella* em linguiças frescas produzidas artesanalmente e inspecionadas, comercializadas no oeste do Paraná, Brasil. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.81, n.2, p. 107-112, 2014.
- VALIATTI, T.B.; BARCELOS, I.B.; CALEGARI, G.M.; SILVA, W.M.C.; ALMEIDA, F.K. V.; PRAZERES, P.F.L.; SOBRAL, F.O.S.; ROMÃO, N.F.; GASPAROTTO, P.G.H. Avaliação microbiológica de linguiças tipo frescal comercializadas em supermercados do município de Ji-Paraná, Rondônia. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, v. 14, n. 2, p. 678–686, 2016.

ANEXO B - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO

Normas para Publicação de Trabalhos

Guia para os Autores (Português)

A Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal - Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity, é um órgão oficial de divulgação do *Colégio Brasileiro de Ultrassonografia Animal (CBUA)*, entidade sem fins lucrativos com início em 2019, CNPJ 33.210.465 0001 - 26 e *Universidade Federal do Ceará (UFC)* desde 2007. Tem como objetivo publicar temas relativos ao estudo das principais doenças infecciosas, contagiosas e parasitárias emergentes. Saúde pública veterinária / saúde pública humana – zoonoses, como também na aplicação de diagnósticos (ultrassom) de patologias em diversas espécies animais bem como de assuntos correlatos. A revista tem periodicidade trimestral. Os trabalhos podem ser submetidos em língua portuguesa, inglesa e espanhola.

O envio dos trabalhos deverá ser feito por e - mail (rev.hig.san@gmail.com), juntamente com a carta de encaminhamento e a taxa de pagamento, constando o endereço completo da Instituição e E-mail do autor ou autores correspondentes ao artigo.

Este periódico não faz qualquer restrição à titulação acadêmica mínima para submissão de trabalhos e a avaliação é por dois ou três revisores ad hoc e pelo Corpo Editorial. O conteúdo dos artigos publicados é de exclusiva responsabilidade de seus autores e os direitos de publicação são da RBHSA, sendo o conteúdo disponibilizado com acesso livre na Internet (www.higieneanimal.ufc.br). Este periódico oferece a todos os pesquisadores acesso eletrônico livre para consulta de todos os trabalhos, desde seu primeiro volume publicado em 2007. **Qualis CAPES - 2015 - Ensino: B3, Engenharia III B4.**

Custo de publicação

No ato da submissão é requerido um depósito de R\$ 250,00 (duzentos e cinquenta reais) não reembolsáveis para compor as despesas com a editoração, publicação e atribuição do **Digital Object Identifier - DOI**. Se o trabalho for rejeitado na avaliação prévia do Comitê Editorial, a taxa paga não poderá ser reutilizada para outras submissões dos autores e nem tampouco a devolução do depósito já efetuado. O comprovante de depósito ou transferência deve ser enviado via e-mail da RBHSA (rev.hig.san@gmail.com). Os depósitos ou transferências deverão ser efetuados em nome do: **COLÉGIO BRASILEIRO DE ULTRASSONOGRÁFIA ANIMAL (CBUA)** – CNPJ – 33.210.465.0001 - 26 - Banco do Brasil: Agência bancária: 3655-2 - Conta corrente: 75.042-5.

Digitação

O trabalho deverá ser digitado em tamanho A 4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaçamento entre linhas 1,5 linhas, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.

Estrutura

O artigo científico deverá ser redigido obedecendo a seguinte ordem de estrutura: título, title, autores, resumo (incluindo termos para indexação), abstract (incluindo index terms), introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusões, agradecimentos (opcional) e referências bibliográficas. Notas científicas não necessitam obedecer a estrutura do artigo, mas devem ter, obrigatoriamente, resumo (incluindo termos para indexação), title e abstract (incluindo index terms).

Título

Deve ser escrito com apenas a inicial maiúscula, em negrito e centralizado na página. A chamada de rodapé sem traços para identificação deve ser extraída do título, devendo constar informações sobre a natureza do trabalho (se extraído de tese/dissertação) e referências a instituições colaboradoras. Os títulos das demais seções da estrutura deverão ser escritos com apenas a inicial maiúscula, em negrito, localizados no início da linha.

Autores

Os nomes completos deverão vir abaixo do título, somente com a primeira letra maiúscula, um após outro, separados por vírgula e centralizados na linha. Como chamada de rodapé na primeira página, deve-se indicar, de cada autor, a formação acadêmica, instituição onde trabalha e endereço eletrônico.

Resumo e abstract

Devem começar com estas palavras, na margem esquerda, com apenas a inicial maiúscula, em negrito, contendo no máximo 250 palavras cada e entre três e cinco termos para indexação, os quais não devem constar no título.

Citação de autores no texto

Serão feitas pelo sobrenome, com apenas a primeira letra em maiúscula, seguido do ano de publicação. Citação com apenas um autor usar da seguinte forma: Santos (2002) ou (Santos, 2002); com dois autores, usar Pereira & Freitas (2002) ou (Pereira & Freitas, 2002); com três ou mais autores, usar Xavier et al. (1997) ou (XAVIER et al., 1997).

Tabelas

Serão denominadas de Tabela (em negrito), numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na parte superior. Não usar linhas verticais. As linhas horizontais devem ser usadas para separar o título do cabeçalho e este do conteúdo, além de uma no final da tabela. Cada dado deve ocupar uma célula distinta.

Figuras

Gráficos, fotografias ou desenhos levarão a denominação geral de Figura (em negrito) sucedida de numeração arábica crescente e legenda na parte inferior. Para a preparação dos gráficos deve-se utilizar “softwares” compatíveis com “Microsoft Windows” (“Excel”, “Power Point”, “Harvard Graphics”, etc.). Gráficos e figuras confecciona em

planilhas eletrônicas devem vir acompanhados do arquivo com a planilha original. Fotos e desenhos devem ser digitalizados; escaneados com 300 dpi, gravados em arquivo nos formatos TIF ou JPG e enviados em arquivos separados do arquivo de texto. Evitar tabelas e figuras com largura superior a 17 cm.

Agradecimentos

Logo após as conclusões poderão vir os agradecimentos a pessoas ou instituições, em estilo sóbrio e claro, indicando as razões pelas quais os faz.

Referências Bibliográficas

Deverão ser apresentadas em ordem alfabética de autores e numeradas de acordo com a NBR 6032 de agosto/2000 da ABNT e conter os nomes de todos os autores.

As referências são utilizadas para convencer o leitor acerca da validade dos fatos e argumentos apresentados. Quando adequadamente escolhidas, fornecem maior credibilidade ao trabalho. **Observação:** deve-se priorizar a citação de referências atualizadas, ou seja, publicadas nos últimos cinco anos, considerando o momento da submissão do manuscrito. *Devem ser citadas de periódicos científicos indexados em bases de dados nacionais e internacionais que foram consultadas na íntegra pelo autor e que tenham relação direta, relevante com o assunto abordado;* Não incluir na lista referências que não possam ser recuperadas no original pelo leitor, como teses e dissertações, trabalhos de conclusão de curso e outras fontes inacessíveis (apostilas, anais etc.) ou obras de reduzida expressão científica. A atualidade da referência, isto é, a citação de obras recentes, com menos de cinco anos, é essencial em artigos originais; As referências a artigos publicados em periódicos latino-americanos e que possuem versão em inglês, deverão ser citadas com o título em inglês; Não incluir mais de 20 referências e menos de 15. Todas enumeradas. Veja alguns detalhes citados abaixo.

Alguns exemplos:

Livro

DOMINGUES, P.F., LANGONI, H. Manejo Sanitário Animal. 1th ed. Rio de Janeiro: EPUB, 2001. 210p.

FORTES, E. Parasitologia veterinária. 3a.ed. São Paulo: Ícone. 686p.

GEORGI, J.R. Parasitologia veterinária. 4a. ed. São Paulo: Manole, 1988. 379p.

Capítulo de livro

AKIBA, M.; TANIKAWA, E.; FUJII, Y. Volatile basic nitrogen (VBN) as a freshness Indicator of fish for canning. In: FAO Technical conference of fish inspection and quality control, 1st, Halifax, 1969. 4 p. (FE: FJC/69/0/52).

Tese/dissertação

PINHEIRO, R.R. Vírus da Artrite encefálica caprina. Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot -Blot) e estudo epidemiológico no Estado

do Ceará. Belo Horizonte, 2001. 115p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) –Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2001.

Artigo de revista

CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes(CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. Pesquisa Veterinária Brasileira , Viçosa, v.3, n.21, p.87-97, jan. 2001.

Resumo de trabalho de congresso

SALES, R.O. & DE OLIVEIRA, A.C. Comparação entre cromatografia gasosa e de troca iônica para avaliação da qualidade nutricional da proteína da silagem da despesca da tilápia do Nilo. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15o., 1996, Poços de Caldas - Minas Gerais, Anais...Poços de Caldas: SBCTA, 1996. p.

Trabalho de congresso pela Internet

SILVA, R.N.; OLIVEIRA, R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 4., 1996, Recife. Anais eletrônicos... Recife: UFPE, 1996.
Disponível em <<http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais/educ/ce04.htm>>. Acesso em: 21 jan. 1997.

Trabalho de congresso em CD

CANDIDO, M.J.D.; BENEVIDES, I.I.; FARIAS, S.F. et al. Comportamento de ovinos em pastagem irrigada sob lotação rotativa com três períodos de descanso. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande, Anais...Campo Grande: SBZ/EMBRAPA Gado de Corte, 2004, (CD -ROM-AMB 055).

Nas referências atentar para esses detalhes.

1.ANTUNES, M.C. et al. Postharvest quality of strawberry produced during two consecutive seasons. Horticultura Brasileira, v.32, n.2, p.168-173, Apr./Jun. 2014. Available from: <Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-05362014000200168&script=sci_arttext >. Accessed: Apr. 01, 2015. doi: 10.1590/S0102-05362014000200008. [[Links](#)]

2.CAPRONI, C.M. et al. Produção sustentável de morangueiro. Revista Agrogeoambiental, v.5, n.3, p.91-98, Dec. 2013. Available from: <Available from: <http://agrogeoambiental.ifsuldeminas.edu.br/index.php/Agrogeoambiental/article/view/545/544> >. Accessed: Apr. 22, 2015. [[Links](#)]

3.COCCO, C. et al. Strawberry yield submitted to different root pruning intensities of transplants. Revista Brasileira de Fruticultura, v.34, n.4, p.1284-1288, Dec. 2012. Available from: <Available from: >

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452012000400039 >. Accessed: Mar. 23, 2015. **doi:** 10.1590/S0100-29452012000400039. [[Links](#)]

4.HENZ, G.P. Desafios enfrentados por agricultores familiares na produção de morango no Distrito Federal. Horticultura Brasileira, v.28, n.3, p.260-265, Jul./Sep. 2010. Available from: <Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362010000300003 >. Accessed: Mar. 12, 2015. **doi:** 10.1590/S0102-05362010000300003. [[Links](#)]

5.MAZARO, S.M. et al. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-s-metil. Revista Brasileira de Fruticultura, v.30, n.1, p.185-190, Mar. 2008. Available from: <Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452008000100034&script=sci_abstract&tlng=pt >. Accessed: Apr. 22, 2015. **doi:** 10.1590/S0100-29452008000100034. [[Links](#)]

6.MIRANDA, F.R. et al. Production of strawberry cultivars in closed hydroponic systems and coconut fibre substrate. Revista Ciência Agronômica, v.45, n.4, p.833-841, Oct./Dec. 2014. Available from: <Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rca/v45n4/22.pdf> >. Accessed: Feb. 27, 2015. [[Links](#)]

7.NUNES, C.F. et al. The genetic diversity of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) hybrids based on ISSR markers. Acta Scientiarum. Agronomy, v.35, n.4, p.443-452, Oct. 2013. Available from: <Available from: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/16737> >. Accessed: Mar. 10, 2015. **doi:** 10.4025/actasciagron.v35i4.16737. [[Links](#)]

8.NYOIKE, T.W. et al. Confirmation of *Meloidogyne hapla* on strawberry in Florida using molecular and morphological techniques. Nematropica, v.42, n.2, p.253-259, Dec. 2012. Available from: <Available from: <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/81857/78980> >. Accessed: Mar. 21, 2015. [[Links](#)]

9.PINHEIRO, J.B. et al. Reação de genótipos de *Capsicum* ao nematóide-das-galhas. Horticultura Brasileira, v.32, n.3, p.371-375, Jul./Sep. 2014. Available from: <Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-05362014000300371&script=sci_arttext >. Accessed: Mar. 12, 2015. **doi:** 10.1590/S0102-05362014000300022. [[Links](#)].

Informações Gerais

Missão Publicar Artigos Técnico - Científicos (trabalhos originais) de importância nacional e internacional inerentes com o objetivo de publicar temas relativos ao estudo das principais doenças infecciosas, contagiosas e parasitárias emergentes. Saúde pública veterinária / saúde pública humana – zoonoses, como também na aplicação de diagnósticos (ultrassom) de patologias em diversas espécies animais bem como de assuntos correlatos.

Público

Aberta aos profissionais de nível superior, professores, pesquisadores e estudantes ligados às áreas de Medicina Veterinária e recursos naturais.

Política editorial

Trabalhos submetidos à publicação serão enviados a três revisores e publicados somente, os artigos aprovados pelo menos por dois revisores e pelo corpo editorial. Os revisores de cada artigo serão, obrigatoriamente, de instituições distintas daquela de origem dos autores. As opiniões emitidas nos trabalhos são de exclusiva responsabilidade de seus autores.

Declaração de Direito Autoral

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

Ronaldo de Oliveira Sales
Editor-in-Chief
Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal
Fortaleza -CE, Brasil
E-mail (rev.hig.san@gmail.com).

ANEXO C - QUALIS DO PERIÓDICO NA ÁREA INTERDISCIPLINAR

27/07/2021

Plataforma Sucupira

CORONAVÍRUS (COVID-19) (HTTP://WWW.SAUDE.GOV.BR/CORONAVIRUS)

ACESSO À INFORMAÇÃO (HTTP://WWW.ACESSOINFORM/



ACESSO RESTRITO

(/sucupira/portais/menu_portal.jsf)

INÍCIO (/SUCUPIRA/PUBLIC/INDEX.JSF) >> Qualis >> Qualis Periódicos



Qualis Periódicos

*** Evento de Classificação:**

Área de Avaliação:

 INTERDISCIPLINAR

ISSN:

Título:

 Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal

Classificação:

 -- SELECIONE --

Consultar Cancelar

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1981-2965	REVISTA BRASILEIRA DE HIGIENE E SANIDADE ANIMAL	INTERDISCIPLINAR	B2

Início Anterior 1 Próxima Fim

1 a 1 de 1 registro(s)

(/sucupira/public/index.xhtml)