UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* DERBY ORIGINADA DA CADEIA PRODUTIVA DE SUÍNOS: FORMAÇÃO DE BIOFILME, RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E PERFIL DE MACRO-RESTRIÇÃO (PFGE)

CINTIA SIMONI

PORTO ALEGRE
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* DERBY ORIGINADA DA CADEIA PRODUTIVA DE SUÍNOS: FORMAÇÃO DE BIOFILME, RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E PERFIL DE MACRO-RESTRIÇÃO (PFGE)

Autora: Cintia Simoni

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, com ênfase em Bacteriologia.

Orientadora: Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Co-orientadora: Dra. Graciela Volz Lopes

PORTO ALEGRE
2016

CIP - Catalogação na Publicação

Simoni, Cintia
CARACTERIZAÇÃO DE Salmonella DERBY ORIGINADA DA CADEIA PRODUTIVA DE SUÍNOS: FORMAÇÃO DE BIOFILME, RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E PERFIL DE MACRO-RESTRIÇÃO (PFGE) / Cintia Simoni. -- 2016.
87 f.

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.
Coorientadora: Graciela Volz Lopes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Salmonella Derby. 2. resistência a antimicrobianos. 3. biofilmes. I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema, orient. II. Lopes, Graciela Volz, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cintia Simoni

Caracterização de *Salmonella* Derby originada da cadeia produtiva de suínos: formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e perfil de macro-restrição (PFGE)

Aprovado em 20 de abril de 2016.

APROVADO POR

_____

Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Orientadora e Presidente da Comissão

APROVADO POR

_____

Dra. Graciela Volz Lopes

Co-orientadora

APROVADO POR

_____

Dra. Marisa da Costa

Membro da Comissão

APROVADO POR

_____

Dra. Amanda de Souza de Motta

Membro da Comissão

APROVADO POR

_____

Dra. Franciele Maboni

Membro da Comissão

Dedico aos meus pais, Adelar e Margarete, e às minhas irmãs, Ethel e Renata, por toda a compreensão e incentivo. Ao meu namorado, Amyr, pelo apoio e estima, e a todos que de alguma forma participaram desta jornada comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a minha família, colegas e amigos, por estarem sempre ao meu lado, com o apoio e a força necessários para nunca desistir. Aos meus pais e minhas irmãs, por acreditarem em mim e me incentivarem a sempre persistir. À minha querida avó, pelas rezas incansáveis e por todos os pensamentos positivos. Ao meu namorado e família, que sempre me receberam de braços abertos.

À Profa. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, pelos ensinamentos e toda a dedicação e cuidados prestados.

À Dra. Graciela Volz Lopes, pela orientação e amizade oferecida ao longo desta jornada.

Aos colegas Caroline Pissetti, Marjo Cadó Bessa, Lisandra Mürmann, Luis Eduardo da Silva, Patrícia Schwarz e Sandra Maria Ferraz Castagna, pelo empréstimo das cepas que fizeram parte deste trabalho.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva UFRGS: Amanda Dias de Oliveira, Caroline Pissetti, Cláudia Navarrete, Daniel Paim, Eduardo Costa, Franciele Caetano, Gabriela Orosco Werlang, Gustavo Machado, Gustavo Souza Silva, Mariana Ortiz, Paola Roppa, Tatiana Vieira, Thais de Campos Ausani, Vanessa Laviniki, Waldemiro Neto e Dona Bernadete Franco, por todos os ensinamentos, ajuda nas diversas tarefas, incentivos e alegrias.

Aos colegas do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária UFRGS, Dra. Karen Apellanis Borges e Dr. Thales Quedi Furian, pela disponibilidade e auxílio durante a realização dos experimentos.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

Salmonella enterica subsp. *enterica* sorovar Derby (*S.* Derby) é um dos sorovares mais frequentemente detectados na cadeia produtiva de suínos na região sul do Brasil. Estudos prévios indicaram que isolados de *S.* Derby apresentando perfis similares de resistência a antimicrobianos estavam circulando ao longo dos anos nesta região. A sobrevivência de *Salmonella* no ambiente e a persistência no hospedeiro são facilitadas pela sua habilidade em formar biofilmes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar a presença de grupos clonais entre 140 isolados de *S.* Derby coletados ao longo de um período de dez anos de diferentes origens da cadeia produtiva de suínos (linfonodos, conteúdo intestinal, ambiente e produtos suínos). Para tanto, o perfil de resistência a antimicrobianos, através de dois conceitos distintos de avaliação de resistência (valores ECOFF e valores de *breakpoint*), a habilidade em formar biofilmes e a caracterização genotípica por macro-restrição (PFGE) foram avaliados. A determinação do MIC foi realizada em todos os isolados, frente aos seguintes antimicrobianos: ácido nalidíxico, ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina, colistina, florfenicol, gentamicina, estreptomicina e tetraciclina. Para avaliar a capacidade de *S.* Derby em formar biofilmes, três metodologias foram aplicadas: *i.* morfologia de colônia em ágar contendo Vermelho Congo, para determinar a detecção fenotípica de fímbria *curli* e celulose; *ii.* formação de biofilme na interface ar-líquido em caldo LB; *iii.* aderência em microplacas de poliestireno de 96 poços. No total, apenas 17 (12,1%) isolados puderam ser classificados como suscetíveis a todos os antimicrobianos testados. As maiores frequências de populações "non-Wild Type" (nWT) foram observadas frente a tetraciclina (75,7%), estreptomicina (70%) e colistina (11,4%), enquanto que não foram detectadas populações nWT para ciprofloxacina, ceftazidima e gentamicina. Multi-resistência (resistência a $\geq$ 3 antimicrobianos; de acordo com valores de *breakpoint*) foi detectada em 8,6% dos isolados. Em ágar contendo Vermelho Congo, três diferentes morfologias de colônia foram observadas. A morfologia Rdar (vermelha, seca e rugosa) foi a mais frequente, sendo detectada em 59 isolados (42,1%); enquanto que as morfologias Saw (branca e mucoide) e Pdar (rosa, seca e rugosa) foram observadas em 46 (32,9%) e em 35 (25%) dos isolados, respectivamente. Os morfotipos Rdar e Pdar, que em conjunto albergaram a maioria dos isolados, são considerados os mais usualmente observados em isolados de *Salmonella* capazes de formar biofilme. A formação de película rígida, sem dispersão por agitação, foi observada em 24 amostras (17,1%) em caldo LB convencional e em 78 amostras (55,7%) em caldo LB *low salt*, sendo todas pertencentes aos morfotipos Rdar ou Pdar. Em placas de poliestireno de 96 poços, um grande número (n=96; 68,6%) dos isolados foram fracamente ou moderadamente produtores de biofilme, incluindo todos os isolados que apresentaram os morfotipos Rdar e Pdar. Através dos perfis de formação de biofilme e de resistência a antimicrobianos observados, 36 isolados foram selecionados para macro-restrição por eletroforese em campo pulsado (PFGE). Destas, 27 foram agrupadas em 11 pulsotipos que apresentavam mais de uma cepa com 100% de similaridade. Desta forma, foi possível identificar clones e cepas intimamente relacionadas de *S.* Derby que circularam em granjas, matadouros-frigoríficos e foram encontrados em alimentos ao longo de uma década.

ABSTRACT

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Derby (S. Derby) is one of the serovars most frequently detected in the swine production chain of southern Brazil. Previous studies indicated that isolates of S. Derby displaying similar antimicrobial resistance profiles circulated over the years in this region. Survival of Salmonella in the environment and persistence in the host are facilitated by the ability to form biofilms. Thus, the aim of this study was to identify the presence of clonal groups between 140 S. Derby isolates collected over a ten-year period from various porcine origins (lymph nodes, intestinal content, environment and pork). Therefore, the antimicrobial resistance profile, through two distinct concepts of resistance evaluation (ECOFF value and breakpoint value), the ability to form biofilm and the genotypic characterization by macro-restriction (PFGE) were evaluated. MIC determinations were performed on all isolates, against the following antimicrobials: nalidixic acid, ampicillin, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin, colistin, florfenicol, gentamicin, streptomycin and tetracycline. To evaluate the S. Derby ability to form biofilm, three methods were applied: i. colony morphology on Congo Red agar, to determine the phenotypic detection of curli fimbriae and cellulose; ii. biofilm formation in liquid-air interface of LB broth; iii. adherence on a 96-well polystyrene microtiter plate. In total, only 17 (12.1%) isolates were classified as susceptible to all antimicrobials tested. The highest frequencies of non-Wild Type (nWT) populations were observed against tetracycline (75.7%), streptomycin (70%) and colistin (11.4%), whereas there were no detectable nWT population to ciprofloxacin, ceftazidime and gentamicin. Multidrug resistance (resistance to ≥ 3 antimicrobials) was detected in 8.6% of isolates. On Congo Red agar, three different colony morphology types were observed. The Rdar type (read, dry and rough) was the most frequent, being detected in 59 isolates (42.1%); while Saw (white and smoth) and Pdar (pink, dry and rough) types were observed in 46 (32.9%) and 35 isolates (25%), respectively. The Rdar and Pdar types, which together encompassed the majority of the isolates, are considered the most often observed in Salmonella isolates able to form biofilm. The formation of a rigid pellicle, which could not be dispersed by agitation, was observed in 24 (17.1%) isolates in conventional LB broth and in 78 (55.7%) isolates in low salt LB broth, all belonging to morphotypes Rdar or Pdar. On 96-well polystyrene microtiter plate, a larger number (n=96; 68.6%) of isolates showed to be weak or moderate biofilm producers, including all isolates that showed the Rdar and Pdar type. Through the biofilm and resistance profiles observed, 36 isolates were selected for macro-restriction for pulsed-feld gel electrophoresis (PFGE). Of these, 27 isolates were clustered in 11 pulsotypes which presented more than one strain with 100% of similarity. Therefore, was possible to identify clones and strains closely related of S. Derby that circulated in pig farms, slaughter plants and encountered in foods along a decade.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Distribuição da população *non-Wild Type* (nWT) de referência para *Salmonella* sp. frente a ciprofloxacina (Disponível em: http://mic.eucast.org/Eucast2/). A distribuição foi baseada em dados de quatro fontes (2281 observações). O ECOFF (0,064 mg/L) preliminar é 26

FIGURA 2 – Esquema dos procedimentos adotados para determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) de antimicrobianos para isolados de *Salmonella* Derby 43

FIGURA 3a – Morfotipos de *Salmonella* Derby em ágar LB low salt acrescido dos corantes Vermelho Congo e Brilliant Blue G. Pdar: colônias 1-6 e 9-10; Rdar: colônias 7 e 8; Saw: colônias 11 e 12; após 48 hs de incubação..... 50

FIGURA 3b – Morfotipos de *Salmonella* Derby em ágar LB *low salt* acrescido dos corantes Vermelho Congo e Brilliant Blue G. (A) Rdar e Pdar (setas) após 48 hs de incubação e (B) Rdar e Pdar (setas) após 96 horas de incubação 51

FIGURA 4 – Morfotipos de Salmonella Derby em ágar LB low salt acrescido de Calcolfuor. (A) Saw, (B) Rdar e (C) Pdar após 48 hs de incubação..... 51

FIGURA 5 – Formação de biofilme em caldo LB low salt. (A) Resultado positivo para a presença de rígida película na interface ar-caldo. (B) A positividade é dependente da não dispersão da película (seta) por agitação 52

FIGURA 6 – Porcentagem de isolados positivos para formação de biofilme na interface ar-caldo entre os morfotipos Rdar (n = 59) e Pdar (n = 35) 53

FIGURA 7 – Distribuição dos isolados de morfotipos Saw, Rdar e Pdar (n = 140) entre as categorias de aderência em placas de microtitulação a 28ºC 54

FIGURA 8 – Perfis de PFGE de isolados de *Salmonella* Derby. (M^a) Morfologia de biofilme. (R^b) Perfil de resistência. (P^c) Pulsotipos 56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Isolados de *Salmonella* Derby analisados no presente estudo 40

TABELA 2 – Antimicrobianos testados, intervalo das concentrações e valores de ECOFF e de *breakpoint* 42

TABELA 3 – Resultado da Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos isolados de *Salmonella* Derby frente aos diferentes antimicrobianos avaliados 49

TABELA 4 – Perfis fenotípicos de suscetibilidade a antimicrobianos, de acordo com os valores de *breakpoint* clínicos, e de formação de biofilme de *Salmonella* Derby 55

TABELA 5 – Características de cepas de *Salmonella* Derby pertencentes a um mesmo pulsotipo no PFGE..... 57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
2.1 Características do Gênero *Salmonella* 15
2.1.1 Sorovar Derby 20
2.2 Resistência aos agentes antimicrobianos 21
2.3 Aderência bacteriana e formação de biofilmes 28
2.4 Tipagem molecular 32
2.5 Salmonelose em Humanos 34
2.6 Contaminação da Cadeia Produtiva de Suínos por *Salmonella* 35
3 MATERIAIS E MÉTODOS 40
3.1 Isolados 40
3.2 Concentração Mínima Inibitória (MIC) de antimicrobianos 40
3.3 Detecção fenotípica de fímbria *curli* e celulose pelos isolados de *Salmonella* Derby 44
3.4 Formação de película na interface ar-líquido pelos isolados de *Salmonella* Derby 44
3.5 Quantificação da adesão dos isolados de *Salmonella* Derby em placas de poliestireno 45
3.6 Macro-restrição e eletroforese em campo pulsado (PFGE) 46
4 RESULTADOS 48
4.1 Concentração Mínima Inibitória (MIC) de antimicrobianos 48
4.2 Detecção fenotípica de fímbria *curli* e celulose pelos isolados de *Salmonella* Derby 50
4.3 Formação de película na interface ar-líquido pelos isolados de *Salmonella* Derby 52
4.4 Quantificação da adesão dos isolados de *Salmonella* Derby em placas de poliestireno 53
4.5 Macro-restrição e eletroforese em campo pulsado (PFGE) 54
5 DISCUSSÃO 58
6 CONCLUSÃO 66
REFERÊNCIAS 67

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma das atividades mais expressivas na agropecuária brasileira – principalmente nos estados da região sul do país, os quais mantêm 69% da produção nacional de carne suína –, e possui papel significativo na fixação de empregos diretos e indiretos em toda a cadeia produtiva. O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína do mundo, atingindo a produção de 3,47 milhões de toneladas no ano de 2015, sendo que 14,2% desta produção foram destinadas à exportação (ABPA, 2015). Ainda, o Brasil é o segundo maior fornecedor mundial de produtos alimentares e agrícolas e o principal fornecedor em atender a demanda global adicional, principalmente proveniente da Ásia (OECD/FAO, 2015). Frente à alta demanda nacional e internacional de alimentos, com destaque aos alimentos de origem animal, há também maior exigência de alimentos livres de micro-organismos patogênicos, principalmente aqueles de caráter zoonótico. Entre os micro-organismos causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTA), *Salmonella* ganha destaque por sua importância na saúde pública e pelo impacto causado sobre o comércio – devido aos regulamentos nacionais e internacionais.

Salmonella é o principal agente etiológico de surtos de DTA no Brasil (BRASIL, 2014), Estados Unidos (CENTER FOR SCIENCE IN THE PUBLIC INTEREST, 2014) e Europa (EFSA, 2015), e a carne suína é frequentemente associada a esses surtos. A alta taxa de carnes suínas contaminadas por *Salmonella* é associada à alta prevalência do patógeno em suínos e em carcaças de suínos pós-abate (BERENDS et al., 1997; LITTLE et al., 2008). Entre os sorovares mais frequentemente isolados em suínos e em carcaças de suínos, o sorovar Derby destaca-se como um dos mais prevalentes (MÜRMANN; SANTOS; CARDOSO, 2009; KICH et al., 2011; EFSA, 2015). Ainda, *S.* Derby foi isolada em casos de gastroenterites em humanos, associados ao consumo de carne suína (ARNEDO-PENA et al., 2015; RODRÍGUEZ et al., 2016). Entretanto, poucos estudos relatam a diversidade fenotípica e genotípica deste sorovar entre os isolados de *Salmonella* coletados na cadeia produtiva de suínos.

A caracterização fenotípica da resistência microbiana entre os principais patógenos de origem alimentar deve ser medida essencial para programas de vigilância epidemiológica das DTA. Como já estabelecido por diversos estudos, o uso excessivo de antimicrobianos na suinocultura proporciona a pressão seletiva necessária para a predominância de patógenos resistentes que, por sua vez, podem ser disseminados

através da cadeia de alimentos (COGLIANI; GOOSSENS; GREKO, 2011). Desta forma, surge a exigência de estudarmos a frequência da resistência frente às principais classes de antimicrobianos utilizados, tanto na suinocultura quanto na medicina humana, em isolados de *S.* Derby coletados da cadeia produtiva de suínos no Brasil.

Os sistemas e programas de monitoramento da resistência microbiana, entretanto, devem ter abordagens diferentes daquelas utilizadas para caracterizar micro-organismos resistentes clinicamente. Este conceito foi harmonizado pelo *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), o qual definiu diferentes valores de ponto de corte para, por um lado, detectar mecanismos de resistência e inspecionar o desenvolvimento da resistência em populações microbianas definidas (valor ECOFF) e, por outro, para orientação terapêutica (valor de *breakpoint*) (KAHLMETER et al., 2003). Este entendimento só pode ser aplicado em trabalhos que aplicam a determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) para os isolados em análise e, apesar de trazer inúmeras vantagens para a ótica da vigilância da resistência microbiana, ainda não foi totalmente difundido entre os trabalhos encontrados na bibliografia – que, na sua maioria, utilizam os métodos de disco-difusão para determinar a resistência.

A disseminação de *Salmonella* através da cadeia alimentar deve-se, em parte, à capacidade deste micro-organismo de permanecer em ambientes adversos. A formação de biofilmes na cadeia produtiva de alimentos implica na sobrevivência e permanência de micro-organismos patogênicos nestes ambientes e, consequentemente, pode servir como veículo de transmissão e infecção. Apesar de a contaminação de carcaças por *Salmonella* nos abatedouros ser frequentemente associada ao conteúdo intestinal ou aos linfonodos, a contaminação cruzada com equipamentos e superfícies pode ocorrer (BOTTELDOORN et al., 2003). A persistência de *Salmonella* nas superfícies e equipamentos nos ambientes de processamento de alimentos requer, portanto, melhor compreensão e caracterização.

Estudos já relataram a capacidade de *Salmonella* em formar biofilmes em diversas superfícies, incluindo as utilizadas nas indústrias de alimentos (OLIVEIRA et al., 2014), e ainda persistir e tolerar os processos de higienização (MØRETRØ et al., 2009). Entretanto, há poucos estudos relatando esta capacidade em *S.* Derby. Desta forma – analisando a alta prevalência de *S.* Derby em abatedouros de suínos, a admissível contaminação cruzada que ocorre nestes ambientes e a comprovada associação de gastroenterites causadas por *S.* Derby com o consumo de carne suína –, se faz necessária

a investigação da capacidade de formar biofilmes em isolados de *S.* Derby coletados na cadeia produtiva de suínos.

Do mesmo modo, a diversidade genotípica de *S.* Derby ainda é pouco conhecida. Entre as metodologias utilizadas para genotipificação de *Salmonella*, a macro-restrição por eletroforese em campo pulsado (PFGE) permanece como padrão ouro (ANONYMOUS, 2009). Hauser e colaboladores (2011) demonstraram isolados de *S.* Derby pertencendo aos mesmos perfis fenotípicos de resistência a antimicrobianos e mesmo perfil molecular por PFGE, indicando a presença de um clone de *S.* Derby frequentemente isolado ao longo da cadeia produtiva de alimentos de origem suína na Alemanha. Outros estudos também indicam a presença de isolados de *S.* Derby, com perfis similares de resistência a antimicrobianos e perfis moleculares por PFGE, em diferentes amostras de alimentos de origem suína, de casos de gastroenterites em humanos e de suínos (MICHAEL et al., 2006b; KEROUANTON et al., 2013). A epidemiologia molecular é uma ferramenta relevante e deve ser utilizada para a compreensão da cadeia de transmissão dos patógenos de origem alimentar.

Isto posto, os objetivos deste trabalho foram:

i. Analisar a diversidade fenotípica e genotípica de 140 isolados de *S.* Derby coletados ao longo de dez anos na cadeia produtiva de suínos da região sul do Brasil;

ii. Avaliar fenotipicamente a resistência a antimicrobianos em isolados de *S.* Derby, através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) e de dois conceitos distintos de avaliação de resistência (valores ECOFF e valores de *breakpoint*);

iii. Avaliar fenotipicamente a capacidade de *S.* Derby em formar biofilmes e em expressar estruturas relacionadas;

iv. Avaliar genotipicamente, através de análise por PFGE, isolados de *S.* Derby selecionados através das características fenotípicas acima citadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características do Gênero *Salmonella*

O Gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é composto por bacilos Gram-negativos curtos (2-4 x 0,5-1 µm) não capsulados, anaeróbicos facultativos, oxidase-negativo e catalase-positivos. Possuem flagelos peritríquios e fímbrias, sendo a maioria móvel, exceto os sorovares Gallinarum e Pullorum. Tem como temperatura ótima 37ºC, podendo crescer em temperatura de até 43ºC – característica favorável e seletiva frente aos contaminantes de amostras clínicas. Outras características metabólicas também favorecem a seletividade para cultivo *in vitro* das bactérias pertencentes a este gênero, como a utilização seletiva de selenito de sódio e tetrationato de sódio. Entre outras características bioquímicas, as bactérias do gênero *Salmonella* utilizam o citrato como fonte de carbono, produzem gás sulfídrico (H_2S), produzem lisina descarboxilase, não produzem indol e não hidrolisam ureia (MARKEY et al., 2013).

Salmonella apresenta três principais antígenos: antígeno somático (O), antígeno flagelar (F) e antígeno da virulência (Vi) (HENSEL, 2004). O antígeno O provém da composição do lipopolissacarídeo (LPS) e o antígeno F é composto por proteínas flagelares, podendo apresentar-se na forma simples (H1), ou monomérica, e na forma difásica (H2). Os sorovares e suas fórmulas antigênicas estão listados no Esquema de White-Kauffmann-LeMinor. Atualmente, são reconhecidos 2.579 sorovares do gênero *Salmonella*, sendo 1.531 pertencentes à *Salmonella enterica* subsp. e*nterica* (*S.*) (GRIMONT; WEILL, 2007).

O primeiro relato de *Salmonella* ocorreu em 1885, quando o bacteriologista veterinário Daniel Elmer Salmon e o veterinário Theobald Smith isolaram um bacilo de suínos doentes que denominaram “bacilo da peste suína”. Após a correta identificação como patógeno secundário, o bacilo foi denominado como *Salmonella choleraesuis*. A nomenclatura de *Salmonella choleraesuis* como espécie única do gênero foi aceita até a publicação de Le Minor & Poppoff, em 1987, que propunha *Salmonella enterica* como a espécie única do gênero, defendendo que o uso da taxonomia *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* sorovar Typhi poderia levar a inconsistências devido a diferenças de patogenicidade do sorovar Choleraesuis e do sorovar estritamente humano Typhi. Anteriormente, Kauffmann & Edwards (1952) já haviam proposto a

Salmonella enterica como espécie única do gênero, por não compartilhar a denominação com nenhum sorovar já identificado.

Somente em 2005 a Comissão Judicial do Comitê Internacional para a Sistemática de Procariontes publicou a Opinião 80, que define a *Salmonella enterica* como espécie do gênero *Salmonella*, como proposto por Le Minor & Popoff (1987) e solicitado por Euzéby (1999). A Opinião 80 também estabelece outras regras: (a) a cepa padrão de *Salmonella enterica* é a LT2 (outras designações: CIP 60.62, ATCC 43971, NCIMB 11450 e NCTC 12416); (b) o epíteto *enterica* é conservado sobre todos os epítetos anteriores que possam ser aplicados. Estas ações geraram automaticamente novas combinações de subespécies para a espécie *Salmonella enterica.*

A definição da taxonomia do gênero *Salmonella* teve início com estudos de hibridização de ácido desoxirribonucleico (DNA, sigla em inglês), por Crosa et al. (1973). Os autores demonstraram que todos os sorovares e todos os representantes dos subgêneros de *Salmonella* são relacionados em nível de espécie, assim como os sorovares do antigo gênero *Arizona* – que foi incorporado ao gênero *Salmonella* (*Salmonella enterica* subsp. *arizonae*) após análises genéticas. Em 1989, Reeves e colaboradores conduziram um estudo de eletroforese de enzimas codificadas por multilocus (MLEE, na sigla em inglês), o qual demonstrou que os sorovares da atual subespécie *bongori* (V) formam um *cluster* bastante distante dos formados pelos outros sorovares. Os estudos de hibridização DNA-DNA de Reeves e colaboradores (1989) levaram à designação de uma segunda espécie: *Salmonella bongori*.

Assim, duas espécies de *Salmonella* são aceitas: *Salmonella enterica*, que possui seis subespécies (subsp.) reconhecidas: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). E a *Salmonella bongori*, com apenas uma subespécie reconhecida: *bongori* (V) (GRIMONT; WEILL, 2007; GUIBOURDENCHE et al., 2010). Em 2005, Shelobolina e colaboradores propuseram uma nova espécie, *Salmonella subterranea*. Porém, nem todos os bacteriologistas aceitam a nova espécie, tendo em vista que o isolado tem grande similaridade com *Escherichia hermannii* e, portanto, pode não pertencer ao gênero *Salmonella* (GRIMONT; WEILL, 2007). A maior parte das infecções é causada pela subespécie *enterica* (BARROW et al., 2010), entretanto, todas as espécies e sorovares do gênero *Salmonella* são considerados potencialmente patogênicos (TORTORA et al., 2012).

Nos humanos, os sorovares Typhi e Paratyphi são os únicos reconhecidos por causarem uma síndrome sistêmica denominada febre tifoide, sendo que os sorovares

Typhi e Paratyphi A são restritos a humanos e os sorovares Paratyphi B e Paratyphi C entram na transmissão animal-homem (BARROW et al., 2010). Os demais são denominados sorovares não-tifóides e causam, na maioria dos casos, uma enterocolite auto limitante caracterizada por resposta inflamatória na lâmina própria da mucosa intestinal. Entretanto, em alguns casos pode evoluir para um quadro sistêmico e levar a condições crônicas, como artrite reativa, osteomielite, inflamação cardíaca e desordens neurológicas (D'AOUST, 1994).

A classificação da virulência dos sorovares do gênero *Salmonella* é outro ponto de divergência entre os bacteriologistas. Há duas classificações em vigor. A primeira considera a associação com a espécie hospedeira como determinante, formando três grupos de virulência: (a) sorovares hospedeiro-específicos que causam, de forma geral, doença sistêmica em um número limitado de espécies (Ex.: *S.* Typhi em humanos, *S.* Gallinarum em aves, *S.* Abortusovis em ovinos); (b) sorovares hospedeiro-restritos que, da mesma forma como os sorovares hospedeiro-específicos, causam doença sistêmica em espécies hospedeiras estreitamente relacionadas, mas também podem causar doença em outros hospedeiros não relacionados (Ex.: *S.* Dublin e *S.* Choleraesuis estão associados com doença sistêmica grave em bovinos e suínos, respectivamente, porém podem infectar humanos); (c) sorovares ubíquos que causam gastroenterite em uma ampla variedade de espécies hospedeiras não relacionadas (Ex.: *S.* Typhimurium e *S.* Enteritidis) (BARROW et al., 2010).

Em outra linha de pensamento, a classificação de virulência pode ser realizada através da divisão em dois grandes grupos de diferentes cenários patológicos, denominados patovares. No primeiro grupo, estão inclusos os sorovares que, de forma geral, produzem doença sistêmica semelhante à febre tifoide em mamíferos ou em aves. Já o segundo grupo de patovares é composto pelos sorovares que colonizam o intestino de diversas espécies e causam enterites e gastroenterites (BARROW et al., 2010).

Diversos fatores referentes ao hospedeiro determinam sua suscetibilidade às infecções causadas por *Salmonella*. Entre eles, destaca-se a idade do animal no momento da infecção, que pode determinar diferentes variações do quadro clínico. Os animais jovens são altamente suscetíveis a infecções intestinais devido à ausência de microbiota intestinal competidora (BARROW et al., 2010). O estado imunológico do hospedeiro também é fator determinante para o curso da doença e o comprometimento da barreira de defesa intestinal pode resultar em bacteremia e, até mesmo, levar à morte do hospedeiro (SANTOS et al., 2009).

Os reservatórios naturais de *Salmonella* são o trato intestinal de animais de sangue quente e de sangue frio, os quais são, em sua maioria, excretores assintomáticos ou subclínicos. A transmissão do patógeno ocorre pela via fecal-oral, também podendo ocorrer através das membranas mucosas das conjuntivas e pelo trato respiratório superior (MARKEY et al., 2013). Os alimentos de origem animal, destacando a carne, aves, ovos e leite, são reconhecidos por serem os veículos mais envolvidos em surtos de salmonelose em humanos (WHO, 2015).

Estudos com voluntários revelaram que a dose infectante de diversos sorovares não-tifóides testados é de 10^5 a 10^{10} bactérias por grama de alimento (KOTHARY; BABU, 2001). Entretanto, alguns dados obtidos de surtos de salmonelose sugerem que a dose infectante pode ser tão baixa quanto 100 bactérias (D'AOUST et al., 1975). A quantidade de bactérias por grama de alimento necessária para causar infecção varia com a cepa envolvida, o alimento consumido e o estado fisiológico e imunológico do hospedeiro. Alimentos que neutralizam a acidez estomacal e bebidas que atravessam rapidamente o estômago são exemplos de veículos que contribuem para menor dose infectante (DARWIN; MILLER, 1999).

Após a ingestão, a colonização do intestino delgado distal e do cólon é o estágio inicial do processo infeccioso, seguida por adesão às células específicas, invasão tecidual e sobrevivência intracelular. A disseminação de *Salmonella* pode ocorrer, ainda, nos linfonodos mesentéricos e mais esporadicamente no jejuno, fígado e baço. A capacidade de sobrevivência no trato gastrointestinal também é determinante para todos os processos envolvidos nos primeiros estágios da infecção (BARROW et al., 2010). Entre os fatores intrínsecos do hospedeiro, podemos destacar a anatomia gastrointestinal e a formação de nichos específicos, o fluxo intestinal de cada espécie acometida e a composição da microbiota intestinal, que pode ser inibitória para diversos micro-organismos patogênicos, incluindo *Salmonella* (BARROW et al., 2010). A microbiota intestinal inibitória é caracterizada pela produção de ácidos orgânicos voláteis, que inibem o crescimento de *Salmonella*, e pelo bloqueio dos sítios de adesão (MARKEY et al., 2013).

A chegar ao lúmen intestinal, *Salmonella* utiliza adesinas denominadas fímbrias para a ligação às células intestinais, especificamente às células epiteliais membranosas (células M), que fazem parte do epitélio folículo-associado (FAE), e também aos enterócitos. As células M promovem fagocitose ativa de macromoléculas e micro-organismos presentes no lúmen intestinal para internalização de antígenos, apresentação

ao tecido linfoide da mucosa e produção de resposta imunológica (NEUTRA et al., 1996). As fímbrias estudadas e relacionadas com a adesão são: fímbria tipo I (Fim), fímbria codificada por plasmídeo (PE), fímbria polar longa (LP) e fímbria agregativa fina (*curli*) (MARKEY et al., 2013; VELDEN et al., 1998). Hase e colaboradores (2009) conseguiram demonstrar que a subunidade FimH da fímbria tipo I liga-se seletivamente à glicoproteína-2, que é estritamente expressa pelas células M, caracterizando tropismo por essas células. Há ainda outras adesinas não fímbrias relacionadas à aderência celular de *Salmonella* (WAGNER; HENSEL, 2011).

Após a adesão às células intestinais, a via patogênica depende de complexos sistemas denominados Sistemas de Secreção, que já foram observados em diversas bactérias Gram-negativas. Quatro destes sistemas já foram bem descritos, sendo que o Sistema de Secreção Tipo III (T3SS) é bastante estudado e responsável pela translocação ativa de proteínas do citoplasma bacteriano ao citoplasma da célula do hospedeiro, caracterizando um mecanismo importante de patogenicidade (GALAN; COLLMER, 1999; KUHLE; HENSEL, 2004). Os genes de virulência responsáveis pela invasão e proliferação intracelular de cepas virulentas de *Salmonella* estão abrigados em grandes regiões cromossomais denominadas Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI) (KUHLE; HENSEL, 2004).

As bactérias do gênero *Salmonella* foram as únicas descritas com dois tipos de T3SS, codificados em dois *clusters* distintos nas SPI (SPI-1 e SPI-2), que parecem desempenhar papéis diferentes na patogenicidade. O T3SS codificado na SPI-1 é responsável pela penetração inicial da mucosa intestinal, enquanto que o presente na SPI-2 é necessário para os estágios subsequentes da infecção sistêmica (HUECK, 1998). A secreção de proteínas a partir do T3SS durante os estágios iniciais da infecção promove a invasão de *Salmonella* em células M e em enterócitos, através da modificação do citoesqueleto de actina destas células, provocando alongamentos da membrana celular e captação das células bacterianas em vesículas ligadas à mesma (WALLIS; GALVOY, 2000; HENSEL, 2004).

A multiplicação intracelular ocorre dentro destas vesículas e promove a secreção de quimiocinas e o recrutamento de células polimorfonucleares (PMN), especialmente neutrófilos (MARKEY et al., 2013). Ainda, proteínas efetoras translocadas pelo T3SS para as células do hospedeiro são responsáveis pela secreção de mediadores pró-inflamatórios (McCORMICK et al., 1995; ZHANG et al., 2002). As prostaglandinas, secretadas pelos PMN e pelos enterócitos infectados, aumentam a atividade da

adenilato-ciclase nos enterócitos, resultando em secreção aumentada de eletrólitos e de fluidos para o lúmen intestinal e, consequentemente, em diarreia (DUEBBERT; PETERSON, 1985; WALLIS; GALYOV, 2000).

Já o T3SS codificado pela SPI-2 está relacionado com a sobrevivência intracelular em células fagocitárias (ASTEN; DIJK, 2005). As condições físico-químicas das vesículas endossomais, como baixo pH, privação de fosfato e menor disponibilidade de Mg^{2+}, promovem a expressão do T3SS codificado na SPI-2 e a translocação de proteínas para a superfície da célula bacteriana, que por sua vez interferem no processo endossomal (CIRILLO et al., 1998; BEUZÓN et al., 1999). De forma contrária, a indução da expressão e secreção de proteínas pelo T3SS codificado na SPI-1 ocorre quando o pH do meio passa de ácido para alcalino – situação observada pela passagem das bactérias do estômago para o intestino (DAEFLER, 1999).

A multiplicação e sobrevivência intracelular de *Salmonella* resultam na translocação citoplasmática das vesículas endossomais dos enterócitos infectados para a região basal da célula, resultando em liberação de grande número de bactérias patogênicas viáveis para a lâmina própria (D'AOUST, 1991). A sobrevivência intracelular em macrófagos permite a disseminação de *Salmonella* para os linfonodos mesentéricos e, dependendo da cepa envolvida e do estado imunológico do hospedeiro, para o fígado e para o baço, podendo ainda causar bacteremia (MARKEY et al. , 2013).

Após a fase aguda da salmonelose, há excreção fecal intermitente que pode durar alguns dias (estado portador convalescente) ou pode persistir por um ou mais anos (estado portador crônico) (D'AOUST, 1991). Alguns indivíduos podem tornar-se portadores crônicos e carrear *Salmonella* por diversas semanas ou até anos sem apresentar qualquer sintomatologia e, mediante situações estressantes, sofrer a reativação da multiplicação e excreção do agente (BARROW et al., 2010).

2.1.1 Sorovar Derby

A *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (*S.*) sorovar Derby pertence ao sorogrupo O:4 (B) e possui a fórmula antigênica 1,4,[5],12: f,g:[1,2] (GRIMONT; WEILL, 2007). O primeiro isolamento de *S.* Derby ocorreu em 1921, a partir de um caso de salmonelose humana devido à ingestão de torta de carne suína contaminada (PECKHAM, 1923). Desde então, *S.* Derby tem ganhado destaque entre os isolados bacterianos de fontes clínicas não humanas e de alimentos (ZHAO et al., 2003;

VALDEZATE et al., 2005; CDC, 2011), principalmente dos alimentos de origem suína, assim como em casos de salmonelose em humanos (LING et al., 2001; EFSA, 2011). Além disso, *S.* Derby tem ficado entre os principais sorovares isolados de abatedouros e carcaças de suínos no Brasil (BESSA; COSTA; CARDOSO, 2004; KICH et al., 2011) e na Europa (GIOVANNACCI et al., 2001; VALDEZATE et al., 2005; EFSA, 2008a).

Estudos que utilizaram eletroforese em campo pulsado (PFGE, sigla em inglês) e avaliação dos perfis de suscetibilidade a antimicrobianos demonstraram grande similaridade entre isolados de *S.* Derby provenientes de humanos e de suínos infectados, sugerindo que o homem pode adquirir *S.* Derby através do consumo de carne suína (VALDEZATE et al., 2005; HAUSER et al., 2011; KEROUANTON et al., 2013). Há ainda forte relação entre a contaminação das carcaças suínas e os suínos portadores assintomáticos com excreção intermitente (IVANEK et al., 2012), através da transmissão a animais suscetíveis ou a re-infecções e através da contaminação cruzada durante o processo de abate.

Em trabalho recente desenvolvido por Matiasovic e colaboradores (2014) com cepa de *S.* Typhimurium e *S.* Derby, isoladas de suínos portadores assintomáticos, foi demonstrado que *S.* Derby promoveu maior tempo de excreção fecal de bactérias e maior colonização intestinal, demonstrando maior capacidade de excreção intermitente e, consequentemente, maiores chances de contaminação cruzada e de transmissão a outros animais.

2.2 Resistência aos agentes antimicrobianos

A resistência antimicrobiana é um desafio global complexo para a saúde pública, tanto do ponto de vista clínico como socioeconômico. Os impactos causados pela resistência antimicrobiana abrangem o aumento no tempo de administração de antimicrobianos, falhas de tratamento e ocorrência de óbitos decorrentes dessas enfermidades. A imposição de custos adicionais aos sistemas de saúde também resulta em efeitos econômicos preocupantes. Nos Estados Unidos, o custo anual estimado é de US$ 21 a US$ 34 bilhões, acompanhados por mais de US$ 8 milhões pelos dias adicionais de hospitalização (WHO, 2014).

Para entender os mecanismos envolvidos na resistência antimicrobiana, é preciso conhecer os mecanismos de ação dos antimicrobianos, que podem ser resumidos em: (a) inibição da síntese da parede celular (ex.: penicilinas e cefalosporinas); (b) inibição da

síntese de proteínas (ex.: tetraciclinas, estreptomicina e cloranfenicol); (c) inibição da replicação de ácidos nucleicos e da transcrição (ex.: quinolonas) (d) dano à membrana plasmática (ex.: polimixina B e colistina); e (e) inibição da síntese de metabólitos essenciais (ex.: sulfonamidas e trimetoprima) (TORTORA et al., 2012).

As bactérias possuem a capacidade de responder rapidamente e eficientemente à pressão seletiva imposta pelo uso de antimicrobianos (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001). A resistência aos antimicrobianos pode ser intrínseca ou adquirida. Na resistência intrínseca, os genes responsáveis pela resistência são naturalmente encontrados no DNA cromossomal e são, normalmente, associados à ausência ou inacessibilidade da estrutura alvo (ALEKSHUN; LEVY, 2007). Os genes envolvidos na resistência intrínseca são independentes da exposição anterior ao agente antimicrobiano e não podem ser transferidos horizontalmente (FAJARDO et al., 2008). Como exemplo clássico de mecanismo intrínseco, pode-se citar a membrana externa de bactérias Gram-negativas, que funciona como uma barreira para compostos hidrofóbicos e hidrofílicos (ALEKSHUN; LEVY, 2007). Outro exemplo são os sistemas de efluxo de *Pseudomonas aeruginosa*, que permitem a expulsão de diversas classes de antimicrobianos, que conseguem ingressar na célula bacteriana, para o seu exterior (LI; LIVERMORE; NIKAIDO, 1994; KOHLER et al., 1997).

A resistência adquirida origina-se de mutações aleatórias ou pela aquisição de genes de resistência. Mutações aleatórias podem dar origem a características genéticas responsáveis pela sobrevivência e persistência frente a desafios. Contudo, ao contrário da aquisição de genes de resistência, a resistência adquirida através de mutações é um evento de baixa frequência (DAVIES, 1994). A rápida propagação da resistência entre populações bacterianas é resultado da transferência horizontal de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, através dos processos de conjugação, transdução e transformação (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001).

Os plasmídeos são elementos extracromossomais de replicação autônoma e capazes de coexistirem com outros elementos móveis, inclusive com outros plasmídeos, dentro da mesma célula bacteriana. Os genes transportados pelos plasmídeos podem ser múltiplos e não são necessários para o crescimento e multiplicação celular, mas podem codificar fenótipos fundamentais à sobrevivência em condições adversas, como resistência aos antimicrobianos e fatores de patogenicidade. Podem também carrear outros elementos móveis, ou ainda, serem integrados ao DNA cromossomal (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001).

Meervenne e colaboradores (2012) demonstraram que plasmídeos carreando múltiplos genes de resistência podem ser transferidos do ambiente para patógenos alimentares em elevadas taxas de transferência. Outros estudos tem demonstrado a prevalência de plasmídeos de incompatibilidade do grupo N (IncN) em *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*, os quais são responsáveis pela disseminação de genes de β-lactamases de amplo espectro e de genes de resistência às quinolonas (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2008; CLOECKAERT et al., 2010; FOLSTER et al., 2010; TAUSOVA et al., 2012).

Os transposons também podem carrear genes de resistência. Entretanto, não possuem sistemas de replicação e precisam estar integrados no DNA cromossomal ou em plasmídeos (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001). Os transposons são segmentos de DNA capazes de se mover no cromossomo, ou de um cromossomo para plasmídeos e vice-versa, através da codificação de sequências de inserção, que possuem função de transposição dos elementos (ZAHA, 2012). Diversos exemplos ilustram a associação de transposons e plasmídeos. A presença dos transposons Tn*1721*, carreando o gene *tet*(A) de resistência à tetraciclina, e do Tn*3*, que contem o gene bla_{TEM} de resistência à ampicilina, foi demonstrada em plasmídeos de isolados de *Salmonella* (PASQUALI et al., 2005). Em outro estudo, foi evidenciada a presença de um plasmídeo em *S.* Typhimurium, contendo múltiplos genes de resistência e que é derivado do transposon Tn*2670* (CAIN & HALL, 2012).

O integron é elemento genético capaz de captar e mobilizar genes localizados em cassetes gênicos, e consiste em: (a) um gene *intI*, que codifica a enzima integrase, responsável pela inserção e excisão de cassetes gênicos, (b) um sitio de recombinação *attI*, adjacente ao *intI*, que é o local de reconhecimento para a integrase, e (c) um promotor, responsável pela transcrição e expressão dos cassetes gênicos (HALL, 2012). Em *Salmonella,* a ilha genômica 1 de *Salmonella* (SGI-1, sigla em inglês), inclui um integron, denominado In*104,* que carreia um grupo de genes de resistência (BOYD et al., 2002; DOUBLET et al., 2005). Esses genes, localizados no integron In*104* codificam resistência à ampicilina, cloranfenicol, florfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (BRIGGS & FRATAMICO, 1999). Este integron, por sua vez, está amplamente distribuído entre os sorovares de *Salmonella*, e já foi identificado em *S.* Derby (BOYD et al., 2002; DOUBLET et al., 2004; LEVINGS et al., 2005; AKIBA et al., 2006).

Entre os processos envolvidos na transferência dos elementos genéticos móveis, a conjugação é o processo mais comum. Plasmídeos e transposons conjugativos podem ser transferidos entre espécies, e mesmo entre gêneros bacterianos (SCHWARZ; KEHRENBERG; WALSH, 2001). Para que o processo de conjugação ocorra, o plasmídeo deve carrear genes de mobilização, para processamento do DNA, e genes que codifiquem um complexo acoplamento associado à membrana, que é responsável pela formação de um poro na parede bacteriana para a transferência do plasmídeo de uma célula doadora a uma célula receptora. Os plasmídeos que codificam o seu próprio conjunto de genes são denominados plasmídeos conjugativos. Pequenos plasmídeos não conjugativos podem ser mobilizados simultaneamente com outros plasmídeos conjugativos, sendo denominados plasmídeos mobilizáveis (SMILLIE et al., 2010).

No processo de transdução, fragmentos de DNA são transportados de uma célula à outra por bacteriófagos. Durante o ciclo lisogênico dos bacteriófagos, segmentos de DNA bacteriano – inclusive genes de resistência contidos no DNA cromossomal ou em plasmídeos que estejam próximos ao sitio de integração – podem ser incorporados ao DNA viral e propagados com as partículas virais para novas células hospedeiras. A transdução é um evento raro e é observado principalmente em bactérias da mesma espécie (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001). Schicklmaier e colaboradores (1998) demonstraram que uma grande parte dos isolados de *Salmonella* abrigam genomas de fagos, na forma de profagos. Em outro estudo, Schmieger & Schicklmaier (1999) demonstraram que, embora as taxas de transdução sejam muito baixas, o processo de transdução é capaz de transferir genes de resistência entre cepas de *Salmonella*.

A transformação é um processo de captação de pequenos segmentos de DNA exógeno, sendo um mecanismo em potencial para adquirir genes de resistência ou de patogenicidade e de promover mudanças genéticas na célula receptora, também denominada célula competente (ZAHA, 2012). Este mecanismo possui um papel limitado na transferência de material genético *in vivo*, entretanto é o mecanismo de escolha para experimentos com transferência de plasmídeos *in vitro* (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001). Uma vez adquiridos, os genes de resistência passam a ser transmitidos verticalmente e, devido à alta taxa de reprodução das bactérias, toda uma população bacteriana pode tornar-se resistente em um curto espaço de tempo.

Atestar que um isolado microbiano é resistente implica dizer que o mesmo não é inibido pelas concentrações normalmente utilizadas do agente antimicrobiano, e/ou

encontra-se na faixa em que mecanismos específicos de resistência são prováveis e que a eficácia não pode ser atestada em estudos clínicos. Os testes de suscetibilidade antimicrobiana são utilizados para avaliação quantitativa e/ou qualitativa da resposta *in vitro* de um organismo frente ao agente antimicrobiano, em níveis atingíveis, com as doses geralmente prescritas do antimicrobiano em análise, nos tecidos ou sangue (CLSI, 2012). Esses testes devem ser realizados seguindo instruções claras e precisas e de acordo com procedimentos aceitos internacionalmente, como os padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2014), *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) (ANDREWS, 2009), entre outros.

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana podem ser resumidos em: teste de disco-difusão, E-test, teste de diluição em ágar e testes de macro e microdiluição em caldo. Os critérios de interpretação são baseados em *breakpoints* de suscetilidade/resistência estabelecidos para um determinado antimicrobiano frente a um grupo bacteriano. O *breakpoint* é definido a partir de diversos fatores, como: regimes quimioterápicos e via de administração usual, indicações terapêuticas, dados de resposta clínica, farmacocinética e farmacodinâmica (BYWATER; SILLEY; SIMJEE, 2006). Excetuando o teste de disco-difusão, que tem caráter exclusivamente qualitativo, os outros testes mencionados fornecem a Concentração Mínima Inibitória (MIC, sigla em inglês) do antimicrobiano para o isolado bacteriano testado. Por definição, MIC é a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um micro-organismo, em testes de suscetibilidade *in vitro*. O MIC, ao ser comparado com o *breakpoint* previamente estabelecido, pode categorizar o isolado em suscetível (associado ao sucesso terapêutico), intermediário (associado a um efeito terapêutico indeterminado ou incerto) ou resistente (associado a um risco elevado de insucesso na terapêutica) (KAHLMETER et al., 2003). O *breakpoint* tem caráter clínico e pode servir como guia para a terapêutica.

Outro critério de interpretação, formulado pelo EUCAST, são os valores de *cut-off* epidemiológicos (ECOFFs), que são utilizados para detectar e definir a resistência antimicrobiana e monitorar o desenvolvimento da resistência nas populações microbianas. Os ECOFFs são definidos a partir da distribuição dos valores de MIC em populações de micro-organismos sem mecanismo de resistência adquirida fenotipicamente detectável, denominadas populações-selvagens (WT, sigla para *wild-type*). Para definir os ECOFFs, é necessária a coleta de dados, que devem ser

analisados e, então, inseridos em um banco de dados disponibilizado gratuitamente na internet (http://mic.eucast.org/Eucast2/) (Figura 1). Para cada combinação de agente antimicrobiano e espécie microbiana, formam-se agregados dos dados coletados produzindo um banco de dados de referência internacional (KAHLMETER et al., 2003; EFSA, 2012).

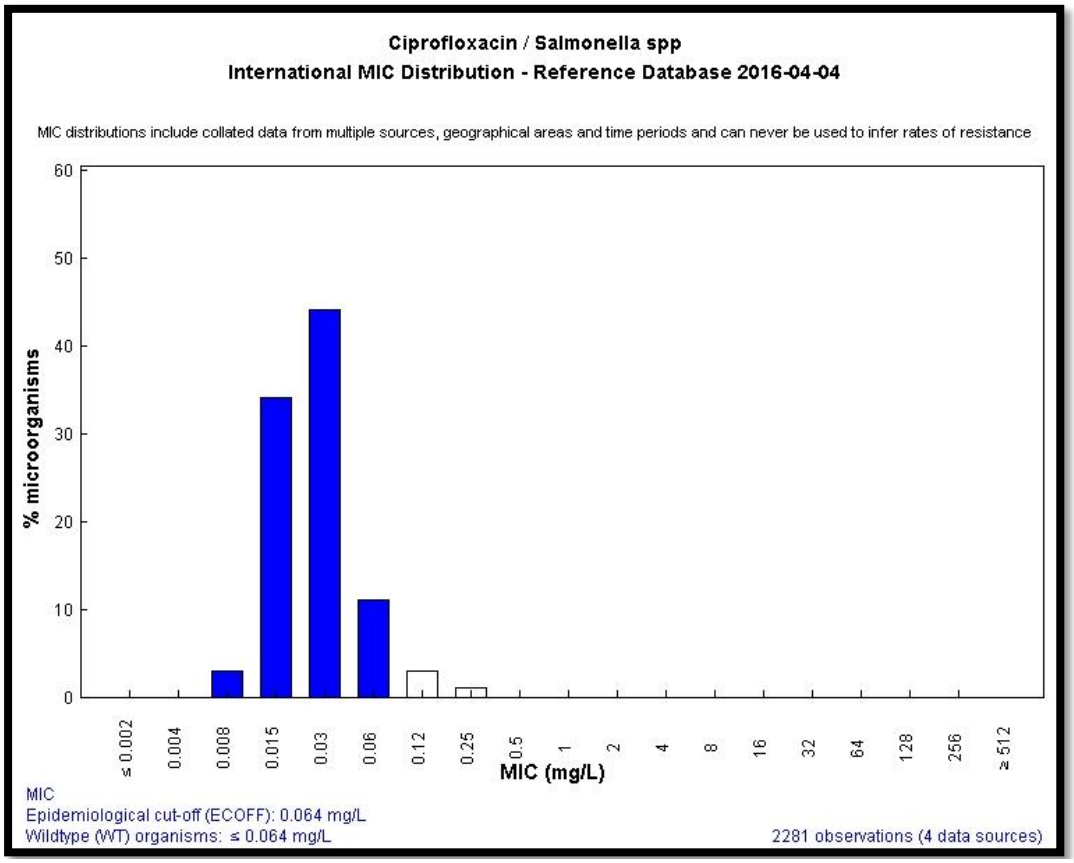

FIGURA 1 – Distribuição da população *non-Wild Type* (nWT) de referência para *Salmonella* sp. frente a ciprofloxacina (Disponível em: http://mic.eucast.org/Eucast2/). A distribuição foi baseada em dados de quatro fontes (2281 observações). O ECOFF (0,064 mg/L) preliminar é apresentado.

O desenvolvimento dos mecanismos de resistência nas populações microbianas é um processo evolutivo normal, porém acelerado devido à pressão seletiva exercida pelo uso generalizado de antimicrobianos. Na produção intensiva de suínos é comum a utilização de antimicrobianos para o controle de doenças, tanto no tratamento clínico como no profilático, e como promotores de crescimento. Este cenário proporciona condições favoráveis para a seleção e propagação da resistência, assim como a persistência de populações resistentes nestes ambientes (AARESTRUP, 2005).

Os antimicrobianos utilizados como promotores de crescimento são administrados continuamente como suplemento alimentar em doses subterapêuticas. Os promotores de crescimento têm como finalidade aumentar a eficiência alimentar e o ganho de peso (GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE, 2010). Os antimicrobianos mais utilizados para este propósito são as tetraciclinas, os macrolídeos e as penicilinas. As tetraciclinas e os β-lactâmicos não são utilizados como promotores de crescimento na União Europeia desde 1975 (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001). Apesar da diminuição significativa do uso de tetraciclina na produção de suínos na Dinamarca, a detecção de resistência à tetraciclina em isolados de *Salmonella* continua a aumentar, provavelmente pela propagação de clones resistentes (DANMAP, 2011).

A utilização de antimicrobianos na produção de animais pode influenciar no aparecimento e no aumento de bactérias resistentes em humanos, através do contato direto ou indireto com os animais e com o consumo de alimentos de origem animal (PHILLIPS et al., 2004; MARSHALL; LEVY, 2011). Kerouanton e colaboradores (2013) demonstraram que havia similaridade nos perfis de macro-restrição por PFGE entre isolados de *S.* Derby originados de suínos, de carne suína e de humanos. O estudo também constatou que 79% dos isolados eram resistentes à tetraciclina e que somente 15,5% dos isolados não apresentavam nenhuma resistência antimicrobiana.

Em um estudo conduzido no Reino Unido (UK, sigla em inglês), entre 2003 e 2005, Little e colaboradores (2008) encontraram uma prevalência de 2,4% de carnes vermelhas positivas para *Salmonella* sp. no varejo e em serviços de alimentação. Entre os isolados de carne suína, *S.* Typhimurium e *S.* Derby foram os sorovares mais frequentes e apresentaram resistência a pelo menos um dos doze antimicrobianos testados. Destes, tetraciclina teve a maior frequência de resistência, seguida por sulfonamida, estreptomicina, ampicilina e cloranfenicol. Em um estudo de comparação temporal e espacial entre isolados de *Salmonella* não-tifóides de humanos, de suínos e do ambiente de granjas, foi demonstrada maior frequência de resistência antimicrobiana e de padrões de resistência a múltiplas drogas em *S.* Typhimurium e *S.* Derby isolados de suínos. Ainda, foram encontrados perfis de macro-restrição por PFGE idênticos entre os isolados de *S.* Derby de suínos e de origem ambiental (KEELARA et al., 2014).

O aumento da resistência frente aos antimicrobianos usualmente utilizados na produção animal deve ser analisado com precaução, dado o risco de disseminação de bactérias patogênicas resistentes aos humanos. Frente às inquietações ocasionadas pelo impacto na saúde pública, programas de monitoramento da resistência antimicrobiana e

utilização prudente de antimicrobianos como ferramenta de gestão são recomendações para a contenção primária da resistência antimicrobiana (WHO, 2001).

2.3 Aderência bacteriana e formação de biofilmes

A habilidade que alguns micro-organismos possuem de aderir às superfícies e formar agregados celulares complexos, denominados biofilmes, tem implicações diretas na persistência e sobrevivência no ambiente. Em especial, a formação de biofilmes nos estabelecimentos de processamento de alimentos, resultando na contaminação constante desses alimentos, proporciona um importante veículo de transmissão e infecção. Assim, os mecanismos celulares envolvidos na formação dos biofilmes devem ser estudados e discutidos, pois são alvos em potencial para intervenções e estratégias de controle nesses ambientes.

Biofilmes são agregados de micro-organismos aderidos a uma superfície, geralmente sólida, e incorporados a uma matriz extracelular, que consiste em substâncias poliméricas extracelulares (EPS, sigla em inglês), produzidas pelas próprias células microbianas que compõem o biofilme. A matriz extracelular possui diversas funções, entre elas a formação de uma arquitetura tridimensional responsável pela agregação e interação entre as células microbianas, além de proporcionar coesão e estabilidade mecânica. Essa arquitetura dos biofilmes é composta por canais e poros, formados pela rede de polímeros, que permitem a difusão de nutrientes e oxigênio. Outra importante função é a barreira protetiva formada, que confere resistência e tolerância a vários agentes antimicrobianos e a desinfetantes. Ainda, as proteínas e polissacarídeos hidrofílicos que compõem a matriz são responsáveis pela retenção de água, que permite a formação de um microambiente altamente hidratado e tolerância à dessecação (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Nos estabelecimentos de carnes e derivados, tantos os micro-organismos como as proteínas provenientes desses produtos são incorporados às superfícies dos equipamentos, formando um filme orgânico ou condicionado. Os micro-organismos biologicamente ativos que integram o filme condicionado podem, então, efetuar aderência inicial às superfícies, que é reversível e dependente do tipo de superfície envolvida (SHI; ZHU, 2009).

O aço inoxidável é um dos materiais mais utilizados nos estabelecimentos de alimentos, por sua estabilidade físico-química e resistência à corrosão. Possui

característica hidrofílica, que é desejável no quesito inibição da aderência bacteriana. Superfícies com propriedades hidrofóbicas são mais suscetíveis à adesão de micro-organismos, já que favorecem menor ângulo de contato entre as bactérias e a superfície (OLIVEIRA et al., 2001). Entretanto, de acordo com o acabamento e polimento final, que podem ocasionar rugosidades, a hidrofilicidade da superfície do aço inoxidável pode tornar-se heterogênea, proporcionando nichos para a adesão. Ainda, o uso e lavagens contínuas deste material podem formar fendas que servirão como abrigo e proteção contra a força de cisalhamento decorrente das lavagens dos equipamentos (SINDE; CARBALLO, 2000; SHI; ZHU, 2009). Diversos estudos demonstraram a capacidade de *Salmonella* em aderir e formar biofilmes em aço inoxidável e em outros materiais utilizados nos estabelecimentos de alimentos e, ainda, persistir e tolerar os processos de limpeza e desinfecção (JOSEPH, 2001; RAMESH et al, 2002; GIAOURIS; NYCHAS, 2006; MØRETRØ et al, 2009; OLIVEIRA et al., 2014).

Outro material utilizado tanto em granjas como em abatedouros, indústrias de processamento de alimentos e em cozinhas, comerciais ou não, para a construção das tubulações, acessórios e superfícies de corte, é o cloreto de polivinil (PVC) (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000; STEENACKERS et al., 2012). Este material possui superfície hidrofóbica, que favorece a adesão bacteriana (OLIVEIRA et al., 2001), e é similar ao poliestireno, material utilizado nas placas para cultivo *in vitro*. Assim como no caso do aço inoxidável, diversos estudos demonstram a adesão e formação de biofilmes de *Salmonella* em placas de poliestireno (STEPANOVIC et al., 2003, 2004; MALCOVA et al., 2008; SEIXAS et al., 2014). Os sorovares Typhimurium e Enteritidis são os mais amplamente estudados, havendo poucos relatos da formação de biofilmes com isolados de Derby, os quais são representados em número consideravelmente menor quando comparados com Typhimurium e Enteritidis (MALCOVA et al., 2008; DÍEZ-GARCÍA; CAPITA; ALONSO-CALLEJA, 2012).

O desenvolvimento dos biofilmes compreende a adesão inicial a uma superfície, seguida de formação de microcolônias e, por fim, revestimento das microcolônias por EPS, configurando um biofilme maduro (DAVEY; O'TOOLE, 2000). Na adesão inicial, também designada como adesão reversível, a interação entre bactérias e substrato é fraca e consiste em forças de van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas. Durante a fase de adesão reversível, as bactérias aderidas são facilmente removidas pela aplicação de força de cisalhamento, obtida durante os processos de lavagem (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003). A adesão reversível das células

bacterianas ocorre em questão de algumas horas e, tratando-se de estabelecimentos de alimentos, é praticamente impossível realizar a higienização correta em tempo de evitar esta primeira etapa de adesão (MEYER, 2003).

Já a adesão irreversível, que resulta da ancoragem de apêndices celulares e da produção de EPS, pode ser evitada adotando os procedimentos operacionais padronizados (POP) para higienização de instalações, equipamentos e móveis. Entretanto, falhas nas etapas de higienização, tanto na limpeza como na desinfecção, podem ser decisivas para a formação de biofilmes irreversíveis. Os principais fatores de um programa de higienização efetivo são: (a) energia química, tanto dos detergentes como dos sanitizantes, que requerem concentrações e aplicações específicas; (b) energia mecânica, como jatos de pressão de água, escovações manuais ou automáticas, etc.; (c) temperatura, que afeta os efeitos químicos dos detergentes e sanitizantes e altera a remoção de gorduras e óleos; e (d) tempo requerido para o contato entre superfície e composto químico (GIBSON et al., 1999).

Ainda, rugosidades e falhas nas superfícies dos equipamentos podem proteger os micro-organismos do processo de cisalhamento decorrente da lavagem. A produção da matriz extracelular – que cria uma barreira protetora contra situações adversas, inclusive contra a ação dos desinfetantes (SINDE; CARBALLO, 2000; JOSEPH et al., 2001; RAMESH et al., 2002; MØRETRØ et al., 2009; FLEMMING; WINGENDER, 2010) – e a presença de células sem crescimento ativo tornam o biofilme persistente no ambiente (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; DUNNE, 2002). A persistência de *Salmonella* nos estabelecimentos de alimentos propicia a contaminação de alimentos e a transmissão a novos hospedeiros (WINFIELD; GROISMAN, 2003; WHITE et al., 2006). Em um estudo realizado em abatedouros de suínos, *Salmonella* foi isolada de amostras ambientais em alta frequência e pode ser isolada antes mesmo do inicio do abate, evidenciando a permanência de *Salmonella* no ambiente, equipamentos e facas. No mesmo estudo, os sorovares predominantes foram Typhimurium e Derby (BOTTELDOORN et al., 2003).

Entre os mecanismos celulares envolvidos na aderência de *Salmonella* nas superfícies, destaca-se a produção de fímbrias e de celulose. A fímbria fina agregativa (*agf*), também conhecida por fímbria *curli* (*csg*), é essencial para a aderência em superfícies bióticas e abióticas. Sua expressão é restrita a baixas temperaturas e à baixa osmolaridade do meio (AUSTIN, 1998; RÖMLING et al., 1998a, 1998b), e dependente de outros fatores externos, como tensão de oxigênio e privação de nutrientes

(GERSTEL; RÖMLING, 2001). A celulose é um componente estrutural que promove estabilidade ao agregado de células aderidas, fortalecendo a adesão. Sua expressão depende das mesmas condições que a fímbria *curli*, sugerindo a mesma via regulatória (RÖMLING et al., 1998b; ZOGAJ et al., 2001). A produção concomitante dessas duas estruturas forma uma matriz extracelular altamente inerte e hidrofóbica que promove uma ligação consolidada e irreversível (ZOGAJ et al., 2001; DUNNE, 2002).

A expressão de fímbria *curli* e de celulose pode ser observada no cultivo em placa com meio contendo corante Vermelho Congo, que interage com ambas as estruturas e conduz à formação de colônias com superfície rugosa e seca, com margens onduladas e com coloração púrpura (RÖMLING, 2005). As morfologias observadas podem ser categorizadas conforme as características de colônia: Rdar (colônia vermelha, rugosa e seca), Pdar (colônia rosa, rugosa e seca), Bdar (colônias marrom, rugosa e seca) e Saw (colônia branca e mucoide). A morfologia Rdar ocorre pela expressão tanto de celulose quanto fímbria *curli*, enquanto a Pdar decorre da produção isolada de celulose e a Bdar da fímbria *curli*. Na morfologia Saw, não há expressão de nenhuma das duas estruturas (RÖMLING et al., 1998a, 1998b; MALCOVA et al., 2008).

A avaliação exclusiva da produção de celulose pode ser obtida quando em cultivo em ágar ou em caldo adicionados de Calcofluor, que se liga naturalmente à celulose e, quando ligado, emite fluorescência visível sob luz UV 366 nm (RÖMLING et al., 2003; VESTBY et al., 2009). Outro método de avaliação fenotípica de biofilmes é através do cultivo em caldo, que resulta na formação de uma película de flutuação na interface ar-líquido que bloqueia totalmente a superfície do caldo e que não pode ser dispersa por agitação (SOLANO et al., 2002), técnica utilizada para visualizar a formação de biofilme por *Salmonella*. Ainda, a avaliação qualitativa e quantitativa pode ser realizada em microplacas de 96 poços de fundo chato, no qual a densidade óptica do biofilme formado, tanto no fundo quanto nas paredes dos poços, é determinada por espectrofotometria (CHRISTENSEN et al., 1985; STEPANOVIC et al., 2000).

A combinação de dois ou mais métodos de avaliação fenotípica de biofilmes deve ser considerada, visto que o crescimento de *Salmonella* em cultivo em placas é regulado de forma diferente do que quando em cultivo em caldo, devido a diferenças no fornecimento de nutrientes e oxigênio, proximidade das células, acúmulo de metabólitos, entre outros fatores (WANG et al., 2004).

Diversos estudos de avaliação fenotípica têm demonstrado que de 60% a 90% dos isolados de *Salmonella* apresentam morfologia Rdar (SOLANO et al., 2002;

RÖMLING et al., 2003; MALCOVA et al., 2008; O'LEARY et al., 2013; SEIXAS et al., 2014). White e colaboradores (2006) demonstraram que isolados de *Salmonella* com morfologia Rdar possuem maior resistência à dessecação, tendo uma taxa de sobrevivência de 68% e de 9,7% quando em estocagem por três e nove meses, respectivamente. Em contraste, a taxa de sobrevivência foi de 6,2% e 0,27%, respectivamente, em cepas com deleção nos genes responsáveis pela produção de fímbria *curli* e celulose. No mesmo estudo, isolados Rdar sofreram redução de 1 a 2 ciclos logarítmicos, quando submetidos à estocagem por três meses seguida de tratamento com hipoclorito de sódio a 60 ppm, enquanto cepas com deleção tiveram uma redução de pelo menos 6 logs.

A habilidade de formar biofilmes pode ser um fator determinante para a persistência de *Salmonella* na cadeia produtiva de suínos. A higienização de superfícies em ambientes de produção de alimentos é afetada pelas propriedades de resistência a dessecação e a desinfetantes, conferida pelos biofilmes, implicando em falhas na higienização e conferindo persistência e contaminação de alimentos com micro-organismos patogênicos presentes nos biofilmes.

2.4 Tipagem molecular

A tipagem molecular tem como objetivo determinar a relação genética entre micro-organismos previamente relacionados epidemiologicamente e fenotipicamente. Os métodos de tipagem molecular são fundamentais para o entendimento da epidemiologia das doenças, rastreamento de linhagens patogênicas, identificação de fontes de infecção e para o monitoramento e controle das doenças infecciosas (BELKUM et al., 2001; RANJBAR et al., 2014).

Os métodos de tipagem molecular mais usualmente utilizados são baseados no DNA microbiano e podem envolver a análise do cromossomo total ou dos plasmídeos, utilização de enzimas de restrição, de forma a separar o DNA em fragmentos, e análise de polimorfismos genéticos (GILBERT, 2002). A escolha do método deve ser baseada em características de reprodutibilidade, poder discriminatório e facilidade de execução.

Em *Salmonella*, o método de macro-restrição por PFGE permanece como padrão ouro (ANONYMOUS, 2009). Beutlich e colaboradores (2011) utilizaram métodos de tipagem molecular, incluindo PFGE, para investigar as propriedades moleculares e a relação epidemiológica entre isolados de *Salmonella* de origem humana, animal e de

alimentos. Da mesma forma, Kim e colaboradores (2011) puderam confirmar a relação epidemiológica entre isolados de *Salmonella* com mesmo perfil de resistência e Hendriksen e colaboradores (2012), também através de PFGE, confirmaram o mesmo perfil molecular de amostras de *Salmonella* Stanley isoladas de pacientes asiáticos e isoladas de pacientes europeus que haviam recentemente viajado para o sul da Ásia.

Na cadeia produtiva de suínos, o método PFGE também pode ser utilizado para rastrear a origem de contaminação em carcaças de suínos e relacionar os isolados com fontes ambientais e animais (BOTTELDOORN et al., 2004). Giovannacci e colaboradores (2001) demonstraram, através de PFGE, concordância entre isolados de *Salmonella* Typhimurium e Derby de carcaças suínas e de ambiente ou de linfonodos mesentéricos do mesmo grupo amostrado.

A relação epidemiológica entre isolados de suínos, de alimentos de origem suína e de infecções em humanos pode ser analisada através dos métodos de tipagem molecular. Hauser e colaboradores (2011) demonstraram, através de PFGE e de outros métodos moleculares, a frequência de um mesmo clone de *Salmonella* Derby entre isolados de suínos e de humanos na Alemanha. Da mesma forma, Valdezate e colaboradores (2005) puderam definir a diversidade genética de isolados de *Salmonella* Derby em diversas fontes da Espanha e puderam identificar dois clones intimamente relacionados, sendo um identificado em isolados de alimentos de origem suína e de humanos e o outro em isolados da cadeia produtiva de suínos.

Outros métodos já foram propostos para tipagem molecular de *Salmonella*, como métodos primários e/ou como métodos auxiliares. Entre eles, pode-se citar a tipagem baseada em sequências multilocus (MLST, sigla em inglês) (TORPDAHL et al., 2005; PERRON; BELL; QUESSY, 2008), polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados (AFLP, sigla em inglês) (TORPDAHL et al., 2005), e PCR de elementos repetitivos (Rep-PCR) (RASSCHAERT et al., 2005), entre outros. Deve-se sempre considerar que a discriminação dos isolados é reforçada pela combinação de dois ou mais métodos de tipagem, incluindo os métodos fenotípicos, como perfil de resistência e outros. Assim, a escolha dos métodos para tipagem molecular deve discorrer das características próprias de cada método e do poder de complementaridade entre eles.

2.5 Salmonelose em Humanos

A epidemiologia das infecções causadas por *Salmonella* varia conforme os sorovares envolvidos. Enquanto os sorovares Typhi e Paratyphi causam uma doença sistêmica grave e potencialmente fatal conhecida como febre tifoide, os sorovares não-tifóides causam uma gastroenterite auto limitante de severidade leve a moderada. Entretanto, os sorovares não-tifóides podem ocasionar graves complicações pós-infecção, incluindo septicemia, pneumonias, artrites e aneurismas (LOCHT; MØLBAK; KROGFELT, 2002; TERNHAG et al., 2008; KUHN et al., 2012).

A gastroenterite aguda, ocasionada pela infecção por *Salmonella* não-tifóide, aparece dentro de 6 a 72 horas após a ingestão de água ou alimentos contaminados e inclui sintomas como diarreia, vômitos, dor abdominal e febre. O tratamento inclui reposição de fluidos e a antibacteriano-terapia não é indicada para gastroenterites leves a moderadas (HOHMANN, 2001). Cerca de 5% dos indivíduos acometidos por *Salmonella* desenvolvem bacteremia. Os pacientes imunologicamente comprometidos são mais propensos a desenvolver bacteremia e infecções focais, que incluem meningites, artrite séptica, osteomielite, pneumonia, entre outros. Nesses casos, o tratamento antibacteriano pode ser indicado, juntamente com culturas de sangues adicionais (HOHMANN, 2001).

Os principais veículos de *Salmonella* são os alimentos de origem animal, incluindo os alimentos de origem suína. Nos Estados Unidos, *Salmonella* é o segundo maior patógeno de origem alimentar e o maior patógeno atribuído a hospitalizações e a casos de óbito decorrentes de doenças transmitidas por alimentos (SCALLAN et al., 2011), e a carne suína é um dos produtos mais propensos a causar doença, quando consideradas as taxas de consumo (CENTER FOR SCIENCE IN THE PUBLIC INTEREST, 2014).

Na União Europeia, *Salmonella* é o segundo maior patógeno gastrointestinal de humanos e o suíno é a segunda maior fonte de salmonelose humana, com 43,8% dos casos atribuídos, sendo que Typhimurium, Enteretidis e Derby são os principais sorovares referidos a esta fonte (PIRES; KNEGT; HALD, 2011; EFSA, 2015). Na França, o sorovar Derby se classifica entre o terceiro e o quarto na prevalência entre os isolados humanos e está provavelmente relacionado com suínos (KEROUANTON et al., 2013). Na China, o sorovar Derby aparece como um dos principais isolados de salmoneloses humanas (XIA et al., 2009; KE et al., 2014).

No Brasil, a vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos (VE-DTA) iniciou-se em 1999. De 2000 a 2014, a VE-DTA recebeu notificação de 9.719 surtos, com 192.803 doentes e 1.948.144 expostos. O agente etiológico mais frequente foi *Salmonella* sp., presente em 38,2% dos surtos identificados. Os alimentos mistos foram o principal veículo de transmissão, sendo causa de 30,6% dos surtos. Os alimentos de origem suína foram causa de 4,3% dos surtos. Deve-se levar em conta, ainda, que 43% dos alimentos envolvidos não foram identificados (BRASIL, 2014).

2.6 Contaminação da Cadeia Produtiva de Suínos por *Salmonella*

A contaminação por *Salmonella* está presente em diferentes fases da cadeia de produção da carne suína e pode originar-se de qualquer ponto, desde a alimentação dos animais nas granjas, nas próprias granjas, durante os processos do abate, durante a produção e processamento dos produtos e subprodutos suínos, na comercialização de carne suína crua e de subprodutos e no decorrer da preparação dos alimentos na casa dos consumidores e nos serviços de alimentação (LO FO WONG et al., 2002).

Suínos podem ser infectados por praticamente todos os sorovares de *Salmonella*, entretanto a infecção raramente causa doença, com exceção do sorovar Choleraesuis, que pode causar septicemia e infecção sistêmica com alta mortalidade, e do sorovar Typhimurium, que pode causar diarreia e infecção sistêmica com mortalidade tipicamente baixa (BARROW et al., 2010; CARLSON; BARNHILL; GRIFFITH, 2012). A infecção pelos demais sorovares resulta em diarreia branda ou em infecções subclínicas e, em ambos os casos, os suínos infectados podem tornar-se portadores, persistindo nesse estado por pelo menos três semanas após a infecção (FEDORKA-CRAY et al., 1994). O sorovar Derby é fortemente adaptado aos suínos, sendo o segundo sorovar de maior prevalência nessa espécie, após *S.* Typhimurium (GIOVANNACCI et al., 2001; EFSA, 2008a; MATIASOVIC et al., 2014).

A ração pode ser considerada a principal fonte de introdução de *Salmonella* em regiões de baixa prevalência, e pode ter importância discutível em regiões de elevada prevalência (EFSA, 2008b). Outra importante fonte de introdução é a entrada de animais portadores de *Salmonella*, que contaminam o ambiente e, subsequentemente, os animais. Ainda, os processos de higienização, quando seguidos os critérios, minimizam o mecanismo de transmissão fecal-oral e diminuem a pressão da infecção (LO FO WONG et al., 2004; VAN DER GAAG, 2004; KICH et al., 2005). Deve-se considerar,

ainda, que muitas granjas possuem sua própria microbiota de *Salmonella*, e que esta só pode ser desfeita com controles rígidos de higienização e de biosseguridade (BERENDS et al., 1998).

O risco de contaminação durante o processo de abate, tanto do produto final quanto dos equipamentos e do espaço físico do abatedouro, é consideravelmente maior quanto maior for o total de suínos carreando *Salmonella* nos abatedouros. A frequência de isolamento de *Salmonella* previamente ou durante o abate também é maior, quando comparada com a frequência de isolamento nas granjas (HURD et al., 2002, 2003; FOSSE et al., 2008). A razão dessa diferença pode ser explicada, em parte, pelo estresse causado pela privação de alimentos e pelo transporte, que aumenta a excreção fecal de *Salmonella*, proporciona a reativação da excreção por portadores latentes e aumenta a suscetibilidade a novas infecções (BERENDS et al., 1996; SEIDLER et al., 2001; MOREIRA et al., 2010; VERBRUGGHE et al., 2012).

Outro agravante é o tempo de espera pré-abate, no qual pocilgas contaminadas podem ser importantes fontes de infecção (ROSTAGNO et al., 2001; DE BUSSER et al., 2011). Alguns cuidados durante o tempo de espera pré-abate podem minimizar o risco de infecção, como higienização correta das pocilgas, tempo de jejum mínimo de 12 horas e máximo de 18 horas, e redução do tempo de espera para 2 a 4 horas (LUDTKE et al., 2010). Hurd e colaboradores (2002) demonstraram que grande parte das infecções detectadas após a saída dos animais das granjas não é devido à reativação de portadores latentes, e sim a novas infecções que ocorreram durante o transporte ou durante a espera pré-abate.

No processo de abate, as carcaças podem ser contaminadas direta ou indiretamente, por intermédio de suínos carreando *Salmonella* no conteúdo gastrointestinal, ou mesmo na pele, ou por equipamentos e utensílios contaminados (BOTTELDOORN et al., 2003; EFSA, 2011; DE BUSSER et al., 2013). Alguns aspectos técnicos podem favorecer ou reduzir a contaminação cruzada durante o processo de abate. A depilação, o polimento e a evisceração são etapas que podem levar a um aumento da contaminação, enquanto que o chamuscamento e a escalda diminuem significativamente (BERENDS et al., 1997, BOLTON et al., 2002). Bolton e colaboradores (2002) demonstraram que a lavagem pré-abate e a lavagem final da carcaça não são capazes de alterar a contagem de bactérias viáveis na pele e na carcaça, respectivamente.

Segundo Berends e colaboradores (1997), a evisceração contribui em 55% a 90% das contaminações das carcaças por *Salmonella* e os equipamentos utilizados durante o polimento contribuem em 5% a 15%. O tanque de escaldagem e a serra utilizada na divisão das carcaças devem receber igual atenção, por serem possíveis fontes de contaminação (DE BUSSER et al., 2011). Em um estudo de prevalência de *Salmonella* em suínos durante o abate e em amostras do ambiente de diferentes abatedouros, Batteldoorn e colaboradores (2003) demonstraram que as amostras ambientais foram positivas para *Salmonella* em uma frequência de 92% a 100%, com flutuação de 33% a 75% entre os abatedouros analisados. Amostras de facas e outros equipamentos também foram positivos para *Salmonella*.

Diversos estudos objetivam avaliar a prevalência de *Salmonella* nos abatedouros, a partir de amostras das carcaças, de fezes, do ambiente, entre outras. No Brasil, os estudos de prevalência e de frequência de isolamento de *Salmonella* concentram-se na região sul e possuem valores variáveis. Kich e colaboradores (2011) encontraram uma prevalência de 24% em carcaças e de 67% em linfonodos de suínos abatidos em Santa Catarina. Em outro estudo, realizado em abatedouros de suínos no Rio Grande do Sul, Bessa e colaboradores (2004) constataram prevalência de 55,6% de *Salmonella*, sendo que as prevalências dos linfonodos e das fezes foram de 17,6% e de 18,3%, respectivamente. Ainda no Rio Grande do Sul, foi demonstrada prevalência de 83,3% em amostras de linfonodos, tonsilas e conteúdo intestinal (CASTAGNA et al., 2004) e frequência de isolamento de *Salmonella* variando entre 62,5% e 85,0% em amostras de linfonodos (SCHWARZ et al., 2009). Estudos de prevalência e de frequência de isolamento em outros estados do Brasil são escassos. Silva e colaboradores (2009) demonstraram prevalência de 16,6% em amostras de linfonodos e tonsilas de suínos abatidos no Mato Grosso do Sul. Nos estudos mencionados, o sorovar Derby tem se conservado entre os principais sorovares isolados de carcaças, linfonodos e fezes de suínos.

As carcaças contaminadas por *Salmonella* na linha final do abate podem contaminar todas as fases subsequentes ao abate. Nas salas de corte e desossa, as taxas de contaminação são similares às encontradas nos processos finais do abate (DELHALLE et al., 2009). Segundo Lo Fo Wong e colaboradores (2002), os fatores que influenciam a qualidade microbiológica dos cortes de carnes são: manuseio da matéria-prima, tempo e temperatura. O adequado manuseio da matéria-prima é capaz de diminuir a contaminação cruzada entre os produtos. Já o abuso no tempo e na

temperatura proporciona a multiplicação e sobrevivência de micro-organismos patogênicos nos cortes cárneos. Se a temperatura da estocagem e do transporte dos produtos finais se mantiver abaixo de 6ºC, o crescimento de *Salmonella* é mínimo (LO FO WONG et al., 2002).

No estudo de Delhalle e colaboradores (2009), foi constatado alto nível de contaminação por *Salmonella* em apenas alguns dos cortes cárneos amostrados. Entretanto, durante o processo de moagem da carne há mistura dos cortes, que resulta na disseminação da *Salmonella* na carne moída. Nas diferentes etapas do processamento da carne crua, e mesmo durante a venda a varejo, há mistura de lotes de diferentes origens, proporcionando oportunidade para contaminação cruzada e propagação de micro-organismos patogênicos (LO FO WONG et al., 2002). A prevalência de *Salmonella* nos cortes de carnes suínas é bastante variável. Prendergast e colaboradores (2008) demonstraram prevalência de 3,3% em carnes suínas e constataram alta variabilidade durante as visitas realizadas, com variação de 0% até 31,7%. No mesmo estudo, foi demonstrada predominância dos sorovares Typhimurium e Derby, sendo condizente com os sorovares predominantemente isolados durante o abate em diversos estudos. Outros estudos apontam prevalência de *Salmonella* de 3,3% e 4,2% em cortes de carne suína (ZHAO et al., 2001; HANSEN; CHRISTENSEN; AABO, 2010). Hansen e colaboradores (2010) demonstraram ainda prevalência de *Salmonella* de 8,1% e de 2,6% em cortes de carne suína obtidos de açougues e de supermercados, respectivamente.

Da mesma forma, a qualidade microbiológica dos produtos suínos tipo frescal é dependente da inocuidade da matéria-prima. Em um estudo realizado por Castagna e colaboradores (2004), foi evidenciada prevalência média de 83,3% de suínos portadores de *Salmonella* e, em associação, prevalência média de 93,9% de *Salmonella* no produto final (massa para embutimento). Outros estudos demonstram prevalência de 11,8% (LOGUERCIO et al., 2002), 17,6% (GIOVANNINI et al., 2004), 24,4% (MÜRMANN et al., 2009) e 27% (SPRICIGO et al., 2008) em linguiças frescais suínas.

Diversas medidas de controle foram propostas para a redução da contaminação cruzada durante a linha de abate e o processamento das carnes suínas. Algumas regras gerais são aceitas para a produção de alimentos livre de *Salmonella*, como higienização regular e controlada das pocilgas e dos caminhões de transporte, dos utensílios e equipamentos e do ambiente de produção; treinamento e conduta higiênica dos manipuladores de alimentos; e controle integrado de pragas (BERENDS et al., 1998).

Entretanto, estas medidas não são suficientes para redução eficiente da contaminação cruzada de *Salmonella*, sendo necessária a aplicação de medidas de controle nos pontos críticos já mencionados, como no transporte e nas pocilgas de espera, durante os diversos processos do abate e na manipulação das matérias-primas e dos produtos finais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolados

Foram recuperados 140 isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Derby (*S.* Derby) pertencentes à coleção de culturas do Setor de Medicina Veterinária Preventiva-FAVET-UFRGS (TABELA 1). Os isolados analisados são provenientes de amostras coletadas em matadouros-frigoríficos de suínos localizados nos Estados de Santa Catarina (SC) e do Rio Grande do Sul (RS) e de produtos de origem suína obtidas em supermercados e açougues da cidade de Porto Alegre (RS).

TABELA 1 – Isolados de *Salmonella* Derby analisados no presente estudo.

Grupo amostral	Material de origem	Nº de Isolados	Período da coleta	Referência
1	Linfonodo mesentérico	12	1999 – 2000	BESSA; COSTA; CARDOSO, 2004
	Fragmento do intestino	12		
2	Linfonodos submandibulares e tonsilas	13	2001 – 2002	FERRAZ et al., 2004a FERRAZ et al., 2004b
	Conteúdo intestinal	4		
3	Massa para embutimento	7	2005	SCHWARZ et al., 2011
	Linfonodo mesentérico	28		
4	Lingüiça frescal suína	9	2005	MÜRMANN; SANTOS; CARDOSO, 2009
5	Carcaça de suíno	21	2007 – 2009	SILVA et al., 2012
	Conteúdo Intestinal	10		
	Baias de espera	2		
6	Piso evisceração	1	2010	PISSETTI et al., 2012
	Carcaça de suíno	16		
	Mesa de miúdos	2		
	Baias de espera	3		
	Total	**140**		

3.2 Concentração Mínima Inibitória (MIC) de antimicrobianos

A concentração mínima inibitória (MIC) foi determinada pelo Método de Microdiluição em Caldo, como preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards*

Institute (CLSI, 2012; CLSI, 2013), em placas de 96 poços de fundo chato (SPL Life Science, Coréia).

Os seguintes antimicrobianos foram utilizados: ácido nalidíxico (Sigma-Aldrich, EUA), ampicilina (Sigma-Aldrich, EUA), cefotaxima (Sigma-Aldrich, EUA), ceftazidima (Sigma-Aldrich, EUA), ciprofloxacina (Sigma-Aldrich, EUA), colistina (European Pharmacopeia, Reino Unido), estreptomicina (Carl Roch, Alemanha), florfenicol (Sigma-Aldrich, EUA), gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA) e tetraciclina (Sigma-Aldrich, EUA).

A escolha do conjunto de antimicrobianos testados, do intervalo de concentrações testadas e dos valores de ECOFF e de *breakpoint* utilizados na interpretação dos resultados foi realizada de acordo com as recomendações do EUCAST (EFSA, 2012). Na ausência dos critérios interpretativos do EUCAST, os valores de *breakpoints* do CLSI foram adotados (CLSI, 2013) (TABELA 2). A cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade para todos os testes realizados. Para fins de avaliação dos isolados, os valores de ECOFF foram utilizados, enquanto que os valores de *breakpoint* foram adotados para estabelecer o perfil fenotípico de resistência antimicrobiana.

Para preparação das soluções estoque, foram adotados os solventes e diluentes recomendados pelo CLSI (2013), ou conforme instruções dos fabricantes. As concentrações das soluções estoque foram equivalentes a dez vezes a concentração mais alta a ser testada e de pelo menos 1000 mg/L. Após completa homogeneização, as soluções estoque foram fracionadas em volumes de um a cinco mililitros, acondicionadas em tubos de ensaio e armazenadas a -20ºC até a utilização. Como exceção, a solução estoque de ceftazidima foi utilizada imediatamente após o preparo, em cada dia de teste, pois não pode ser estocada por um período superior a seis horas. As concentrações dos antimicrobianos foram obtidas através de diluições seriadas das soluções estoque, em caldo Mueller Hinton cátion ajustado (CAMBH) (Fluka, EUA).

O caldo CAMBH, já acrescido de antimicrobiano, foi distribuído em ordem crescente de concentração nos poços, com um volume final de 90 μL. Após, adicionou-se os isolados a serem testados em uma concentração de 5×10^4 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por poço. Para obtenção da concentração final de cada isolado, foram utilizadas culturas de 18 horas e, a partir destas, os isolados foram ajustados até turvação equivalente a 0,5 da escala de MacFarland – correspondente a 1×10^8 UFC. Após, foi realizada diluição 1:20 para atingir uma concentração de

5 x 10^6 UFC e, desta, foram transferidos 10 µL para os poços contendo 90 µL de caldo CAMBH já acrescido de antimicrobiano, resultando em concentração final de 5 x 10^5 UFC por mililitro, ou ainda, 5 x 10^4 UFC por poço (FIGURA 2).

TABELA 2 – Antimicrobianos testados, intervalo das concentrações e valores de ECOFF e de *breakpoint*.

Antimicrobianos	Concentrações (mg/L)	ECOFF (mg/L) [a]	*Breakpoint* (mg/L)
Ácido nalidíxido	1-128	> 16	> 16 [c]
Ampicilina	0,5-128	> 8	> 8 [b]
Cefotaxima	0,015-4	> 0,5	> 2 [b]
Ceftazidima	0,06-8	> 2	> 4 [b]
Ciprofloxacina	0,008-16	> 0,064	> 1 [b]
Colistina	0,12-16	> 2	> 2 [b]
Estreptomicina	1-128	> 16	> 32 [e]
Florfenicol	2-256	> 16	> 16 [d]
Gentamicina	0,25-32	> 2	> 4 [b]
Tetraciclina	0,5-128	> 8	> 8 [c]

[a] Fonte: http://mic.eucast.org/Eucast2/
[b] EFSA, 2012
[c] CLSI, 2013
[d] CLSI, 2008
[e] Fonte: http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/60400520/NARMS/ABXSalm.pdf

Após, as placas foram seladas com parafilme e incubadas a 35±2ºC por 16-20 horas. As placas foram examinadas sob um fundo escuro e a menor concentração de um dado antimicrobiano na qual não pode ser observado crescimento bacteriano foi considerada a Concentração Mínima Inibitória (MIC) do antimicrobiano para o isolado testado.

O isolado em teste foi inoculado em CAMBH sem antimicrobiano, para certificar a capacidade de crescimento bacteriano (controle positivo). Como controle negativo, poços da placa de teste foram preenchidos com 100 µL de CAMBH sem antimicrobiano e sem inóculo. Em cada placa, a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 foi inoculada como controle de qualidade do teste.

Periodicamente, a contagem em placa das suspensões da cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 foi realizada. Para tanto, 10 µL do poço controle positivo foram inoculados em 10 mL de salina e, desta, 100 µL foram espalhados pela técnica de *spread plate* em TSA e incubados a 35±2ºC por 18-24 horas. A contagem de 20 a 80 colônias, correspondendo a 2 a 8 x 10^5 UFC por mililitro, garantia que a correta diluição dos micro-organismos estava sendo realizada.

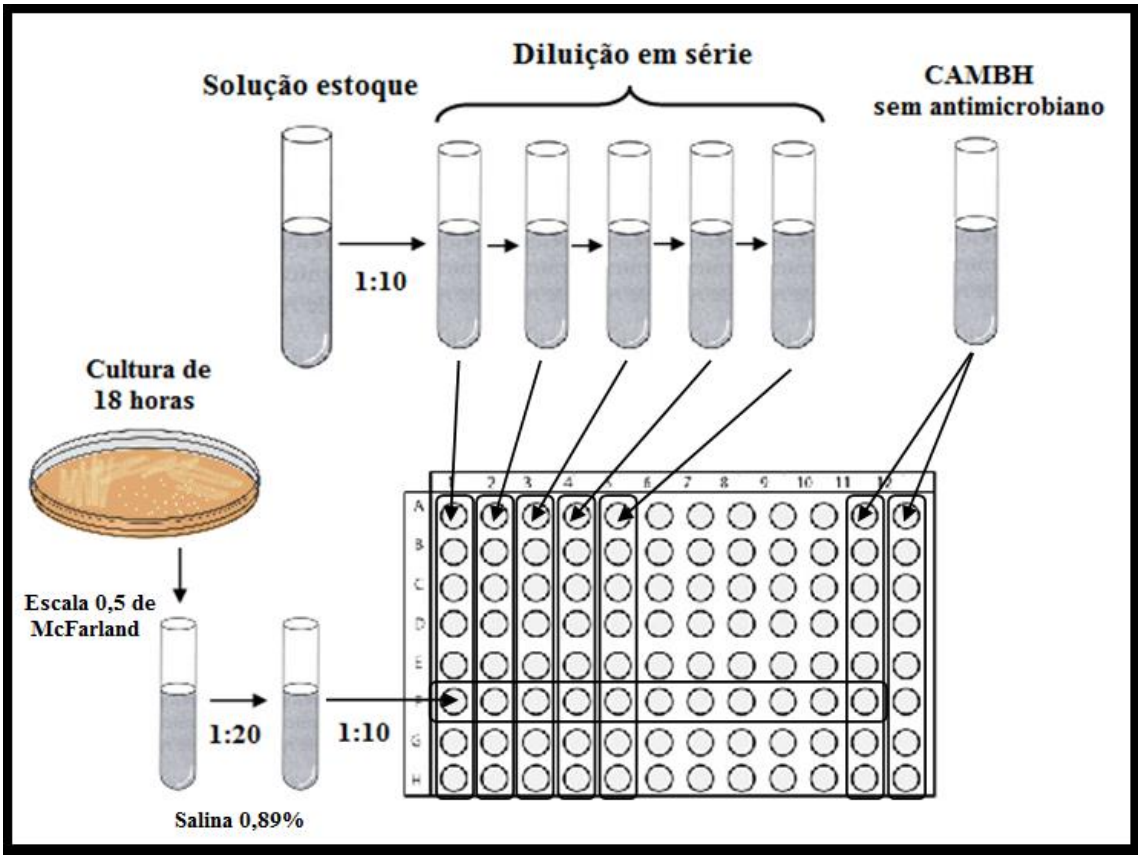

FIGURA 2 – Esquema dos procedimentos adotados para determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) de antimicrobianos para isolados de *Salmonella* Derby.

3.3 Detecção fenotípica de fímbria *curli* e celulose pelos isolados de *Salmonella* Derby

A detecção da expressão fenotípica de fímbria *curli* e de celulose foi avaliada pelo cultivo dos isolados em placas contendo caldo Luria com 0,5% de NaCl (LB *low salt*) acrescido de 1,6% de ágar bacteriológico (HiMedia Laboratories, India), 40 µg/mL de Vermelho Congo (Sigma-Aldrich, EUA) e 20 µg/mL de corante Brilliant Blue G

(Sigma-Aldrich, EUA). A detecção fenotípica de celulose também foi avaliada em placas contendo caldo LB *low salt* suplementado com 1,6% de ágar bacteriológico (HiMedia Laboratories, India) e 50 µM de Fluorescent Brightener 28 (Sigma-Aldrich, EUA), o qual emite fluorescência visível sob luz UV 366 nm quando está ligado à celulose.

Os testes foram conduzidos tanto pela incubação das culturas a 37ºC por 24 horas quanto a 28ºC por 48 e 96 horas (RÖMLING et al., 2003; MALCOVA et al., 2008), a fim de observar a influência da temperatura de incubação na expressão das estruturas analisadas. Todos os ensaios, em ambas as temperaturas, foram realizados em duplicata e repetidos por pelo menos três vezes.

As morfologias das colônias observadas foram categorizadas como: Rdar (colônia vermelha, rugosa e seca), Pdar (colônia rosa, rugosa e seca), Bdar (colônia marrom, rugosa e seca) e Saw (colônia branca e mucoide). A morfologia Rdar significa que houve a expressão tanto de celulose quanto de fímbria *curli*; Pdar resulta da expressão de celulose e Bdar de fímbria *curli* isoladamente. Quando ocorre a morfologia Saw, não houve expressão de celulose ou fímbria *curli*. As cepas *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 foram utilizadas como controle para a morfologia Rdar e para a morfologia Saw, respectivamente.

3.4 Formação de película na interface ar-líquido pelos isolados de *Salmonella* Derby

A avaliação da formação de biofilme na interface ar-líquido foi realizada através da inoculação de culturas de 18 horas em caldo Luria convencional (LB) (Acumedia Manufactures, EUA) e em LB *low salt* (Sigma-Aldrich, EUA), em tubos de ensaio de vidro. As diferentes concentrações de NaCl dos caldos utilizados foram empregadas para analisar a influência da osmolaridade na formação de película. Os caldos inoculados foram incubados a 25ºC por 96 horas (SOLANO et al., 2002). A formação de biofilme foi considerada positiva quando uma película na interface ar-caldo, com bloqueio total da superfície do caldo, e que não podia ser dispersa por agitação, foi formada. Todos os ensaios foram realizados em três repetições. As cepas *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

3.5 Quantificação da adesão dos isolados de *Salmonella* Derby em placas de poliestireno

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços de fundo chato (Techno Plastic Products, Alemanha), contendo 230 µL de caldo Soja Triptona sem glicose (TSB sem glicose) (Becton Dickinson & Company, EUA). Em cada poço foram inoculados 20 µL de uma cultura de 18 horas, de cada isolado, ajustada até turvação equivalente a 0,5 da escala de MacFarland. O controle negativo era constituído por poços contendo apenas TSB sem glicose. As cepas *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foram utilizadas como controle positivo para a produção de biofilme e a cepa *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 como controle negativo para a produção de biofilme. O teste de cada isolado foi realizado em triplicata e repetido pelo menos três vezes. Os ensaios foram conduzidos tanto pela incubação das placas a 37ºC por 24 horas quanto a 28ºC por 96 horas (STEPANOVIC et al., 2004).

Após incubação, em ambas as temperaturas, os poços foram esvaziados com auxílio de pipeta automática e lavados com água destilada por três vezes. Durante o processo de lavagem, as microplacas foram vigorosamente agitadas para remoção de todas as células não aderidas. As células remanescentes foram fixadas com 250 µL de Metanol 99% e, após 15 minutos, os poços foram esvaziados e deixados secar. As microplacas foram coradas com 250 µL de Solução Cristal Violeta de Hucker a 2% durante cinco minutos. O excesso de corante foi removido com lavagens com água destilada. Para a leitura e quantificação, os poços foram preenchidos com 250 µL de Ácido Acético Glacial 33% (v/v) e a densidade óptica (OD) lida em comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro Strip Reader (Modelo EL301) (BioTek, EUA).

Para cada microplaca, o ponto de corte (ODc) foi definido como três desvios-padrão acima da média de OD dos controles negativos. Os isolados testados foram classificados em quatro categorias: O.D. ≤ O.D.c = não produtor de biofilme; O.D.c < O.D. ≤ (2x O.D.c) = fraco produtor de biofilme; (2x O.D.c) < O.D. ≤ (4x O.D.c) = moderado produtor de biofilme; e (4x O.D.c) < O.D. = forte produtor de biofilme.

3.6 Macro-restrição e eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A partir da avaliação dos perfis fenotípicos de formação de biofilme e de resistência antimicrobiana, isolados de *Salmonella* Derby foram selecionados para macro-restrição do DNA total e eletroforese em campo pulsado (PFGE), realizadas conforme protocolo do PulseNet (CDC, 2013). Após obtenção de culturas de 18 horas em ágar TSA, foram preparadas – para cada um dos isolados selecionados – suspensões bacterianas em Tampão de Suspensão Celular (100 mM Tris: 100 mM EDTA, pH 8,0). O ajuste da concentração de micro-organismos foi realizado conforme instruções do protocolo do PulseNet, através da leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 610 nm, e ajuste para densidade óptica entre 0,8-1,0.

Após, 400 µL da suspensão bacteriana foram transferidos para novos microtubos, os quais foram incubados em banho-maria a 54-55ºC, e foram adicionados 20 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e 400 µL de solução agarose 1%, previamente mantidos em banho-maria a 54-55ºC. As suspensões, já com os acréscimos, foram cuidadosamente homogeneizadas e rapidamente inoculadas em moldes próprios para formação de blocos de agarose, os quais foram mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos para completa solidificação. Para promover a lise celular, os moldes de agarose foram inseridos em tubos de Falcon contendo 5 mL de Tampão de Lise Celular (50 mM Tris: 50 mM EDTA, pH 8,0 + 1% sarcosyl) e 20 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e incubados em banho-maria a 54-55ºC por duas horas.

Após a lise celular, os blocos de agarose foram lavados duas vezes com água Milli-Q e três vezes com Tampão TE (10 mM Tris: 1 mM EDTA, pH 8,0). Para cada lavagem, os blocos eram imersos nas soluções de lavagem (água Milli-Q ou Tampão TE) e incubados em banho-maria a 54-55ºC por 10 minutos. Os blocos de agarose foram então transferidos para microtubos contendo 1 mL de Tampão TE e mantidos a 4ºC até a utilização.

A extração do DNA total foi realizada nos blocos de agarose previamente preparados, os quais foram submetidos à digestão com a enzima XbaI (Thermo Scientifics, EUA). Como referência para o tamanho dos fragmentos gerados, foi utilizada a cepa *Salmonella* Braenderup H9812, para a qual foram realizadas as mesmas etapas da preparação dos blocos e digestão enzimática (macro-restrição).

A eletroforese foi realizada no sistema CHEF DR-II (Bio-Red Laboratories, EUA), seguindo os seguintes parâmetros: pulso inicial de 2,2 segundos e final de 63,8

segundos, gradiente de voltagem de 6 V/cm, tempo de corrida de 19-20 horas e manutenção da temperatura em 14ºC. Após, os géis foram corados em solução de brometo de etídio (1 µg/mL) e foto-documentados pelo sistema Kodak Gel Logic 2200.

Os perfis de macro-restrição foram analisados no software GelCompare II (Applied Maths, Bélgica). O coeficiente de Dice foi utilizado para determinar a similaridade entre os perfis analisados, considerando tolerância de 1% para a posição das bandas e optimização de 1%. O dendrograma foi construído pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Isolados com uma banda de diferença foram considerados como pertencentes a diferentes pulsotipos.

4 RESULTADOS

4.1 Concentração Mínima Inibitória (MIC) de antimicrobianos

Para todos os testes realizados, a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 apresentou valores de MIC dentro dos parâmetros estabelecidos pelo CLSI (Tabela 4A – CLSI, 2013). Ainda, em todas as contagens em placa das suspensões da cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 realizadas, foi certificada a concentração de 2 a 8 x 10^5 UFC por mililitro e, consequentemente, garantida a correta diluição dos micro-organismos.

A distribuição da Concentração Mínima Inibitória (MIC) revelou maiores valores de MIC_{50} (concentração mínima capaz de inibir 50% dos isolados) e MIC_{90} (concentração mínima capaz de inibir 90% dos isolados) para os antimicrobianos estreptomicina e tetraciclina, para os quais tanto o MIC_{50} e MIC_{90} ultrapassaram os valores de *breakpoint* e de ECOFF. O antimicrobiano colistina também obteve MIC_{90} acima dos valores de *breakpoint* e de ECOFF. Os antimicrobianos cefotaxima e ciprofloxacina apresentaram os menores valores de MIC_{50} e MIC_{90} (TABELA 3).

Os valores de *breakpoint* clínico foram utilizados para estabelecer os diferentes perfis fenotípicos dos isolados. Não houve resistência detectada para os antimicrobianos ceftaxima, ceftazidima, ciprofloxacina e gentamicina. Já para os antimicrobianos tetraciclina, estreptomicina, colistina, ácido nalidíxico, ampicilina e florfenicol, foi detectada resistência em 106 (75,7%), 54 (38,6%), 16 (11,4%), 13 (9,3%), 8 (5,7%) e 1 (0,7%) isolados, respectivamente. Entre os isolados, 26 (18,6%) foram suscetíveis a todos os antimicrobianos analisados e 12 (8,6%) foram resistentes a três ou mais antimicrobianos de classes distintas, sendo então considerados multi-resistentes. Os valores de ECOFF também foram utilizados para avaliação dos isolados (TABELA 3), para os quais foram observadas as mesmas frequências de isolados resistentes e nWT, exceto para cefotaxima e estreptomicina, para os quais 0,7% e 70% dos isolados foram classificados como nWT, respectivamente.

TABELA 3 – Resultado da Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos isolados de *Salmonella* Derby frente aos diferentes antimicrobianos avaliados.

ATM [a]	Frequência (%) de isolados com MIC (mg/L) igual a:																	MIC50	MIC90	nWT [b]	R [c]
	0,008	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	(mg/L)	(mg/L)	(%)	(%)
NAL	-	-	-	-	-	-	-	0	0	52,1	38,6	0,0	5,0	3,6	0,7	0	-	4	8	9,3	9,3
AMP	-	-	-	-	-	-	1,4	70,7	15,7	6,4	0	0	0	0	0,7	5,0	-	1	4	5,7	5,7
CTX	-	0	0,7	17,9	66,4	13,6	0,7	0,7	0	0	-	-	-	-	-	-	-	0,125	0,25	0,7	0
CTZ	-	-	-	0	2,9	18,6	65,7	12,1	0,7	0	0	-	-	-	-	-	-	0,5	1	0	0
CIP	58,6	32,9	8,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0,008	0,015	0	0
CL	-	-	-	-	0	0	0	13,6	75,0	11,4	0	0	-	-	-	-	-	2	4	11,4	11,4
STR	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0,7	29,3	31,4	3,6	10,0	24,3	0,7	32	256	70,0	38,6
FLF	-	-	-	-	-	-	-	-	0	50,0	48,6	0,7	0	0	0	0	0,7	4	8	0,7	0,7
GEN	-	-	-	-	-	0,7	80,0	19,3	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0,5	1	0	0
TET	-	-	-	-	-	-	0	22,1	2,1	0	0	0	0	27,1	7,1	41,4	-	64	256	75,7	75,7

[a] Antimicrobianos (ATM) avaliados: ácido nalidíxico (NAL), ampicilina (AMP), ceftaxima (CTX), ceftazidima (CTZ), ciprofloxacina (CIP), colistina (CL), estreptomicina (STR), florfenicol (FLF), gentamicina (GEN) e tetraciclina (TET).
[b] Isolados *non-wild type* (nWT), conforme valores ECOFF.
[c] Isolados resistentes (R), conforme valores de *breakpoint* clínicos.
As linhas verticais sólidas indicam os valores ECOFF e as linhas verticais pontilhadas indicam os valores de *breakpoint* clínicos, quando diferentes dos valores ECOFF correspondentes.
As concentrações não incluídas no painel de teste encontram-se tracejadas.

4.2 Detecção fenotípica de fímbria *curli* e celulose pelos isolados de *Salmonella* Derby

Quando incubadas a 28ºC por 48 horas em caldo LB *low salt* acrescido dos corantes Vermelho Congo e Brilliant Blue G, três morfologias foram observadas (FIGURA 3a). A morfologia Rdar (colônia vermelha, seca e rugosa) foi a mais frequente, sendo detectada em 59 (42,1%) isolados. As morfologias Saw (colônia marrom e mucoide) e Pdar (colônia rosa, seca e rugosa) foram observadas em 46 (32,9%) e em 35 (25%) isolados, respectivamente. Quando incubadas a 37ºC por 24 horas, todas as amostras – exceto um isolado, de morfologia Pdar – apresentaram a morfologia Saw.

Os isolados foram mantidos a 28ºC por até 96 horas – para melhor distinção entre colônias rugosas e mucoides –, entretanto, a partir de 48 horas de incubação, a morfologia Pdar não pôde ser distinguida da Rdar, sendo necessárias leituras em diferentes tempos de incubação (FIGURA 3b). Todas as amostras classificadas como Rdar ou Pdar foram também positivas para a detecção fenotípica de celulose em meio acrescido de Fluorescent Brightener 28, enquanto que as amostras de morfotipo Saw foram negativas para a expressão desta estrutura (FIGURA 4).

Para todas as repetições, os controles *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 apresentaram as morfologias Rdar e Saw, respectivamente.

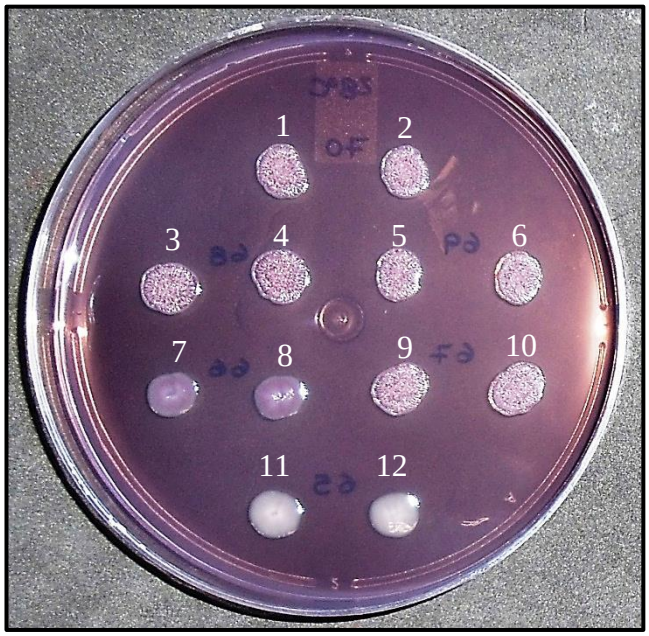

FIGURA 3a – Morfotipos de *Salmonella* Derby em ágar LB *low salt* acrescido dos corantes Vermelho Congo e Brilliant Blue G. Pdar: colônias 1-6 e 9-10; Rdar: colônias 7 e 8; Saw: colônias 11 e 12; após 48 hs de incubação.

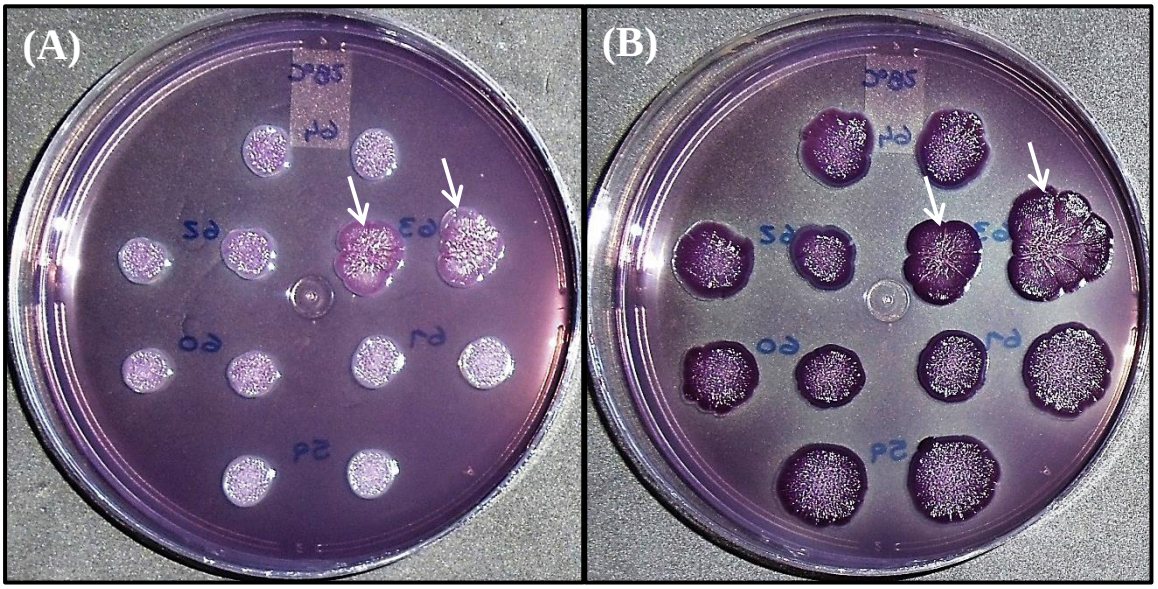

FIGURA 3b – Morfotipos de *Salmonella* Derby em ágar LB *low salt* acrescido dos corantes Vermelho Congo e Brilliant Blue G. (A) Rdar e Pdar (setas) após 48 hs de incubação e (B) Rdar e Pdar (setas) após 96 horas de incubação.

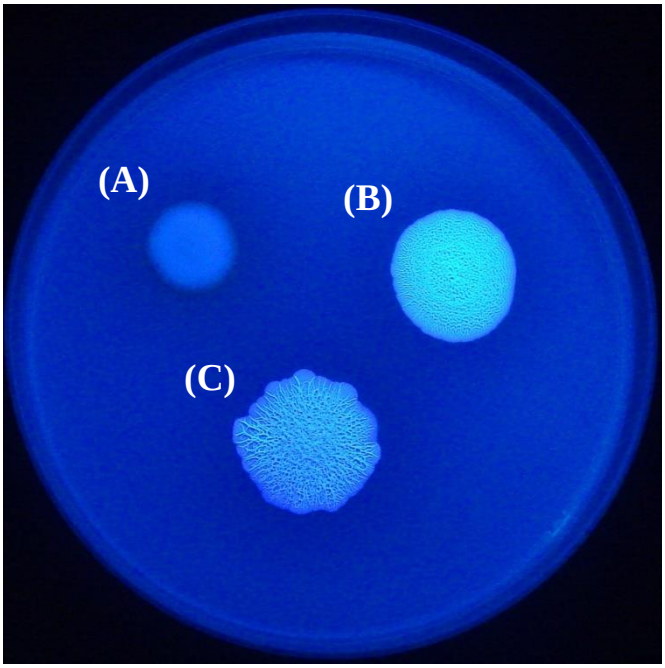

FIGURA 4 – Morfotipos de *Salmonella* Derby em ágar LB *low salt* acrescido de Calcolfuor. (A) Saw, (B) Rdar e (C) Pdar após 48 hs de incubação.

4.3 Formação de película na interface ar-líquido pelos isolados de *Salmonella* Derby

A formação de biofilme na interface ar-líquido foi considerada positiva quando observada uma película entre a interface do ar-caldo, com total bloqueio da superfície do caldo, e que não pôde ser dispersa por agitação (FIGURA 5). As amostras consideradas positivas para formação de biofilme na interface ar-líquido tiveram resultados consistentes entre as repetições. Para as amostras de resultado inconclusivo, as quais a formação de película foi variável entre as repetições, a formação de biofilme foi considerada negativa.

A formação de película rígida, sem dispersão por agitação, foi observada em 24 amostras (17,1%) em caldo LB convencional e em 78 amostras (55,7%) em caldo LB *low salt*. Em ambos os testes, todas as amostras positivas foram posteriormente classificadas como Rdar ou Pdar, confirmando a presença fenotípica de estruturas relacionadas com a formação de biofilme. Em caldo LB *low salt*, apenas 16 amostras (17%) classificadas como Rdar ou Pdar foram negativas para a formação de película na interface ar-líquido, enquanto que em caldo LB convencional uma grande parte das amostras (70 amostras, 74,5%) classificadas nestes morfotipos foi negativa na avaliação subjetiva de formação de biofilme (FIGURA 6).

Para todas as repetições, os controles *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 apresentaram resultado positivo e negativo para formação de película, respectivamente.

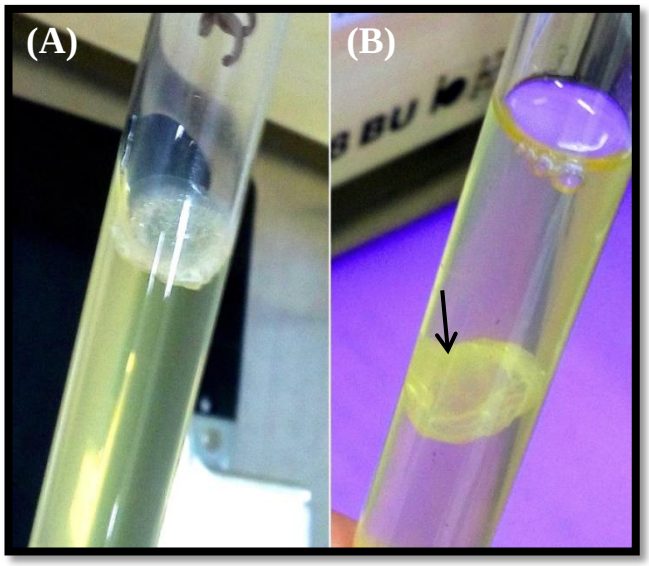

FIGURA 5 – Formação de biofilme em caldo LB *low salt*. (A) Resultado positivo para a presença de rígida película na interface ar-caldo. (B) A positividade é dependente da não dispersão da película (seta) por agitação.

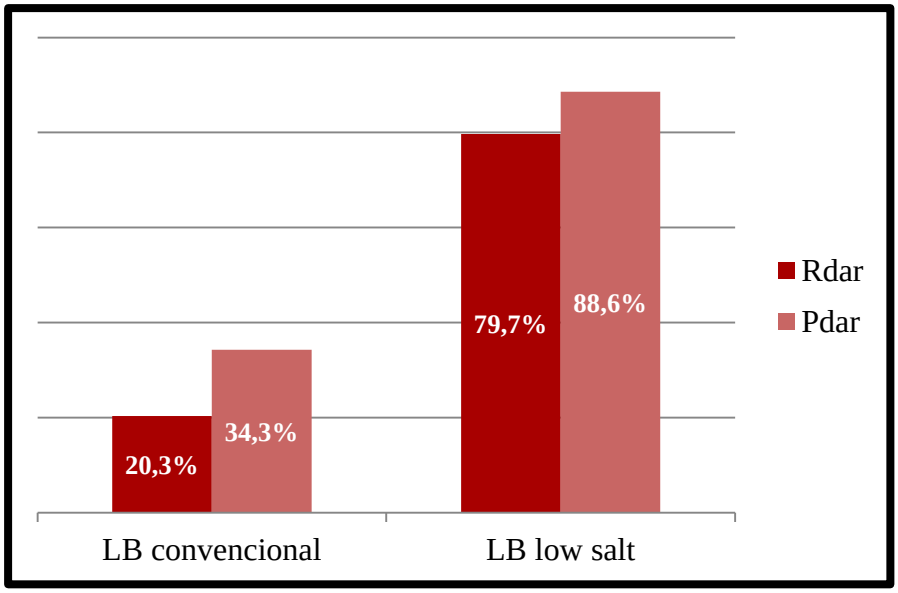

FIGURA 6 – Porcentagem de isolados positivos para formação de biofilme na interface ar-caldo entre os morfotipos Rdar (n = 59) e Pdar (n = 35).

4.4 Quantificação da adesão dos isolados de *Salmonella* Derby em placas de microtitulação

A formação de biofilme em placas de poliestireno pôde ser observada em 8 isolados (5,7%) a 37ºC e em 96 isolados (68,6%) a 28ºC. A 37ºC, os valores de densidade óptica (D.O) variaram de 0,1233 a 0,3647. As médias de D.O obtidas foram de 0,1870 para o ponto de corte (D.O.c), 0,1614 para os isolados considerados não aderentes (D.O < D.O.c) e 0,2082 para os isolados fracamente aderentes (D.O.c > D.O < 2x D.O). Entre os isolados aderentes, 4 (50%) pertenciam à morfologia Pdar e 4 (50%) à morfologia Saw. Não foram observados isolados moderados ou fortemente aderentes à 37ºC.

À 28ºC, os valores de densidade óptica (D.O) variaram entre 0,1203 a 0,8110. As médias de D.O obtidas foram de 0,2156 para o ponto de corte (D.O.c), 0,1901 para os isolados considerados não aderentes (D.O < D.O.c), 0,3538 para os isolados fracamente aderentes (D.O.c > D.O < 2x D.O) e 0,4841 para os isolados moderadamente aderentes (2x D.O.c > D.O < 4x D.O). Entre os isolados aderentes, 59 (61,5%) pertenciam à morfologia Rdar, 35 (36,5%) à Pdar e dois (2,1%) à Saw. Todos os isolados pertencentes à morfologia Rdar e Pdar foram classificados como aderentes. Entre os

isolados Rdar, 29 (49,2%) foram classificados como moderadamente aderentes e 30 (50,8%) como fracamente aderentes. Entre os isolados Pdar, 14 (40%) e 21 (60%) foram classificados como moderado e fracamente aderentes, respectivamente. Os dois isolados Saw foram classificados como fracamente aderentes (FIGURA 7).

Entre as repetições a 37ºC, a cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 apresentou resultado moderaderadamente aderente, enquanto que a 28ºC apresentou-se como fracamente aderente. De forma contrária, a cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 apresentou resultado fracamente aderente a 37ºC e moderadamente aderente a 28ºC. A cepa *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 não apresentou aderência em nenhuma das temperaturas avaliadas.

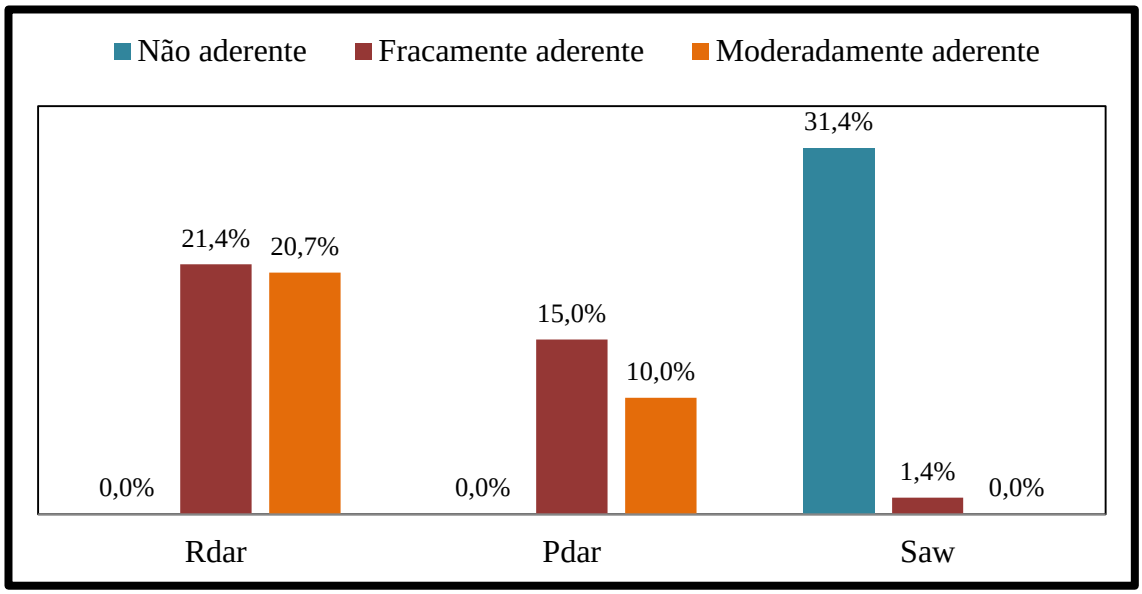

FIGURA 7 – Distribuição dos isolados de morfotipos Saw, Rdar e Pdar (n = 140) entre as categorias de aderência em placas de microtitulação.

4.5 Macro-restrição e eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Baseado nos perfis de formação de biofilme e de resistência (TABELA 4), 36 isolados foram selecionados para análise por eletroforese em campo pulsado (PFGE), sendo que pelo menos um isolado de cada perfil fenotípico foi selecionado para análise por PFGE.

O perfil de PFGE gerado apresentou vinte pulsotipos (FIGURA 8). Entre os isolados, 24 foram agrupados em um *cluster* com 83,6% de similaridade, os quais

apresentam diferentes perfis morfológicos de biofilme, sendo 41,7% pertencendo à morfologia Rdar, 25% à Pdar e 33,3% à Saw. Também foi possível observar 11 pulsotipos com dois ou mais isolados agrupados (com 100% de similaridade), os quais possuíam diferentes perfis de resistência microbiana e de biofilmes, períodos de coleta e materiais de origem (TABELA 5).

TABELA 4 – Perfis fenotípicos de suscetibilidade a antimicrobianos, de acordo com os valores de *breakpoint* clínicos, e de formação de biofilme de *Salmonella* Derby.

Perfil de suscetibilidade	Perfil de biofilme	Representatividade [b]
Suscetíveis [a]	Rdar	2,1%
	Pdar	15,7%
	Saw	0,7%
TET	Rdar	25,0%
	Pdar	4,3%
STR	Pdar	0,7%
NAL	Rdar	2,8%
TET-STR	Saw	30,7%
TET-CL	Rdar	2,1%
	Pdar	3,6%
NAL-CL	Rdar	1,5%
TET-NAL	Rdar	2,1%
TET-STR-AMP	Rdar	1,5%
TET-STR-NAL	Pdar	0,7%
TET-STR-CL	Rdar	0,7%
	Saw	1,5%
AMP-NAL-CL	Rdar	0,7%
AMP-NAL-TET	Rdar	0,7%
TET-STR-AMP-NAL	Rdar	0,7%
TET-STR-AMP-CL	Rdar	1,5%
TET-STR-AMP-FLF	Rdar	0,7%

[a] Isolados suscetíveis a todos os antimicrobianos testados.
[b] Isolados pertencentes ao perfil fenotípico indicado (n = 140).

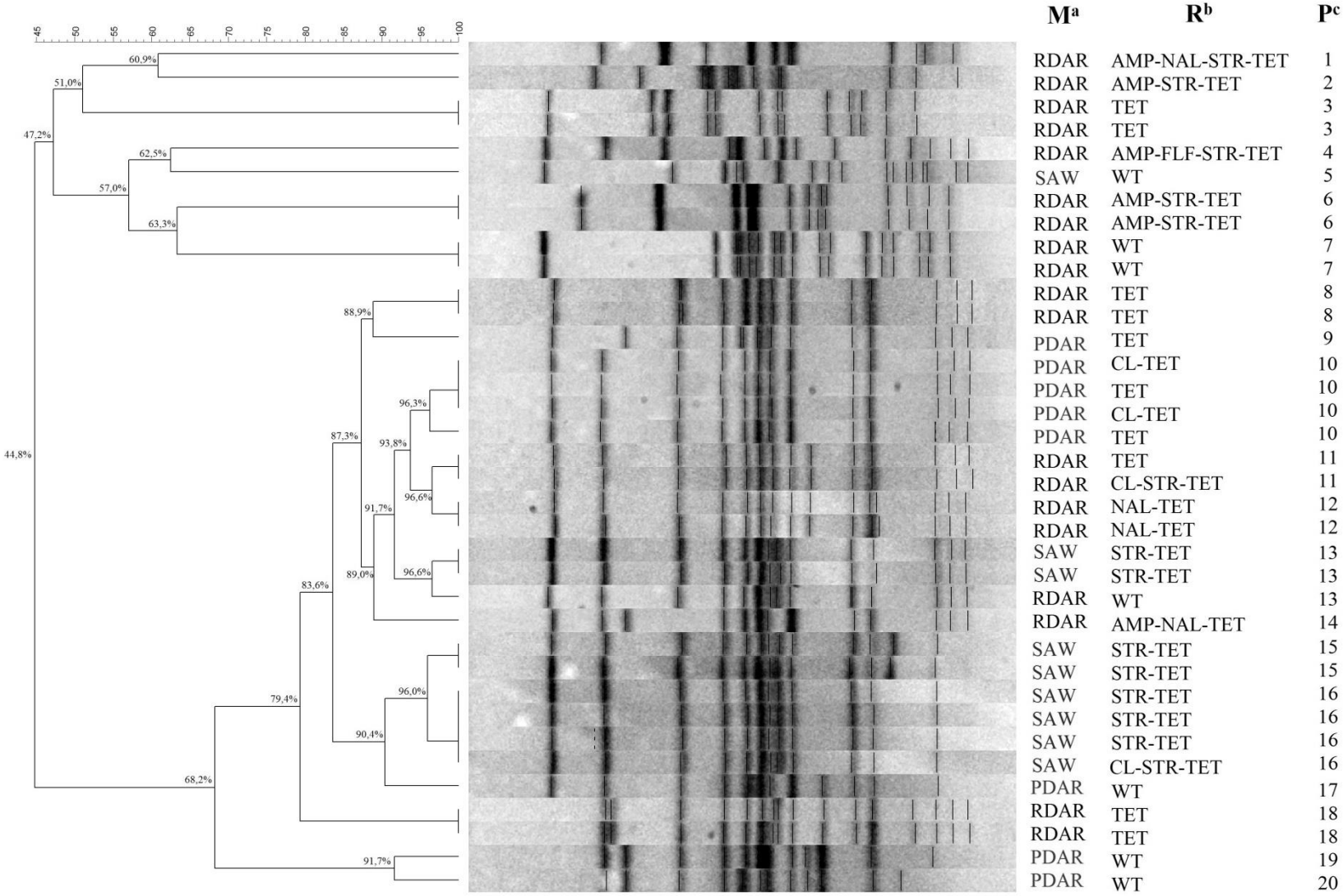

FIGURA 8 – Perfis de PFGE de isolados de *Salmonella* Derby. (M[a]) Morfologia de biofilme. (R[b]) Perfil de resistência. (P[c]) Pulsotipos.

TABELA 5 – Características de cepas de *Salmonella* Derby pertencenter a um mesmo pulsotipo no PFGE.

Pulsotipo	Perfil - Biofilme	Perfil - Resistência	Nº de cepas	Período de coleta	Material de origem
3	Rdar	TET	2	2001-2002	Linfonodo submandibular Massa para embutimento
6	Rdar	AMP-STR-TET	2	2001-2002	Linfonodo submandibular Massa para embutimento
7	Rdar	Suscetível	2	2007-2009	Conteúdo intestinal
8	Rdar	TET	2	2010	Carcaça de suíno
10	Pdar	TET-CL	2	1999-2000 2001-2002	Linfonodo mesentérico Tonsilas
		TET	2	1999-2000 2001-2002	Fragmento de intestino Linfonodo submandibular
11	Rdar	TET TET-STR-CL	2	2005	Linguiça frescal suína
12	Rdar	NAL-TET	2	2005	Linfonodo mesentérico
13	Saw	TET-STR	2	2010	Mesa de miúdos
	Rdar	Suscetível	1	2001-2002	Massa para embutimento
15	Saw	TET-STR	2	2001-2002	Fragmento de intestino
16	Saw	TET-STR	2	2005	Linguiça frescal suína
			1	2007-2009	Carcaça de suíno
	Pdar	TET-STR-CL	1	2010	Carcaça de suíno
18	Rdar	TET	2	1999-2000	Linfonodo mesentérico

5 DISCUSSÃO

A resistência microbiana tem sido um problema mundial desde a descoberta dos antimicrobianos. Os critérios de análise da resistência microbiana são fundamentados nos valores de *breakpoint* clínicos, os quais categorizam os isolados em suscetível (associado ao sucesso terapêutico), intermediário (associado a um efeito terapêutico indeterminado ou incerto) ou resistente (associado a um risco elevado de insucesso na terapêutica). Entretanto, os valores de *breakpoint* não necessariamente percebem a presença ou ausência de mecanismos de resistência. Com isso, surge o conceito do valor ECOFF, que é um ponto de corte para distinguir populações *wild type* (WT) (que não possuem nenhum mecanismo de resistência adquirido detectável fenotipicamente) de populações não-*Wild Type* (nWT) (populações que já possuem mecanismos de resistência adquiridos, mas não necessariamente atingiram o *breakpoint* clínico). Assim, os valores ECOFF são utilizados para detectar os mecanismos de resistência e monitorar o desenvolvimento da resistência em determinada população microbiana (KAHLMETER et al., 2003; EFSA, 2012).

No presente trabalho, utilizamos o conceito dos valores ECOFF para determinar populações nWT de 140 isolados de *S.* Derby coletados durante um período de dez anos. Através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) em microdiluição em caldo, foi possível estabelecer que apenas 12,1% dos isolados puderam ser classificados como WT para todos os antimicrobianos testados. Estudos têm apontado diferentes resultados de isolados de *Salmonella* totalmente suscetíveis a determinados painéis de antimicrobianos. O relatório do *The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme* (DANMAP) de 2014, divulgou que 50% dos isolados de *S.* Derby na Dinamarca são suscetíveis a todos os antimicrobianos incluídos no painel de teste – determinado pelo próprio programa (DANMAP, 2014). Os relatórios do DANMAP utilizam-se, assim como o presente trabalho, de valores obtidos através da determinação de MIC e de valores de *breakpoint* clínicos e de valores ECOFF. Entretanto, os estudos de avaliação da resistência em *Salmonella* encontrados na bibliografia utilizam, na sua maioria, o método de disco-difusão em ágar e, portanto, são capazes de fornecer informações unicamente qualitativas.

Neste trabalho, demonstramos que, entre os 140 isolados de *S.* Derby, as maiores taxas de populações nWT foram observadas entre os antimicrobianos: tetraciclina

(75,7%), estreptomicina (70%), colistina (11,4%), ácido nalidíxico (9,3%) e ampicilina (5,7%). Já para os antimicrobianos ciprofloxacina, ceftazidima e gentamicina, todos os isolados foram classificados como WT, e para os antimicrobianos cefotaxima e florfenicol apenas 0,7% dos isolados foram categorizados como nWT.

A alta frequência de isolados nWT frente à tetraciclina está possivelmente associada ao uso contínuo desse antimicrobiano na produção de suínos (SCHWARZ; KEHRENBERG; WALSH, 2001; McEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002). Com o aumento da resistência à tetraciclina entre os diferentes patógenos suínos, a restrição do uso de tetraciclinas por países importadores de carne suína e pela sua proibição como aditivo na alimentação animal em 2009 (BRASIL, 2009), o uso de tetraciclinas tem diminuído na suinocultura intensiva no Brasil (dados não disponíveis). A alta taxa de resistência obtida neste trabalho pode ser associada ao período de coleta dos isolados (1999-2010) e espera-se uma diminuição das frequências de resistência entre isolados de *Salmonella*. Entretanto, os relatórios do DANMAP têm apontado que, mesmo com a diminuição significativa do uso de tetraciclinas na produção animal, a ocorrência de altas taxas de resistência à tetraciclina em *Salmonella* permanece (DANMAP, 2011; 2013). A manutenção da resistência à tetraciclina pode ser associada à presença de plasmídeos e outros elementos genéticos móveis que, por carrearem genes de resistência à tetraciclina associados a genes de resistência de outras classes antimicrobianas, continuam sofrendo pressão seletiva.

Genes de resistência às tetraciclinas (*tet*) estão frequentemente incluídos em transposons e juntamente a outros genes de resistência (MIRIAGOU; CARATTOLI; FANNING, 2006). O *tet*(G) é um dos componentes de resistência agrupado na ilha genômica 1 de *Salmonella* (SGI-1), que por sua vez inclui múltiplos genes de resistência carreados em integrons e transposons. A SGI-1 já foi descrita em diversos sorovares de *Salmonella* (MICHAEL et al., 2006a), inclusive em *S.* Derby (AKIBA et al., 2006), e pode conter genes de resistência a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (BOYD et al., 2002). Os genes *tet*(A) e *tet*(B), por sua vez, estão associados a transposons, sendo o *Tn*1721 o mais estudado, e já foram identificados em plasmídeos contendo genes de múltipla resistência (MICHAEL et al., 2006a; MIRIAGOU; CARATTOLI; FANNING, 2006; PEZZELLA et al., 2004).

De forma equivalente, foi observada alta frequência de isolados nWT em relação à estreptomicina. Mecanismos de resistência à estreptomicina têm tido destaque entre os

diferentes estudos com *Salmonella*. Os cassetes gênicos *aadA*1 e *aadA*2, já descritos em *S.* Derby (MICHAEL; CARDOSO; SCHWARZ, 2005; AKIBA et al., 2006; LOPES et al., 2014), codificam a enzima aminoglicosídeo-adeniltransferase, que modifica a estrutura dos aminoglicosídeos e confere resistência à estreptomicina e à espectinomicina. Estes cassetes gênicos estão associados a plasmídeos que conferem resistência a múltiplos antimicrobianos, incluindo sulfonamidas e tetraciclinas (GESTAL et al., 2005). Outros estudos evidenciam isolados de *S.* Derby com resistência às tetraciclinas, estreptomicina e/ou sulfonamidas, mas não a ampicilina e florfenicol (MICHAEL et al., 2006b; ANJUM et al., 2011; KEROUANTON et al., 2013), perfil apresentado por 71,4% dos isolados no presente estudo (TABELA 4).

Os resultados apresentados na TABELA 3 também demonstram discrepância entre isolados resistentes e isolados nWT frente à estreptomicina. Outros estudos têm discutido os valores utilizados como ponto de corte para avaliar isolados de *Salmonella* frente à estreptomicina. O valor de *breakpoint* da estreptomicina ainda não foi estabelecido pelo CLSI e, como resultado, o programa de monitoramento *National Antimicrobial Resistance Monitoring System* (NARMS) tem definido como resistentes isolados de *Salmonella* com MIC maior ou igual a 64 mg/L (Disponível em: http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/60400520/NARMS/ABXSalm.pdf). Em um estudo, foi demonstrado que 39% e 15% dos isolados de *Salmonella* com MIC igual a 32 mg/L e a 16 mg/L, respectivamente, possuíam pelo menos um gene de resistência à estreptomicina e estariam erroneamente classificados como suscetíveis quando adotado o valor de 64 mg/L como ponto de corte, como é sugerido por outros programas de monitoramento de resistência microbiana (GARCIA-MIGURA et al., 2012).

No presente estudo, também incluímos colistina na análise, que é um antimicrobiano amplamente utilizado na suinocultura intensiva (CASAL et al., 2007; CALLENS et al., 2012; EFSA, 2012). Apesar de a taxa de isolados nWT frente à colistina (11,4%) não ser muito alta neste estudo, muitos isolados (75%) apresentaram MIC próximo ao *breakpoint* clinico e ao valor ECOFF, sugerindo um incremento de resistência que pode ser representativo a curto prazo. Estudos têm indicado baixas taxas de resistência de *Salmonella* à colistina (DANMAP, 2013; KEMPF et al., 2013), incluindo em *S.* Derby (HOUSER et al., 2011; KEROUANTON et al., 2013). Ainda, Agersø e colaboradores (2012) sugerem que a avaliação de isolados de *Salmonella* com MIC superior a 2 mg/L seja feita a nível de sorovar, uma vez que os antígenos O dos lipopolissacarídeos (LPS) podem estar relacionados com a suscetibilidade à colistina.

Ademais, a resistência às polimixinas está relacionada com mutações nos genes *pmrA* e *pmrB* do sistema regulatório PmrA-PmrB – o qual leva ao aumento da transcrição de proteínas responsáveis pela modificação do LPS e diminuição de ligação às polimixinas. Sun e colaboradores (2009) demonstraram que os MICs obtidos em isolados de *Salmonella* mutantes foram de 0,25 a 4,4 mg/L, cerca de 2 a 35 vezes maior quando comparado com o MIC da cepa suscetível padrão (0,125 mg/L), resultado comparável com os obtidos no presente trabalho, o qual obteve MIC de 1 a 4 mg/L entre os isolados de *S.* Derby. Outras análises, avaliando os mecanismos de resistência à colistina a nível genômico, devem ser conduzidas para estabelecer o perfil de resistência dos isolados WT e nWT de *S.* Derby apresentados neste trabalho.

Diferente do que ocorre com as quinolonas de primeira geração (como ácido nalidíxico), as taxas de resistência às fluorquinolonas (como ciprofloxacina e enrofloxacina) são bastante baixas entre isolados de *Salmonella* (DALLAL et al., 2010; DANMAP, 2013; PANZENHAGEN et al., 2016; PROROGA et al., 2016). O mesmo ocorre com as cefalosporinas de terceira geração (como cefotaxima e ceftazidima). Estes estudos corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho. Estes resultados representam uma situação favorável ao panorama na saúde pública, uma vez que as fluorquinolonas e as cefalosporinas são as drogas de escolha para o tratamento de gastroenterites invasivas em humanos (AARESTRUP et al., 2003; GENDREL; COHEN, 2008).

A resistência às quinolonas deve ser analisada sob a perspectiva dos seguintes mecanismos: mutações nos genes *gyrA* e *gyrB*, presença de bombas de efluxo ativo e diminuição da permeabilidade da membrana. A contribuição individual de cada uma desses mecanismos não é totalmente elucidada e sugere-se um processo acumulativo destes mecanismos para explanar a resistência de *Salmonella* às quinolonas (CLOECKAERT; CHASLUS-DANCLA, 2001; GIRAUD; BAUCHERON; CLOECKAERT, 2006), principalmente na sobre-expressão de bombas de efluxo (GIRAUD et al., 2000). O baixo valor ECOFF para ciprofloxacina (quando comparado ao seu valor de *breakpoint* clínico – 0,125 mg/L e 2 mg/L, respectivamente), é portanto necessário para abranger o espectro de isolados que compartilham diferentes mecanismos de resistência e menor suscetibilidade às quinolonas. E, de fato, há estudos que comprovam a ineficácia de tratamentos clínicos com ciprofloxacina em isolados de *Salmonella* com MICs de 0,06 mg/L à 2 mg/L (AARESTRUP et al., 2003).

No presente trabalho, foi possível distinguir isolados WT e nWT entre os diferentes antimicrobianos avaliados. Similar aos resultados encontrados na bibliografia, os antimicrobianos tetraciclina e estreptomicina foram os que tiveram maior número de isolados nWT entre os isolados de *S.* Derby. Não obstante, a colistina, que é um antimicrobiano utilizado de forma contínua e em abundância na suinocultura intensiva, merece especial atenção, visto que os isolados de *S.* Derby no presente trabalho obtiveram MICs próximos ou maiores ao valor ECOFF. Os valores de *breakpoint* clínicos são essenciais às decisões clínicas de tratamento, porém podem mascarar populações microbianas com mecanismos de resistência já instituídos. Desta forma, os valores ECOFF devem ser utilizados (em conjunto com técnicas moleculares) para monitorar o surgimento de mecanismos de resistência em populações microbianas de interesse na saúde pública. Os estudos de resistência devem não somente objetivar o monitoramento das resistências microbianas, como devem servir de apoio ao desenvolvimento e implementação de políticas de uso prudente de antimicrobianos, tanto na cadeia produtiva de alimentos como na medicina humana e animal.

A capacidade de micro-organismos patogênicos formarem biofilmes em diferentes superfícies, principalmente aquelas usualmente utilizadas nas indústrias de alimentos, pode oferecer consideráveis riscos de contaminação cruzada, afetando a qualidade e a segurança dos alimentos (KUMAR; ANAND, 1998; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). A persistência de micro-organismos patogênicos nestes ambientes é agravada pelo aumento da resistência a sanitizantes, gerado pelo complexo estrutural dos biofilmes. Estudos têm apontado este aumento de resistência de biofilmes de *Salmonella* aos principais sanitizantes utilizados na indústria de alimentos (JOSEPH et al., 2001; CORCORAN et al., 2014; YANG et al., 2016) e, apesar de o mecanismo de resistência não ter sido completamente elucidado, outros fatores ambientais, como pH e temperatura, contribuem para esta resistência (YANG et al., 2016).

As estruturas celulares fímbria *curli* e celulose estão relacionadas com a formação de biofilme em isolados de *Salmonella* e são majoritárias na estrutura da matriz extracelular, responsável pela manutenção e resistência dos biofilmes. A expressão destas estruturas é dependente do tipo de material analisado, da temperatura de incubação, da osmolaridade do meio, entre outros (JOSEPH et al., 2001; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012; OLIVEIRA et al., 2014). Neste estudo, demonstramos que a temperatura de incubação influenciou a expressão de fímbria *curli* e de celulose e a

formação de biofilme em placas de poliestireno. Quando incubados a 37ºC em meio contendo Vermelho Congo, somente um isolado foi positivo para a detecção fenotípica de celulose, sendo este ainda negativo para a expressão de fímbria *curli*. Em contra partida, 67,1% dos isolados foram positivos para a produção de celulose a 28ºC, e entre estes, 42,1% positivos também para a produção de fímbria *curli*.

Entretanto, existem outros fatores ainda não elucidados que podem interferir na expressão destas estruturas em meios contendo Vermelho Congo. Oliveira et al. (2014) demonstraram que, apesar de os genes que regulam a expressão de ambas as estruturas (genes *agfD* e *adrA*) estarem presentes em todos os isolados de *Salmonella* analisados e que 98,3% dos isolados formarem biofilme em pelo menos um dos materiais analisados (aço inoxidável, PVC e vidro), apenas 55,2% apresentaram a morfologia Rdar. Desta forma, os isolados devem ser avaliados com diferentes metodologias, materiais e condições de incubação.

No presente trabalho, entre os isolados incubados em temperatura de 37ºC, somente 5,7% foram positivos para a formação de biofilme em microplacas de poliestireno, sendo ainda categorizados como fracos produtores de biofilme. Entre eles, quatro isolados pertencentes ao morfotipo Saw, ou seja, que não expressam nenhuma das estruturas relacionadas com formação de biofilme em meio contendo Vermelho Congo, foram capazes de formar biofilme em poliestireno.

Quando incubados a 28ºC, 68,6% dos isolados foram positivos para formação de biofilme em microplacas de poliestireno, sendo 55,2% destes qualificados como fracos produtores e 44,8% como moderados produtores de biofilme. Os resultados foram consistentes com os apresentados pela detecção fenotípica de fímbria *curli* e celulose, já que 100% dos isolados pertencentes aos morfotipos Rdar ou Pdar – ou seja, que expressam pelo menos uma das estruturas – foram positivos para a formação de biofilme em microplaca de poliestireno. Entre os resultados encontrados na bibliografia, há ampla variação entre os valores encontrados. Muitos trabalhos apontam que, entre os isolados de *Salmonella* capazes de formar biofilme em poliestireno, grande parte é classificada como fraca produtora de biofilme (GHASEMMAHDI et al., 2015; NAIR et al., 2015; PIRAS et al., 2015). Entretanto, no presente trabalho, não houve diferença entre os isolados classificados como fracos e como moderados produtores de biofilme.

O presente estudo também demonstrou a interferência da osmolaridade do meio na formação de biofilme em caldo. A formação de biofilme em caldo LB convencional (contendo 10% de NaCl) foi positiva em 17,1% dos isolados, enquanto que em caldo

LB *low salt* (contendo 0,5% de NaCl) foi positiva em 55,7%. Outros estudos corroboram com estes resultados, demonstrando que a osmolaridade do meio influencia na formação de biofilme de *Salmonella* (RÖMLING et al., 1998b; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012). No presente trabalho também pôde ser observada inconsistência entre os resultados de formação de película na interface ar-caldo. Os isolados positivos foram assim considerados somente quando o mesmo resultado foi obtido entre as repetições. Muitos isolados foram considerados negativos por apresentarem diferentes resultados, apesar de apresentarem capacidade para formar biofilme em caldo, embora não de forma congruente.

Em síntese, 68,6% dos isolados de *S.* Derby avaliados neste estudo foram capazes de formar biofilme em poliestireno e 67,1% expressaram pelo menos uma das estruturas relacionadas. Ainda, a formação de biofilme em poliestireno e em caldo é influenciada pela temperatura e pela osmolaridade do meio. A formação de biofilme em *Salmonella* é um mecanismo complexo e sua avaliação deve ser realizada em diferentes materiais, principalmente aqueles utilizados nas indústrias de alimentos e cozinhas domésticas, e incorporar diferentes metodologias para abranger todas as variações de expressão – incluindo técnicas de microscopia eletrônica, que podem fornecer informações essenciais para estudos de organização e interação microbiana nos biofilmes.

Também foi possível observar que os perfis fenotípicos mais predominantes entre os isolados de *S.* Derby analisados incluíam: (a) morfotipos Saw com resistência à tetraciclina e à estreptomicina (30,7%); (b) morfotipos Rdar com resistência à tetraciclina (25%); (c) morfotipos Pdar suscetíveis a todos os antimicrobianos avaliados (15,7%) (TABELA 4). Estes resultados, porém, não permitem associar a capacidade de formar biofilme com o perfil de multi-resistência microbiana.

A capacidade de formar biofilmes não é a única responsável pela sobrevivência de *Salmonella* na cadeia produtiva de alimentos, a qual também possui a habilidade de responder de forma bastante eficaz às variações ambientais. Dada sua ubiquidade, é improvável que possamos erradicar a presença de *Salmonella* na cadeia produtiva de suínos e de alimentos de forma geral. Dessa forma, a caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Salmonella* coletados na cadeia produtiva de alimentos pode indicar a presença de clones que possam ter dominância temporária em alguns ambientes. A tipagem molecular desses clones pode trazer informações epidemiológicas necessárias para implementar programas de controle de *Salmonella*.

A macro-restrição por PFGE é o método padrão ouro para genotipagem em *Salmonella* e possui bom poder discriminatório quando comparado com outras metodologias de tipificação. Neste trabalho, 36 cepas de *S.* Derby foram selecionadas – através de perfis fenotípicos de resistência microbiana e de formação de biofilme – para tipagem molecular por PFGE. Destas, 27 foram agrupadas em 11 pulsotipos que apresentavam mais de uma cepa com 100% de similaridade. Desta forma, foi possível identificar alguns clones presentes em diferentes períodos de coleta e distribuídos entre os diversos materiais de origem. As cepas do pulsotipo 10, para as quais foi observado perfil de resistência microbiana similar e mesmo perfil de biofilme, foram encontradas em dois diferentes períodos de coleta. Entre as quatro cepas do pulsotipo 16, três obtiveram mesmo perfil de biofilme e mesmo perfil de resistência microbiana e pertenciam a períodos de coleta e material de origem bastante distintos. Já para os outros pulsotipos apresentados na TABELA 5, é sugestível que clones de *S.* Derby estivessem presentes nos períodos de coleta apresentados. Não obstante, é possível supor que cepas de mesmo pulsotipo que possuíam diferentes perfis de resistência microbiana (pulsotipos 10 e 11) estivessem intimamente relacionadas, uma vez que a circulação destas em diferentes pressões seletivas possa ter modificado seu perfil de resistência microbiana.

Salmonella Derby tem demonstrado ser frequente e amplamente distribuída na cadeia produtiva de suínos do sul do Brasil há vários anos (BESSA; COSTA; CARDOSO, 2004; CASTAGNA et al., 2004; MÜRMANN; SANTOS; CARDOSO, 2009; KICH et al., 2011). A caracterização de cepas desse sorovar no presente estudo demonstrou que existiram clones que circularam em granjas, matadouros-frigoríficos e foram encontrados em alimentos ao longo de uma década.

6 CONCLUSÃO

Há ampla diversidade fenotípica e genotípica entre os isolados de *S.* Derby coletados durante uma década na cadeia produtiva de suínos no sul do Brasil.

As maiores frequências de isolados nWT e resistentes foram encontradas frente aos antimicrobianos: tetraciclina, estreptomicina, colistina, ácido nalidíxico e ampicilina. Todos os isolados foram considerados WT frente aos antimicrobianos ceftazidima, ciprofloxacina e gentamicina. Apenas 0,7% dos isolados foram categorizados como nWT frente à cefotaxima e florfenicol.

A maioria dos isolados de *S.* Derby foi capaz de formar biofilme em poliestireno e de expressar as estruturas relacionadas – fímbria *curli* e celulose. Também foi demonstrada a influência da temperatura e da osmolaridade na expressão das estruturas e na formação de biofilme.

Através da macro-restrição por PFGE, foi possível identificar clones e cepas intimamente relacionadas de *S.* Derby entre diferentes períodos de coleta e distribuídos entre os diversos materiais de origem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M.; WIUFF, C.; MØLBAK, K.; THRELFALL, E. J. Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp.?. **Antimicrobial Agents and CHemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 827-829, 2003.

AARESTRUP, F. M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, p. 271-281, 2005.

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual de Atividades 2014**, São Paulo, 2015. Disponível em: http://abpa-<br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf> Acesso em: 30 mar. 2016.

AGERSØ, Y.; TORPDAHL, M.; ZAHCARIASEN, C.; SEYFARTH, A.; HAMMERUM, A. M.; NIELSEN, E. M. Tentative colistin Epidemiological Cut-Off value for *Salmonella* spp. **Foordborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 4,; p. 367-369, 2012.

AKIBA, M.; NAKAMURA, K.; SHINODA, D.; YOSHII, N.; ITO, H.; UCHIDA, I.; NAKAZAWA, N.; Detection and characterization of variant *Salmonella* genomic island 1s from *Salmonella* Derby isolates. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 59, p. 341-345, 2006.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell**, v. 128, p. 1037-1050, 2007.

ANDREWS, J. M. BSAC standardized disc susceptibility testing method. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 454-489, 2009.

ANJUM, M. F.; CHOUDHARY, S.; MORRISON, V.; SNOW, L. C.; MAFURA, M.; SLICKERS, P.; EHRICHT, R.; WOODWARD, M. J. Identifying antimicrobial resistance genes of human clinical relevance within *Salmonella* isolated from food animals in Great Britain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 550-559, 2011.

ANONYMOUS. Outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections associated with eating alfalfa sprouts – United States, 2009. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 58, 2009.

ARNEDO-PENA, A.; SABATER-VIDAL, S.; HERRERA-LÉON, S.; BELLIDO-BLASCOA, J. B.; SILVESTRE-SILVESTRE, E.; MESEGUER-FERRERA, N.; YAGUE-MUNOZ, A.; GIL-FORTUNO, M.; ROMEU-GARCIA, A.; MORENO-MUNOZ, R. articleAn outbreak of monophasic and biphasic *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Derby associated with the consumption of dried porksausage in Castellon (Spain**). Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.016

ASTEN, A.; DIJK, J. E. Distribution of classic virulence factors among *Salmonella* spp. **Immunology and Medical Microbiology**, Utrecht, v. 44, p. 251-259, 2005.

AUSTIN, J. W.; SANDERS, G.; KAY, W. W.; COLLINSON, S. K. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 162, p. 295-301, 1998.

BARROW, P. A.; JONES, M. A.; THOMSON, N. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J.; THOEN, C. O. (Ed.) **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**, 4th Edition. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010, p. 231-265.

BELKUM, A. V.; STRUELENS, M.; DE VISSER, A.; VERBRUGH, H.; TIBAYRENC, M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 547-560, 2001.

BERENDS, B. R.; URLINGS, H. A. P.; SNIJDERS, J. M. A.; KNAPEN, F. V. Identification and quantification of risk factors animal management and transport regarding in *Salmonella* spp. in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 37-53, 1996.

BERENDS, B. R.; KNAPEN, F. V.; SNIJDERS, J. M.; MOSSEL, D. D. A. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 199-206, 1997.

BERENDS, B. R.; KNAPEN, F. V.; MOSSEL, D. D. A.; BURT, S. A.; SNIJDERS, J. M. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 219-229, 1998.

BESSA, M. C. ; COSTA, M. ; CARDOSO, M . Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n.2, p. 80-84, 2004.

BEUTLICH, J.; JAHN, S.; MALORNY, B.; HAUSER, E.; HÜHN, S.; SCHROETER, A.; RODICIO, M. R.; APPEL, B.; THRELFALL, J.; MEVIUS, D.; HELMUTH, R.; GUERRA, B. Antimicrobial resistance and virulence determinants in european *Salmonella* genomic island 1-positive *Salmonella enterica* isolates from different origins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 16, p. 5655-5664, 2011.

BEUZÓN, C. R.; BANKS, G.; DEIWICK, J.; HENSEL, M.; HOLDEN, D. W. pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. **Molecular Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 806-616, 1999.

BOLTON, D. J.; PEARCE, R. A.; SHERIDAN, J. J.; BLAIR, I. S.; McDOWELL, D. A.; HARRINGTON, D. Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 893-902, 2002.

BOTTELDOORN, N.; HEYNDRICKX, M.; RIJPENS, N.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 891-903, 2003.

BOTTELDOORN, N.; HERMAN, L.; RIJPENS, N.; HEYNDRICKX, M. Phenotypic and molecular typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial pig slaughterhouses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5305-5314, 2004.

BOYD, D.; CLOECKAERT, A.; CHASLUS-DANCLA, E.; MULVEY, M. R. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1714-1722, 2002.

BRASIL. Instrução Normativa 26/2009. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2009. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1984822284> Acesso em: 30 mar. 2016.

BRASIL. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA. **Ministério da Saúde**, 2014. Disponível em: <http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf> Acesso em: 26 mar. 2016.

BRIGGS, C. E.; FRATAMICO, P. M. Molecular Characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 846-849, 1999.

BYWATER, R.; SILLEY, P.; SIMJEE, S. Antimicrobial breakpoints – Definitions and conflicting requirements. **Veterinary Microbiology**, v. 118, p. 158–159, 2006.

CAIN, A. K.; HALL, R. M. Evolution of a multiple antibiotic resistance region in IncHI1 plasmids: reshaping resistance regions *in situ*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 67, p. 2848-2853, 2012.

CALLENS, B. PERSOONS, D.; MAES, D.; LAANEN, M.; POSTMA, M.; BOYEND, F.; HAESEBROUCK, F.; BUTAYE, P.; CATRY, B.; DEWULF, J. Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 106; p. 53-62, 2012.

CARLSON, S. A.; BARNHILL, A. E.; GRIFFITH, R. W. Salmonellosis. In: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. (Ed.) **Diseases of Swine**. Wiley-Blackwell, p. 821-833, 2012.

CASAL. J.; MATEU, E.; MEJÍA, W.; MARTÍN, M. Factors associaded with routine mass antimicrobial usage in fattening pig units in a high density-pig area. **Veterinary Research**, Barcelona, v. 38, p. 481-492, 2007.

CASTAGNA, S. M. F.; SCHWARZ, P.; CANAL, C. W.; CARDOSO, M. R. I. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 2, p. 141-147, 2004.

CDC. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella*

flexneri. **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html> Acesso em: 30 mar. 2016.

CDC. National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Annual Report, 2011. **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveillOverview_508.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2015.

CDC. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157:H7, Escherichia coli non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri, 2013. **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: < http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf> Acesso em: 3 mar. 2016.

CENTER FOR SCIENCE IN THE PUBLIC INTEREST. A review of foodborne illness in america from 2002-2011, 2014. **Foodborne Outbreak Online Database**. Disponível em: <http://cspinet.org/reports/outbreakalert2014.pdf> Acesso em: 26 mar. 2016.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 22-32, 2003.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRETT, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.

CIRILLO, D. M.; VALDIVIA, R. H.; MONACK, D. M.; FALKOW, S. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. **Molecular Microbiology**, Standford, v. 30, n. 1, p. 175-188, 1998.

CLOECKAERT, A.; CHASLUS-DANCLA, E. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*. **Veterinary Research**, Nouzilly, v. 32, p. 291-300, 2001.

CLOECKAERT, A.; PRAUD, K.; LEFEVRE, M.; DOUBLET, B.; PARDOS, M.; GRANIER, S. A.; BRISABOIS, A.; WEILL, F. IncI1 plasmid carrying extended-spectrum-β-lactamase gene $bla_{ctx\text{-}m\text{-}1}$ in *Salmonella enterica* isolates from poultry and humans in France, 2003 to 2008. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4484-4486, 2010.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bactéria isolated from animals; Approved Standard – 3. Ed. CLSI document M31-A3. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. M07-A9. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory**

Standards Institute, 2012.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2013.

COGLIANI, C.; GOOSSENS, H.; GREKO, C. Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. **Microbe**, v. 6, n. 6, p. 274-279, 2011.

CORCORAN, M.; MORRIS, D.; DE LAPPE, N.; O'CONNOR, J.; LALOR, P.; DOCKERY, P.; CORMICAN, M. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1507-1514, 2014.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CROSA, J. H.; BRENNER, D. J.; EWING, W. H.; FALKOW, S. Molecular relationships among the Salmonelleae. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 115, n. 1, p. 307-315, 1973.

D'AOUST, J. Y.; ARIS, B. J.; THISDELE, P.; DURANTE, A.; BRISSON, N.; DRAGON, D.; LACHAPELLE, G.; JOHNSTON, M.; LAIDLEY, R. Salmonella eastboume outbreak associated with chocolate. **J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.**, Ottawa, v. 8, n. 4, p. 181-184, 1975.

D'AOUST, J. Y.; Pathogenicity of foodborne Salmonella. **International Journal of Food Microbiology**, Ottawa, v. 12, p. 17-40, 1991.

D'AOUST, J. Y.; Salmonella and the international food trade. **International Journal of Food Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 11-31, 1994.

DAEFLER, S. Type III secretion by Salmonella typhimurium does not require contact with a eukaryotic host. **Molecular Microbiology**, New York, v. 31, n. 1, p. 45-51, 1999.

DALLAL, M. S.; DOYLE, M. P.; REZADEHBASHI, M.; DABIRI, H.; SANAEI, M.; MODARRESI, S.; BAKHTIARI, R.; SHARIFIY, K.; TAREMI, M.; ZALI, M. R.; YAZDI, S. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. **Food Control**, v. 21, p. 388-392, 2010.

DANMAP. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark, 2011. **National Food Institute**. Disponível em: <http://www.danmap.org/Downloads/Reports.aspx> Acesso em: 26 mar. 2016.

DANMAP. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark, 2013. **National Food**

Institute. Disponível em: <http://www.danmap.org/Downloads/Reports.aspx> Acesso em: 26 mar. 2016.

DANMAP. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark, 2014. **National Food Institute**. Disponível em: <http://www.danmap.org/Downloads/Reports.aspx> Acesso em: 26 mar. 2016.

DARWIN, K. H.; MILLER, V. L. Molecular Basis of the Interaction of Salmonella with the Intestinal Mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, Missouri, v. 12, n. 3, p. 405-428, 1999.

DAVEY, M. D.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DAVIES, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**, Vancouver, v. 264, p. 375-382, 1994.

DE BUSSER, E. V.; MAES, D.; HOUF, K.; DEWULF, J.; IMBERECHTS, H.; BERTRAND, D.; DE ZUTTER, L. Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 279-286, 2011.

DE BUSSER, E. V.; DE ZUTTER, L.; DEWULF, J.; HOUF, K.; MAES, D. *Salmonella* control in live pigs and at slaughter. **The Veterinary Journal**, v. 196, p. 20-27, 2013.

DELHALLE, L.; SAEGERMAN, C.; FARNIR, F.; NORSAK, N.; MAES, D.; MESSENS, W.; DE SADELLER, L.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G. *Salmonella* surveillance and control at post-harvest in the Belgian pork meat chain. **Food Microbiology**, v. 26, p. 265-271, 2009.

DÍEZ-GARCÍA, M.; CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. **Food Microbiology**, v. 31, p. 173-180, 2012.

DOUBLET, B.; WEILL, F.; FABRE, L.; CHASLUS-DANCLA, E.; CLOECKAERT, A. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster containing a novel 3'-*N*-Aminoglycoside acetyltransferase gene cassette, *aac*(3)-*Id*, in *Salmonella enterica* serovar Newport. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3806-3812, 2004.

DOUBLET, B.; BOYD, D.; MULVEY, M. R.; CLOECKAERT, A. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1911-1924, 2005.

DUEBBERT, I. E.; PETERSON, J. W. Enterotoxin-induced fluid accumulation during experimental salmonellosis and cholera: involvement of prostaglandin synthesis by intestinal cells. **Toxicon**, Galveston, v. 23, n. 1, p. 157-172, 1985.

DUNNE, W. M. J. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

EFSA. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. **The European Food Safety Authority Journal**, v. 135, p. 1-111, 2008a.

EFSA. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals – Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. **The European Food Safety Authority Journal**, v. 720, p. 1-84, 2008b.

EFSA. Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine). **The European Food Safety Authority Journal**, v. 9, n. 10, p. 1-198, 2011.

EFSA. Technical specifications on the harmonised monitoring and reporting of antimicrobial resistance in *Salmonella*, *Campylobacter* and indicator *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. bacteria transmitted through food. **The European Food Safety Authority Journal**, v. 10, n. 6, p. 1-64, 2012.

EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **The European Food Safety Authority Journal**, v. 13, n. 1, p. 1-165, 2015.

EUCAST. Procedure for establishing zone diameter breakpoints and quality control criteria for new antimicrobial agentes, 2014. **The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. Disponível em: <http://www.eucast.org/eucast_news/news_singleview/?tx_ttnews%5Btt_news%5D=130&cHash=6966a2ad3765424fbf7d8fc391c3775a> Acesso em: 26 mar. 2016.

EUZEBY, J. P. Revised Salmonella nomenclature: designation of Salmonella enterica. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Toulouse, v. 49, p. 927-930, 1999.

FAJARDO, A.; MARTÍNEZ-MARTÍN, N.; MERCADILLO, M.; GALÁN, J. C.; GHYSELS, B.; MATTHIJS, S.; CORNELIS, P.; WIEHLMANN, L.; TÜMMLER, B.; BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. **PLoS One**, v. 3, n. 2, p. 1-6, 2008.

FEDORKA-CRAY, P. J.; WHIPP, S. C.; ISAACSON, R. E.; NORD, N.; LAGER, K. Transmission of *Salmonella typhimurium* to swine. **Veterinary Microbiology**, v. 41, p. 333-344, 1994.

FERRAZ, S. M.; SCHWARZ, P.; CANAL, C. W.; CARDOSO, M. R. I. Prevalência de suínos portadores de Salmonella sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, n.2, p. 141-147, 2004a.

FERRAZ, S. M.; SCHWARZ, P.; CANAL, C. W.; CARDOSO, M. R. I. Presença de Salmonella sp. no trato intestinal/linfonodos submandibulares de suínos ao abate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n.3, p. 300-306, 2004b.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.

FOLSTER, J. P.; PECIC, G.; BOLCEN, S.; THEOBALD, L.; HISE, K.; CARATTOLI, A.; ZHAO, S.; McDERMOTT, P. F.; WHICHARD, J. M. Characterization of extended-spectrum cephalosporin–resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from humans in the United States. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 2, p. 181-187, 2010.

FOSSE, J.; OUDOT, N.; ROSSERO, A.; LAROCHE, M.; FEDERIGHI, M.; SEEGERS, H.; MAGRAS, C. Contamination de produits primaires porcins par *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens* et *Salmonella enterica*. **Journées Recherche Porcine**, v. 40, p. 55-60, 2008.

GALAN, J. E.; COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**, v. 284, p. 1322-1328, 1999.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; CHIARETTO, G.; BERTINI, A.; VILLA, L.; FORTINI, D.; RICCI, A.; CARATTOLI, A. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum β-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. **Journal od Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 1229-1233, 2008.

GARCIA-MIGURA, L.; SUNDE, M.; KARLSMOSE, S.; VELDMAN, K.; SCHROETER, A.; GUERRA, B.; GRANIER, S. A.; PERRIN-GUYOMARD, A.; GICQUEL-BRUNEAU, M.; FRANCO, A.; ENGLUND, S.; TEALE, C.; HEISKA, H.; CLEMENTE, L.; BOERLIN, P.; MORENO, M. A.; DAIGNAULT, D.; MEVIUS, D.; HENDRIKSEN, R. S.; AARESTRUP, F. Establishing streptomycin epidemiological cut-off values for *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Microbiological Drug Resistance**, v. 18, n. 1, p. 88-93, 2012.

GENDREL, D. COHEN, R. Diarrhées bactériennes et antibiotiques: les recommandations européennes. **Archives de Pédriatrie**, Paris, v. 15, p. 93-96, 2008.

GERSTEL, U.; RÖMLING, U. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agf*D promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 638-648, 2001.

GESTAL, A. M.; STOKES, H. W.; PARTRIDGE, S. R.; HALL, R. M. Recombination between the *dfrA12*-orfF-*aadA2* Cassette Array and an *aadA1* Gene Cassette Creates a Hybrid Cassette, *aadA8b*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, New South Wales, v. 49, n. 11, p. 4771-4774, 2005.

GHASEMMAHDI, H.; TAJIK, H.; MORADI, M.; MARDANI, K.; MODARESI, R.; BADALI, A.; DILMAGHANI, M. Antibiotic resistance pattern and biofilm formation ability of clinically isolates of *Salmonella enterica* serotype *typhimurium*. **International Journal of Enteric Pathogens**, Urmia, v. 3, n. 2, 2015.

GIAOURIS, E. D.; NYCHAS, G. E. The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: The importance of the air–liquid interface and nutrient availability. **Food Microbiology**, v. 23, p. 747-752, 2006.

GIBSON, H.; TAYLOR, J. H.; HALL, K. E.; HOLAH, J. T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 41-48, 1999.

GILBERT, G. L. Molecular diagnostics in infectious diseases and public health microbiology: cottage industry to postgenomics. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 6, p. 280-287, 2002.

GIOVANNACCI, I.; QUEGUINER, S.; RAGIMBEAU, C.; SALVAT, G.; VENDEUVRE, J. L.; CARLIER, V.; ERMEL, G. Tracing of *Salmonella* spp. in two pork slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 131-147, 2001.

GIOVANNINI, A.; PRENCIPE, V.; CONTE, A.; MARINO, L.; PETRINI, A.; POMILIO, F.; RIZZI, V.; MIGLIORATI, G. Quantitative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region. **Food Control**, v. 15, p. 139-144, 2004.

GIRAUD, E.; CLOECKAERT, A.; KERBOEUF, D.; CHASLUS-DANCLA, E. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Antimicrobial Agenst and CHemotherapy**, Monnaie, v. 44, n. 5, p. 1223-1228, 2000.

GIRAUD, E.; BAUCHERON, S. CLOECKAERT, A. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 193-1944, 2006.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the Salmonella serovars, 9th Edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. **Institute Pasteur**, Paris, 2007. Disponível em: <https://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089> Acesso em: 25 jun. 2015.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**. Porto Alegre: Artmen, 267 p., 2010.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.; WEILL, F. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-LeMinor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, p. 26-29, 2010.

HALL, M. R. Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1267, p. 71-78, 2012.

HANSEN, T. B.; CHRISTENSEN, B. B.; AABO, S. *Salmonella* in pork cuttings in supermarkets and butchers' shops in Denmark in 2002 and 2006. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p. 23-29, 2010.

HASE, K. et al. Uptake through glycoprotein 2 of $FimH^+$ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. **Nature**, v. 462, p. 226-231, 2009.

HAUSER, E.; HEBNER, F.; TIETZE, E.; HELMUTH, R.; JUNKER, E.; PRAGER, R.; SCHROETER, A.; RABSCH, W.; FRUTH, A.; MALORNY, B. Diversity of *Salmonella enterica* serovar Derby isolated from pig, pork and humans in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, Berlin, v. 151, p. 141-149, 2011.

HENDRIKSEN, R. S.; LE HELLO, S.; BORTOLAIA, V.; PULSRIKARN, C.; NIELSEN, E. M.; PORNRUANGMONG, S.; CHAICHANA, P.; SVENDSEN, C. A.; WEILL, F.; AARESTRUP, F. M. Characterization of isolates of *Salmonella enterica* serovar Stanley, a serovar endemic to asia and associated with travel. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 709-720, 2012.

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**, Erlangen, v. 294, p. 95-102, 2004.

HOHMANN, E. L. Nontyphoidal Salmonellosis. **Food Safety**, v. 32, p. 263-269, 2001.

HUECK, C. J. Type III Protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Wurzburg, v. 61, n. 2, p. 379-433, 1998.

HURD, H. S.; McKEAN, J. D.; GRIFFITH, R. W.; WESLEY, V.; ROSTAGNOL, M. H. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2376-2381, 2002.

HURD, H. S.; McKEAN, J. D.; GRIFFITH, R. W.; ROSTAGNOL, M. H. Estimation of the *Salmonella enterica* prevalence in finishing swine. **Epidemiology and Infection**, v. 132, p. 127-135, 2003.

IVANEK, R.; OSTERBERG, J. O.; GAUTAM, R.; LEWERIN, S. S. Salmonella Fecal Shedding and Immune Responses are Dose - and Serotype - Dependent in Pigs. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. 1-11, 2012.

JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, Indrani; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 367-372, 2001.

JUDICIAL COMMISSION OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATICS OF PROKARYOTES. Opinion 80. **Internation Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 519-520, 2005.

KAHLMETER, G.; BROWN, D. F. J.; GOLDSTEIN, F. W.; MACGOWAN, A. P.; MUTON, J. W.; ÖSTERLUND, A.; RODLOFF, A.; STEINBAKK, M.; URBASKOVA, P.; VATOPOULOS, A. European harmonization of MIC breakpoints

for antimicrobial susceptibility testing of bactéria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 145-148, 2003.

KAUFFMANN, F.; EDWARDS, P. R. Classification and Comenclature of Enterobacteriaceae. **International Bulletin**, p. 2-8, 1952.

KE, B.; SUN, J.; HE, D.; LI, X.; LIANG, Z.; KEL, C.; Serovar distribution, antimicrobial resistance profiles, and PFGE typing of *Salmonella enterica* strains isolated from 2007–2012 in Guangdong, China. **BMC Infectious Disease**, v. 14, p. 1-10, 2014.

KEELARA, S.; SCOTT, H. M.; MORROW, W. M.; HARTLEY, C. S.; GRIFFIN, D. L.; GEBREYES, W. A.; THAKUR, S. Comparative phenotypic and genotypic characterization of temporally related nontyphoidal *Salmonella* isolated from human clinical cases, pigs, and the environment in North Carolina. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 2, p. 156-164, 2014.

KEMPF, I.; FLEURY, M. A.; DRIDER, D.; BRUNEAU, M.; SANDERS, P.; CHAUVIN, C.; MADEC, J.; JOUY, E. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceaein avian and pig production in Europe? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, p. 379-383, 2013.

KEROUANTON, A.; ROSE, V.; WEILL, F.; GRANIER, S. A.; DENIS, M. Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella enterica* serotype Derby isolated from pigs, pork, and humans in France. **Foodborne Pathogens and Disease**, Paris, v. 10, n. 11, p. 977-984, 2013.

KICH, J. D.; MORES, N.; PIFFER, I. A.; COLDEBELLA, A.; AMARAL, A.; RAMMINGER, L.; CARDOSO, M. Fatores associados à soroprevalência de *Salmonella* em rebanhos comerciais de suínos. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 398-305, 2005.

KICH, J. D.; COLDEBELLA, A.; MORES, N.; NOGUEIRA, M. G.; CARDOSO, M.; FRATAMICO, P. M.; CALL, J. E.; FEDORKA-CRAY, P.; LUCHANSKY, J. B. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 307-313, 2011.

KIM, K.; PARK, J.; KWAK, H.; WOO, G. Characterization of the quinolone resistance mechanism in foodborne *Salmonella* isolates with high nalidixic acid resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 52-56, 2011.

KÖHLER, T.; MICHÉA-HAMZEHPOUR, M.; HENSE, U.; GOTOH, N.; CURTY, L. K.; PECHÈRE, J. Charazterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 2. P. 345-354, 1997.

KOTHARY, M. H.; BABU, U. S. Infective Dose of Foodborne Pathogens in Volunteers: A Review. **Journal of Food Safety**, Washington, v. 21, p. 49-73, 2001.

KUHLE, V.; HENSEL, M. Cellular microbiology of intracellular Salmonella enterica: functions of the type III secretion system encoded by Salmonella pathogenicity island 2. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Erlangen, v. 61, p. 2812-2826, 2004.

KUHN, K. G.; FALKENHORST, G.; CEPER, T. H.; DALBY, T.; ETHELBERG, S.; MØLBAK, K.; KROGFELT, K. A. Detecting non-typhoid *Salmonella* in humans by ELISAs: a literature review. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 1-7, 2012.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Karnal, v. 42, p. 9-27, 1998.

LE MINOR, L.; POPOFF, M. Y. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., norn. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Paris, v. 37, n. 4, p. 465-468, 1987.

LEVINGS, R. S.; LIGHTFOOT, D.; PARTRIDGE, S. R.; HALL, R. M.; DJORDJEVIC, S. P. The Genomic Island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. enterica* serovars. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 13, p. 4401-4409, 2005.

LI, X.; LIVERMORE, D. M.; NIKAIDO, H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 8, p. 1732-1741, 1994.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Thessaloniki, v. 160. P. 171-178, 2012.

LING, J. M.; CHAN, E. W.; CHENG, A.F. Molecular epidemiological analysis of *Salmonella enterica* serotype Derby infections in Hong Kong. **Journal of Infection**, Hong Kong, v. 42, p. 145-153, 2001.

LITTLE, C. L.; RICHARDSON, J. F.; OWEN, R. J.; PINNA, E.; THRELFALL, E. J. *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003–2005. **Food Microbiology**, v. 25, p. 538-543, 2008.

LO FO WONG, D. M. A.; HALD, T.; VAN DER WOLF, P. J.; SWANENBURG, M. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. **Livestock Production Science**, v. 76, p. 215-222, 2002.

LO FO WONG, D. M. A.; DAHL, J.; STEGE, H.; VAN DER WOLF, P. J.; LEONTIDES, L.; VON ALTROCK, A.; THORBERG, B. M. Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 62, p. 253-266, 2004.

LOCHT, H.; MØLBAK, K.; KROGFELT, K. A. High frequency of reactive joint symptoms after na outbreak of *Salmonella enteritidis*. **The Journal of Rheumatology**, v. 29, n. 4, p. 767-771, 2002.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G.; VARGAS, A. C.; COSTA, M. M. ELISA indireto na detecção de *Salmonella* spp. em lingüiça suína. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 1057-1062, 2002.

LOPES, G. V.; MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Identification and characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Derby isolates carrying a new *aadA26* gene cassette in a class 1 integron obtained at pig slaughterhouses. **FEMS Microbiology Letters**, v. 356, p. 71-78, 2014.

LUDTKE, C. B.; CIOCCA, J. R. P.; DANDIN, T.; BARBALHO, P. C.; VILELA, J. A.; COSTA, O. A. D. **Abate Humanitário de Suínos**. Rio de Janeiro: WSPA, 2010.

MALCOVA, M.; HRADECKA, H.; KARPISKOVA, R.; RYCHLIK, I. Biofilm formation in field strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Identification of a new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, Brno, v. 129, p. 360-366, 2008.

MARKEY, B.; LEONARD, F.; ARCHAMBAULT, M.; CULLINANE, A.; MAGUIRE, D. **Clinical Veterinary Microbiology**. Second Edition. Edinburgh: Elsevier, p. 255-266, 2013.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 718-733, 2011.

MATIASOVIC, J.; STEPANOVA, H.; KUDLACKOVA, H.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; RYCHLIK, I.; CHLEBOVA, K.; LEVA, L.; OSVALDOVA, A.; GEBAUER, J.; FALDYNA, M. Immune response of pigs to *Salmonella enterica* serovar Derby and Typhimurium infections. **Veterinary Microbiology**, Brno, v. 170, p. 284-290, 2014.

MCCORMICK, B. A.; MILLER, S. I.; CARNES, D.; MADARA, J. L. Transepithelial signaling to neutrophils by Salmonellae: a Novel virulence mechanism for gastroenteritis. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 6, p. 2302-2309, 1995.

MCEWEN, S. A.; FEDORKA-CRAY, P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Antimicrobial Use and Resistance in Animals**, v. 34, p. 93-106, 2002.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, p. 249-253, 2003.

MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Identification of an *aadA2* Gene Cassette from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Derby. **Journal of Veterinary Medicine Series B-infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 52, p. 456-459, 2005.

MICHAEL, G. B.; BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1898-1914, 2006a.

MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M.; RABSCH, W.; SCHWARZ, S. Phenotypic and genotypic differentiation of porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Derby isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 118, p. 312–318, 2006b.

MIRIAGOU, V.; CARATTOLI, A.; FANNING, S. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1923-1930, 2006.

MOREIRA, C. G.; WEINSHENKER, D.; SPERANDIO, V. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence in vitro and in vivo. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 914-926, 2010.

MØRETRØ, T.; VESTBY, L. K.; NESSE, L. L.; STORHEIM, S. E.; KOTLARZ, K.; LANGSRUD, S. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1005-1012, 2009.

MÜRMANN, L. ; SANTOS, M.C.M. ; CARDOSO, M. R. I. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, v. 20, p. 191-195, 2009.

NAIR, A.; RAWOOL, D. B.; DOIJADB, S.; POHARKAR, K.; MOHANA, V.; BARBUDDHE, S. B.; KOLHE, R.; KURKURE, N. V.; KUMAR, A.; MALIK, S. V. S.; BALASARAVANAN, T. Biofilm formation and genetic diversity of *Salmonella* isolates recovered from clinical, food, poultry and environmental sources. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 36, p. 424-433, 2015.

NEUTRA, M. R.; FREY, A.; KRAEHENBUHL, J. Epithelial M Cells: Gateways for mucosal infection and immunization. **Cell**, v. 86, p. 354-348, 1996.

O'LEARY, D.; CABE, E. M. M.; McCUSKER, M. P.; MARTINS, M.; FANNING, S.; DUFFY, G. Microbiological study of biofilm formation in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 and DT104b cultured from the modern pork chain. **Internatinal Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 36-43, 2013.

OECD/FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015, **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015**, OECD Publishing, Paris. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en> Acesso em 31 mar. 2016.

OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J.; TEIXEIRA, P.; FONSECA, A. P. The role of hydrophobicity in bacterial adhesion. In: GILBERT, P. (Ed.). **Biofilm community interactions, chance or necessity? : contributions made at the Fifth Meeting of the Biofilm Club held at Gregynog Hall, Powys, 13-15 September, 2001**. Cardiff: BioLine, 2001.

OLIVEIRA, D. C. V.; FERNANDES, A. J.; KANENO, R.; SILVA, M. G.; ARAÚJO, J. P. J.; SILVA, N. C. C.; RALL, V. L. M. Ability of *Salmonella* spp. to produce

biofilm is dependent on temperature and surface material. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 11, n. 6, p. 478-483, 2014.

PANZENHAGEN, P. H. N.; AGUIAR, W. S.; FRASÃO, B. S.; PEREIRA, V. L. A.; ABREU, D. C.; RODRIGUES, D. P.; NASCIMENTO, E. R.; AQUINO, M. H. C. Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Control**, v. 61, p. 243-247, 2016.

PASQUALI, F.; KEHRENBERG, C.; MANFREDA, G.; SCHWARZ, S. Physical linkage of Tn3 and part of Tn1721 in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 55, p. 562-565, 2005.

PECKHAM, C. F.; SAVAGE, W. G. An outbreak of pork pie poisoning at Derby. **The Journal of Hygiene**, v. 22, n. 1, p. 69-76, 1923.

PERRON, G. G.; BELL, G.; QUESSY, S. Parallel evolution of multidrug-resistance in *Salmonella enterica* isolated from swine. **FEMS Microbiology Letters**, v. 281, p. 17-22, 2008.

PEZZELLA, C.; RICCI, A.; DIGIANNATALE, E.; LUZZI, I.; CARATTOLI, A. Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 903-908, 2004.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? : A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 28-52, 2004.

PIRAS, F.; FOIS, F.; CONSOLATI, S. G.; MAZZA, R.; MAZZETTE, R. Influence of temperature, source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, Sassari, v. 78, n. 10, p. 1875-1878, 2015.

PIRES, S. M.; KNEGT, L.; HALD, T. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. **National Food Institute**, 2011.

PISSETTI, C.; WERLANG, G. O.; BIESUS, L. L.; KICH, J. D.; CARDOSO, M. Detecção de *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes* em carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 4, p. 1071, 2012.

POMPERMAYER, D. M. C.; GAYLARDE, C. C. The in£uence of temperature on the adhesion ofmixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, v. 17, p. 361-365, 2000.

PRENDERGAST, D. M.; DUGGAN, S. J.; FANNING, S.; CORMICAN, M.; GONZALES-BARRON, U.; BUTLER, F.; DUFFY, G. Prevalence and numbers of

Salmonella spp. and Enterobacteriaceae on pork cuts in abattoirs in the Republic of Ireland. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1209-1219, 2008.

PROROGA, Y. T. R.; CAPUANO, F.; CARULLO, M. R.; LA TELA, I.; CAPPARELLI, R.; BARCO, L.; PASQUALE, V. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* strains from food of animal origin in southern Italy. **Folia Microbiologica**, v. 61, p. 21-27, 2016.

RAMESH, N.; JOSEPH, S. W.; CARR, L .E.; DOUGLASS, L. W.; WHEATON, F. W. Evaluation of chemical disinfectants for the elimination of *Salmonella* biofilms from poultry transport containers. **Poultry Science**, v. 81. P. 904-910, 200.2

RANJBAR, R.; KARAMI, A.; FARSHAD, S.; GIAMMANCO, G. M.; MAMMINA, C. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. **New Microbiologica**, v. 37, p. 1-15, 2014.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; IMBERECHTS, H.; GRIJSPEERDT, K.; DE ZUTTER, L.; HEYNDRICKX, M. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3615-3623, 2005.

REEVES, M. W.; EVINS, G. M.; HEIBA, A. A.; PLIKAYTIS, B. D.; FARMER, J. J. clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other Salmonellae as shown by Multilocus Enzyme Electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 313-320, 1989.

RODRIGUEZ, E. C.; DIAZ-GUEVARA, P.; MORENOA, J.; BAUTISTA, A.; MONTANOA, L.; REALPE, M. E.; GASPERA, A. D.; WIESNER, M. Vigilancia por laboratorio de *Salmonella enterica* en casos clínicoshumanos en Colombia 2005 a 2011. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.023

RÖMLING, U.; BIAN, Z.; HAMMAR, M.; SIERRALTA, W. D.; NORMARK, S. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 3, p. 722-731, 1998a.

RÖMLING, U.; SIERRALTA, W. D.; ERIKSSON, K.; NORMARK, S. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 249-264, 1998b.

RÖMLING, U.; BOKRANZ, W.; RABCH, W.; ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; TSHÄPE, H. Occurrence and regulation of the multicelular morphotype in Salmonella serovars importante in human disease. **International Journal of Medical Microbiology**, Stockholm, v. 293, p. 273-285, 2003.

RÖMLING, U. Characterization of the rdar morphotype, a multicelular behaviour in Enterobacteriaceae. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 1234-1246, 2005.

ROSTAGNO, M.; HURD, S.; MCKEAN, J.; ZIEMER, C.; GAILEY, J.; LEITE, R. Abattoir holding pens as a source of *Salmonella*for swine. In: Fourth international symposium on the epidemiology and control of *Salmonella* and other food borne pathogens in pork, 2001, Washington. **International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazarads in Pigs and Pork.** Disponível em: <http://lib.dr.iastate.edu/safepork/2001/allpapers/75/> Acesso em: 30 mar. 2016.

SANTOS, R. L.; RAFFATELLU, M.; BEVINS, C. L.; ADAMS, L. G.; TUKEL, Ç.; TSOLIS, R. M.; BAUMLER, A. J. Life in the inflamed intestine, Salmonella style. **Trends Micriobiology**, v. 17, n. 11, p. 498-506, 2009.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ÂNGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, A. ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the united states – major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2001.

SCHICKLMAIER, P.; MOSER, E.; WIELAND, T.; RABSCH, W.; SCHMIEGER, H. A comparative study on the frequency of prophages among natural isolates of *Salmonella* and *Escherichia coli* with emphasis on generalized transducers. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 49-54, 1998.

SCHMIEGER, H.; SCHICKLMAIER, P. Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT104. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, p. 251-256, 1999.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary Research**, v. 32, p. 201-225, 2001.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 431-437, 2001.

SCHWARZ, P.; CALVEYRA, J.; SELLA, A.; BESSA, M. C.; CARDOSO, M. R. I. Salmonella enterica: soroprevalência e isolamento em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1028-1034, 2009.

SCHWARZ, P.; KICH, J. D.; KOLB, J.; CARDOSO, M. Use of an avirulent live *Salmonella* Choleraesuis vaccine to reduce the prevalence of *Salmonella* carrier pigs at slaughter. **Veterinary Record**, v. 169, n. 21, p. 553, 2011.

SEIDLER, T.; ALTER, T.; KRÜGER, M.; FEHLHABER, K. Transport stress – consequences for bacterial translocation, endogenous contamination and bactericidal activity of sérum of slaughter pigs. In: Fourth international symposium on the epidemiology and control of *Salmonella* and other food borne pathogens in pork, 2001, Washington. **International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazarads in Pigs and Pork.** Disponível em: <http://lib.dr.iastate.edu/safepork/2001/allpapers/118/> Acesso em: 30 mar. 2016.

SEIXAS, R.; MACHADO, J.; BERNARDO, F.; VILELA, C.; OLIVEIRA, M. Biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar 1,4,[5],12:i:- Portuguese isolates: a phenotypic, genotypic, and sociogeographic analysis. **Current Microbiology**, v. 68, p. 670-677, 2014.

SHELOBOLINA, E. S.; SULLIVAN, S. A.; O'NEILL, K. R.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Isolation, Characterization, and U(VI)-Reducing Potential of a Facultatively Anaerobic, Acid- Resistant Bacterium from Low-pH, Nitrate- and U(VI)-Contaminated Subsurface Sediment and Description of Salmonella subterranea sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2959-2965, 2004.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 407-413, 2009.

SILVA, M. C.; FARIA, G. S.; DE PAULA, A. J.; MARTINS, R. P.; CARAMORI, J. G.; KICH, J. D.; COLODEL, E. M.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Prevalência de Salmonella sp. em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. **Ciência Rural**, v. 39, p. 266-268, 2009.

SILVA, L. E.; DIAS, V.; FERRONATTO, A.; GUERRA, P.; BERNO, L.; TRICHES, N.; KICH, J. D.; CORBELLINI, L. G.; CARDOSO, M. Longitudinal Dissemination of Salmonella enterica Clonal Groups through the Slaughter Process of Salmonella-Positive Pig Batches. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 9, p. 1580-1588, 2012.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 573–583, 2010.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetra£uor-ethylene: the in£uence of free energy and the e¡ect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, p. 439-447, 2000.

SMILLIE, C.; GARCILLÁN-BARCIA, M. P.; FRANCIA, M. V.; ROCHA, E. P. C.; DE LA CRUZ, F. Mobility of Plasmids. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 434-452, 2010.

SOLANO, C.; GARCIA, B.; VALLE, J.; BERASAIN, C.; GHIGO, J.M.; GAMAZO, C.; LASA, I. Genetic analysis of Salmonella enteritidis biofilm formation: critical role of celulose. **Molecular Microbiology**, Pamplona, v. 43, n. 3, p. 793-808, 2002.

SPRICIGO, D. A.; MATSUMOTO, S. R.; ESPÍNDOLA, M. L.; FERRAZ, S. M. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiça frescal suína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 779-785, 2008.

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S. C. J. *Salmonella* biofilms: An overview on ocurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, Leuven, v. 45, p. 502-531, 2012.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, Belgrade, v. 40, p. 175-179, 2000.

STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; MIJAC, V.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditionson biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, Belgrade, v. 20, p. 339-343, 2003.

STEPANOVIC, S. et al. Biofilm formation by Salmonella spp. and Listeria monocytogenes on plastic surfasse. **Letters in Applied Microbiology**, Belgrade, v. 38, p. 428-432, 2004.

SUN, S.; NEGREA, A.; RHEN, M.; ANDERSSON, D. I, Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Antimicrobial Agenst and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 229802305, 2009.

TAUSOVA, D.; DOLEJSKA, M.; CIZEK, A.; HANUSOVA, L.; HRUSAKOVA, J.; SVOBODA, O.; CAMLIK, G.; LITERAK, I. *Escherichia coli* with extended-spectrum b-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. **Journal of ntimicrobial Chemoterapy**, Brno, v. 67, p. 1103-1107, 2012.

TERNHAG, A.; TÖRNER, A.; SVENSSON, A.; EKDAHL, K.; GIESECKE, J. Short- and long-term effects of bacterial gastrointestinal infections. **Emerging Infectious Diseases**, Stockholm, v. 14, n. 1, 143-148, 2008.

TORPDAHL, M.; SKOV, M. N.; SANDVANG, D.; BAGGESEN, D. L. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragmente length polymorphism. **Journal of Microbiological Methods**, Copenhagen, v. 63, p. 173-184, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10º Edição. Porto Alegre: Armet, p. 712-714, 2012.

VALDEZATE, S.; VIDAL, A.; HERRERA-LEON, S.; POZO, J.; RUBIO, P.; USERA, M. A.; CARVAJAL, A.; ECHEITA, M. A. Salmonella Derby Clonal Spread from Pork. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 694-698, 2005.

VAN DER GAAG, M. A.; VOS, F.; SAATKAMP. H. W.; VAN BOVEN, M.; VAN BEEK, P.; HUIRNE, R. B. M. A state-transition simulation model for the spread of *Salmonella* in the pork supply chain. **European Journal of Operational Research**, v. 156, p. 782-798, 2004.

VAN MEERVENNE, E.; VAN COILLIE, E.; KERCKHOF, F.; DEVLIEGHERE, F.; HERMAN, L.; DE GELDER, L. S. P.; TOP, E. M.; BOON, N. Strain-specific transfer of antibiotic resistance from an environmental plasmid to foodborne pathogens. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 0. 1-8, 2012.

VELDEN, A. W. M.; BAUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HEFFRON, F. Multiple Fimbrial Adhesins Are Required for Full Virulence of Salmonella typhimurium in Mice. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 6, p. 2803-2808, 1998.

VERBRUGGHE, E.; BOYEN, F.; GAASTRA, W.; BEKHUIS, L.; LEYMAN, B.; VAN PARYS, A.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. The complex interplay between stress and bacterial infections in animals. **Veterinary Microbiology**, v. 155, p. 115-127, 2012.

VESTBY, L. K.; MØRETRØ, T.; BALLANCE, S.; LANGSRUD, S.; NESSE, L. L. Survival potential of wild type cellulose deficient *Salmonella* from the feed industry. **BMC Veterinary Research**, v. 5, n. 43, 2009.

WAGNER, C.; HENSEL, M. Adhesive Mechanisms of Salmonella enterica. In: LINKE, D.; GOLDMAN, A. (Ed.) **Bacterial Adhesion: Chemistry, Biology and Physics**. New York: Springer Science, p. 17-34, 2011.

WALLIS, T. S.; GALYOV, E. E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. **Molecular Microbiology**, Berkshire, v. 36, n. 5, p. 997-1005, 2000.

WANG, Q.; FRYE, J. G.; MCCLELLAND, M.; HARSHEY, R. M. Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surfasse growth and putative new motility and pathogenicity genes. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 169-187, 2004.

WHITE, A. P.; GIBSON, D. L.; KIM, W.; KAY, W. W.; SURETTE, M. G. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 9, p. 3219-3227, 2006.

WHO. Monitoring antimicrobial usage in food animals for the protection of human health. **World Health Organization**, Oslo, 2001. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/amr-food/en/> Acesso em: 30 mar. 2016.

WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **World Health Organization**, Geneva, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> Acesso em: 30 mar. 2016.

WHO – World Health Organization. Health Topics *Salmonella*. Disponível em: <http://www.who.int/topics/salmonella/en/>. Acesso em: 10 jun. de 2015.

WINFIELD, M. D.; GROISMAN, E. A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, St. Louis, v. 69, n. 7, p. 3687-3694, 2003.

XIA, S.; HENDRIKSEN, R. S.; XIE, Z.; HUANG, L.; ZHANG, J.; GUO, W.; XU, B.; RAN, L.; AARESTRUP, F. M. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from infections in humans in Henan Province, China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 2,. P. 401-409, 2009.

YANG, Y.; MIKS-KRAJNIK, M.; ZHENG, Q.; LEE, S.B.; LEE, S.C.; YUK, H. Biofilm formation of *Salmonella* Enteritidis under food-related environmental stress conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment. **Food Microbiology**, v. 54, p. 98-105, 2016.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P.. **Biologia Molecular Básica**. 4º Edição. Porto Alegre: Artmed, 2012.

ZHANG, S.; SANTOS, R. L.; TSOLIS, R. M.; STENDER, S.; HARDT, W. D.; BAUMLER, A. J.; ADAMS, L. G. The Salmonella enterica Serotype Typhimurium Effector Proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 Act in Concert To Induce Diarrhea in Calves. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3843-3855, 2002.

ZHAO, C.; GE, B.; DE VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; WAGNER, D.; MENG, J. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the greater Washington, D.C., Area. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5431-5436, 2001.

ZHAO, S.; DATTA, A. R.; AYERS, S.; FRIEDMAN, S.; WALKER, R. D.; WHITE, D. G. Antimicrobial-resistant Salmonella serovars isolated from imported foods. **International Journal od Food Microbiology**, v. 84, p. 87092, 2003.

ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; ROHDE, M.; BOKRANZ, W.; RÖMLING, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, Braunschweig, v. 39, n. 6, p. 1452-1463, 2001.