

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**TIPIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Salmonella*
HEIDELBERG ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO**

MARIA ANGÉLICA THIELE FRACASSI

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Porto Alegre
Novembro/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**TIPIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA
DE *Salmonella* HEIDELBERG ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO**

Maria Angélica Thiele Fracassi
Licenciada em Ciências Biológicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia de Alimentos Processados e “in natura”

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Novembro/2017

CIP - Catalogação na Publicação

Fracassi, Maria Angélica Thiele
Tipificação molecular e avaliação da resistência de
Salmonella Heidelberg isoladas de carcaças de frango
/ Maria Angélica Thiele Fracassi. -- 2017.
61 f.
Orientador: Eduardo Cesar Tondo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Salmonella Heidelberg. 2. Susceptibilidade
antimicrobiana. 3. PCR-Ribotipificação. I. Tondo,
Eduardo Cesar, orient. II. Título.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eduardo C. Tondo, meu orientador, pelo constante incentivo ao aprofundamento da pesquisa, pela dedicação e apoio nos momentos decisivos, meu sincero carinho e respeito.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, do ICTA, colegas e amigas sempre se colocaram à disposição para ajudar, ensinar e dirimir minhas dúvidas, em especial a Ana Carolina Batista, Claudia Titze Hessel, Susana de Oliveira Elias e Luana Trombini Decol.

Aos colegas da Fundação Liberato Salzano Vieira da Cunha, pelo apoio, incentivo e colaboração, em especial à Carla Kereski Ruschel, pelo incentivo a realização deste mestrado.

A UERGS, Campus Novo Hamburgo, que gentilmente cedeu o uso do Laboratório de Biotecnologia, para a execução de importantes atividades práticas do meu projeto.

Um agradecimento especial à Prof^a Dra. Débora Vom Endt e à Prof^a Dra. Ana Lucia Kern, pelo carinho, amizade, gentileza e disposição em ajudar numa importante etapa do trabalho.

Também quero manifestar meu agradecimento a Marcel Ludwig Maria, meu querido aluno, pela colaboração nas atividades práticas, pela dedicação, interesse e apoio em todos os momentos.

Enfim, minha eterna gratidão àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente, que apostaram em mim mais do que ninguém, e, seguramente, são os que mais compartilham a minha alegria: minha família!

Autora: Maria Angélica Thiele Fracassi
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

RESUMO

Atualmente, no Brasil, *Salmonella* Heidelberg tem sido isolada, com maior frequência, em abatedouros frigoríficos de aves, despertando preocupação. Em diversos países, esse sorovar tem provocado surtos alimentares importantes, demonstrando ser mais virulento e multirresistente do que outros sorovares de *Salmonella*. Este estudo teve como objetivos realizar a tipificação molecular de 173 *S. Heidelberg*, isoladas de produtos de frango de um abatedouro avícola, e avaliar a resistência a antimicrobianos e a sanitizantes comumente utilizados em indústria de carne. A tipificação molecular foi realizada por PCR-Ribotipificação. A avaliação da resistência a antimicrobianos foi realizada através da técnica de disco-difusão, enquanto que a avaliação dos sanitizantes ácido peracético e quaternário de amônio foi realizada tanto com células em suspensão, quanto com células aderidas ao aço inoxidável AISI 304. Com a PCR-Ribotipificação foram identificados três perfis, com duas, três e quatro bandas de DNA, e, com o ensaio de susceptibilidade, vinte e oito perfis de resistência distintos. Dentre os isolados, 86% apresentaram característica de multirresistência, ou seja, foram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos. Esses dados foram cruzados com a tipificação molecular e um dendrograma reuniu as cepas em oito *clusters*, revelando expressiva diversidade de cepas de *S. Heidelberg* nos produtos avícolas. Um representante dos cinco principais *clusters* foi utilizado para avaliar a resistência aos sanitizantes. Cerca de 7 log UFC/mL de *S. Heidelberg* foram totalmente inativados, nos primeiros cinco minutos de contato, no ensaio com células em suspensão, com ambos sanitizantes testados. Resultados diferentes foram obtidos com as células aderidas, uma vez que o ácido peracético reduziu 2 log de UFC/cm², dos cerca de 4 log UFC/cm² iniciais, nas concentrações de 555ppm (0,18%) e 1110ppm (0,37%), com 1 minuto de contato. No entanto, este sanitizante, após 10 minutos de contato nas mesmas concentrações, inativou todas as células de *S. Heidelberg* aderidas. Na concentração de 1481ppm (1%), nos tempos de 1 e 10 minutos de contato, o ácido peracético inativou totalmente as células aderidas. O sanitizante quaternário de amônio só foi capaz de inativar todas as células aderidas, dentre as diluições testadas, na concentração de 4000ppm (2%). Com base nos resultados, pode-se concluir que há ampla variedade de cepas de *S. Heidelberg* contaminando os produtos avícolas avaliados, sugerindo também diversidade de fontes de contaminação. Além disso, os sanitizantes ácido peracético e quaternário de amônio foram capazes de inativar os micro-organismos quando as concentrações recomendadas pelos fabricantes foram utilizadas.

¹Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (63 p.) Novembro, 2017.

Author: Maria Angélica Thiele Fracassi
Advisor: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

ABSTRACT

Salmonella Heidelberg in Brazil has currently been isolated, often at poultry slaughterhouses arising worries. In many countries, this serovar has caused important foodborne outbreaks showing to be much more virulent and multidrug resistant (MDR) than some other Salmonella serovars. The aim of this study is to carry out molecular typification 173 S. Heidelberg, isolated from chicken products from a poultry slaughterhouse. Moreover, evaluate the antimicrobial and sanitizers resistance usually used in meat industries. Molecular typification was performed by PCR-Ribotyping. Antimicrobial resistance evaluation carried out through disc diffusion, meanwhile, the peracetic acid and quaternary ammonium sanitizers evaluation was carried out not only with suspension cells, but also with stainless steel AISI 304 adhered cells. Through the PCR-Ribotyping three (3) profiles were identified, with two (2), three (3) and four (4) bands of DNA and with the antimicrobial susceptibility method, 28 different resistance profiles. Among the isolates, 86% showed MDR to at least three different antimicrobial classes. These data were correlated with molecular typification and a dendrogram brought together the strains in eight (8) clusters, presenting significant S. Heidelberg strain diversity in poultry products. A sample of each one of the main five (5) clusters was used to evaluate the resistance to sanitizers. Nearly 7 log UFC/ml of S. Heidelberg were totally inactivated during the first 5 (five) minutes of contact, by suspension cells approach. On the other hand, different results were gained with adhered cells. Once, the peracetic acid decreased 2 log UFC/cm² of the initial 4 log UFC/cm², in different concentrations of 555ppm (0,18%) and 1110ppm (0,37%) with a minute of contact. Nevertheless, this sanitizer after 10 minutes of contact, in these concentrations, inactivated all S. Heidelberg adhered cells. In the concentration of 1481ppm (1%), at the time of 1 (one) and 10 minutes, the peracetic acid inactivated fully the adhered cells. The quaternary ammonium sanitizer was only able to inactivate all the adhered cells, among the dilutions tested, in the concentration 4000ppm (2%). Based on the results, it is concluded that there is a broad variety of S. Heidelberg strains infecting the poultry products evaluated, also suggesting diversity of contamination sources. Nonetheless, the sanitizers, peracetic acid and the quaternary ammonium were able to inactivate the microorganisms when the concentrations recommended by its producers were used.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (63 p.) november, 2017.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3	REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1	Características gerais de <i>Salmonella</i> spp.	4
3.2	Classificação taxonômica	4
3.3	Salmoneloses	5
3.4	<i>Salmonella</i> Heidelberg	6
3.5	Caracterização Molecular	7
3.6	Susceptibilidade a antimicrobianos	9
3.7	Resistência a sanitizantes	10
3.7.1	Ácido peracético	11
3.7.2	Quaternário de amônio	12
4	MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1	Isolados de <i>S. Heidelberg</i>	14
4.2	Caracterização Molecular: PCR-Ribotipificação	14
4.2.1	Sequências Iniciadoras	14
4.2.2	Extração DNA: Lise térmica	15
4.2.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	15
4.2.4	Eletroforese	16
4.2.5	Critério para interpretação das bandas	16
4.3	Susceptibilidade a antimicrobianos	16
4.4	Resistência a sanitizantes	17
4.4.1	Preparo da suspensão de <i>S. Heidelberg</i>	18
4.4.2	Método 1 – Resistência a sanitizantes, segundo Brasil, 1993, com células em suspensão.	18
4.4.3	Método 2 – Resistência a sanitizantes, segundo método com células aderidas ao aço inoxidável AISI 304.	19
4.4.3.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	20
4.4.3.2	Ensaio dos sanitizantes em células de <i>S. Heidelberg</i> aderidas aço inox AISI 304.	21

4.5	Análise estatística	22
5	RESULTADOS	23
5.1	Tipificação molecular	23
5.1.1	PCR-Ribotipificação.....	23
5.2	Susceptibilidade a antimicrobianos	24
5.3	Resistência a sanitizantes	30
5.3.1	Método 1 – Resistência a sanitizantes, segundo Brasil, 1993, com células em suspensão	30
5.3.2	Concentração Inibitória Mínima	30
5.3.3	Método 2 – Resistência a sanitizantes segundo método com células aderidas ao aço inox AISI 304.....	30
6	DISCUSSÃO	33
6.1	Caracterização por PCR-Ribotipificação	33
6.2	Caracterização da susceptibilidade a antimicrobianos	34
6.3	Avaliação dos dendrogramas	36
6.4	Resistência a sanitizantes	37
7	CONCLUSÃO	40
8	REFERÊNCIAS	41

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Antimicrobianos utilizados no ensaio de susceptibilidade, dos isolados de <i>S. Heidelberg</i> segundo norma CLSI (2015), classes a que pertencem e respectivas concentrações.....	15
Tabela 2 – Soluções de sanitizantes utilizados no ensaio de resistência segundo Portaria 101/93, MAPA, com suas respectivas concentrações do princípio ativo e pH.....	17
Tabela 3 – Soluções de sanitizantes utilizadas na determinação da CIM e respectivas concentrações de partida (1ºpoço).....	19
Tabela 4 – Número total e percentual dos 173 isolados de <i>S. Heidelberg</i> susceptíveis, com resistências intermediárias e resistentes em relação a cada antimicrobiano testado.....	29

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Fórmula estrutural plana do ácido peracético.....	12
Figura 2 – Fórmula estrutural genérica de compostos à base de quaternário de amônio.....	12
Figura 3 – Esquema das etapas de reação de PCR que ocorrem durante o processo de amplificação da fita de DNA.....	15
Figura 4 – Perfil A – bandas de <i>S. Heidelberg</i> isoladas de carcaças de frango tipificadas por PCR-Ribotipificação. As canaletas de 501 a 508 apresentam os perfis de isolados de <i>S. Heidelberg</i> , enquanto que a canaleta M indica o padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder.....	23
Figura 5 – Perfil B – bandas de <i>S. Heidelberg</i> isoladas de carcaças de frango tipificadas por PCR-Ribotipificação. As canaletas de 301 a 308 apresentam os perfis de isolados de <i>S. Heidelberg</i> , enquanto que a canaleta M indica o padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder.....	24
Figura 6 – Perfil C – bandas de <i>S. Heidelberg</i> isoladas de carcaças de frango tipificadas por PCR-Ribotipificação. As canaletas de 117 a 122 apresentam os perfis de isolados de <i>S. Heidelberg</i> , enquanto que a canaleta M indica o padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder.....	24
Figura 7 – Perfis de resistência dos isolados de <i>S. Heidelberg</i> obtidos pelo ensaio susceptibilidade a antimicrobianos, segundo <i>CLSI</i> , 2015.....	25
Figura 8 – Padrão de susceptibilidade antimicrobiana de amostras de <i>S. Heidelberg</i> isoladas de carcaças de frango.....	26
Figura 9 – Dendrograma com os dados do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de 173 <i>S. Heidelberg</i> isoladas de carcaças de frango.....	27
Figura 10 – Dendrograma correlacionando os dados da tipificação molecular por PCR-Ribotipificação com os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos de 173 <i>S. Heidelberg</i> isolados de carcaças de frango.....	29
Figura 11 – Ensaio de eficácia do sanitizante ácido peracético* na inativação de células de <i>S. Heidelberg</i> aderidas ao aço inoxidável AISI 304, após o tempo de 1 minuto. *Kalyclean 380.....	31
Figura 12 – Ensaio de eficácia do sanitizante ácido peracético* na inativação de células de <i>S. Heidelberg</i> aderidas ao aço inoxidável AISI 304, após o tempo de 10 minutos. Kalylcean 380.....	31
Figura 13 – Ensaio de eficácia do sanitizante à base de quaternário de amônio*	

na inativação de células S. Heidelberg aderidas ao aço inoxidável AISI 304, após o tempo de 1 minuto. *Pluron A 464..... 32

Figura 14 – Ensaio de eficácia do sanitizante à base de quaternário de amônio* na inativação de células S. Heidelberg aderidas ao aço inoxidável AISI 304, após o tempo de 10 minutos. *Pluron A 464..... 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AISI	American Iron and Steel Institute
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APA	Ácido Peracético
BHI	Brain Heart Infusion
BSA	Bovine Serum Albumin
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFO	Cefoxitina
CFZ	Cefazolina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRO	Ceftriaxona
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
EST	Estreptomicina
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
GEN	Gentamicina
ICTA	Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
IMP	Imipenem
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NESP	National Enteric Surveillance Program
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis
PHAC	Public Health Agency of Canada
PREBAF	Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango
QUAT	Quaternário de Amônio
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
SUL	Sulfonamida

TET	Tetraciclina
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidade Formadora de Colônia
XLD	Xylose-Lisine-Desoxycholate Agar

1 INTRODUÇÃO

Anualmente, inúmeros surtos de gastroenterites graves ocorrem devido à ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos. Em diversos países, incluindo o Brasil, *Salmonella* spp. tem figurado entre os principais agentes causadores de surtos alimentares, provocando, com certa frequência, internações hospitalares e, até mesmo, óbitos.

Diversos alimentos podem ser contaminados por *Salmonella* spp., tais como ovos, queijos, farinhas, carnes de gado, de suíno e de frango. No caso de produtos avícolas, diferentes sorovares têm sido isolados, sendo que *S. Enteritidis*, durante muitos anos, frequentemente esteve envolvida em surtos, no Brasil e no mundo. Atualmente, as medidas de controle implementadas pelo governo e indústrias de carne parecem estar surtindo efeito, uma vez que os surtos de salmoneloses causados pela *S. Enteritidis* parecem estar diminuindo. Ao mesmo tempo, outros sorovares de *Salmonella* começam a ser isolados com maior frequência nos abatedouros frigoríficos de aves, despertando interesse e atenção.

No Brasil, o sorovar *Salmonella* Heidelberg tem sido isolado de aves e produtos avícolas, desde a década de 80, porém, nos últimos anos, a frequência de isolamento aumentou expressivamente, tornando-se motivo de preocupação em diversos abatedouros frigoríficos. Um dos principais motivos dessa preocupação é a resistência a antimicrobianos que esse sorovar apresenta, a qual, geralmente, é maior que outros sorovares de *Salmonella* isolados de produtos avícolas. A resistência às cefalosporinas de terceira geração, como Ceftriaxona e Ceftiofur, é dos fatos que mais preocupam os especialistas, pois podem limitar tratamentos de infecções causadas por *Salmonella* em gestantes, crianças e imunodeprimidos. Outros perfis de resistência têm sido investigados, envolvendo, principalmente, diferentes princípios ativos, tais como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e fenicois.

O aumento na frequência de isolamento de *S. Heidelberg* e a sua conhecida resistência a antimicrobianos levantam dúvidas quanto à sua diversidade genética e resistência a sanitizantes comumente utilizados em indústrias de alimentos, uma vez que os abatedouros frigoríficos têm isolado tais micro-organismos em diferentes pontos da produção primária e dentro das indústrias de aves, sugerindo diversidade de fontes de contaminação.

Em vista disso, a presente pesquisa direcionou esforços na investigação da diversidade de cepas de *S. Heidelberg* e suas respectivas resistências a antimicrobianas e a sanitizantes, o que pode contribuir para o controle desse micro-organismo na carne de frango brasileira.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a tipificação de isolados de *S. Heidelberg* provenientes de carcaças de frango e avaliar suas resistências frente a antimicrobianos e sanitizantes.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Realizar a tipificação molecular das amostras, utilizando a técnica de PCR-Ribotipificação;

2.2.2 Verificar a susceptibilidade dos isolados frente a diferentes antimicrobianos;

2.2.3 Avaliar a resistência aos sanitizantes ácido peracético e quaternário de amônio.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características gerais de *Salmonella* spp.

Salmonella é um micro-organismo Gram-negativo, da família *Enterobacteriaceae*, anaeróbio facultativo, não formador de endósporos e em formato de bastonetes curtos (1 a 2µm). Pode fermentar glicose produzindo ácido e gás, mas é incapaz de metabolizar lactose e sacarose. Por não formar endósporos, é relativamente termossensível e facilmente destruída a uma temperatura de 60°C após 10 a 20 minutos (FORSYTHE, 2013; JAY, 2009).

Gastrenterites causadas por *Salmonella* spp. (salmonelose) podem resultar da ingestão de alimentos contaminados com diversos sorovares do gênero, sendo que todos os sorovares são considerados patogênicos. Ovos, maionese, frangos, carnes e produtos à base de carnes são os veículos mais comuns de salmonelose humana (RODRIGUES *et al.*, 2009; BORSOI *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2008; COSTALUNGA *et al.*, 2002).

Todas *Salmonella* spp. podem ser potencialmente patogênicas, contudo o grau de virulência pode variar conforme o hospedeiro, o ambiente, bem como devido à sua constituição genética. Além disso, o estabelecimento de uma infecção em humanos depende da habilidade da bactéria de invadir e de colonizar células intestinais. A taxa de crescimento ideal ocorre a 37°C e o pH, entre 6,5 e 7,5, próximo do neutro. No entanto, sua adaptabilidade fisiológica é evidenciada pela habilidade de crescer e se desenvolver em meios cujos valores de pH variam entre 4,5 e 9,5 (MONTVILLE, 2012).

A água disponível também é um fator que influencia no desenvolvimento desse micro-organismo, sendo que valores de atividade de água (a_w) abaixo de 0,94 são inibitórios quando em meios com pH neutro. O valor de atividade de água considerado ideal é 0,95 (JAY, 2009; FORSYTHE, 2013).

O habitat primário de *Salmonella* spp. é o trato intestinal de animais como aves, répteis e de humanos. Ela é excretada nas fezes e facilmente disseminada a diversas localidades através de insetos ou de outros organismos. *Salmonella* também pode ser encontrada em ambientes aquáticos, especialmente em águas poluídas (JOKINEN *et al.*, 2015).

3.2 Classificação taxonômica

A classificação mais conhecida e utilizada para *Salmonella* está relacionada à tipificação sorológica. O esquema sugerido por White-Kaufmann-Le Minor (1971) está baseado nas diferenças existentes nas estruturas superficiais das células que atuam como antígenos, identificados como somáticos (antígenos “O”), capsulares (antígenos “Vi”) e flagelares (antígenos “H”) (CDC, 2011).

Atualmente, as bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* estão agrupadas em duas espécies, a *S. enterica* e *S. bongori*, com mais de 2600 sorovares (JAY, 2009; FORSYTHE, 2013). A espécie *S. enterica* agrupa os sorovares associados a infecções gastrintestinais, principalmente em animais de sangue quente e em humanos. A espécie *S. bongori* está geralmente associada ao ambiente e aos animais de sangue frio (BARROW, 1999 *apud* OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Salmonella Heidelberg é assim designada por indicar o local onde foi primeiramente isolada. Um acordo internacional adotou essa convenção para nomenclatura de muitos dos sorovares de *Salmonella* spp. Outras denominações levam em conta a síndrome relacionada ou conforme o hospedeiro específico (CDC, 2011).

3.3 Salmoneloses

Apesar da maioria das infecções causadas por *Salmonella* em humanos estarem associadas a alimentos cárneos e produtos lácteos, atualmente, muitos surtos têm sido associados a frutas, vegetais crus, brotos de feijão e sucos não pasteurizados. A contaminação cruzada na produção de alimentos industriais é um dos principais fatores causadores de salmoneloses (CAPALONGA *et al.*, 2014; CARRASCO, RUEDA & GIMENO, 2012).

Dentre os fatores identificados como causadores de salmoneloses estão os alimentos expostos à temperatura ambiente por mais de duas horas, refrigeração e manipulação inadequadas, falta de higienização dos utensílios e equipamentos, além de contaminação cruzada (COSTALUNGA *et al.*, 2002).

Alguns sorovares de *Salmonella* como *S. Typhi* e *S. Paratyphi* podem causar doenças cujos danos são considerados graves, como a febre tifoide, que tem o maior tempo de incubação e alta taxa de mortalidade, e a febre paratifoide, que tende a ser mais branda que a primeira, provocando, mais comumente, gastroenterites (HANNEMANN *et al.*, 2017). A febre tifoide acomete o homem e causa

sintomas que podem persistir por até nove semanas, e o patógeno pode ser transmitido através de água ou de alimentos contaminados. Muitos portadores não apresentam sintomas, o que os torna potenciais disseminadores de *S. Typhi*.

A maioria das pessoas infectadas com *Salmonella* spp. desenvolve diarreia, febre e cólicas abdominais entre 12 e 72h após a infecção a qual dura de quatro a sete dias. Normalmente não é necessário tratamento com antimicrobianos. No entanto, em algumas pessoas, a diarreia pode ser tão grave que o paciente precisa ser hospitalizado (CDC, 2011).

A ocorrência generalizada de doenças e os altos níveis de morbidade e mortalidade associados a esse micro-organismo tornaram-no um alvo de programas de controle em todo o mundo. Na atualidade, a maioria dos surtos de salmonelose é de origem alimentar ou animal (MAJOWICZ *et al.*, 2010).

A presença de *Salmonella* em rios e em lagos demonstra os riscos relativos associados ao consumo da água contaminada e também alerta para áreas específicas de uma bacia hidrográfica que podem precisar de atenção em relação a monitoramento e/ou à gestão sob uma perspectiva de saúde pública (JOKINEN, 2015).

No Rio Grande do Sul, *S. Enteritidis* foi o sorovar predominante isolado de alimentos envolvidos em salmoneloses nos anos de 1999 e 2000 por GEIMBA *et al.*, (2005); de 1999 a 2002, por OLIVEIRA *et al.* (2009) e de 2007 a 2012 por CAPALONGA *et al.* (2014). No entanto, a partir de 2007 ocorreu uma redução na incidência deste sorovar no Brasil, e, entre 2008 e 2012, sorovares de incidência reduzida aumentaram sua prevalência, tais como *S. Mbandaka*, *S. Heidelberg* e *S. Minnesota*. A partir de 2013, *S. Heidelberg* tem se destacado dos demais sorovares e sua prevalência tem aumentado desde então (FIOCRUZ, 2017).

3.4 *Salmonella* Heidelberg

Nos EUA, *Salmonella* spp. é o principal agente patogênico causador de surtos de origem alimentar. Estima-se que cause mais de um milhão de doenças a cada ano, com mais de vinte e três mil hospitalizações, levando cerca de quatrocentos e cinquenta pacientes a óbito (SCALLAN *et al.*, 2011; CDC, 2011). Muitos casos têm sido associados a gastroenterites provocadas por *Salmonella* Heidelberg presentes em carnes de frango e em produtos derivados (CDC, 2013a; CDC, 2014b).

O *National Enteric Surveillance Program (NESP)* do Canadá, em 2013, relatou que, dentre os patógenos entéricos notificados, 63% foram isolados bacterianos, sendo que *Salmonella* spp. foi a mais frequente, com mais de seis mil notificações. Os três sorovares mais comumente isolados, os quais permanecem inalterados desde 2008, foram *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium*, os quais, em conjunto, compuseram 55% de todos os isolados de *Salmonella* notificados ao *NESP (PHAC, 2013)*.

No Brasil, há registros de estudo sobre *S. Heidelberg* desde a década de 60. Entre os anos de 1962 e 1991 foi avaliada a distribuição de diferentes sorovares isolados em aves. Na ocasião, as amostras fornecidas pelo Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz foram isoladas em ambiente de aviários de doze estados brasileiros. *S. Heidelberg* foi classificada como muito frequente, ou seja, com frequência entre 65% e 67%, sendo a maioria (cerca 95%) proveniente do estado de Santa Catarina (HOFER, SILVA FILHO & REIS, 1997).

Pesquisas demonstram que *S. Heidelberg* tem sido isolada em diferentes etapas do processamento de frangos na região sul do país, e que, frequentemente, tem apresentado altas taxas de resistência a antimicrobianos (GIURIATTI *et al.*, 2017; MION *et al.* 2014; PULIDO-LANDÍNEZ *et al.* 2013). A frequência de isolamento tem aumentado em alguns abatedouros frigoríficos brasileiros, despertando inquietação e necessidade de controle.

3.5 Caracterização Molecular

Métodos moleculares variados são utilizados na caracterização e na classificação de bactérias e apresentam vantagens em relação aos métodos fenotípicos tradicionais, como sorotipificação e tipificação por fagos, devido à alta sensibilidade e à especificidade.

Para a escolha do método a ser utilizado, é preciso considerar alguns fatores como a capacidade de diferenciar os micro-organismos relacionados e não relacionados, reprodutibilidade, além de capacidade de identificar a proporção de isolados caracterizados pelo método (HUNTER, 1990; OLIVE & BEAN, 1999).

Esses métodos tornam-se mais importantes à medida que as diferenças encontradas pela análise de seus ácidos nucleicos podem ser utilizadas para a reclassificação de patógenos de origem alimentar. Dessa forma, são muito utilizados na investigação de surtos de origem alimentar, sendo possível a identificação da

origem dos veículos de transmissão e o monitoramento de seus reservatórios (GANDRA *et al.*, 2008; KOTTWITZ & OLIVEIRA, 2011).

Dentre os diversos métodos de tipificação molecular de *Salmonella* spp., estão RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), PFGE (*Pulsed-field Gel Electrophoresis*) e PCR-Ribotipificação.

A técnica RAPD utiliza primer único de sequência curta (10 a 15 pares de base), escolhido ao acaso, o qual amplifica o DNA genômico resultando em um conjunto de fragmentos que atuam como marcadores genéticos permitindo evidenciar diferenças entre sorovares de uma espécie (GANDRA, *et al.*, 2008). A principal vantagem desta técnica é a possibilidade de detectar polimorfismos de DNA sem a necessidade de conhecimento prévio da sequência de nucleotídeos de um gene relevante ou do DNA alvo. Entretanto, a escolha de iniciadores que apresentam boa reprodutibilidade é um pouco trabalhosa, exigindo, muitas vezes, testes prévios com dezenas deles (Maslow *et al.*, 1993 apud Gandra, *et al.*, 2008).

Oliveira, *et al.* (2007) utilizaram esta técnica para diferenciar oitenta e cinco cepas de *Salmonella* proveniente de alimentos associados com surtos alimentares em 2001 e 2002. Dentre as cepas analisadas, 93% foram identificadas como *S. Enteritidis*. LIM, *et al.* (2005) puderam diferenciar 96% das cinquenta e sete cepas de *Salmonella* spp. fornecidas pelo Instituto Nacional de Saúde, Coréia do Sul, utilizando três diferentes *primers*.

PFGE tornou-se uma técnica muito utilizada para tipificação molecular de muitas bactérias patogênicas, dentre elas, a *Salmonella* spp. O método consiste em clivar o genoma bacteriano com enzimas de restrição, de forma aleatória, gerando fragmentos grandes que variam de 10 a 800 kb, os quais não podem ser separados por eletroforese convencional. Para efetuar a separação dos fragmentos, estes são submetidos a um campo elétrico o qual modifica periodicamente o sentido do fluxo elétrico, permitindo que os fragmentos sejam separados por diferença de tamanho (KOTTWICZ & OLIVEIRA, 2011). No entanto, alguns aspectos podem dificultar a realização deste método, como o custo do equipamento e insumos, além do tempo necessário para realização do ensaio.

O método de PCR-Ribotipificação é realizado com a utilização de sequências iniciadoras que anelam nas regiões 16S e 23S e amplificam as sequências presentes entre os genes do *operon* ribossomal (LAGATOLLA, *et al.*, 1996; JENSEN & HUBNER, 1996). As regiões espaçadoras entre 16S e 23S

apresentam variações tanto no tamanho, quanto na sequência de bases, os quais podem ser utilizados na caracterização de bactérias em nível de sorovar (LAGATOLLA, *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2010; CAPALONGA *et al.*, 2014). Os produtos de amplificação podem gerar sequências intermediárias paralelas às quais, ao hibridizar-se, formam estruturas de DNA heteroduplex. Essas estruturas, por apresentarem DNA de cadeia simples e dupla, demonstram uma mobilidade eletroforética reduzida em comparação com a dos produtos homogêneos de PCR de cadeia dupla. Essa redução na mobilidade é influenciada tanto pela quantidade de DNA de cadeia simples presente nas estruturas heterodúplex quanto pelo grau de estrutura secundária formada nessas regiões (JENSEN & HUBNER, 1996).

Muitos autores têm utilizado a PCR-Ribotipificação pela facilidade e pela rapidez na execução, além de alta reprodutibilidade. Oliveira *et al.* (2007) agruparam, em um mesmo perfil de bandas de fragmentos de DNA, 92% dos isolados de *Salmonella* Enteritidis. Geimba *et al.* (2004) e Capalonga *et al.* (2014) consideraram a técnica adequada e com boa reprodutibilidade para a tipificação de sorovares de *Salmonella*.

3.6 Susceptibilidade a antimicrobianos

Antimicrobianos agem inibindo a multiplicação ou causando a morte de bactérias. Resistência antimicrobiana é a capacidade de um micro-organismo persistir e continuar a se multiplicar, mesmo na presença de níveis terapêuticos de um antimicrobiano específico. Estudos têm demonstrado que *S. Heidelberg* tende a ser mais invasiva do que *S. Enteritidis* e que pode causar doenças com maior gravidade, sendo necessário o uso de antimicrobianos (CAPALONGA *et al.*, 2014; AMAND *et al.*, 2013; DUTIL *et al.*, 2010).

Na pecuária, os antimicrobianos são utilizados tanto para tratar ou prevenir doenças infecciosas quanto ajudar no desempenho zootécnico dos animais (ANVISA/PREBAF, 2012). Mesmo em doses subterapêuticas, esses antimicrobianos são utilizados como promotores de crescimento, pois atuam selecionando a microbiota do intestino e eliminando patógenos produtores de toxinas, o que melhora o aproveitamento dos alimentos. O uso em frigoríficos tende a aumentar a resistência de micro-organismos frequentemente expostos a essas substâncias (ECDC, 2017; PALMEIRA *et al.*, 2016; AMAND *et al.*, 2013).

O uso frequente de cefalosporinas de terceira geração, como Ceftiofur, em animais para consumo humano tem levado à resistência a outras cefalosporinas de amplo espectro, como Cefamicina e Ceftriaxona. Como esses são os antimicrobianos de eleição para tratar salmoneloses graves ou invasivas em crianças e mulheres grávidas, as opções de tratamento se tornam limitadas (GIURIATTI, *et al.*, 2017; MEDALLA *et al.*, 2013).

Um estudo comparativo de resistência a antimicrobianos de *S. Heidelberg* isoladas em abatedouro avícola, nos anos de 2005 e 2009, Mion *et al.* (2014) revelaram que as amostras de 2009 foram 100% resistentes àqueles princípios ativos que em 2005 haviam apresentado alguma ação sobre ela. Enquanto que, em 2005, 46,1% foram resistentes a uma classe de antimicrobianos, em 2009, 100% das amostras apresentaram resistência a pelo menos quatro classes de antimicrobianos.

Medeiros *et al.* (2011), em seu estudo, verificaram que 100% das amostras de *S. Heidelberg* isoladas de carcaças de frango comercializadas, de 2004 a 2006, em diversos estados do Brasil, foram resistentes a, pelo menos, três classes de antimicrobianos. Aqueles que apresentaram maior frequência de resistência foram Ampicilina, Estreptomicina e Sulfonamida, com 100% de isolados resistentes, Aztreonam, Cefalotina e Ceftriaxona, com 87,5%, 81,3% e 75% de isolados resistentes, respectivamente. Nesse mesmo estudo, também foram avaliadas amostras de *Salmonella* Enteritidis e, dentre elas, 63,9% foram resistentes a, pelo menos, três classes de antimicrobianos. Dessa forma, comparativamente, os resultados demonstraram que *S. Heidelberg* apresentou maior resistência que *S. Enteritidis*.

Liakopoulos *et al.* (2016) avaliaram a resistência de duzentos isolados de *S. Heidelberg*, coletados durante os anos de 1999 a 2013, pelo *National Institute of Public Health and the Environment*, da Holanda. Os isolados foram provenientes de animais para produção de alimentos, de carnes de aves, de infecções humanas e de outras fontes. Dentre as amostras de *S. Heidelberg*, isoladas de animais destinados ao consumo humano e a carnes de aves, 50,4% apresentaram multirresistência, ou seja, apresentaram resistência a três ou a mais classes de antimicrobianos.

3.7 Resistência a sanitizantes

As indústrias de alimentos possuem diversos controles que são

estabelecidos a fim de evitar alterações durante o processamento dos alimentos, aumentando assim a sua vida útil e reduzindo perdas decorrentes da contaminação por resíduos químicos, físicos ou biológicos.

A avaliação da resistência de *Salmonella* aos sanitizantes é importante, pois o uso correto desses compostos na higienização dos ambientes de processamento de alimentos pode evitar surtos de doenças provocadas por patógenos alimentares (TONDO, *et al.*, 2010).

A Portaria 101, de 11/08/1993 (MAPA/Brasil,) estabelece o método para a determinação da eficiência dos sanitizantes considerando as diluições e as condições de uso recomendadas pelos fabricantes. Os ensaios são realizados na presença de matéria orgânica, tais como albumina bovina 1%, extrato de levedura a 1%, entre outros. A norma prevê ainda um acréscimo de 10% no valor da diluição recomendada pelo fabricante em água destilada.

O princípio ativo dos sanitizantes atua de forma diferente nos micro-organismos que, em algumas situações, produzem lesões subletais, exercendo, assim, ação bacteriostática e não bactericida. Dessa forma, a norma prevê um período de incubação de, no mínimo, 96h com uso de meios de enriquecimento apropriados (livres de inibidores) que permitem a recuperação de células injuriadas (BRASIL, 1993). O surgimento de patógenos resistentes a sanitizantes tem consequências que impactam diretamente na saúde pública, além de implicações econômicas para as indústrias.

Estudos têm demonstrado que sorovares de *Salmonella* são sensíveis à ação de sanitizantes como ácido peracético, hipoclorito de sódio e quaternário de amônio em concentrações indicadas pelos fabricantes (MILAN *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2010).

Tendo em vista que os sanitizantes à base de quaternário de amônio e ácido peracético são muito utilizados em indústrias de alimentos, esses foram utilizados, nesta pesquisa, para verificar a resistência de *S. Heidelberg* em relação a eles.

3.7.1 Ácido peracético

O ácido peracético (APA), também denominado de ácido peroxiacético, ou, ainda, de peróxido acético, é um composto orgânico formado pela mistura estabilizada de ácido acético e peróxido de hidrogênio, cuja fórmula estrutural pode

ser observada na Figura 1.

A sua ação oxidante o torna um excelente sanitizante, pois, além de não produzir resíduos tóxicos nos alimentos, quando decomposto, não produz espuma, resíduos de fosfato e não causa danos no processo de tratamento de efluentes (KUNIGK & ALMEIDA, 2001). O composto é eficaz numa faixa de pH entre 3 a 7,5 e muito eficiente em baixas concentrações (SCHIMIDT *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2010). Possui largo espectro de ação, pois consegue interferir na formação de biofilmes, e é eficiente em ampla faixa de temperatura. Tem sido apontado como provável substituto do hipoclorito do sódio. É relativamente estável e pode ser utilizado em baixas concentrações, de 100 a 200 ppm (KUNIGK & ALMEIDA, 2001; SCHIMIDT *et al.*, 2009).

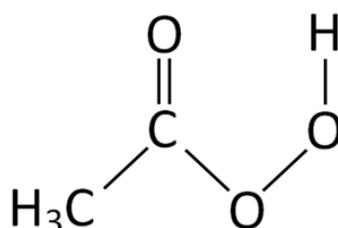


Figura 1: Fórmula estrutural plana do ácido peracético

3.7.2 Quaternário de amônio

Sanitizantes a base de quaternários de amônio (QUAT) são surfactantes catiônicos cuja ação está relacionada à atração de materiais e de estruturas com carga negativa como proteínas bacterianas (SCHMIDT, 2009). Ao diminuir a tensão superficial da água, os compostos QUAT apresentam boa penetrabilidade e eficiência, mesmo em superfícies porosas (COLLA, 2012). Figura 2 representa a fórmula estrutural genérica plana de compostos à base de quaternário de amônio.

Esses compostos são estáveis em uma ampla faixa de temperatura e não apresentam efeito corrosivo sobre as superfícies. Apresentam melhor atividade em pH alcalino e são ativos contra bactérias, fungos/leveduras e vírus (SCHMIDT, 2009; MACHADO, 2010).

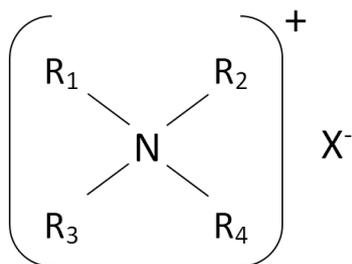


Figura 2: Fórmula estrutural genérica de compostos à base de quaternário de amônio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolados de *S. Heidelberg*

As cepas de *S. Heidelberg* analisadas nesse estudo foram isoladas de etapas de processamento de carcaças de frango durante o ano de 2015 em um abatedouro frigorífico do estado de Santa Catarina e sorotipificadas pela Fiocruz. Cento e setenta e três isolados foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS) em ágar nutriente inclinado, dentro de tubos de vidro, lacrados e acondicionados em caixas térmicas vedadas.

Cada isolado foi repicado para meio de cultivo BHI (caldo cérebro coração) (Himedia, Índia) e incubado a 37°C/24h. Após, a pureza do isolado foi verificada pelo estriamento em ágar XLD (desoxicolato-lisina-xilose), (Himedia), e novamente incubado a 37°C/24h. Uma colônia isolada típica de cada placa foi transferida para 4 mL de meio de cultivo BHI e, após 24h de incubação, a 37°C, uma alíquota de 0,7 µl foi preservada em 0,3µl de glicerol estéril e armazenada a -18°C, em freezer.

4.2 Caracterização Molecular: PCR-Ribotipificação

4.2.1 Sequências Iniciadoras

As sequências de oligonucleotídeos utilizadas foram 5' – 3' CAA GGC ATC CAC CGT GT (*primer 1*) e 5' – 3' GTG AAG TCG TAA CAA GG (*primer 2*). Esses oligonucleotídeos foram inicialmente utilizados por Jensen & Strauss (1993) e são específicos para a amplificação de regiões hipervariáveis entre os genes 16S e 23S do *operon* ribossomal. A Figura 3 apresenta o esquema das etapas de reação de PCR que ocorrem durante o processo amplificação da fita de DNA.

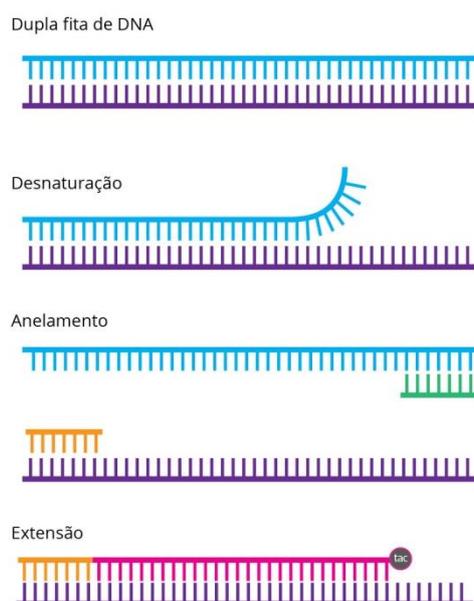


Figura 3: Esquema das etapas de reação de PCR que ocorrem durante o processo de amplificação da fita de DNA.

4.2.2 Extração DNA: Lise térmica

Foi utilizada a técnica de lise por tratamento térmico. Uma colônia de cada isolado foi repicada para meio TSB (caldo de tripton e soja) a 37°C/18h. Um mL foi transferido para frasco Eppendorf e centrifugado a uma velocidade de 5000 rpm/4 min. O líquido sobrenadante foi retirado e, o *pellet* ao fundo foi ressuscitado em 1 mL de tampão TE (10mM Tris HCl, pH 8,0; 1mM EDTA, pH 8,0) e novamente centrifugado a 5000 rpm/4min. Esse processo foi repetido três vezes. Ao final, o *pellet* foi ressuscitado com 100µl de TE. Os frascos Eppendorf foram dispostos em bloco térmico, a 95°C/10min, para promover a lise bacteriana. Ao final, foram novamente centrifugados e o líquido sobrenadante foi transferido para um novo frasco Eppendorf.

4.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de PCR foi adaptada de Jensen & Hubner (1996) e Oliveira (2007), com volume final de 50µL de solução, contendo 10µL tampão de reação Go Taq Promega; 1µL dNTP's 10mM (5mM dATP, 5mM dCTP, 5mM dGTP, 5mM dTTP); 5µL de cada sequência iniciadora (20pmol/uL); 1U Go Taq DNA (Promega, São Paulo, Brasil) e 26,75µL de água ultrapura e 2µL do DNA bacteriano. Os isolados foram submetidos às seguintes condições de amplificação: 94°C (por 2min),

seguido de 25 ciclos de desnaturação, a 94°C (30seg), anelamento, a 55°C (4min) e polimerização, a 72°C (1min); e extensão final de 5 minutos a 72°C. Cada corrida de PCR incluiu um controle negativo sem DNA molde. A amplificação do DNA bacteriano foi realizada com equipamento Mastercycler Nexus Gradient da Eppendorf.

4.2.4 Eletroforese

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de Agarose (Invitrogen) 1,5% contendo Brometo de Etídio (0,5µg/mL), conforme Oliveira *et al.* (2007). A corrente utilizada foi de 1,5 V/cm² sendo que as imagens formadas foram visualizadas por lâmpada UV e capturadas por Transiluminator Loccus L-PIX e armazenadas em dispositivo eletrônico.

4.2.5 Critério para interpretação das bandas

Pequenas diferenças na intensidade das bandas, bem como bandas fracas não foram consideradas na definição dos perfis. Foram considerados distintos os isolados cujo padrão diferenciou em uma ou mais bandas, analisadas visualmente, e considerados iguais aqueles cujo perfil foi idêntico (OLIVEIRA, 2012).

O ensaio foi realizado ao menos em duplicata para cada cepa analisada, sendo que uma das cepas de *S. Heidelberg* foi utilizada em todas as corridas, como controle positivo.

4.3 Susceptibilidade a antimicrobianos

A técnica utilizada para realização desse ensaio foi a de disco-difusão, estabelecida por *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015)*, a qual classifica micro-organismos em susceptível, em intermediário ou em resistente, conforme a formação ou não de um halo de inibição e o tamanho desse em presença de discos com antimicrobianos.

Cada isolado de *S. Heidelberg* foi ativado em meio TSB a 37°C/24h e, com o auxílio de um suabe estéril, a suspensão foi semeada na superfície do ágar Mueller Hinton (Himedia), em três direções, de maneira uniforme.

Discos de onze antimicrobianos, da marca Sensifar (Cefar Diagnóstico), com diferentes princípios ativos foram dispostos equidistantes sobre a superfície do meio, e a placa foi incubada a 37°C por 16/18 horas.

O perfil de susceptibilidade dos isolados foi determinado através da formação, ou não, de halos entorno de cada disco de antimicrobiano. Segundo *CLSI* (2015), a avaliação seguiu os critérios interpretativos do diâmetro do halo formado para cada antimicrobiano. De acordo com a medida do diâmetro formado, o isolado foi classificado em susceptível, em intermediário ou em resistente ao antimicrobiano em questão. A medição foi realizada com paquímetro da marca TESA.

Os antimicrobianos foram selecionados por representarem diferentes classes e princípios ativos, por serem utilizados no Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos (PREBAF) e por terem sido utilizados na avaliação da susceptibilidade de *S. Heidelberg* em diversas pesquisas (LIAKOPOULOS *et al.*, 2016; MION *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2011; LYNNE *et al.*, 2009) Estão descritos na Tabela 1, os antimicrobianos testados nesse ensaio, e as classes a que pertencem.

Tabela 1: Antimicrobianos utilizados no ensaio de susceptibilidade dos isolados de *S. Heidelberg*, segundo *CLSI* (2015), classes a que pertencem e respectivas concentrações.

Classe	Antimicrobiano	Concentração (μg)
β -Lactâmicos		
Penicilina*	Ampicilina (AMP)	10
Carbapenem*	Imipenem (IMP)	10
Cefalosporina*	Cefazolina (CFZ)	30
	Cefoxitina (CFO)	30
	Ceftriaxona (CRO)	30
Fenicol	Cloranfenicol (CLO)	30
Aminoglicosídeo	Estreptomicina (EST)	10
	Gentamicina (GEN)	10
Quinolona	Ciprofloxacina (CIP)	5
Sulfonamida	Sulfonamida (SUL)	300
Tetraciclina	Tetraciclina (TET)	30

Nota: Subdivisão da classe dos β -Lactâmicos. Fonte: a autora, 2017.

4.4 Resistência a sanitizantes

A resistência aos sanitizantes Ácido Peracético (Kalyclean 380) e Quaternário de Amônio (Pluron 464 A/cloreto de alquil dimetil benzil amônio e cloreto

de didecil dimetil amônio) foi avaliada através de dois métodos diferentes. O primeiro método, realizado segundo Portaria 101/93, do MAPA, utilizou células bacterianas em suspensão. O segundo método, realizado conforme Engel *et al.* (2017), avaliou a ação do sanitizante em relação às células aderidas de *S. Heidelberg* em corpos-de-prova de aço inoxidável AISI 304.

4.4.1 Preparo da suspensão de *S. Heidelberg*

Foram selecionados cinco isolados de *S. Heidelberg* a partir do dendrograma relativo ao cruzamento dos dados de tipificação molecular por PCR-Ribotipificação e do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos (Figura 8). P107, P119, P410, P506 e P618 foram os isolados selecionados. Os isolados foram ativados em meio BHI, a 37°C/24horas. Foram feitas diluições seriadas até 1/100, com a finalidade de obter a concentração de 10^7 UFC/mL. A concentração de cada isolado foi determinada segundo a técnica da gota (MILES & MISRA, 1938). Após, dez mililitros da suspensão de cada isolado foram transferidos para um frasco estéril para compor o *pool* bacteriano. O preparo do *pool* de *S. Heidelberg* foi o mesmo para ambos os ensaios de resistência realizados.

4.4.2 Método 1 – Resistência a sanitizantes, segundo Brasil, 1993, com células em suspensão.

A dosagem do teor de ácido peracético no produto comercial Kalyclean 380 foi realizada através de análise titulométrica por iodometria. Nessa análise o ácido peracético reage com o iodeto de potássio, liberando I_2 , o qual é determinado por solução padrão de Tiosulfato de Sódio.

O teor do sanitizante Pluron 464 A foi fornecido pelo fabricante.

O ensaio foi realizado com diferentes concentrações dos sanitizantes, conforme descrito na Tabela 2, onde também é possível visualizar a concentração do princípio ativo. A maior concentração foi preparada segundo a recomendação dos fabricantes, acrescido de 10%, como preconiza a Portaria 101/93, do MAPA. Também foram testadas as diluições com concentração indicada pelo fabricante, uma diluição com metade dessa concentração, bem como uma diluição de 10% do valor recomendado pelo fabricante.

Cada solução foi esterilizada através de filtro estéril com poros de 0,22 μ m, MODELO K18-230, KASVI. De cada diluição foram retirados nove mililitros do

sanitizante e distribuídos em tubos de ensaio estéreis.

Tabela 2: Soluções de sanitizantes utilizados no ensaio de resistência, segundo Portaria 101/93, MAPA, com suas respectivas concentrações do princípio ativo e pH's.

Concentração (% v/v)	Ácido Peracético		Quaternário de Amônio	
	ppm	pH	ppm	pH
0,1	148	3,68	-	-
0,2	-	-	400	8,15
0,5	740	3,36	-	-
1,0*	1481*	3,04	2000	9,04
1,1	1630	3,00	-	-
2,0*	-	-	4000*	9,07
2,2	-	-	4400	9,10

Nota: *concentração recomendada pelo fabricante.

Fonte: a autora, 2017.

A solução de albumina bovina sérica 1% tem a função de simular a presença de matéria orgânica durante a realização do ensaio. A solução foi preparada através da dissolução de um grama de albumina bovina sérica (BSA), em 100 mL de água deionizada estéril, e a solução foi armazenada em frasco também estéril.

Uma alíquota de 100µL do *pool* de *S. Heidelberg*, na fase estacionária, da diluição 1/100, foi transferida para cada tubo contendo 9mL de solução sanitizante, conforme descrito na Tabela 2, mais 1 mL de BSA 1% e homogeneizado. O tempo foi cronometrado a partir daquele momento e 10µL foram transferidos para tubos contendo caldo BHI após 5, 10, 15 e 20 minutos de exposição. O procedimento foi realizado para cada uma das concentrações dos sanitizantes. Os tubos repicados foram incubados a 37°C por 96h, conforme descrito na Portaria 101/93.

A avaliação de tubos positivos foi realizada após 24, 48, 72 e 96 horas. A positividade do crescimento do micro-organismo é evidenciada pela turvação do meio, o que indica a resistência aos sanitizantes.

4.4.3 Método 2 – Resistência a sanitizantes, segundo método com células aderidas ao aço inoxidável AISI 304.

Esse ensaio foi realizado com base nos estudos de Engel *et al.* (2017),

em que um corpo-de-prova de aço inoxidável AISI 304, com dimensões de 20 x 20 mm e 0,1mm de espessura foi exposto ao *pool* da suspensão bacteriana, a 37°C, durante 15 minutos. Após esse tempo, foi determinada a resistência das células aderidas em relação a determinadas concentrações do sanitizante. As concentrações utilizadas nesse ensaio foram selecionadas após o ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada sanitizante, o qual foi realizado previamente.

4.4.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Cada isolado de *S. Heidelberg* foi ativado em caldo BHI e incubado a 37°Celsius. Após 24 horas, o ajuste da suspensão para aproximadamente 10^8 UFC/mL foi realizado com o auxílio de espectrofotômetro marca Bel *Photonic Spectrophotometer*, modelo SP 1102 (OD 630 nm), até o valor de absorvância de aproximadamente 0,5, utilizando meio BHI estéril como diluente. Para compor o *pool* bacteriano, 10mL de cada suspensão foram transferidas para um frasco estéril. A confirmação do ajuste das suspensões a 10^8 UFC/mL foi realizada através da diluição seriada em água peptonada, sendo que, segundo o método da gota, 20 μ L de cada diluição foram dispostos em placa contendo ágar BHI, em duplicata, e incubados a 37° C por 24 horas.

Para a determinação do CIM, foi utilizado microplaca de 96 poços. A cada um dos poços foi adicionado 100 μ L de caldo BHI estéril. No primeiro poço, foram adicionados 100 μ L de solução de sanitizante e homogeneizado. Desse poço, 100 μ L foram retirados e transferidos ao poço seguinte e, novamente, homogeneizado, e, assim, sucessivamente, até o último poço. Em seguida, foram adicionados 100 μ L da suspensão de *S. Heidelberg* a cada poço, com exceção do último, no qual foi utilizado como controle negativo.

Estão descritas na Tabela 3, as soluções iniciais dos sanitizantes que foram utilizados no ensaio e suas respectivas concentrações. A cada transferência de 100 μ L para o poço seguinte, a concentração do sanitizante ficou diluída em 50% em relação ao valor da concentração do poço anterior.

Todas as diluições foram testadas em duplicata, e a placa incubada a 37°C durante 18/24 horas. Os poços considerados positivos foram os que apresentaram turbidez perceptível a olho nu.

Tabela 3: Soluções de sanitizantes utilizadas na determinação da CIM e respectivas concentrações de partida (1ºpoço).

Sanitizante	Diluição (%)	Concentração inicial (ppm)
Ácido Peracético	1,80	2670
	2,00	2960
	2,20	3260
	3,00	4450
Quaternário de amônio	2,25	4500
	2,50	5000
	2,75	5500
	3,00	6000

Fonte: a autora, 2017.

4.4.3.2 Ensaio dos sanitizantes em células de *S. Heidelberg* aderidas aço inox AISI 304

Os corpos de prova foram lavados com detergente neutro, enxaguados e secos em estufa. Os corpos de prova foram esterilizados em autoclave a 121°C, por 15 minutos em frasco estéril e mantidos a temperatura ambiente.

Um corpo de prova de aço inoxidável foi imerso em 10mL do *pool* de *S. Heidelberg* previamente ajustado a 10^8 UFC/mL, e incubado a 37°C, por 15 minutos. Durante esse período ocorreu a adesão de células bacterianas na superfície do corpo-de-prova e, em seguida, esse foi lavado com água peptonada 0,1% estéril, para remoção das células pouco aderidas. O corpo de prova foi, então, imerso em 10mL de solução sanitizante preparada conforme a CIM. O corpo de prova foi novamente lavado com água peptonada 0,1% estéril e transferido para um frasco contendo 10mL de água peptonada 0,1% e submetido ao equipamento de ultrassom Ultracleaner USC-1400A, Unique, com potência de 40 Hz, por 10 minutos, para a liberação das células aderidas. Quatro diluições decimais foram preparadas a partir da água peptonada sonicada, sendo que 20µL dessas foram dispostas em forma de gota, em ágar BHI, e incubadas a 37°C/24h (MILLES & MISRA, 1938). As colônias formadas foram contabilizadas, e o resultado foi calculado em log de UFC/cm² (ENGEL *et al.*, 2017).

O ensaio foi realizado com diluições dos sanitizantes nas concentrações referentes a metade do valor do CIM, bem como o dobro dessa concentração. Os tempos de contato do corpo de prova contendo células aderidas com as soluções de sanitizantes foram de 1 e 10 minutos.

O controle negativo foi realizado colocando o corpo de prova em contato com água peptonada 0,1% por um período de 10 minutos e levado ao sonicador. Uma alíquota de 20µL foi semeada em ágar BHI, pelo método da gota, e incubados a 37°C/24 horas.

O controle positivo foi realizado com o corpo-de-prova de aço inoxidável imerso em 10mL do *pool* bacteriano e incubado a 37°C, por 15 minutos. Transcorrido o tempo de contato, foram feitas duas lavagens com água peptonada 0,1% e transferido para outro frasco contendo 10mL de água peptonada 0,1%. Esse foi sonicado por 10 minutos, e alíquotas de quatro diluições decimais foram semeadas em ágar BHI, através do método da gota. As placas foram incubadas a 37°C/24 horas. O resultado foi calculado em log UFC/cm². Foram realizadas pelo menos três repetições de cada concentração dos sanitizantes.

4.5 Análise estatística

Através do programa estatístico PAST 3.16, os resultados da tipificação molecular por PCR-Ribotipificação e do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foram analisados. Com os dados obtidos foram elaborados dois dendrogramas os quais reuniram os isolados com características semelhantes em grupos. Com o programa Excel 2010, os resultados de resistência aos sanitizantes foram analisados.

5 RESULTADOS

5.1 Tipificação molecular

5.1.1 PCR-Ribotipificação

A técnica de PCR-Ribotipificação permitiu agrupar os 173 isolados de *S. Heidelberg* em três perfis distintos. O perfil A, característico para 53 cepas, 30,7%, apresentou duas bandas de DNA, com tamanhos de 750 e 950pb. O perfil B, o qual agrupou 46,8%, equivalente a 81 cepas, apresentou três bandas de DNA nos tamanhos de 750, 900 e 950pb. O perfil C, característico de 21,4%, reuniu 39 cepas, apresentou quatro bandas de DNA, sendo elas de 750, 900, 950 e 1000pb.

As Figuras 4, 5 e 6 apresentam os três perfis de PCR-Ribotipificação, em gel de agarose, apresentando duas, três e quatro bandas de DNA, respectivamente.

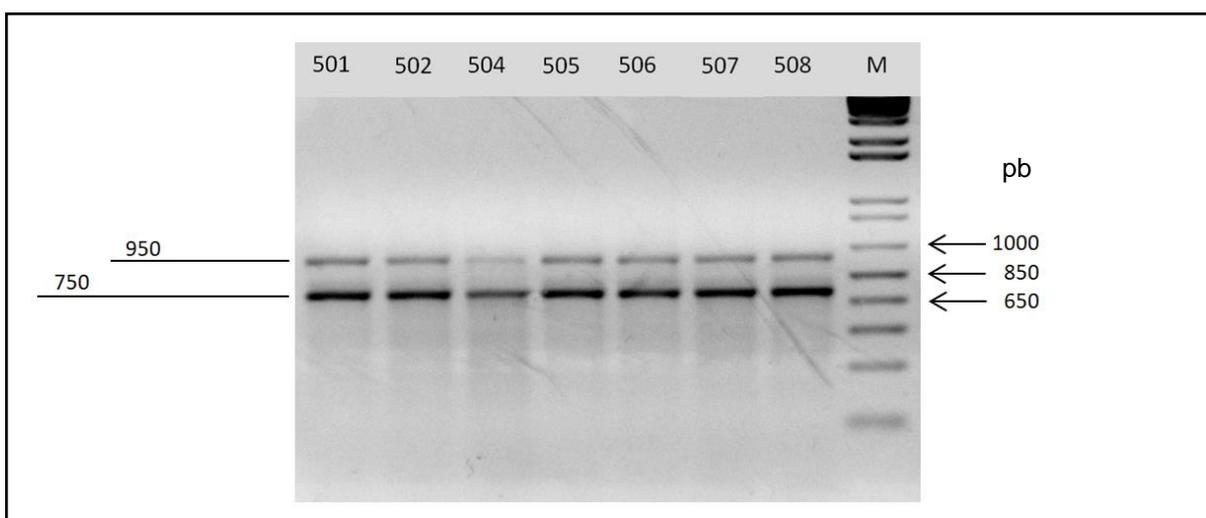


Figura 4: Perfil de bandas A, de *S. Heidelberg* isoladas de carcaças de frango tipificadas por PCR-Ribotipificação. As canaletas de 501 a 508 apresentam os perfis de isolados de *S. Heidelberg*, enquanto que a canaleta M indica o padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder.

Fonte: a autora, 2017.

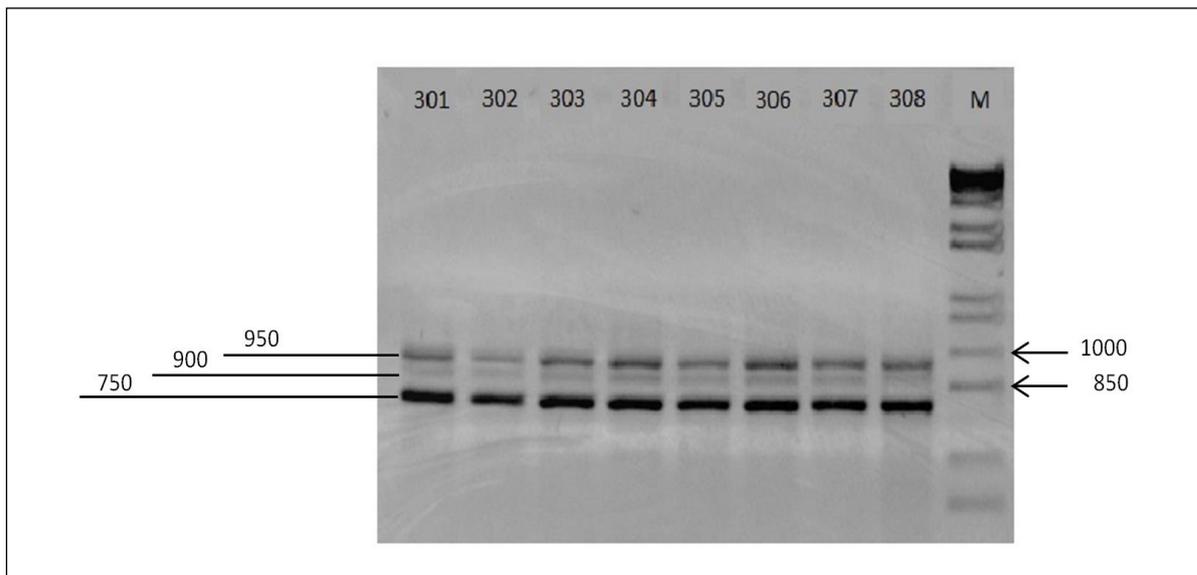


Figura 5: Perfil de bandas B, de *S. Heidelberg* isoladas de carcaças de frango tipificadas por PCR-Ribotipificação. As canaletas de 301 a 308 apresentam os perfis de isolados de *S. Heidelberg*, enquanto que a canaleta M indica o padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder.

Fonte: a autora, 2017.

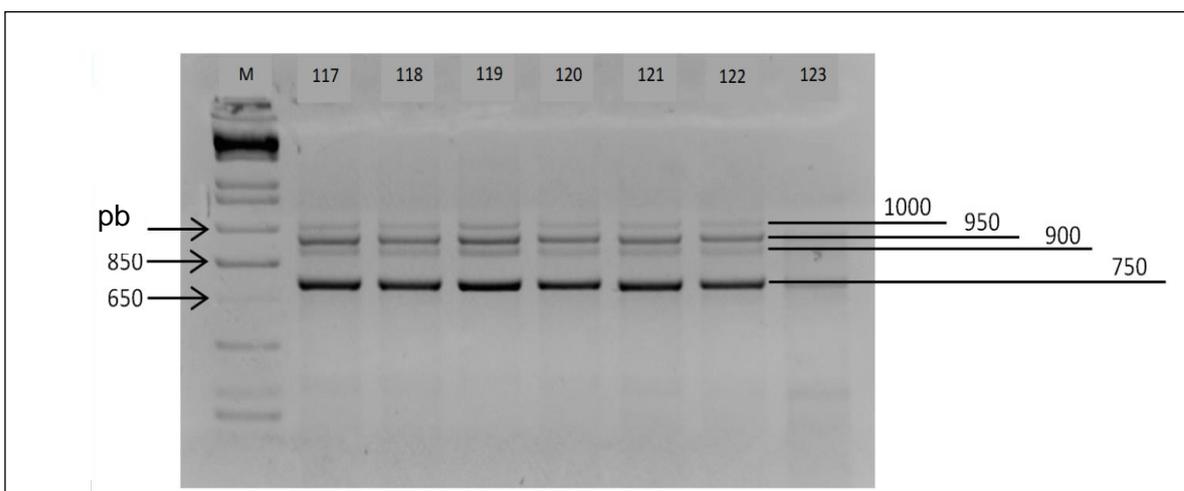


Figura 6: Perfil de bandas C, de *S. Heidelberg* isoladas de carcaças de frango tipificadas por PCR-Ribotipificação. As canaletas de 117 a 122 apresentam os perfis de isolados de *S. Heidelberg*, enquanto que a canaleta M indica o padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder.

Fonte: a autora, 2017.

5.2 Susceptibilidade a antimicrobianos

Na Figura 7 estão descritos os vinte e oito perfis de resistência aos antimicrobianos utilizados no ensaio. O perfil que reuniu o maior número de cepas (59) reuniu 34,1% das cepas e apresentou resistência à Ceftriaxona, Sulfonamida, Ampicilina, Cefazolina, Tetraciclina e à Cefoxitina. O segundo perfil com maior

número de cepas (30) agrupou 17,3% e foram resistentes à Ceftriaxona, Sulfonamida, Ampicilina, Cefazolina, Tetraciclina, Cefoxitina e à Ciprofloxacina.

Outro dado importante demonstra que 86,1% dos isolados apresentaram multirresistência, ou seja, foram resistentes a três ou a mais classes de antimicrobianos. Dentre esses, 79,2% apresentaram resistência a pelo menos seis dos antimicrobianos testados.

Dentre os antimicrobianos com menor eficiência estão a Sulfonamida, na qual 97,7% dos isolados foram resistentes, seguido de Tetraciclina, com 95,5% e Cefazolina com 83,8%. Após, classificam-se Ampicilina e Ceftriaxona com índice de 77,5% de resistência e, com 64,7%, a Cefoxitina.

Os resultados relativos ao antimicrobiano Ciprofloxacina, da classe das quinolonas, demonstraram que 32,9% dos isolados apresentaram resistência, 67,1% apresentaram resistência intermediária e nenhum dos isolados foi susceptível.

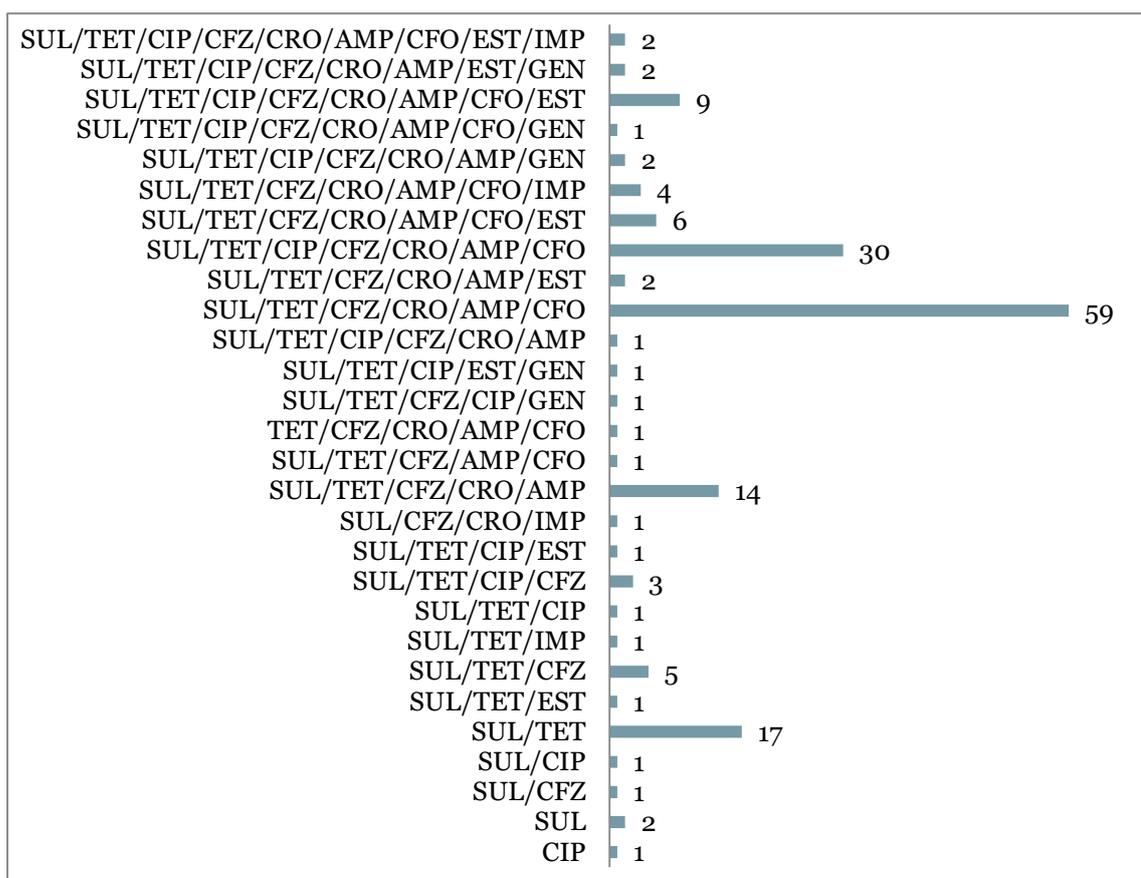


Figura 7: Perfis de resistência dos isolados de *S. Heidelberg* obtidos pelo ensaio susceptibilidade a antimicrobianos, segundo CLSI, 2015.

Nota: Ampicilina (AMP); Cefazolina (CFZ); Cefoxitina (CFO); Ceftriaxona (CRO); Ciprofloxacina (CIP); Cloranfenicol (CLO); Estreptomicina (EST); Gentamicina (GEN) Imipenem (IMP); Tetraciclina (TET); Sulfonamida (SUL). Fonte: a autora, 2017.

Na Figura 8, apresenta-se o padrão de susceptibilidade dos isolados de *S. Heidelberg* em relação aos onze antimicrobianos testados distribuídos na forma de gráfico em colunas. Nele, é possível visualizar que a maioria dos isolados apresentou resistência ou resistência intermediária a sete dos onze antimicrobianos de quatro classes diferentes.

Em relação à susceptibilidade, as maiores percentagens foram referentes a Cloranfenicol, em que 100% dos isolados foram susceptíveis, seguidas de 95,6%, para a Gentamicina, 71,1%, para o Imipenem e 41,6% para a Estreptomicina.

Na Figura 9, consta o dendrograma formado a partir da classificação da susceptibilidade dos isolados, utilizando o programa PAST 3.16. Nele, é possível identificar cinco *clusters* os quais são identificados pelas chaves destacadas pelas setas. Os isolados reunidos nos *clusters* apresentam semelhanças em relação aos dados da susceptibilidade de cada antimicrobiano. Quanto mais distante da base do gráfico, tanto mais diferentes são as características dos isolados. O *cluster* C₁ é formado por apenas dois isolados (P709, P723) com características principais de susceptibilidade à Cloranfenicol, à Cefoxitina e à Ampicilina e resistente ou com resistência intermediária em relação aos demais antimicrobianos. O *cluster* C₂, com oito isolados, apresentou, como característica principal, a susceptibilidade à Tetraciclina, diferentemente de todos os outros isolados que foram resistentes a ele.

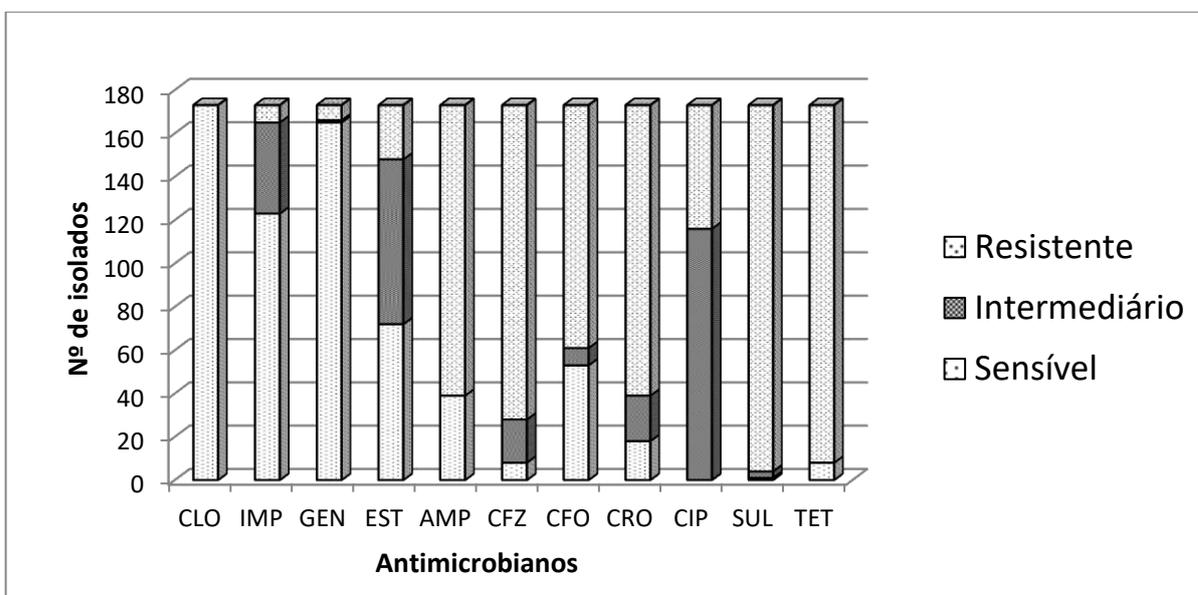


Figura 8: Padrão de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *S. Heidelberg* isolados de carcaças de frango.

Nota: Ampicilina (AMP); Cefazolina (CFZ); Cefoxitina (CFO); Ceftriaxona (CRO); Ciprofloxacina (CIP); Cloranfenicol (CLO); Estreptomicina (EST); Gentamicina (GEN) Imipenem (IMP); Tetraciclina (TET); Sulfonamida (SUL). Fonte: a autora, 2017.

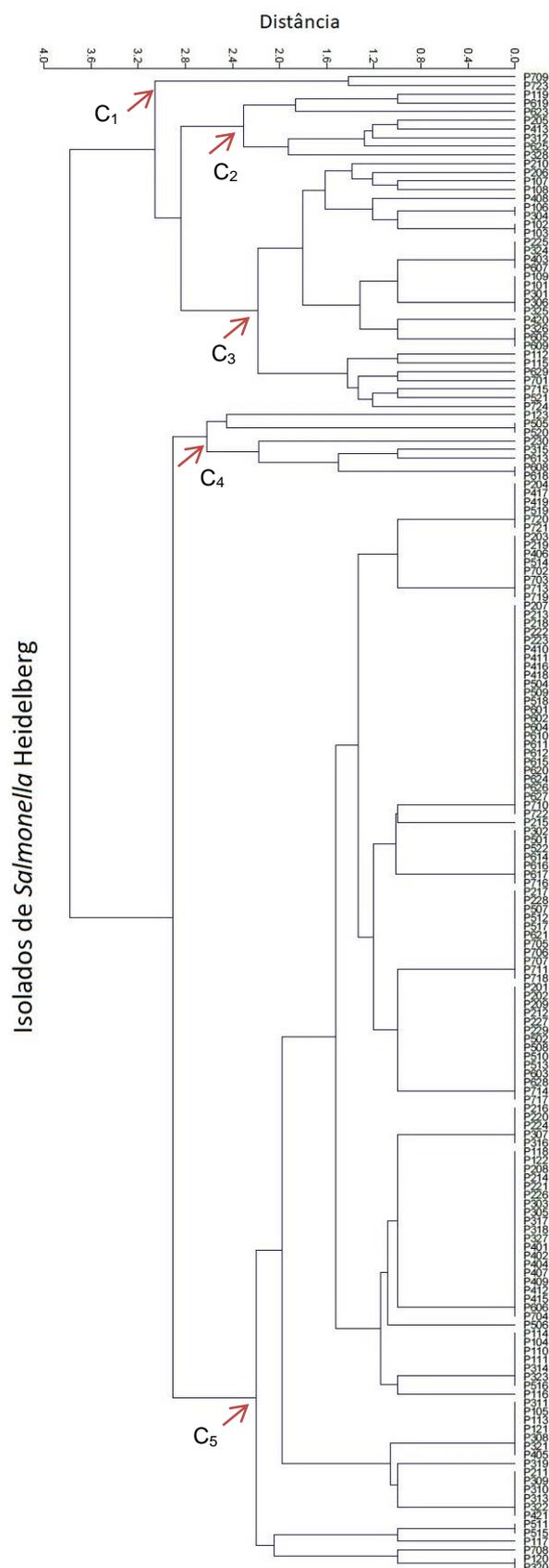


Figura 9: Dendrograma com os dados do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos 173 *S. Heidelberg* isoladas de carcaças de frango.

Nota: As setas assinalam os clusters formados a partir das semelhanças entre os isolados.

Fonte: a autora, 2017.

Um segundo *cluster*, C₃, reuniu vinte e nove isolados que demonstraram características de maior sensibilidade, sendo suscetíveis entre quatro e oito antimicrobianos. Todos os isolados desse *cluster* foram resistentes à Sulfonamida e à Tetraciclina. O *cluster* C₄, também com oito isolados, apresentou resistência a, pelo menos, seis antimicrobianos, à Ampicilina, à Ceftriaxona, à Cefazolina, à Ciprofloxacina, à Sulfonamida e à Tetraciclina. O *cluster* C₅, com maior número de isolados (126), em sua maioria, foi resistente à Cefoxitina, à Ampicilina, à Ceftriaxona, à Cefazolina, à Ciprofloxacina, à Sulfonamida e à Tetraciclina e sensíveis à Cloranfenicol, à Gentamicina, à Imipenem e à Estreptomicina, com algumas variações de resistência intermediária.

Na Tabela 5, consta o número total de isolados de *S. Heidelberg* e seu respectivo percentual de resistência, resistência intermediária e de susceptibilidade aos antimicrobianos testados.

Tabela 5: Número total e percentual dos 173 isolados de *S. Heidelberg* susceptíveis, com resistências intermediárias e resistentes em relação a cada antimicrobiano testado.

Antimicrobiano	Susceptíveis		Resistência Intermediária		Resistentes	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cloranfenicol (CLO)	173	100,0	0	0,0	0	0,0
Gentamicina (GEN)	165	95,4	1	0,6	7	4,0
Imipenem (IMP)	123	71,1	42	24,3	8	4,6
Estreptomicina (EST)	72	41,6	76	43,9	25	14,5
Ciprofloxacina (CIP)	0	0,0	116	67,1	57	32,9
Cefoxitina (CFO)	53	30,7	8	4,6	112	64,7
Ceftriaxona (CRO)	18	10,4	21	12,1	134	77,5
Ampicilina (AMP)	39	22,5	0	0,0	134	77,5
Cefazolina (CFZ)	8	4,6	20	11,6	145	83,8
Tetraciclina (TET)	8	4,6	0	0,0	165	95,4
Sulfonamida (SUL)	1	0,6	3	1,7	169	97,7

Fonte: a autora, 2016.

Os dados de tipificação molecular foram cruzados com os dados do perfil de susceptibilidade e foi elaborado um segundo dendrograma com o programa PAST 3.16. Na Figura 10, está representada a imagem do dendrograma obtido em que é possível identificar, novamente, vários *clusters* nos quais estão reunidos os isolados com características semelhantes.

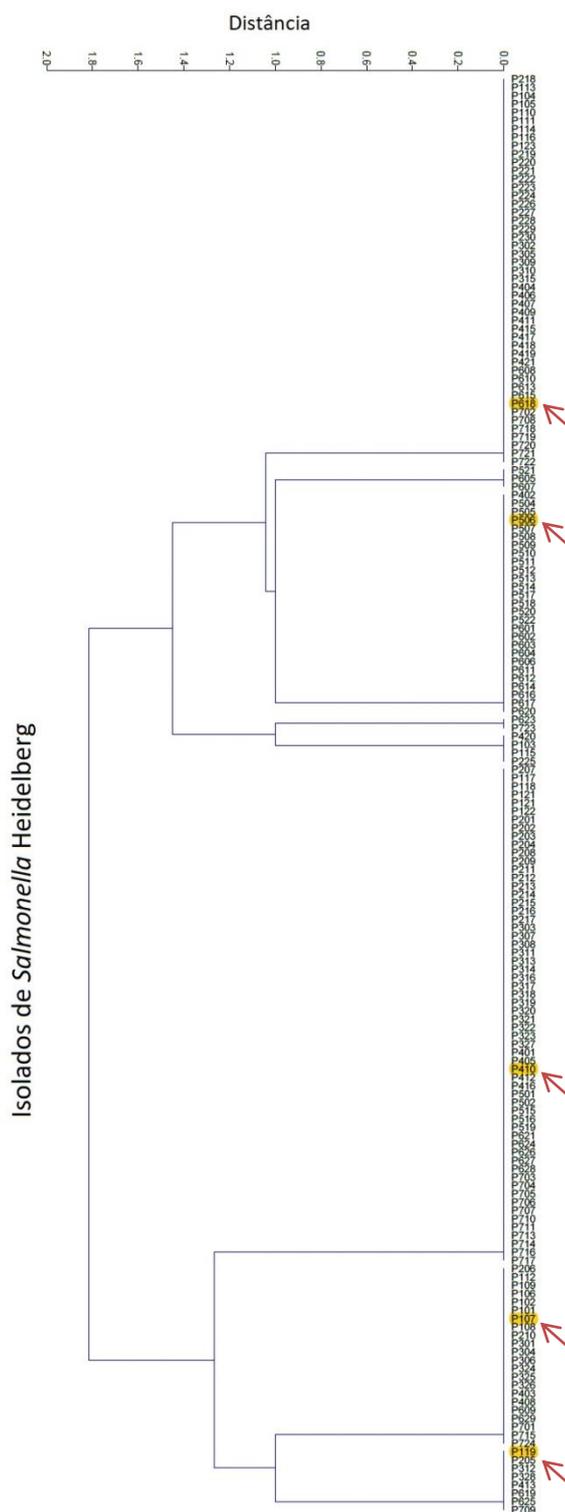


Figura 10: Dendrograma correlacionando os dados da tipificação molecular por PCR-Ribotipificação com os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos de 173 *S. Heidelberg* isolados de carcaças de frango.

Nota: As setas indicam os isolados representantes de cada *cluster* utilizados nos ensaios de resistência a sanitizantes. Fonte: a autora, 2017.

Para a realização dos ensaios de determinação da resistência a sanitizantes, foi utilizada uma suspensão bacteriana composta dos cinco isolados selecionados, representando cada um dos clusters principais: P107, P119, P410, P506 e P618.

5.3 Resistência a sanitizantes

5.3.1 Método 1 – Resistência a sanitizantes, segundo Brasil, 1993, com células em suspensão

O ensaio realizado, conforme a Portaria 101/93, do MAPA, revelou que os dois sanitizantes testados, ácido peracético e quaternário de amônio, foram capazes de inativar totalmente cerca de 7 log UFC/mL do *pool* de *S. Heidelberg*, nos tempos e nas concentrações testados.

5.3.2 Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima encontrada para o ácido peracético foi de 555ppm, o que equivale a uma diluição de 0,37%. O sanitizante quaternário de amônio apresentou uma CIM de 100ppm, que equivale a uma diluição de 0,05%.

5.3.3 Método 2 – Resistência a sanitizantes segundo método com células aderidas ao aço inox AISI 304

Os resultados obtidos, neste ensaio, demonstraram que uma suspensão de *S. Heidelberg* com população média inicial de 8 a 9 log UFC/mL foi capaz de aderir ao corpo-de-prova, após 15 minutos, um valor médio de 4,31 log UFC/cm².

As células aderidas no corpo-de-prova de aço inoxidável, com um minuto de contato com o sanitizante, não foram totalmente inativadas nas diluições de CIM/2, CIM e CIM*2, mas ocorreu a redução de pelo menos 2 log UFC/cm². A concentração recomendada pelo fabricante (1%) inativou totalmente as células de *S. Heidelberg* aderidas. Na Figura 11, apresenta-se o gráfico obtido nos resultados do sanitizante ácido peracético, no tempo de um minuto.

O sanitizante ácido peracético, na metade da concentração inibitória mínima (CIM/2), o que equivale a 277,5ppm, no tempo de 10 minutos, reduziu 2,11 log UFC/cm². Nas demais diluições, CIM (555ppm), CIM*2 (1110ppm) e na recomendada pelo fabricante (1481ppm), o ácido peracético foi capaz de inativar

totalmente as células aderidas ao corpo-de-prova de aço inoxidável. Na Figura 12, está representado o gráfico com esses resultados.

O sanitizante quaternário de amônio não foi capaz de inativar as células aderidas nas diluições de CIM/2 (50ppm), CIM (100ppm) e CIM*2 (200ppm), nos tempos de um e dez minutos. No entanto, ocorreu a redução de 1,36 a 2,39 log UFC/cm². Na diluição de 2% (4000ppm), recomendada pelo fabricante, ocorreu a inativação total das células de *S. Heidelberg* aderidas. Nas Figuras 13 e 14, apresentam-se os gráficos referentes a esses resultados.

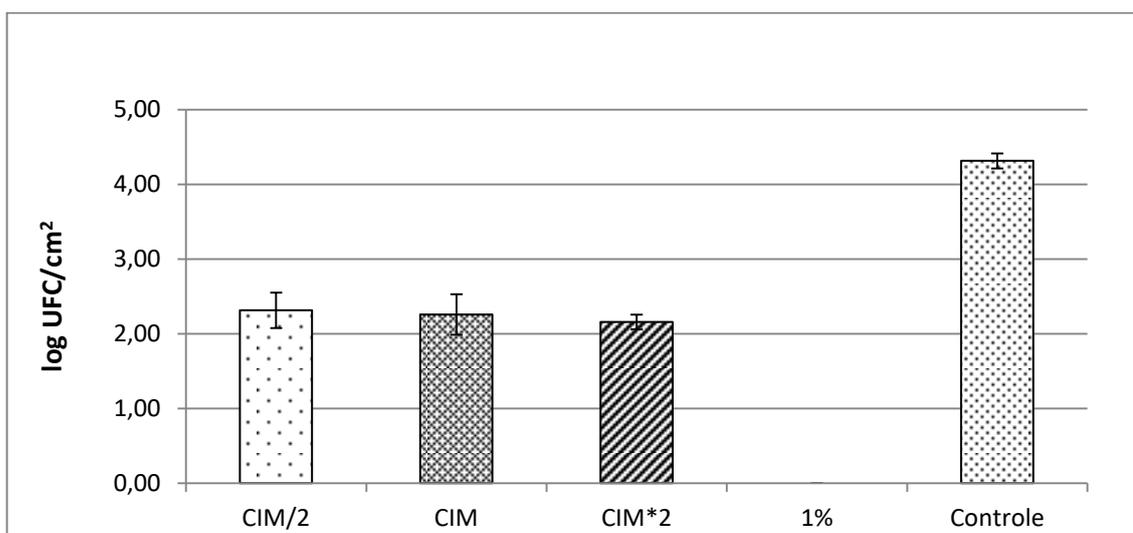


Figura 11: Ensaio de eficácia do sanitizante ácido peracético* na inativação de células de *S. Heidelberg* aderidas ao aço inoxidável AISI 304, após o tempo de 1 minuto. * Kalyclean 380.

Nota: CIM/2 = 277,5ppm (0,18%); CIM = 555ppm (0,37%); CIM*2 = 1110ppm (0,74%); 1% = 1480ppm.

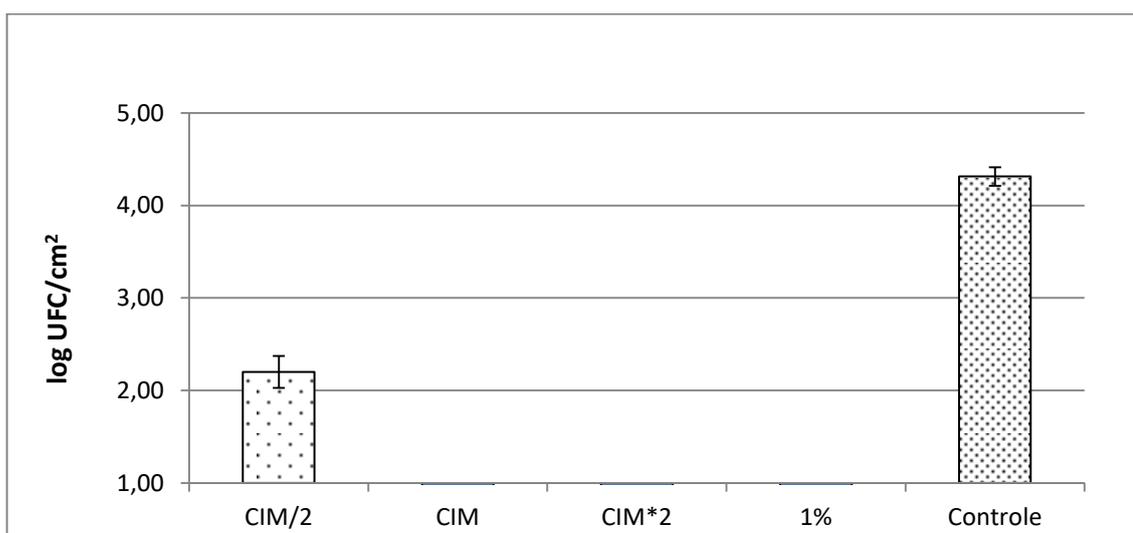


Figura 12: Ensaio de eficácia dos sanitizantes ácido peracético* na inativação de células de *S. Heidelberg* aderidas a aço inoxidável AISI 304, após o tempo de 10 minutos. * Kalyclean 380.

Nota: CIM/2 = 277,5ppm (0,18%); CIM = 555ppm (0,37%); CIM*2 = 1110ppm (0,74%); 1% = 1480ppm.

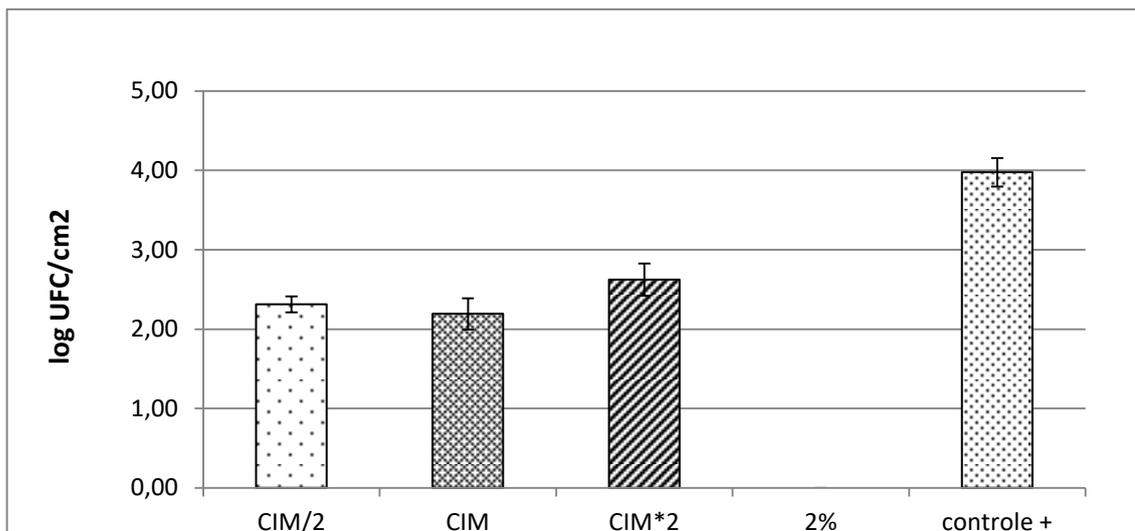


Figura 13: Ensaio de eficácia do sanitizante à base de quaternário de amônio* na inativação de células de *S. Heidelberg* aderidas a aço inoxidável AISI 304, após o tempo de 1 minuto. * Pluron A 464.

Nota: CIM/2 = 50ppm (0,025%); CIM = 100ppm (0,05%); CIM*2 = 200ppm (0,1%); 2% = 4000ppm.
Fonte: a autora, 2017.

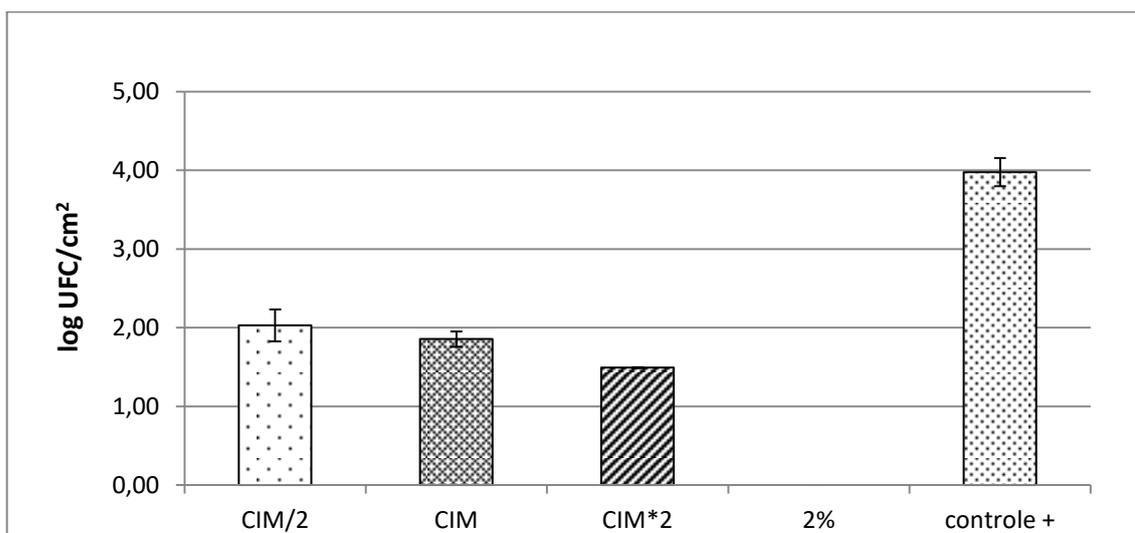


Figura 14: Ensaio de eficácia do sanitizante à base de quaternário de amônio* na inativação de células de *S. Heidelberg* aderidas a aço inoxidável AISI 304, após o tempo de 10 minutos. * Pluron A 464.

Nota: CIM/2 = 50ppm (0,025%); CIM = 100ppm (0,05%); CIM*2 = 200ppm (0,1%); 2% = 4000ppm.
Fonte: a autora, 2017.

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização por PCR-Ribotipificação

Abatedouros frigoríficos brasileiros realizam forte controle microbiológico nas suas várias etapas do processamento de carnes de frango e produtos derivados. Dentre os micro-organismos que necessitam maior controle, estão as *Salmonella* e, dentre elas, o sorovar *S. Heidelberg*, uma vez que tem sido isolado com frequência expressiva. A fim de controlá-lo, há a necessidade de caracterização dos micro-organismos isolados, no intuito de conhecer se há uma ou várias cepas envolvidas na contaminação dos abatedouros frigoríficos e seus produtos, as quais podem vir de uma ou várias fontes de contaminação.

Muitas técnicas de tipificação molecular têm sido utilizadas para a caracterização de sorovares de *Salmonella* isoladas de alimentos, de animais e de humanos, dentre as quais podem ser citadas o PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), a RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e a PCR-Ribotipificação (HAN *et.al*, 2011; LYNNE *et.al*, 2009; OLIVEIRA *et.al*, 2007; OLIVEIRA *et.al*, 2009; OLIVEIRA *et.al*, 2012).

No presente estudo, técnica de PCR-Ribotipificação foi escolhida para tipificação molecular de isolados de *S. Heidelberg*, pois além de ter boa reprodutibilidade e ser de fácil execução, é mais rápida e barata que o PFGE. Além disso, essa técnica tem sido empregada para tipificação molecular de isolados de *Salmonella* envolvidos em surtos alimentares (CAPALONGA, *et.al*, 2014; OLIVEIRA *et. al*, 2012; OLIVEIRA *et. al*, 2009).

Os resultados encontrados neste estudo possibilitaram a identificação de três perfis de bandas, dentre os isolados de *S. Heidelberg* investigados. O perfil mais prevalente apresentou três bandas, com tamanhos entre 750 e 1000pb, e foi característico de 48,0% das cepas testadas. Os outros dois perfis foram formados com duas e quatro bandas, as quais foram referentes a 30,6% e 21,4% das cepas, respectivamente. Durante a realização do presente estudo, não foram encontrados outros trabalhos que tenham utilizado a PCR-Ribotipificação para a caracterização molecular de *S. Heidelberg*, porém essa técnica foi utilizada para caracterizar outro importante sorovar de *Salmonella*, o *S. Enteritidis*. Esse sorovar também tem sido isolado de produtos de frango e ovos e está envolvido em muitos surtos de salmonelose no Brasil (BORGES *et al.*, 2017).

Oliveira *et al* (2009) utilizaram a técnica de PCR-Ribotipificação e identificaram dois padrões de bandas dentre 152 isolados de *S. Enteritidis* provenientes de alimentos envolvidos em salmoneloses, no Rio Grande do Sul, de 1999 a 2002. O padrão predominante, com quatro bandas de DNA, com aproximadamente 300, 400, 600 e 800 bp agrupou 94,7% das cepas em um mesmo perfil, sendo que 5,3% das cepas apresentaram somente duas bandas, com 400 e 600 pb.

Oliveira *et al* (2012) utilizaram duas técnicas de tipificação molecular em 80 amostras de *S. Enteritidis*, isolados de humanos, vítimas de salmoneloses ocorridas no Rio Grande do Sul, e identificaram, pela técnica de PFGE, três perfis (com dez a treze bandas de DNA), sendo que 96,25% das cepas estavam agrupadas num mesmo padrão de bandas. A técnica de PCR-Ribotipificação foi capaz de subdividir ainda mais estes perfis, uma vez que, 97,4%(n=37) das trinta e oito cepas agrupadas em R₁, 92,6% (n=25) das cepas agrupadas em R₂ e 100% (n=15) das cepas agrupadas em R₃ foram também classificadas como P₁, perfil predominante do PFGE.

Capalunga (2014) verificou que dentre as 116 cepas de *S. Enteritidis* provenientes de surtos alimentares isolados de 2007 a 2013, no sul do Brasil, todos apresentaram um único padrão de bandas gerado por PCR-Ribotipificação, o que evidenciou o envolvimento de uma cepa dominante nos surtos ocorridos naquele período.

6.2 Caracterização da susceptibilidade a antimicrobianos

Os resultados da susceptibilidade a antimicrobianos encontrados, nesta pesquisa, revelaram dados em relação à resistência ao antimicrobiano que precisam ser avaliados com atenção. Dentre eles, o dado mais significativo foi de 86,1% dos isolados que apresentaram características de multirresistência. Além disso, nenhum isolado foi pan-susceptível aos antimicrobianos testados apesar de todos apresentarem susceptibilidade ao Cloranfenicol.

Giuriatti *et al.*(2017) reportaram que 100% das cepas de *S. Heidelberg*, isoladas de carnes de frango, apresentaram multirresistência a, pelo menos, quatro classes de antimicrobianos. Antimicrobianos das classes cefalosporinas, penicilina, quinolonas e tetraciclinas foram os que apresentaram maiores taxas, entre 94,4% e 100%, de resistência. Antimicrobianos dessas mesmas classes foram testados no

presente trabalho e os resultados encontrados demonstraram taxas entre 65% e 95% de resistência.

Resultados de Mion *et. al.* (2014) demonstraram que 100% dos isolados de *S. Heidelberg* coletados em abatedouro avícola em 2009, apresentaram resistência a, pelo menos, quatro princípios ativos. Isso revelou um fato importante, pois, na mesma pesquisa, 46,1% dos isolados, do ano de 2005, foram resistentes a, pelo menos, um princípio ativo testado. Tais dados corroboram a preocupação existente em relação ao uso de antimicrobianos em aviários, apesar de esse uso ser em doses subterapêuticas.

Multirresistência a antimicrobianos também foi reportado por Medeiros *et.al.*, (2011) quando foram investigadas 250 cepas de *Salmonella spp.* provenientes de carcaças de frango coletados em quinze cidades, no Brasil. Dentre elas, 6,4% foram identificados como *S. Heidelberg*. Todas as cepas de *S. Heidelberg* apresentaram multirresistência, sendo que os percentuais de resistência mais elevados foram observados para Ampicilina, Estreptomicina e Sulfonamida com 100%; e para Ceftriaxona com 75% de resistência dos isolados. Em comparação com o presente trabalho, é possível observar que Sulfonamida e Ceftriaxona ficaram com valores semelhantes, sendo eles de 97,7% e 77,5%, respectivamente. No entanto, Ampicilina ficou abaixo, com um valor de 77,5%.

Outras pesquisas também indicam que *S. Heidelberg* pode apresentar percentagens de resistência a amoxicilina (β -lactâmico) consideráveis e que, mesmo não sendo utilizado em aviários, é possível que esta resistência à amoxicilina seja co-selecionada pelo uso de outra classe de antimicrobiano. Os genes de resistência que codificam a beta-lactamase estão localizados em elementos genéticos móveis, como nos plasmídeos os quais abrigam genes de resistência para outras classes de antimicrobianos, como tetraciclinas (AMAND *et. al.*, 2013).

Pesquisas anteriores demonstraram valores diferentes quanto à resistência a antimicrobianos (ZHAO *et.al.*, em 2008; LYNNE *et.al.*, 2009; HAN *et. al.*, 2011). Zhao *et al* (2008) verificaram que, dos 298 isolados de *S. Heidelberg* provenientes de carnes, incluindo de aves, coletados de 2002 a 2006, em amostras de carnes de porco, gado, peru e frango, 67% apresentaram resistência a, pelo menos, um agente antimicrobiano; 16,4% com multirresistência a, pelo menos, cinco antimicrobianos e somente nove (3,0%) isolados resistentes a nove antimicrobianos. Na ocasião, Zhao *et al* (2008) encontraram percentagens de 39,9 % de resistência

para Tetraciclina, 37,8% para Estreptomicina e 25,7% para Gentamicina, enquanto que, no presente trabalho, para os mesmos antimicrobianos, as percentagens ficaram bastante distintas, com valores de resistência de 95,4%, 14,5% e 4,0%, respectivamente. Lynne *et al* (2009), demonstraram que isolados de *S. Heidelberg* provenientes de carnes suína e bovina apresentaram percentuais de resistência a antimicrobianos mais elevados do que àqueles provenientes de aves, dos quais 92% foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados.

As cefalosporinas de 3ª geração são a primeira opção quando crianças, gestantes e imunodeprimidas estão acometidas por salmoneloses graves passíveis de tratamento (AMAND *et. al*, 2013; MEDEIROS *et. al*, 2011; DUTIL *et. al*, 2010). Além disso, *Salmonella Heidelberg* tende a provocar miocardite e bacteremia os quais necessitam de terapias com antimicrobianos (HOFFMANN *et. al*, 2014).

Neste trabalho, foram testadas cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, sendo que todas revelaram altos percentuais de resistência por parte dos isolados: 83,8% para a Cefazolina (1ª geração), 64,7%, para a Cefoxitina (2ª geração) e 77,5% para Ceftriaxona (3ª terceira geração). Han *et. al* (2011) revelaram que, embora nenhum dos isolados coletados de pacientes humanos tenha apresentado resistência a Ceftriaxona, neste estudo 10% apresentaram resistência intermediária a este microbiano.

Em estudo desenvolvido na Holanda a resistência a cefalosporinas de espectro expandido de isolados de *S. Heidelberg* provenientes de várias fontes se elevou de 33,3%, em 2011 para 60%, em 2012 e para 75%, em 2013. Neste período, *S. Heidelberg* foi considerado o sorovar predominante dentre as *Salmonella*, na Holanda (LIAKOPOULOS *et al* (2016).

6.3 Avaliação dos dendrogramas

Os dados referentes aos perfis moleculares dos 173 isolados de *S. Heidelberg*, nos quais foram identificados três padrões distintos, com duas, três e quatro bandas de fragmentos de DNA, através da técnica de PCR-Ribotipificação, foram combinados com os perfis de resistência aos onze antimicrobianos testados. O dendrograma formado a partir desses dados revelou a existência de cinco *clusters* principais, em que 95,4% (n=165) dos isolados estão inseridos. Esse dado é importante, uma vez que, dentre os isolados testados, há diferenças moleculares e características de resistência variáveis, o que sugere uma diversidade de cepas de

S. Heidelberg em produtos avícolas. O fato de não haver uma cepa predominante, pode indicar a existência de fontes de contaminação variada.

Padrões moleculares variados, com perfis de resistência a antimicrobianos distintos, têm sido reportados, no Brasil, com certa frequência, para S. Enteritidis (CAPALONGA *et al*, 2014; OLIVEIRA *et al*, 2012; OLIVEIRA *et al*, 2009; OLIVEIRA *et al*, 2007). Esses padrões variados, muitas vezes, permitem identificar o agente patogênico causador de surtos alimentares.

Da mesma forma, diversas cepas de S. Heidelberg, isoladas em produtos de frango, em humanos, em ambientes de processamento de alimentos, entre outros, também têm sido estudadas e suas resistências determinadas (MION *et al*, 2014). Esses estudos são importantes para o estabelecimento de parâmetros no controle e monitoramento das etapas de produção de alimentos a fim de evitar a contaminação e disseminação desses patógenos.

6.4 Resistência a sanitizantes

As superfícies de aço inoxidável presentes em materiais e equipamentos industriais podem ser colonizadas por bactérias capazes de formar biofilmes, tornando-se fontes de contaminação microbiana, comprometendo a qualidade dos alimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2010; ANDRADE, 2008).

Tondo *et al.* (2010) verificaram que, mesmo em curtos períodos de contato, um número considerável de células de *Salmonella* foi capaz de aderir à superfícies de aço inoxidável, demonstrando um risco potencial de contaminação cruzada durante o manuseio e processamento de alimentos. Três sorovares de *Salmonella* não foram completamente inativados pelo processo de desinfecção, mesmo quando a concentração indicada pelo fabricante foi utilizada. Após dez minutos de contato com ácido peracético, ao menos 1 log UFC/cm² dos sorovares S. Bredeney, S. Typhimurium e S. Enteritidis permaneceram na superfície do corpo-de-prova de aço inoxidável. O sanitizante à base de quaternário de amônio e o sanitizante hipoclorito de sódio, também foram testados e não inativaram completamente as células aderidas ao aço inoxidável.

No presente trabalho, foi verificado que o ácido peracético foi capaz de inativar cerca de 4 log UFC/cm² de S. Heidelberg, aderidos ao corpo-de-prova de aço inoxidável AISI 304, após 10 minutos de contato nas concentrações de CIM (555ppm), CIM*2 (1110ppm) e 1% (1481ppm), esse último é a concentração

recomendada pelo fabricante. Entretanto, após um minuto, a inativação não foi total, ocorrendo a redução de cerca de 50% das células de *S. Heidelberg*, permanecendo aderidos na superfície do corpo-de-prova, cerca de 2 log UFC/cm². No entanto, foi observado que, no ensaio de resistência com células em suspensão, realizado segundo a Portaria 101/93, os isolados de *S. Heidelberg* foram totalmente inativados nos primeiros 5 minutos de contato com ácido peracético e todas as concentrações e tempos testados. Esse dado revelou que, quando em suspensão, as células de *S. Heidelberg* tendem a ser mais sensíveis aos sanitizantes, tanto na concentração indicada pelo fabricante, quanto em soluções mais diluídas. Além disso a diferença de resultados entre os dois ensaios pode ser explicada, principalmente, devido aos tempos de contato em que as células de *S. Heidelberg* estiveram em contato como sanitizante. No tempo de um minuto, o sanitizante só foi efetivo, contra as células aderidas no aço inoxidável, na concentração recomendada pelo fabricante.

Os resultados do ensaio de eficiência do quaternário de amônio em células de *S. Heidelberg* aderidas em aço inoxidável demonstraram que as concentrações relativas ao CIM/2 (50ppm), CIM (100ppm) e CIM*2 (200ppm) não foram eficazes na inativação completa das células. Após os tempos de um e dez minutos, ainda permaneceram aderidas, cerca de 2,5 log UFC/cm² e 1,5 log UFC/cm², respectivamente. Ainda assim, no ensaio de resistência com células em suspensão, realizado segundo a Portaria 101/93, o quaternário de amônio inativou todas as concentrações testadas nos primeiros 5 minutos de contato. Na concentração indicada pelo fabricante (2% ou 2000ppm) ocorreu a inativação de todas as células aderidas, tanto no tempo de um minuto, quanto em dez minutos de contato com o sanitizante quaternário de amônio.

Colla, *et al* (2012), também obtiveram resultados semelhantes, com inativação completa das células em suspensão de isolados de *S. Heidelberg* coletados, em abatedouro avícola, nos anos de 2005 e 2009, após cinco minutos de contato com ácido peracético, na concentração de 1%, conforme Portaria 101/93. No entanto, em relação ao quaternário de amônio, a inativação das células em suspensão aos cinco minutos ocorreu somente nos isolados de 2005. Os isolados do ano de 2009 apresentaram 33,3% de resistência aos 5 minutos e 17,0%, aos dez minutos de contato. O mesmo ocorreu em relação ao sanitizante clorexidina onde 25,0% das amostras coletadas em 2005 apresentaram resistência bem como 33,3%

das coletadas em 2009, indicando a progressão de resistência frente a esses dois sanitizantes.

Machado, *et al* (2010) obtiveram resultados semelhantes com os sorovares *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Bredeney*, no ensaio com células em suspensão, quando em contato com ácido peracético na concentração indicada pelo fabricante (1% ou 1500ppm) e na metade dessa (0,5% ou 750ppm), nos tempos avaliados pela Portaria 101/93. O mesmo ocorreu em relação ao quaternário de amônio, na concentração indicada pelo fabricante (2% ou 4000ppm), bem como com a metade dessa concentração (1% ou 2000ppm). Nas concentrações mais baixas, de 0,1% (200ppm), 0,2% (400ppm) e 0,3% (600ppm), os sorovares de *Salmonella* foram resistentes ao sanitizante quaternário de amônio, sobrevivendo ao longo de 20 minutos de exposição. Em relação ao ácido peracético, *S. Bredeney* foi sensível a esse composto também nas concentrações 0,3% (450ppm) e 0,2% (300ppm), sendo que o mesmo não foi observado para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Na menor concentração testada, de 0,1% (150ppm), *S. Bredeney* não foi totalmente inativada, apresentando crescimento nos primeiros cinco minutos de exposição. As demais cepas foram resistentes, apresentando crescimento após exposição ao sanitizante em todos os tempos avaliados.

De maneira geral, os sanitizantes produzidos industrialmente são aprovados, dentro das condições indicadas pelo fabricante, por ensaios com células em suspensão, conforme a Portaria 101/93, do MAPA. No entanto, o ensaio que leva em consideração as células aderidas a corpos de prova de aço inoxidável pode validar o uso dos sanitizantes, nas condições recomendadas, uma vez que avalia o micro-organismo em seu estado sésil (OLIVEIRA, BRUGNER & PICCOLI, 2010).

No ensaio com corpos de prova de aço inoxidável, as células aderidas apresentaram maior resistência aos sanitizantes ácido peracético e quaternário de amônio, nas concentrações abaixo do recomendado pelo fabricante, nos tempos de contato testados, sugerindo a necessidade de promover uma higienização conforme a indicação do fabricante, de forma eficiente, em equipamentos e ambientes de processamento em abatedouros frigoríficos e em indústrias de alimentos em geral.

7 CONCLUSÃO

A tipificação dos 173 isolados de *S. Heidelberg*, através de PCR-Ribotipificação, revelou a presença de três perfis moleculares distintos, em que 30,6% dos isolados apresentaram duas bandas de fragmentos de DNA, 48,0%, com três bandas e 21,4% dos isolados, com quatro bandas de fragmentos de DNA.

A susceptibilidade frente aos onze antimicrobianos testados revelou, como característica principal, que 86,1% dos isolados apresentaram multirresistência, ou seja, foram resistentes a, pelo menos, três classes diferentes de antimicrobianos. Dentre esses, 79,2% demonstraram resistência a, pelo menos, seis antimicrobianos distintos. Sulfonamida, Tetraciclina e Cefazolina foram os antimicrobianos com maiores índices de resistência por parte dos isolados, com valores de 97,7%, 95,4% e 83,8%, respectivamente. Dentre os antimicrobianos com melhor eficiência, Cloranfenicol foi o único em que 100% dos isolados foram susceptíveis, seguido de Gentamicina, com 95,4%, e Imipenem, com 71,1% dos isolados sensíveis.

O *pool* dos isolados P107, P119, P410, P506 e P618 utilizados nos ensaios de resistência aos sanitizantes ácido peracético e quaternário de amônio, determinados segundo Portaria 101/93 (MAPA), foi sensível nas concentrações testadas em todos os tempos previstos do ensaio. No ensaio de resistência com células aderidas, o ácido peracético, em todas as concentrações testadas, inativou totalmente as células de *S. Heidelberg* aderidas ao corpo de prova de aço inoxidável, após 10 minutos de contato. O mesmo desempenho não ocorreu com o sanitizante à base de quaternário de amônio, que foi capaz de inativar cerca de 2 log UFC/cm², ainda permanecendo aderidas, cerca de 1 a 2 log UFC/cm², nas concentrações mais baixas. Somente a concentração indicada pelo fabricante foi eficaz e inativou plenamente as células aderidas nos tempos de 1 e 10 minutos de contato.

Os resultados da resistência antimicrobiana demonstraram que a maioria dos isolados de *S. Heidelberg* foram multirresistentes aos antimicrobianos testados, o que pode causar maiores problemas à população em situações de surtos de origem alimentar. Além disso, foram identificados três diferentes perfis de PCR-ribotipificação o qual sugere uma origem distinta desses isolados e requer maior atenção no processo de abate em frigoríficos avícolas.

8 REFERÊNCIAS

- Amand JAS, Otto SJG, Cassis R, Christianson CBA. 2013. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg isolated from poultry in Alberta. *Avian Patology*. 42(4):379-386.
- Andrade NJ. 2008. **Higiene na indústria de alimentos**: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. Editora Varela: São Paulo.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988. Publicação D.O.U.; 1988.
Disponível em: <<http://goo.gl/SBglV3>>. Acesso em: 20 set. 2015.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2012. PREBAF: Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango. Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos: Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isoladas de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. Brasília, 2012.
Disponível em: <<http://goo.gl/Q8pknT>>. Acesso em: 16 set. 2015.
- Araújo, EA, Andrade NJ, Carvalho AF, Ramos AM, Silva CAS. 2010. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. *Química Nova*. 33(9):1940-1948.
- Borsoi A, Santin E, Santos LR, Salle CTP, Moraes HLS, Nascimento VP. 2009. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed-field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluations. *Poultry Science*. 88:750-758.
- Borsoi A, Santos LR, Salle CTP, Rodrigues, LB, Moraes HLS, Salle, TP, Nascimento VP. 2011. Behaviour of *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis Strains Following Broiler Chick Inoculation: Evaluation of Cecal Morphometry, Liver and Cecum Bacterial Counts and Fecal Excretion Patterns. *Braz J Microbiol*. 42(1):266-273.
- BRASIL – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária: **Portaria 101, de 11 de agosto de 1993**.
Disponível em: <<http://www.crmvgo.org.br/legislacao/OVOS/POR00000101.pdf>>
Acesso em: jul. 2016.
- BRASIL – Ministério da Saúde/Secretaria da Vigilância Sanitária/Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar: **Doenças Transmitidas por Alimentos**. 2017. Brasília, DF:MAPA; 2017.
Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-maio-de-2017>>. Acesso em: out. 2017.
- Capalonga R, Ramos RC, Both JMC, Soeiro MLT, Longaray SM, Haas S, Tondo EC. 2014. *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in Southern Brazil between 2007 and 2012. *Journal of Infection in Developing Countries*. 8(7):811-817.
- Carrasco E, Morales-Rueda A, García-Gimeno RM. 2012. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: a review. *Food Research International*. 45:545-556.
- CDC – Center for Disease Control and Prevention. **National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Surveillance Overview**. 2011. Atlanta, 2011.

Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/national-surveillance/pdfs/NationalSalmSurveillOverview508.pdf>>. Acesso em: 23 jul. 2016.

- CDC – Center for Disease Control and Prevention. 2013a. **Four Multistate Outbreaks of Human *Salmonella* Infections Linked to Live Poultry in Backyard Flocks**. Atlanta, 2013.
Disponível em: <<http://goo.gl/B5y1iz>>. Acesso em: 23 set. 2015.
- CDC – Center for Disease Control and Prevention. 2013b. **Outbreak of *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to a Single Poultry Producer - 13 States, 2012 – 2013: Morbidity and Mortality Weekly Report**. Atlanta, 2013.
Disponível em: <<http://goo.gl/XQiSZ3>>. Acesso em: 22 set. 2015.
- CDC – Center for Disease Control and Prevention. 2014a. **Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006-2013: Morbidity and Mortality Weekly Report**. Atlanta, 2014.
Disponível em: <<http://goo.gl/cexcsv>>. Acesso em: 22 set. 2015.
- CDC – Center for Disease Control and Prevention. 2014b. **Multistate Outbreak of Multidrug-Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Foster Farms Brand Chicken**. Atlanta, 2014.
Disponível em: <<http://goo.gl/D8snjY>>. Acesso em: 23 set. 2015.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. Wayne, 2015.
- Colla FL, Mion L, Parizotto L, Santos LA, Pilotto F, Rodrigues LB, Nascimento VP, Santos LR. 2014. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e eficácia de sanitizantes frente aos isolados de *Salmonella* spp. oriundos de carcaças suínas no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 34(4):320-324.
- Colla FL, Rodrigues LB, Borsoi A, Dickel EL, Nascimento VP, Santos LR. 2012a. Isolamento de *Salmonella* Heidelberg em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte. *Arquivo do Instituto de Biologia*. 79(4):603-606.
- Colla FL, Rodrigues LB, Dickel EL, Borsoi A, Nascimento VP, Santos LR. 2012b. Avaliação *in vitro* de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32(4):289-292.
- Costalunga S, Tondo EC. 2002. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. *Braz J Microbiol*. 33:342-346.
- Doyle ME. 2015. Multidrug-resistant Pathogens in the food supply. 2015. *Foodborne Pathogens and Disease*. 12(4):261-279.
- Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, Bourgault AM, Cole L, Daignault D, Desruisseau A, Denczuk W, Hoang L, Horsman GB, Ismail J, Jamieson F, Maki A, Pacagnella A, Pillai DR. 2010. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases*. 16(1):48-54.
- ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control. 2017. A second joint report on the integrated analysis of the consumption of the antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*. 15(7):135p.
- Engel JB, Heckler C, Tondo EC, Daroit DJ, Malheiros PS. 2017. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. *International Journal of*

- Food Microbiology. 252:18-23.
- Forsythe SJ. 2013. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Artmed: Porto Alegre. 602p.
- Gandra EA, Gandra TKV, Mello WS, Godoi HS. 2008. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. 30(1):109-118.
- Geimba MP, Tondo EC, Oliveira FA, Canal CW, Brandelli A. 2004. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* sp. isolated from foods involved in foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, South of Brasil. Journal of Food Protection. 67(6):1229-1233.
- Geimba MP, Tondo EC, Brandelli A. 2005. Antimicrobial resistance in *Salmonella Enteritidis* isolated from foods involved in human foodborne outbreaks that occurred in the south of Brazil, 1999-2000. Journal of Food Safety. 25:173-182.
- Giuriatti J, Stefani LM, Brisola MC, Crecencio RB, Bitner DS, Faria GA. 2017. *Salmonella* Heidelberg: Genetic profile of its antimicrobial resistance related to extended spectrum β -lactamases (ESBLs). Microbial Pathogenesis. 109:196-199.
- Han J, David DE, Deck J, Lynne AM, Kaldhone P, Nayak R, Stefanova R, Foley SL. 2011. Comparison of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from human patients with those from animals and food sources. Journal of Clinical Microbiology. 49(3):1130-1133
- Hannemann S, Galán G. 2017. *Salmonella enterica* serovar-specific transcriptional reprogramming of infected cells. PLOS Pathogens. 13(7):1-17.
- Hofer E, Silva F^o SJ, Reis EMF. 1997. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira. 17(2):55-62.
- Hoffmann M, Zhao S, Pettengill J, Luo Y, Monday SR, Abbott J, Ayers SL, Cinar HN, Muruvanda T, Li C, Allard MW, Whichard J, Meng J, Brown EW, McDermontt PF. 2014. Comparative genomic analysis and virulence differences in closely related *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolates from humans, retail meats, and animals. Genome Biology and Evolution. 6(5):1046-1068.
- Hunter P. 1990. Reproducibility and Indices of Discriminatory Power of Microbial Typing Methods. Journal of Clinical Microbiology. 29(9):1903-1905.
- Jay JM. 2009. **Microbiologia de Alimentos**. 6. Ed. Artmed: São Paulo. 711 p.
- Jensen MA, Straus N. 1993. Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. Genome Research. 3:186-194.
- Jensen MA, Hubner RJ. 1996. Use of homoduplex ribosomal DNA spacer amplification products and heteroduplex cross-hybridization products in the identification of *Salmonella* serovars. Applied and Environmental Microbiology. 62(8):2741-2746.
- Jokinen CC, Koot J, Cole L, Desruisseau A, Edge TA, Khan IUH, Koning W, Lapen DR, Pintar KDM, Reid-Smith R, Thomas JL, Topp E, Wang LY, Wilkes G, Ziebell K, van Bochove E, Gannon VPJ. 2015. The distribution of *Salmonella enterica* serovars and subtypes in surface water from five agricultural regions across Canada. Water Research. 76:120-131.
- Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, David DE, McDermontt PF, Logue CM, Foley SL. 2008. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Turkey-Associated sources. Applied and Environmental Microbiology. 74(16):5038-5046.
- Kauffmann F. 1971. Serological diagnosis of salmonella-species Kauffmann-white-schema. The Williams & Wilkins Company: Baltimore.

- Kottwitz LBM, Oliveira TCRM, Alcocer I, Farah SMSS, Abrahão WSM, Rodrigues DP. 2010. Avaliação Epidemiológica de Surtos de Salmonelose Ocorridos no Período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum, Health Sciences*. 32(1):9-15.
- Kottwitz LBM, Oliveira TCRM. 2011. Métodos de caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella* Enteritidis e a utilidade da técnica PFGE em estudos epidemiológicos. *Biosaúde*. 13(1/2):38-50.
- Kunigk L, Almeida MCB. 2001. Action of peracetic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension or settled on stainless steel surfaces. *Braz J Microbiol*. 32:38-41.
- Lagatolla C, Dolzani L, Tonin E, Lavenia A, Michele M, Tommasini T, Monti-Bragadin C. 1996. PCR Ribotyping for characterization *Salmonella* isolates of different serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(10):2440-2443.
- Landeras E, Mendoza MC. 1998. Evaluation of PCR-based methods and ribotyping performed with a mixture of *Pst* I and *Sph* I to differentiate strains of *Salmonella* serotype Enteritidis. *Journal of Medical Microbiology*. 47:427-434.
- Liakopolulos A, Geurts Y, Dierikx CM, Brouwer MSM, Kant A, Wit B, Heymans R, van Pelt W, Mevius DJ. 2016. Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg strains, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*. 22(7):1257-1261.
- Lim H, Lee KH, Hong CH, Bahk GJ, Choi WS. 2005. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. *International Journal of Food Microbiology*. 105:411-418.
- Lynne A, Kaldhone P, David D, White DG, Foley SL. 2009. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from foods animals. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6(2):207-215.
- Machado TRM, Malheiros PS, Brandelli A, Tondo EC. 2010. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 69(4):475-481.
- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*. 50:882-889.
- Malheiros PS, Brandelli A, Noreña CPZ, Tondo EC. 2009. Acid and Thermal Resistance of *Salmonella* Enteritidis Strain Involved in Several Foodborne Outbreaks. *Journal of Food Safety*. 29:302-317.
- Medalla F, Hoekstra RM, Whichard JM, Barzilay EJ, Chiller TM, Joice K, Rickert R, Krueger A, Stuart A, Griffin PM. 2013. Increase in Resistance to Ceftriaxone and Nonsusceptibility to Ciprofloxacin and Decrease in Multidrug Resistance Among *Salmonella* Strains, United States, 1996-2009. *Foodborne Pathogens and Disease*. 10(4): 302-309.
- Medeiros MAN, Oliveira DCN, Rodrigues DP, Freitas D, Coradi R. 2011. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* in Chicken Carcasses at Retail in 15 Brazilian Cities. *Revista Panamericana de Salud Publica*. 30(6):555-560.
- Milan C, Agostinetti A, Conceição RCS, Gonzalez HL, Timm CD. 2015. Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 67(2):642-646.
- Miles AA, Misra SS. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*. 38(6):732-749.
- Mion L, Colla FL, Cisco IC, Webber B, Diedrich LN, Pilotto F, Rodrigues LB, Nascimento VP, Santos LR. 2014. Perfil de resistência a antimicrobianos por

- Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 a 2009. *Acta Scientiae Veterinariae*. 42:1197.
- Montville TJ, Mattheus KR, Kniel KE. 2012. **Food Microbiology: an Introduction**. 3.ed. Asm Press: Washington. 570 p.
- Olive DM, Bean P.1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal of Clinical Microbioloy*. 37(6):1661-1669.
- Oliveira, FA. 2005. **Caracterização por susceptibilidade a antimicrobianos, por PCR-Ribotipificação e RAPD de *Salmonella* Enteritidis envolvidas em surtos de Doenças Veiculadas por Alimentos ocorridas no Rio Grande do Sul, nos anos de 2001 e 2002**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Oliveira FA, Frazzon APG, Brandelli A, Tondo EC. 2007. Use of PCR-Ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella enteritidis* involved in food-borne outbreaks in southern Brazil. *Journal Infect Developing Countries*. 1(2):170-176.
- Oliveira FA, Geimba MP, Pasqualotto AP, Brandelli A, Pasquali G, Silva WP, Tondo EC. 2009. Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in southern Brazil. *Food Control*. 20:606-610.
- Oliveira FA, Pasqualotto AP, Silva WP, Tondo EC. 2012. Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from humans samples. *Food Research International*. 45:1000-1003.
- Oliveira MMM, Brugnera DF, Alves E, Piccoli RH. 2010. Biofilm formation by *Listeria monocitogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Braz J Microbiol*. 41:97-106.
- Otto SJG, Carson CA, Finley RL, Thomas MK, Reid-Smith RJ, McEwen SA. 2014. Estimating the Number of Human Cases of Ceftiofur-Resistant *Salmonella enteric* Serovar Heidelberg in Québec and Ontario, Canada. *Food Safety*. 59:1281-1290.
- Palmeira A, Santos LR, Borsoi A, Rodrigues LB, Calasans M, Nascimento VP. 2016. Serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. Isolated from turkey and broiler carcasses in southern Brazil between 2004 and 2006, *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 58(19):1-5.
- PHAC – Public Health Agency Of Canada. 2015a. **Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) 2013 Annual Report – Chapter 2. Antimicrobial Resistance**. Ghelph,2015.
Disponível em: <<http://goo.gl/dtqvTg>>. Acesso em: 22 set. 2015.
- PHAC – Public Health Agency of Canada. 2015b. **Public Health Notice – Outbreak of *Salmonella* Infections Related to Contact with Live Baby Poultry**, Ghelph,2015.
Disponível em: <<http://goo.gl/DV5JmF>>. Acesso em: 22 set. 2015.
- PHAC – Public Health Agency of Canada. 2013. **National Enteric Surveillance Program (NESP) 2013** in: Annual Report Executive Summary.
Disponível em: <<http://goo.gl/HjC4hc>>. Acesso em: mar. 2017.
- Pulido-Landínez M, Sanches-Inguza R, Nascimento VP. 2013. Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil. *Letters in Applied Microbiology*. 57:288-294.
- Ribeiro AR, Kellermann A, Santos LR, Nascimento VP. 2008. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis Isoladas de Amostras Clínicas e

- Ambientais de Frangos de Corte e Matrizes Pesadas. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 60(5):1259-1262.
- Rodrigues DP. 2017. Resistência a antimicrobianos em espécies entéricas proveniente de alimentos produzidos no Brasil. Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu. Paraná.
Disponível em:
<http://www.sigeventos.com.br/sbmicrobiologia/admin/pro_lista_programa.asp?eveld=15&arsld=96>. Acesso em out.2017.
- Rodrigues LB, Santos LR, Rizzo NN, Tagliari VZ, Oliveira AP, Trenhago G, Rodegheri SC, Taglieti RM, Dickel EL, Nascimento VP. 2009. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. Acta Scientiae Veterinariae. 37(3):225-230.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. 2011. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. Emerging Infectious Diseases. 17(1):7-15.
- Schmidt RH. 2009. Basic Elements of Equipment Cleaning and Sanitizing in Food Processing and Handling Operations. FS14, Food Science and Human Nutrition Department, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 14p.
- Tondo EC, Machado TRM, Malheiros PS, Padrão DK, Carvalho AL, Brandelli A. 2010. Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. Braz J Microbiol. 41(4):1027 - 1037.
- Wagner VR, Silveira JB, Tondo EC. 2013. Salmonellosis on the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil, 2002 to 2004. Braz J Microbiol. 44(3):723-729.
- Wang H, Ye K, Wei X, Cao J, Xu X, Zhou G. 2013. Occurrence, Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation of *Salmonella* Isolates from a Chicken Slaughter Plant in China. Food Control. 33:378-384.
- Welker CAD, Both JMC, Longaray SM, Haas S, Soeiro MLT, Ramos RC. 2010. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Biociências. 8(1):44-48.
- Hoffmann M, Zhao S, Pettengill J, Luo Y, Monday SR, Abbott J, Ayers SL, Cinar HN, Muruvanda T, Li C, Allard MW, Whichard J, Meng J, Brown EW, McDermontt PF. 2014. Comparative genomic analysis and virulence differences in closely related *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolates from humans, retail meats, and animals. Genome Biology and Evolution. 6(5):1046-1068.